

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.24.022

哮喘患儿 NR3C1 及 GLCC1 基因多态性的临床预测价值*

杨艳¹, 卢慧娜², 陈霞^{1△}, 冯静¹, 贺颖¹, 张琼琼¹, 王舰辉¹

(1. 中国人民解放军陆军第九五八医院儿科, 重庆 400020; 2. 重庆市中医院儿科, 重庆 400021)

摘要:目的 研究哮喘患儿皮质激素诱导转录物 1 (GLCC1)rs37973 和糖皮质激素受体基因 (NR3C1)rs41423247 两个单核苷酸多态性位点 (SNPs) 与吸入性糖皮质激素 (ICS) 疗效的相关性, 指导 ICS 的正确使用。方法 选取陆军第九五八医院和重庆市中医院儿科 2020 年 12 月至 2022 年 1 月收治的哮喘患儿 40 例作为观察组, 另选取两家医院同期无哮喘患儿 43 例作为对照组, 应用多重聚合酶链式反应高通量测序验证检测。观察组患儿单次雾化吸入布地奈德混悬液 0.5~1 mg 4 h 后, 检测第 1 秒用力呼气容积 (FEV₁); 然后予丙酸氟替卡松吸入气雾剂经口吸入, 每次 50~125 μg, 每日 2 次, 持续治疗 3 个月后, 检测肺功能。对照组在相同时间点检测 FEV₁。结果 两组患儿 rs37973 及 rs41423247 位点不同基因型患儿数相当, 提示两位点与儿童哮喘易感性无明显相关性; 布地奈德治疗 4 h 后, rs41423247 位点 G/C + C/G 基因型 FEV₁ 明显改善 (改善幅度 ≥ 15%) 比例显著低于 G/G 型和 C/C 型, 而 rs37973 位点 G/G 基因型显著低于 G/A + A/G 及 A/A 基因型 (P < 0.05); 氟替卡松治疗 3 个月后, 除基因型 C/C 外, rs41423247 及 rs37973 位点各等位基因 FEV₁ 占预计值百分比及最大呼气中期流量 (MMEF_{75/25}) 占预计值百分比均显著升高 (P < 0.05), 且 rs41423247 位点 G/G 及 G/C + C/G 基因型 FEV₁ / 用力肺活量 (FVC) 变化率及 75%FVC 水平呼气流量变化率显著高于 C/C 型 (P < 0.05)。结论 ICS 用于治疗哮喘患儿时, 可根据 rs41423247 位点基因型的不同, 并依据不同治疗目的合理选择药物。

关键词:哮喘; 儿童; 基因多态性; 吸入性糖皮质激素; 临床疗效

中图分类号: R969; R725; R562.2*5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2022)24-0092-05

Clinical Predictive Value of NR3C1 and GLCC1 Gene Polymorphisms in Children with Asthma

YANG Yan¹, LU Huina², CHEN Xia¹, FENG Jing¹, HE Ying¹, ZHANG Qiongqiong¹, WANG Jianhui¹

(1. Department of Pediatrics, 958 Army Hospital of the PLA, Chongqing, China 400020; 2. Department of Pediatrics, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing, China 400021)

Abstract: Objective To study the correlation between the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of corticosteroid inducible transcript 1 (GLCC1) rs37973 and corticosteroid receptor gene (NR3C1) rs41423247 in children with asthma and the efficacy of inhaled corticosteroid (ICS), and to guide the correct use of ICS. **Methods** From December 2020 to January 2022, 40 children with asthma admitted to the Department of Pediatrics of the 958 Army Hospital of the PLA and the Chongqing Hospital of

* 基金项目: 国家自然科学基金 [81904255]; 重庆市技术创新与应用发展专项 [cstc2019jsex - msxm0282]; 重庆市科卫联合医学科研项目 [2022MSXM029]。

第一作者: 杨艳, 女, 大学本科, 研究方向为儿童慢性呼吸道疾病的诊治, (电话) 023-68762073。

△通信作者: 陈霞, 女, 博士研究生, 主任医师, 研究方向为儿童疑难难治性呼吸道疾病的发病机制及其中药治疗, (电子信箱) 06chenxia@163.com。

[6] 李广华, 赵越, 赵静, 等. rt-PA 静脉溶栓治疗小卒中疗效与安全性分析[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2020, 20(10): 903-907.

[7] MENDELSON SJ, PRABHAKARAN S. Diagnosis and Management of Transient Ischemic Attack and Acute Ischemic Stroke: A Review [J]. JAMA, 2021, 325(11): 1088-1098.

[8] XIONG Y, BATH PM. Antiplatelet Therapy for Transient Ischemic Attack and Minor Stroke [J]. Stroke, 2020, 51(11): 3472-3474.

[9] 王聪杰, 李虹, 郑丽, 等. 轻型缺血性卒中静脉溶栓后双重抗血小板疗效观察[J]. 中国卒中杂志, 2021, 16(10): 1044-1049.

[10] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018 [J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9): 666-682.

[11] 刘晓微, 张家堂. 老年小卒中静脉溶栓临床分析[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2021, 23(10): 1055-1058.

[12] 肖欢, 朱莲, 冯晓荣. 胞磷胆碱联合奥拉西坦治疗高血压脑出血临床效果及对炎症因子、氧化应激、NIHSS 评分的影响[J]. 解放军医药杂志, 2021, 33(12): 88-91.

[13] 曹木东, 高宏美, 张金凤, 等. 奥拉西坦联合脑蛋白水解物治疗脑卒中颈动脉粥样斑块临床评价[J]. 中国药业, 2020, 29(24): 73-75.

[14] 杜红旗. 阿替普酶静脉溶栓治疗对急性脑梗死患者血清中 Vaspin 和血液流变学及认知功能的影响[J]. 山西医药杂志, 2021, 50(7): 1147-1149.

[15] 徐玉婷, 李若照, 陈刚. 小柴胡汤加减对脑卒中后眩晕血液流变学指标的影响[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(1): 233-236.

[16] 赵风华, 李万春, 阮世旺, 等. NLRP3 炎症小体的活化水平与急性缺血性脑卒中患者认知功能改变的关系[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2021, 30(6): 515-521.

(收稿日期: 2022-05-23; 修回日期: 2022-08-11)

Traditional Chinese Medicine were selected as the observation group, and 43 children without asthma in the two hospitals were selected as the control group. Multiple polymerase chain reaction - next generation sequencing (PCR - NGS) was used to verify the detection. The forced expiratory volume in one second (FEV_1) was detected in the children in the observation group after a single inhalation of 0.5 - 1 mg of budesonide suspension for 4 h, and then the children inhaled Fluticasone Propionate Inhaled Aerosol through mouth, 50 - 125 μg each time, twice a day. After three months of continuous treatment, the pulmonary function was tested. FEV_1 was detected at the same time point in the children in the control group. **Results** The number of children with different genotypes at rs37973 and rs41423247 in the two groups was similar, which indicated that there was no significant correlation between the two loci and the susceptibility to asthma in children. After 4 h of budesonide treatment, the FEV_1 of the children with G/C + C/G genotype at rs41423247 improved significantly (improvement range $\geq 15\%$), which was significantly lower than that of children with G/G and C/C genotypes, while that of children with G/G genotype at rs37973 was significantly lower than that of children with G/A + A/G and A/A genotypes ($P < 0.05$). After three months of fluticasone treatment, except for the children with C/C genotype, the percentage of FEV_1 ($FEV_1\%$) and the percentage of maximum mid-expiratory flow ($MMEF_{75/25}\%$) of children with each allelic gene at rs41423247 and rs37973 increased significantly ($P < 0.05$), and the change rate of FEV_1 /forced vital capacity (FVC) of children with G/G and G/C + C/G genotypes at rs41423247 and the change rate of 75% FVC expiratory flow (FEF_{75}) were significantly higher than that of children with C/C genotype ($P < 0.05$). **Conclusion** When ICS is used to treat children with asthma, drugs can be reasonably selected according to the different rs41423247 genotypes and different therapeutic purposes.

Key words: asthma; children; gene polymorphism; inhaled corticosteroids; clinical efficacy

当前,儿童哮喘的发病率逐年上升,虽然许多药物[如吸入性糖皮质激素(ICS)]临床被批准用于治疗哮喘,但仍缺乏针对性。哮喘患者对ICS的反应存在个体差异,因为ICS应答约70%的变异由目标基因的遗传特征决定。近年来全基因组关联研究中发现的基因(如 *GLCCI1*、*FBXL7*、*T*、*ALLC*、*CMTR1*)可能在哮喘诊断/治疗反应通路中发挥直接或间接作用。有研究提示,皮质激素诱导转录物1(*GLCCI1*)通过 IL - 13 / periostin / TGF - β_1 信号通路调节哮喘气道重塑^[1],糖皮质激素受体基因(*NR3C1*)的遗传变异与哮喘患者对ICS的反应密切相关^[2]。为此,本研究中以重庆市两家医院儿科收治的哮喘患儿为研究对象,分析了 *NR3C1* 及 *GLCCI1* 基因多态性与ICS对患儿疗效的相关性,为临床医师制订个体化治疗方案提供参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入标准:符合2016年中华医学会儿科学分会呼吸学组《儿童支气管哮喘诊断与防治指南》中诊断标准;临床资料完整。本研究经医院医学伦理委员会批准,患儿家属签署知情同意书。

排除标准:近1周内呼吸道感染病史;自身免疫疾病、遗传代谢性疾病;合并慢性肾功能衰竭等慢性疾病;精神发育迟滞,无法配合本研究。

病例选择与分组:选取陆军第九五八医院和重庆市中医院儿科2020年12月至2022年1月收治的哮喘患儿40例,作为观察组;另选择此两家医院同期未诊断哮喘患儿43例,作为对照组。

1.2 方法

观察组患儿单次雾化吸入布地奈德混悬液(四川普锐

特药业有限公司,国药准字H20213286,规格为每支2 mL: 1 mg)0.5 ~ 1 mg 4 h后,检测第1秒用力呼气容积(FEV_1);然后予丙酸氟替卡松吸入气雾剂(Glaxo Wellcome S. A., 进口药品注册证号H20130189,规格为每揆50 μg 或125 μg)经口吸入,每次1揆,每日2次,持续治疗3个月后,检测肺功能。对照组在相同时间点检测 FEV_1 。

1.3 多重聚合酶链式反应(PCR)高通量测序(NGS)验证检测

于治疗前抽取患儿外周静脉血2 mL,抗凝、离心、分离后提取基因组DNA,置-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。*GLCCI1* 基因 rs37973 位点上游引物:5' - 'TCCCTACACGAC-GCTCTTCCGATCTACCACGAGCAGACCAATTTGA - 3', 下游引物:5' - AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTA-AATTTACCCACAGTAAAG - 3'; *NR3C1* 基因 rs42423247 位点上游引物:5' - 'TCCCTACACGAC-GCTCTTCCGATCTACTTGCAGGAACATTTGAACG - 3', 下游引物:5' - AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-CAGTGAACAGTGTACCAGAC - 3'。

PCR反应体系为20 μL ,内含 Ready Reaction Premix 1 μL , BigDye sequencing Buffer 3.5 μL ,引物终浓度为0.1 $\mu\text{mol/L}$,PCR产物20 ng,超纯水定容至20 μL 。反应条件为:96 $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min,96 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 4 min,循环25次。PCR产物经纯化后,用基因测序仪测序。

1.4 观察指标

观察患儿的临床指标;基因型、等位基因的分布;不同基因型患儿治疗前后肺功能的改变情况。

1.5 统计学处理

采用SPSS 14.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 *t* 检验;计数资料以率(%)表示,行 χ^2 检验。 $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

2 结果

两组患儿临床指标见表1;不同位点基因型分布无显著差异($P > 0.05$),见表2;吸入ICS 3个月后各基因型的肺功能比较见表3(MMEF_{75/25}为最大呼气中期流量,FVC为用力肺活量,FEF₇₅为75%FVC水平的呼气流量)。观察组吸入ICS 4 h后FEV₁明显改善(改善率 > 15%)患儿基因型分布见表4。

表1 两组患儿临床指标比较

指标	观察组(n=40)	对照组(n=43)	P
性别(男/女,例)	24/16	28/15	>0.05
年龄($\bar{X} \pm s$,岁)	5.84 ± 0.41	4.97 ± 0.42	>0.05
FEV ₁ /预计值($\bar{X} \pm s$,%)	85.99 ± 0.21	86.44 ± 0.26	>0.05
嗜酸性粒细胞比例($\bar{X} \pm s$,%)	7.18 ± 0.31	3.34 ± 0.28	<0.05
过敏原阳性(例)	35	5	<0.05
家族过敏史(例)	25	6	<0.05
家族哮喘史(例)	13	0	<0.05

3 讨论

ICS是控制和管理哮喘的一线药物,可提高哮喘患儿的FEV₁,增加无症状天数,降低住院率及加重次数。

表3 观察组各基因型患儿肺功能比较($\bar{X} \pm s$)

位点	基因型	FEV ₁ /预计值%		MMEF _{75/25} /预计值%		FEV ₁ /FVC 变化(%)	FEF ₇₅ 变化(%)
		治疗前	治疗3个月后	治疗前	治疗3个月后		
rs41423247	G/G	68.77 ± 4.53	93.11 ± 3.25*	74.38 ± 3.40	96.72 ± 3.90*	15.11 ± 4.96 ^{##}	19.18 ± 6.39 ^{##}
	G/C + C/G	66.98 ± 5.09	93.11 ± 3.15*	74.12 ± 4.22	95.74 ± 3.65*	16.74 ± 5.46 [#]	16.98 ± 6.15 [#]
	C/C	76.33 ± 3.65	80.94 ± 3.46	75.84 ± 1.77	78.21 ± 1.67	1.51 ± 1.20	1.84 ± 1.34
rs37973	G/G	64.42 ± 3.94	91.47 ± 2.47*	72.26 ± 3.95	94.06 ± 3.49*	17.92 ± 16.92	11.98 ± 5.26
	G/A + A/G	68.91 ± 4.53	93.44 ± 3.90*	74.78 ± 3.90	96.66 ± 5.00*	15.19 ± 4.78	19.66 ± 5.78
	A/A	70.76 ± 9.97	93.44 ± 6.30*	73.77 ± 2.32	94.14 ± 7.99*	11.17 ± 5.66	17.29 ± 9.11

注:与同位点同基因型治疗前比较,* $P < 0.01$;与同位点C/C基因型比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the same locus genotype before treatment, * $P < 0.01$; Compared with C/C genotype at the same locus, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

表4 观察组吸入ICS 4 h后FEV₁明显改善患儿的基因型分布

Tab. 4 Distribution of genotypes in children with significantly improved FEV₁ at 4 h after ICS inhalation in the observation group

位点	基因型	FEV ₁ 明显改善[例(%)]	位点	基因型	FEV ₁ 明显改善[例(%)]
rs41423247	G/G	19(95.00)	rs37973	G/A + A/G	19(79.17)
	G/C + C/G	9(52.94) [△]		G/G	2(33.33) [△]
	C/C	3(100.00)		A/A	10(100.00)

注:与本组同位点其余基因型比较,[△] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with other genotypes at the same locus, [△] $P < 0.05$.

表2 两组患儿不同位点基因型分布

Tab. 2 Distribution of different loci genotypes in the two groups

位点	观察组(n=40)			对照组(n=43)		
	基因型	例数	构成比(%)	基因型	例数	构成比(%)
rs41423247	G/G	20	50.00	G/G	25	58.13
	G/C + C/G	17	42.50	G/C + C/G	16	37.21
	C/C	3	7.50	C/C	2	4.66
rs37973	G/A + A/G	24	60.00	G/A + A/G	21	48.83
	G/G	6	15.00	G/G	10	23.25
	A/A	10	25.00	A/A	12	27.92

但临床发现哮喘患者对ICS反应具有高度个体可重复性和个体差异性,且患者对ICS抵抗或不敏感是影响哮喘疗效的关键因素。哮喘患儿对ICS治疗反应的差异性不仅与气道炎症的类型有关,更基于药物基因组学的个体化差异,然而对哮喘药物遗传变异的分析仍存在较多难题。多种因素(如环境作用)和复杂的遗传背景(包括易感表型异质性)等使哮喘药物基因组学研究复杂化。不同地区、不同种族等的单核苷酸多态性位点(SNP)各基因型对药物的敏感性均不同,这导致研究报道结果不一致,药物基因组学研究也将成为个体化精准用药的重要参考依据^[3]。本研究立足于重庆市两家医院收治的哮喘患儿,探讨与ICS作用机制密切相关的

GLCCII和NR3C1基因多态性对哮喘易感性及ICS疗效的预测作用。

国内外学者对多个影响哮喘患儿ICS反应SNPs的研究,已证实GLCCII是主要候选基因。GLCCII编码一种功能未知的蛋白,可表达糖皮质激素诱导蛋白水平并可能成为激素导致细胞凋亡的早期标记物。目前认为,GLCCII基因位于第7号染色体短臂2区1带,内有8个外显子。既往对于rs37973位点的研究,初步确定G等位基因与治疗反应较差有关^[4-5]。rs37973位点编码一种功能未知的蛋白质,导致哮喘患者对ICS治疗的

反应降低。该SNP与rs37973 SNP在同一基因上存在完全连锁不平衡,从而影响 *GLCCII* 基因的表达^[1]。然而,另一项研究并未证实 *GLCCII* 基因 rs37973 位点能预测对ICS治疗的反应^[6]。TANTISIRA等^[7]的研究表明,非西班牙裔白种rs37973纯合子GG基因型哮喘患者应用糖皮质激素治疗后FEV₁的改善率仅为野生型的1/3^[7],而RIJAVEC等^[8]对208例成年哮喘患者研究发现,经过3个月ICS治疗后,GG基因型患者FEV₁占预计值百分比明显高于AA+AG基因型患者,且这种基因依赖型的不同主要存在于非吸烟和过敏患者。因此认为,吸烟及过敏影响药物基因检测结果,而GG基因型患者可获得更好的ICS疗效。另外发现,*GLCCII* 基因变异可加速ICS治疗后肺功能改善,同样情况也发现在汉族人群^[9-10]。HOSKING等^[5]证实,*GLCCII* 基因 rs37973 位点不能作为白种哮喘患者ICS疗效预测的指标。郝珉等^[11]研究发现,*GLCCII* 基因另一个SNP rs37972 位点TT型患儿经12周的ICS治疗,FEV₁和FEV₁/FCV较治疗前无明显改善,说明该位点该基因型对ICS的疗效差。本研究中发现,两组*GLCCII* 基因 rs37973 位点3种基因型(GG,GA,AA)患儿发病率无明显差异。观察组经ICS治疗4h后G/G基因型疗效较G/A+A/G及A/A基因型差,而3个月后该组3种基因型比较无明显差异。提示*GLCCII* 基因 rs37973 位点可能与儿童哮喘无明显相关性,且ICS长期治疗反应与该位点基因型(GG,GA,AA)相关性不明显。

糖皮质激素受体(GR)编码的基因 *NR3C1*,位于5q31-32,包含8个内含子和9个外显子,编码800个氨基酸。GR是调节下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)的关键作用点,而HPA轴亢进与*NR3C1*表达下调有关。*NR3C1*位于染色体,包含一簇细胞因子和其他免疫相关基因,包括白细胞介素(IL)-4、IL-5、IL-9、IL-13、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、CD14、白三烯C4合酶(LTC4S)等。有研究表明,rs41423247为哮喘等炎症疾病的易感位点。KESKIN等^[12]证实,携带rs41423247纯合子G等位基因中重度哮喘患儿吸入高剂量ICS后FEV₁可显著改善。另有研究表明,rs41423247位点C等位基因与保护HPA有关,CC基因型与促肾上腺皮质激素最高反应相关^[2,13]。本研究中发现,rs41423247位点与哮喘易感性无明显相关,但观察组rs41423247 SNP G/C+C/G基因型患儿吸入ICS 4h后FEV₁改善≥15%比例较G/G及C/C基因型患儿明显降低。吸入ICS 3个月后rs41423247位点G/G及G/C+C/G基因型FEV₁占预计值百分比、MMEF_{75/25}占预计值百分比比较治疗前明显改善,而等位基因C/C患儿吸入ICS 3个月后肺功能改善不显著。rs41423247

SNP G/G及G/C+C/G基因型患儿FEV₁/FVC变化率、FEF₇₅变化率与C/C基因型比较有显著差异($P < 0.05$)。提示rs41423247 SNP G/C+C/G基因型吸入ICS短期疗效较差,而C/C基因型对ICS长期治疗不敏感。本研究中还测定了对照组各基因型吸入ICS 4h后肺功能变化情况,因FEV₁改善≥15%病例数较少而未进一步统计。

综上所述,*GLCCII* 基因 rs37973 位点并非儿童哮喘易感因素,SNP G/G基因型患儿吸入ICS 4h后FEV₁改善≥15%比例较G/A+A/G、A/A基因型明显下降,而长期ICS治疗反应与基因型无明显相关性。*NR3C1* 基因 rs41423247 位点与哮喘易感性无明显相关性,但G/C+C/G基因型患儿吸入ICS 4h后FEV₁改善≥15%比例较G/G及C/C基因型明显降低,而C/C基因型吸入ICS 3个月后FEV₁/FVC变化率、FEF₇₅变化率较G/G及G/C+C/G基因型显著降低。但本研究样本量较小,以后研究中将扩大样本量,且ICS的长短期疗效差异是否与基因型或环境因素(如抽烟、大气污染等)相关,也需进一步论证。

参考文献

- [1] SALHI M, LAHMAR O, SALAH MO, et al. *GLCCII* and *STIP1* variants are associated with asthma susceptibility and inhaled corticosteroid response in a Tunisian population [J]. *J Asthma*, 2021, 58(2): 197-206.
- [2] AKURUGU WA, VAN HEERDEN CJ, MULDER N, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis suppression in asthma: A glucocorticoid receptor polymorphism may protect [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2021, 32(2): 273-279.
- [3] 王姝姝, 曲衍衍, 朱浩浩, 等. 人类白细胞抗原基因多态性与服用氟氨平患者白细胞计数相关性研究 [J]. *中国药业*, 2021, 30(16): 68-70.
- [4] MCGEACHIE MJ, WU AC, CHANG HH, et al. Predicting inhaled corticosteroid response in asthma with two associated SNPs [J]. *Pharmacogenomics J*, 2013, 3(4): 306-311.
- [5] HOSKING L, BLEECKER E, GHOSH S, et al. *GLCCII* rs37973 does not influence treatment response to inhaled corticosteroids in white subjects with asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 133(2): 587-589.
- [6] AL-MUHSEN S, VAZQUEZ-TELLO A, JAMHAWI A, et al. Rs37972 and rs37973 single-nucleotide polymorphisms in the glucocorticoid-inducible 1 gene are not associated with asthma risk in a Saudi Arabian population [J]. *J Asthma*, 2015, 52(2): 115-122.
- [7] TANTISIRA KG, LASKY-SU J, HARADA M, et al. Genome-wide association between *GLCCII* and response to glucocorticoid therapy in asthma [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(13): 1173-1183.
- [8] RIJAVEC M, ŽAVBIM, LOPERT A, et al. *GLCCII* Polymor-