

维吾尔异常黑胆质型哮喘患者 IL-4 基因多态性的变化特点

克丽别娜·吐尔逊¹ 地力木拉提·艾斯木吐拉² 米合热古力·司马义¹
迪丽努尔·乌甫尔¹ 哈木拉提·吾甫尔³

摘要 **目的** 探讨新疆维吾尔族异常黑胆质型哮喘与白细胞介素-4(IL-4)基因多态性间的关系。**方法** 对76例哮喘患者按维吾尔体液论进行辨证分型,其中异常黑胆质型哮喘组30例,非异常黑胆质型哮喘组46例,与健康对照组89名进行对照,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测各组IL-4基因启动子区-589(C/T)位点的多态性。**结果** 异常黑胆质型哮喘组IL-4基因启动子区-589(C/T)位点CT基因型分布频率明显高于非异常黑胆质型哮喘组和健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);非异常黑胆质型哮喘组CT基因型分布频率明显高于健康对照组($P < 0.05$);3组CC、TT基因型分布频率以及等位基因C、T的分布频率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 新疆维吾尔族异常黑胆质型哮喘可能与IL-4基因的启动子区-589(C/T)位点多态性有关。

关键词 维吾尔医学;异常黑胆质型;支气管哮喘;基因多态性;白细胞介素-4

The Relationship between Asthma Patients with Abnormal Savda in Uyghur Medicine and the Gene Polymorphism of IL-4 Kelbnur Tursun¹, Dilmurat Asmtula², Mihergul Smayil¹, Dilnur Upur¹, and Halmurat Upur³ 1 Department of Respiratory Disease, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi (830011), China; 2 Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi (830011), China; 3 Faculty of Traditional Uyghur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi (830011), China

ABSTRACT **Objective** To explore the relationship between the asthmatic Uyghur patients with abnormal Savda in Xinjiang and the gene polymorphism of interleukin-4 (IL-4). **Methods** Totally 76 asthmatic patients were syndrome typed according to the body fluid theory of Uyghur medicine. Among them, there were 30 asthmatic patients with abnormal Savda and 46 asthmatic patients without abnormal Savda. A comparison study was performed in 89 healthy individuals (as the healthy control group). The gene polymorphism of IL-4 promoter area-589 (C/T) site were detected by using PCR-RFLP. **Results** The distribution rate of genotype CT in asthmatic patients with abnormal Savda was significantly higher than that of the asthmatic patients with non-abnormal Savda and the healthy control group ($P < 0.01$). The distribution rate of genotype CT in asthmatic patients with non-abnormal Savda group was significantly higher than that of the healthy control group ($P < 0.05$). There was no difference in the distribution frequency of genotype CC or TT, or in the distribution frequency of allele C and T among the three groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Asthma in Uyghur patients with abnormal Savda in Xinjiang might be correlated to the gene polymorphism of IL-4 promoter area-589 (C/T).

KEYWORDS Uyghur medicine; abnormal Savda; bronchial asthma; gene polymorphism; interleukin-4

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(No. 2011CB512004);长江学者和创新团队发展计划资助项目(No. IRT0977)

作者单位:1.新疆医科大学第一附属医院呼吸一科(乌鲁木齐 830011);2.新疆医科大学第一附属医院普外科(乌鲁木齐 830011);3.新疆医科大学维吾尔医药系(乌鲁木齐 830011)

通讯作者:哈木拉提·吾甫尔, Tel:0991-4366176, E-mail:halmurat@263.net

DOI: 10.7661/CJIM.2013.08.1076

支气管哮喘(简称哮喘)是一种以气道高反应性为特征的气道慢性炎症性疾病,具有明显的遗传倾向,细胞因子对气道炎症的形成有着极为重要的影响。人类染色体 5q³¹⁻³³ 区域内含有多个与哮喘发病相关的候选基因^[1]。这些基因对 IgE 的调节以及在哮喘的炎症发生、发展过程中均起着非常重要的作用,包括细胞因子簇 IL-4、IL-9、IL-13、 β_2 肾上腺素能受体(β_2 -adrenergic receptor, β_2 -AR)等基因^[2]。IL-4 在哮喘发生的各个环节均起重要作用,它促进 Th0 分化为 Th2,从而产生大量的细胞因子,并抑制 Th0 转化为 Th1,且抑制 Th1 的功能,促进 B 细胞增殖和生长,增加 IgE 的产生和效应,从而可间接或直接诱导肥大细胞(MC)和嗜酸性粒细胞脱颗粒产生气道高反应性及炎症^[3]。

维吾尔医学认为体液是人类生命及生理活动过程的基本物质,包括血液质、黏液质、胆液质、黑胆质体液,是自然界四大物质在人体内的具体表现。人体健康与 4 种体液密切相关。体液超出在肝脏时的正常状态,数量和质量发生改变,成为对人体无益或有损的体液,称为异常体液,包括异常胆液质、异常血液质、异常黏液质和异常黑胆质,其中异常黑胆质体液引起的疾病最为复杂,顽固难治^[4]。笔者以新疆维吾尔族正常人和哮喘患者为研究对象,将哮喘患者按维吾尔医学辨证分型后,分为异常黑胆质型哮喘和非异常黑胆质型哮喘(包括异常血液质型哮喘、异常黏液质型哮喘、异常胆液质型哮喘),其中异常黑胆质型哮喘是哮喘中的重症,且较其他类型多见。应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)技术,对目前已知的可能涉及哮喘发病的 IL-4 基因多态性进行检测分析,旨在了解 IL-4 基因多态性与异常黑胆质型哮喘的关系,探索异常黑胆质型哮喘患者的遗传易感性。

资料与方法

1 诊断标准 支气管哮喘诊断分级标准参照中华医学会呼吸病学分会哮喘学组(2003 年)制订的“支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗及教育和管理方案)”^[5]。

2 维吾尔辨证分型标准 参照新疆维吾尔医药高等专科学校教材《维吾尔医诊断学》^[6]、《维吾尔医气质、体液论及其现代研究》^[7],对哮喘患者进行辨证分型,分为异常黑胆质型哮喘和非异常黑胆质型哮喘(包括异常血液质型哮喘、异常黏液质型哮喘、异常胆液质型哮

喘),具体分型标准如下。

2.1 异常黑胆质型 喉中哮鸣有声,胸膈满闷,喘咳无痰,或少痰呈泡沫样,口渴喜热饮,饮不解渴,但欲漱口不欲咽,面色萎白而发干,唇色淡白而枯燥,舌质淡扞之涩,舌形瘦,舌涎少,舌苔薄白而不润,大便干结而色淡不臭,小便清而短少。

2.2 异常黏液质型 喉中哮鸣有声,胸膈满闷,咳痰稀白,不易咯出,口不干,面色白泽或晦黄,唇色淡白,舌质淡,舌形胖,舌涎多,舌苔薄而润,或白腻,大便溏薄,色淡黄,气腥臭,小便清长。

2.3 异常胆液质型 烦扰气促,无痰或少痰,痰不易咯出,痰少而黏或带血丝如粉线,咽干鼻燥,面干唇色红或紫而燥,舌质深红,扞之糙,舌形瘦,舌涎少,舌苔色深黄而薄,大便干燥,色深黄气臭,小便短赤。

2.4 异常血液质型 喉中哮鸣如吼,气粗息涌,胸膈烦闷,呛咳阵作,痰黄黏稠,排吐不利,口干喜冷饮,面色淡黄,润而有光,唇色红紫而不枯燥,舌质红,舌液多,舌苔厚腻而黄,或罩深黑色于上,大便时溏时结深黄气臭,小便黄。

3 纳入及排除标准 纳入标准:符合西、维医支气管哮喘的诊断、分型标准,年龄 17~72 岁,急性发作期患者。排除标准:(1)经检查证实为结核、矽肺、真菌、肿瘤等因素所致的慢性咳嗽、喘息患者;(2)合并有心血管、肾、肝脏疾病,糖尿病或造血系统等严重原发性疾病及精神病患者。

4 一般资料 收集 2009 年 3 月—2011 年 5 月新疆和田地区第一人民医院 76 例哮喘患者,其中重度哮喘 27 例;中度哮喘 33 例;轻度哮喘 16 例。按维吾尔辨证分型分为异常黑胆质型哮喘组和非异常黑胆质型哮喘组。异常黑胆质型哮喘组 30 例,男性 14 例,女性 16 例;年龄 17~72 岁,平均年龄(38.48±9.45)岁;病程 3~24 年,平均病程(13.35±9.72)年。非异常黑胆质型哮喘组 46 例,男性 13 例,女性 33 例;年龄 17~72 岁,平均年龄(38.11±9.14)岁;病程 4~23 年,平均病程(13.42±9.13)年。两组患者性别、年龄、病程等比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。另任选 89 名健康成年人作为健康对照组,均来自新疆和田地区,经询问病史及各项检查证实为健康者。其中男性 41 名,女性 48 名,年龄 18~70 岁,平均(38.12±8.23)岁。健康对照组 1 个月内无急性上呼吸道感染,胸部 X 线检查未见异常,均无哮喘病史、哮喘病家族史及典型过敏史(包括湿疹、过敏性鼻炎、过敏性皮炎),本组亲属中未问及有哮喘病患者。3 组均为长期生活在和田地区(3 代或以上)未与其他民族通婚的维吾尔族人群,近期

未用糖皮质激素。

5 主要仪器 聚合酶链反应 (PCR) 扩增仪为 Gene Amp PCR System 9700 (美国 PE 公司); 紫外分光光度仪为 Macro Vue Vis-20 型 (荷兰安米德有限公司) 和 Gene Quant TM II 型 (美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司); 高速冷冻台式离心机为 OptimaxI-100 K 型 (美国 Beckman); 凝胶成像仪、旋转混匀器 Ratator、漩涡混合器、恒温箱 incubator 37 °C、医用低温 (-20 °C ~ -70 °C) 冰箱 (日本 Sanyo 公司); 水浴缸; 微波炉; 分析天平; H6 - 微型及各种型号的电泳仪; 微量加样器、各种规格枪头。

6 主要试剂 饱和酚、蛋白酶 K、100 bp DNA Ladder 等购自华美生物工程公司。饱和酚: 氯仿: 异戊醇 = 25: 24: 1, 华美生物工程公司产品。脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 和 Taq DNA 聚合酶, PCR 扩增缓冲液为宝生物工程大连有限公司产品。

7 PCR-RFLP 技术

7.1 标本采集 所有患者于住院次日清晨采血。使用真空 SST 管采集受检者肘静脉血 5 mL, 乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝; 离心机 3 500 r/min 离心后去上清, 将底物 (红细胞和白细胞) 用移液枪移至冻存管中, 迅速 (2 h 内) 放入 -70 °C 冰箱贮存待测。

7.2 样本基因组 DNA 提取 采用酚/氯仿抽提核酸法提取 DNA。

7.3 PCR 扩增

7.3.1 PCR 引物序列 引物序列参考文献 [8, 9] 设计, 由 TaKaRa 生物工程 (大连) 有限公司合成。IL-4 基因启动子区 -589 (C/T) 上游引物: 5'-TGGG-TAAGGACCTTATGGACC-3', 核苷酸序列位置 nucleotides- 683 to -663; 下游引物: 5'-GGTGGCATCTTGAAACTGT-3', 核苷酸序列位置 nucleotides-486 to -505。

7.3.2 PCR 扩增 在 0.2 mL 薄壁反应管中加入 10 倍稀释的 PCR 缓冲液 2 μL, DNTP 1.6 μL, 上游引物 0.2 μL, 下游引物 0.2 μL, TagDNA 聚合酶 0.1 μL, 模板 DNA 0.3 μL, MgCL₂ 1 μL, 去离子水 15.7 μL。10 000 r/min 离心 10 s 混匀, 将反应管置 PCR 扩增仪上, 94 °C 变性 5 min, 94 °C 延伸 1 min, 57 °C 1 min, 68 °C 1 min, 共 35 个循环, 最后 68 °C 延伸 7 min, 自动降至 4 °C 保存。

7.3.3 酶切分析 IL-4 基因做酶切分析, 取 15 μL 上述 PCR 反应产物加入限制性内切酶 BsmF1 2.0 μL、NBL 10 × NE Buffer NO. 4 2.5 μL、NBL 100 × BSA 0.3 μL; 加水至终体积 25 μL, 于 37 °C 水

浴中反应 2 h。

7.4 电泳分析 各取 6 μL 上述 PCR 扩增液与 1 μL 溴酚兰混匀后, 加入预先铺好的含溴化乙锭 (EB) 的 1.8% 琼脂糖凝胶 (Agarose get) 样品孔内, 100 V 电泳 80 min, 取下凝胶, 用瑞典法玛西亚公司 Image Master R VDS 在 300 nm 紫外灯下观察结果, 观察电泳条带, 确定受试者基因型。

7.5 确定基因型 IL-4 基因启动子区 -589 (C/T) 位点酶切分析结果有 3 种酶切位点: 在 198 bp 处存在 1 条电泳带为 T 纯合子 (TT), 在 120 bp 处存在 1 条电泳带为 C 纯合子 (CC), 在 198 bp 与 120 bp 处存在 2 条电泳带的为杂合子 (CT), 见图 1 ~ 3。

8 统计学方法 应用 SPSS 15.0 统计软件包。计量资料用 *t* 检验, 计数资料用 χ^2 检验, 先统计各组各位点基因型及等位基因频率分布, 确认其符合 Hardy-Weinberg 平衡。基因型采用直接计数法; 等位基因频率 = (该基因纯合子个体数 × 2 + 该基因杂合子数) / 总个体数 × 2。P < 0.05 为差异有统计学意义。

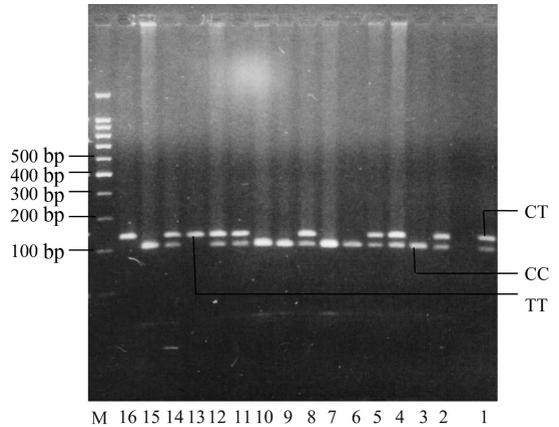


图 1 异常黑胆质型哮喘组 IL-4 基因启动子区 -589 (C/T) 位点基因多态性电泳结果

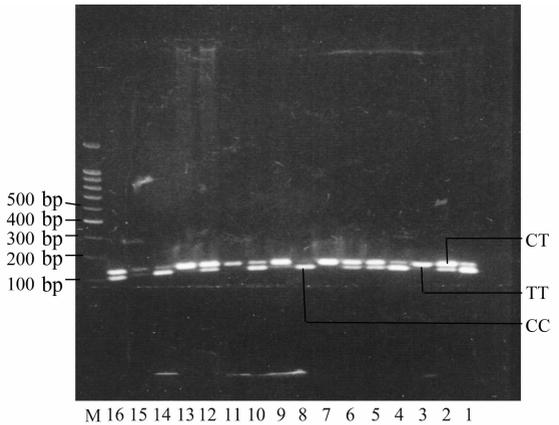


图 2 非异常黑胆质型哮喘组 IL-4 基因启动子区 -589 (C/T) 位点基因多态性电泳结果

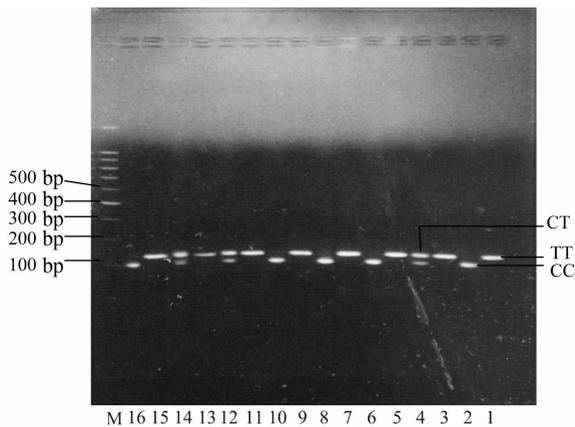


图3 健康对照组 IL-4 基因启动子区 -589 (C/T) 位点基因多态性电泳结果

结果

1 各组 IL-4 基因启动子区 -589 (C/T) 位点基因型频率分布比较 (表 1) 异常黑胆质型哮喘组 IL-4 基因启动子区 -589 (C/T) 位点 CT 基因型分布频率明显高于非异常黑胆质型哮喘组和健康对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。非异常黑胆质型哮喘组 CT 基因型分布频率明显高于健康对照组 ($P < 0.05$)。3 组 CC、TT 基因型频率分布比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组 IL-4 基因启动子区 -589 (C/T) 位点基因型频率分布比较 [例 (%)]

组别	例数	CC	CT	TT
异黑	30	5 (16)	17 (57) ** Δ	8 (27)
非异黑	46	15 (33)	19 (41) *	12 (26)
健康对照	89	35 (39)	28 (31)	26 (29)

注:“异黑”为异常黑胆质型哮喘组,“非异黑”为非异常黑胆质型哮喘组;表 2 同;与健康对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与非异常黑胆质型哮喘组比较, $\Delta P < 0.01$

2 各组 IL-4 基因启动子区 -589 (C/T) 位点等位基因频率分布比较 (表 2) 3 组 IL-4 基因启动子区 -589 (C/T) 位点等位基因 C、T 的频率分布比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组 IL-4 基因启动子区 -589 (C/T) 位点等位基因频率分布比较 [例 (%)]

组别	例数	染色体数	C	T
异黑	30	60	27 (45)	33 (55)
非异黑	46	92	49 (53)	43 (47)
健康对照	89	178	98 (55)	80 (45)

讨论

的顽固性难治性疾病。其中异常黑胆质型哮喘是因患者长期大量服用干寒属性的饮食、药物, 情绪低落、过度伤心、犹豫、悲伤、压抑沉思等情志失常, 长期过度从事脑力和体力劳动, 长期居住干寒环境和过度地受到干寒空气的影响, 严重环境污染等, 常引起体内液体异常, 日久未祛, 其在“热”的作用下“燃烧”导致异常黑胆质的产生。若异常黑胆质沉积在气道, 使原本气质属于干寒的气道其干寒特点进一步亢盛, 异常黑胆质向气道间隙渗透, 并刺激气道使气道痉挛引发哮喘疾病。黑胆质异常所引起的哮喘临床上常表现为重症哮喘^[10]。

现代医学认为, 哮喘是一种具有多基因遗传倾向的疾病。人类染色体 5q³¹⁻³³ 区域内含有多个与哮喘发病相关的候选基因, 主要候选基因有 β_2 -AR 和 IL-4 等。由激活的辅助性 T 淋巴细胞中 Th2 细胞亚群所分泌的 IL-4 是细胞因子的一种, 在哮喘发病中起重要作用。已有研究证明, 哮喘急性发作期患者的 IL-4 分泌明显高于缓解期患者和正常对照组^[11]。IL-4 可促进和诱导 B 细胞合成分泌 IgE, 是 IgE 合成中必不可少的细胞因子。而 IgE 是哮喘发病的重要抗体, 血循环中 IgE 水平与哮喘严重程度和气道高反应性相关。IgE 产生后黏附于支气管黏膜下肥大细胞或血循环中的嗜碱性细胞的细胞膜上, 使这些效应细胞致敏。当 IgE 与变应原结合, 能激活效应细胞, 产生细胞脱颗粒等生化效应, 释放各种生物活性介质如白三烯 (LT)、组胺 (H)、血小板活化因子 (PAF)、缓激肽 (BK)、前列腺素 (PG)、血栓素 A2 (TXA2) 等, 引起气道平滑肌收缩、黏膜水肿和黏液分泌增加, 导致气道狭窄和哮喘发作^[12,13]。

本研究结果显示, 非异常黑胆质型哮喘组 IL-4 基因启动子区 -589 (C/T) 位点 CT 基因型分布频率明显高于健康对照组 ($P < 0.05$), 异常黑胆质型哮喘组 CT 基因型分布频率明显高于非异常黑胆质型哮喘组和健康对照组 ($P < 0.01$)。推测 IL-4 基因启动子区 -589 (C/T) 位点具有 CT 杂合子基因型的个体与异常黑胆质型哮喘易感性相关, IL-4 基因启动子区 -589 (C/T) 位点多态性与异常黑胆质型哮喘有一定的相关性。3 组等位基因 C、T 的频率分布比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示异常黑胆质型哮喘的发病可能与其无关。

维吾尔医在临床实践中, 对异常体液性疾病的治疗经常采用维吾尔医独具特色的成熟和清除疗法。经辨证分型属异常黑胆质证者, 首先使用异常黑胆质成熟剂 (Munziq, 由破布木果、红枣、牛舌草、

维吾尔医学认为, 哮喘是多种因素复合作用所致

蜜蜂花、甘草根、薰衣草、铁线蕨、小茴香、地锦草、刺糖等单味药组成的复方制剂^[14]对异常黑胆质体液进行调理(对失调的异常黑胆质体液的质量或数量进行调整)和堆积(将所调理的异常黑胆质体液聚集在肠黏膜、血液及组织间隙等处,便于排出),然后使用异常黑胆质清除剂(Musil,以清泻山豆、刺糖、菟丝草、西青果、番泻叶等 21 味药材按比例配制,按每味药材的不同特性及工艺要求,陆续加入,进行煎煮、浸泡、静置、再煎煮、过滤、稀释,然后制成成药)^[14]使已成熟好的异常黑胆质体液排出体外,从而使气质复原,体液平衡,为治疗奠定基础,最后针对具体的病因进行相应治疗。在维医哮喘分型中,非异常黑胆质型哮喘可能是异常黑胆质型哮喘的前一阶段,若治疗不当则可能向异常黑胆质型哮喘转化,异常黑胆质型哮喘可能是其他类型哮喘的最终结果。为防止哮喘向重度发展,建议提前使用异常黑胆质成熟剂和清除剂。

参 考 文 献

- [1] Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(3): 169-182.
- [2] 王洪霞,刘春涛. 支气管哮喘相关基因 CH13L1 的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2012, 32(5): 375-378.
- [3] 刘亚君,陈良安,代华平,等. 中华医学会第六次全国呼吸系病学术会议纪要[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(1): 8-11.
- [4] 斯依提·穆哈穆德·候赛音. 麦合孜尼艾地维亚(草药宝库)(波斯文)[M]. 印度:吉维力可西瓦出版社,1988:

251-292.

- [5] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗及教育和管理方案)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(3): 132-136.
- [6] 巴克·阿里木阿吉. 维吾尔医诊断学[M]. 乌鲁木齐:新疆人民卫生出版社, 2012:111-120.
- [7] 哈木拉提·吾甫尔. 维吾尔医气质、体液论及其现代研究[M]. 乌鲁木齐:新疆科学技术出版社, 2003:40-47.
- [8] McGraw DW, Liggett SB. Coding block and 5 leader cistron polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor[J]. Clin Exp Allergy, 1999, Suppl 4: 43-45.
- [9] Steinke JW, Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists[J]. Respir Res, 2001, 2(2): 66-70.
- [10] 居来提·托乎提,阿布都克热木江·吐尔逊托乎提. 维吾尔医学对哮喘病因的认识[J]. 中国民族医学杂志, 2000, 10(4): 3-4.
- [11] 黄永富,余世庆,杭杲,等. 哮喘患者血清中 IL-4, IL-12, IL-13, IFN- γ , IgE 水平的测定及其临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(5): 120-123.
- [12] 张景波,杨建华,倪玉美,等. 支气管哮喘患者血清嗜酸细胞阳离子蛋白的变化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16(1): 372.
- [13] 邓念强,王琦筠,万德胜,等. 无症状气道高反应性与血清特异性 IgE 及血清嗜酸细胞阳离子蛋白的相关性研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(6): 213.
- [14] 阿不力克木·努尔买买提阿吉. 维吾尔医方剂学[M]. 乌鲁木齐:新疆人民卫生出版社, 2008:71-73.

(收稿:2012-05-11 修回:2013-04-17)

《中国中西医结合杂志》获 2012 年度中国国际影响力优秀学术期刊

2012 年 12 月 26 日,《中国学术期刊国际引证报告(2012 版)》(简称《CAJ-IJCR》)对外公布,同时 2012 年度“中国最具国际影响力学术期刊”和“中国国际影响力优秀学术期刊”名单也新鲜出炉。《中国中西医结合杂志》获得“中国国际影响力优秀学术期刊”。

该项成果由中国学术期刊电子杂志社、中国科学文献计量评价研究中心与清华大学图书馆共同发布。报告统计对象为我国正式出版的学术期刊,利用 Web of Science 的数据,旨在建立健全适合反映我国学术期刊国际影响的文献调查和科学分析体系。