DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.049
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

文章编号:1000-5404(2001)01-0105-03

论著

重庆地区汉族儿童β_2-肾上腺素能受体单倍型与哮喘相关性的研究

廖 伟[1],李为明[1],赵聪敏[1],光丽霞[1],王金生[2],奚 敏[1],艾友萍[1],温恩懿[1] (第三军医大学附属新桥医院:[1]儿科;[2]呼吸内科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨β_2肾上腺素能受体(β_2-AR)单倍型与重庆汉族哮喘儿童哮喘的相关性。方法 采用PCR-限制性酶切分析法检测76例汉族哮喘儿童β_2-AR16、27位多态性,并与100例健康人进行对照,统计分析β_2-AR单倍型与哮喘病情严重度的关系。结果 对照组β_2-AR甘氨酸(Gly)16及谷氨酰胺(Gln)27等位基因频率分别为0.42、0.70,哮喘组为0.50、0.72,后者与对照组比较,无显著差异($P>0.05$)。Gly16等位基因及Gly16/Gln27单倍型在重度哮喘组中频率分别为0.71、0.47,在3组中的分布差异显著($P<0.01$, $P<0.05$),以重度哮喘组分布频率较高。结论 Gly16及Gln27型β_2-AR多态性不是中国重庆汉族儿童哮喘发病的主要因素,但Gly16等位基因与Gly16/Gln27单倍型可能与哮喘病情严重程度相关联。

关键词:哮喘;儿童;β_2肾上腺素能受体;单倍型
中图法分类号:R394.5;R725.6 文献标识码:A

Correlation between β_2-adrenergic receptors haplotypes and asthma in the children of Han nationality in Chongqing

LIAO Wei, LI Wei-ming, ZHAO Cong-min, GUANG Li-xia, WANG Jin-sheng, XI Min, AI You-ping, WEN En-yi (Department of pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 40037, China)

Abstract: Objective To study the correlation between β_2-adrenergic receptors (β_2-AR) haplotypes and asthma in the children of the Han nationality in Chongqing. Methods A total of 76 unrelated asthmatic children and 100 healthy individuals (50 children and 50 adults) were subjected from the Han nationality of Chongqing. The polymorphisms of locus 16 and 27 of the β_2-AR from all subjects were studied with PCR restriction fragment analysis. Statistical analysis was carried out on the correlation among glycine (Gly) 16 allele, Gly16/glutamine (Gln) 27 haplotype and the degree of severity of the clinical status of asthma. Results The distribution frequency of Gly 16 and Gln 27 allele accounted for 0.42 and 0.70 in the control group, 0.50 and 0.72 in asthmatic group respectively. There were no significant increase of the frequency of Gly16 and Gln27 allele in the asthmatic group compared with control group. The distribution frequency of Gly16 allele and Gly16/Gln27 haplotype in severe asthmatic group accounted for 0.71 and 0.47 respectively. Significant increase was found in the frequency of Gly16 allele and Gly16/Gln27 haplotype in the severe asthmatic group than the mild and moderate asthmatic groups ($P<0.01$, $P<0.05$ respectively). Conclusion Asthma is not primarily caused by the polymorphisms of Gly and Gln alleles of β_2-AR, but Gly16 allele and Gly16/Gln27 haplotype are possibly correlated with asthmatic severity in the children of the Han nationality in Chongqing.

Key words: asthma; children; β_2-adrenergic receptor; haplotype

研究发现,β_2肾上腺素能受体(β_2-adrenergic receptor,β_2-AR)基因核苷酸48、79位的点突变,可引起编码的氨基酸改变,即精氨酸(Arg)16→甘氨酸(Gly),谷氨酰胺(Gln)27→谷氨酸(Glu)[1],并在体外证实细胞表达Gly16/Gln27比表达Arg16/Glu27单倍型的β_2-AR具有更明显的脱敏和减量调节作用[2,3],同时在白种人群中研究发现Gln27等位基因与Gly16/Gln27单倍型与哮喘病情严重度相关[4]。为此,我们拟用限制性核酸内切酶分析法(PCR)检测重庆汉族儿童β_2-AR 16、27位多态性,研究β_2-AR单倍型与哮喘的关系,从分子水平探索β_2-AR在重庆汉族儿童哮喘发病中的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象

在重庆地区选择彼此无关(非家系)的哮喘患儿76例为哮喘组,男女之比为46∶30,年龄1.25~11.7(6.8±4.3)岁,均符合全国儿科哮喘组制定的诊断标准[5];同时选择健康儿童50例,男女之比为32∶18,年龄0.5~12.5(6.5±5.1)岁,健康成人50例,年龄26~35(31±4.7)岁,男女之比为27∶23,为对照组。所有对象均为汉族。

作者简介:廖 伟(1971-),男,四川省平昌县人,硕士,医师,主要从事哮喘发病遗传机制方面的研究。电话:(023)68755000-74602
收稿日期:2000-05-05;修回日期:2000-06-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 主要试剂

蛋白酶K、Taq DNA 聚合酶及4种dNTP 购自加拿大Sangon公司，10bp DNA Ladder标准购自美国Promega公司、DNA 小分子量标准购自上海复华公司、限制性核酸内切酶NcoⅠ、BbvⅠ购自美国New England公司，引物由上海生工公司合成。

1.3 方法

1.3.1 哮喘组临床分度 按照中华医学会呼吸病学分会1997年制定《支气管哮喘防治指南诊断标准》对76例患儿进行临床分度[6]。

1.3.2 DNA提取 抽取外周静脉血2 ml，酸性柠檬酸葡萄糖液(ACD)抗凝，淋巴细胞分离液分离淋巴细胞，蛋白酶K消化，氯仿、异戊醇法抽提DNA，无水乙醇沉淀后，TE溶解。

1.3.3 引物设计及PCR扩增 在引物中导入限制性内切酶位点来检测β_2-AR16位多态性，设计如下：上游引物：5' GCC TTC TTG CTG GCA CCC CAT 3'，下游引物：5' CAG ACG CTC GAA CTT GGC CAT G 3'，扩增β_2-AR cDNA25位至192位序列，产物168 bp，下画线碱基为错配碱基，目的产生*Nco*Ⅰ酶切位点，因此扩增产物经*Nco*Ⅰ酶切后，Arg16等位基因产生146、22 bp，Gly16等位基因产生128、22、18 bp；27位多态性用*Bbv*Ⅰ内切酶鉴定，BbvⅠ内切酶仅在谷氨酰胺(Gln)27等位基因序列上消化，产生105及63 bp，谷氨酸(Glu)27仍为168 bp。

PCR扩增：50 μl反应体系含10× 反应缓冲液5 μl，$MgCl_2$(25 mmol/L) 3 μl，dNTP(2.5 mmol/L)4 μl，上、下游引物各1 μl(终浓度为0.5 μmol/L)、基因组DNA 1.0 μg及TaqDNA聚合酶1 U(0.5 μl)，混匀后，置PCR扩增仪上(Bio-Rad Gene Cycler™，美国)，反应条件为95 ℃变性5 min；94 ℃ 50 s，62℃ 50 s，72 ℃ 50 s，共30个循环；72 ℃延伸5 min，后取5 μl扩增液电泳，50 V，40 min后于紫外线下观察，产物168 bp，见图1。

1.3.4 限制性核酸内切酶消化及聚丙烯酰胺凝胶电泳 在20 μl体系加入超纯水7.5 μl，10× 酶切反应缓冲液2 μl，PCR扩增液10 μl，限制性核酸内切酶*Nco*Ⅰ或*Bbv*Ⅰ 0.5 μl(1 U)，于37 ℃反应2 h后，取10 μl反应液加2 μl溴酚蓝于12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳，电压50 V，3 h后观察，据条带鉴定β_2-AR多态性，见图2，图3。

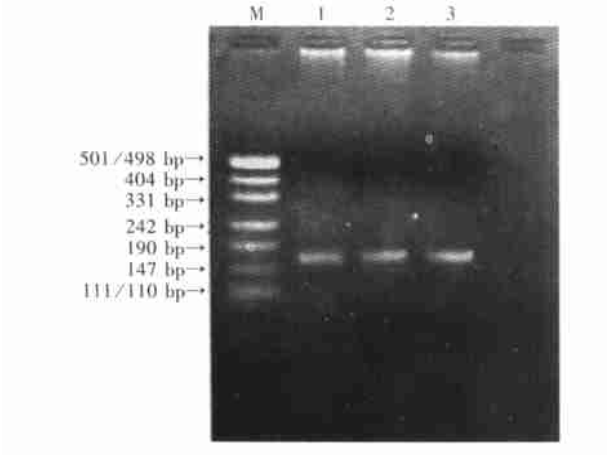


图1 β_2-AR基因片段扩增结果

Fig 1 Amplified product of β_2-AR fragement

M: Standard marker of DNA; 1～3: Amplified fragment of different samples(168bp)



图2 β_2-AR基因片段*Nco*Ⅰ酶切结果

Fig 2 Products of β_2-AR DNA fragment digested with *Nco*Ⅰ

M1, M2: Standard marker of DNA; 1: Amplified fragment of samples; 2, 5: Arginine(Arg)/glycine(Gly) genotype(146、128 bp); 3, 4: Arg/Arg genotype(146 bp); 6: Gly/Gly genotype(128 bp)



图3 β_2-AR基因片段*Bbv*Ⅰ酶切结果

Fig 3 Products of β_2-AR DNA fragment digested with *Bbv*Ⅰ

M: Standard marker of DNA; 1: Glutamic acid(Glu)/Glu genotype (168bp); 2, 3, 5: Glutamine(Gln)/Gln genotype(105、63bp); 4: Gln/Glu gentype (168、105、63bp)

1.3.5 β_2-AR基因型判断标准 由于12%的聚丙烯酰胺凝胶分离有效范围为40～200 bp，故Arg/Arg型出现146 bp，Arg/Gly型出现146、128 bp，Gly/Gly型出现128 bp，Gln/Gln型出现105、63 bp，Gln/Glu型出现168、105及63 bp，Glu/Glu型出现168 bp是检测的关键。

1.3.6 统计学处理 统计学处理用SPSS软件包，等位基因频率在哮喘与对照组分布用χ^2检验，单倍型频率分布采用3× 2表及2× 2表χ^2检验，哮喘组间比较用χ^2检验或Fisher确切概率法检验。

2 结果

2.1 哮喘组临床分度如下

间歇发作：14例；轻度：23例；中度：22例；重度：17例

2.2 β_2-AR等位基因在重庆汉族儿童中的分布

对照组中β_2-AR Gly16等位基因频率为0.42，Gln27等位基因频率为0.70，哮喘组中β_2-AR Gly16等位基因频率为0.50，Gln27等位基因频率为0.72，二者与对照组比较差异不显著(χ^2=2.22，0.21，$P>0.05$，$P>0.05$)，见表1。

2.3 β_2-AR等位基因与哮喘儿童病情分度的关系

我们把间歇及轻度归为一组，β_2-AR Gly16等位基因频率在

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

三度患儿中的分布有显著差异($\chi^2=9.47$, $P<0.01$), 以重度组分布的频率较高, 同时 Gly16 等位基因在重度组分布分别与轻度、中度组比较有显著差异($\chi^2=8.4, 6.80$, $P<0.01$), 见表 2。

表 1　β_2-AR 等位基因在重庆汉族儿童中的分布

Tab 1　β_2-AR allele frequency for subjects

Group	n	Allele n (frequency)			
		Gly16	P	Gln27	P
Asthma	76	76(0.50)	>0.05	110(0.72)	>0.05
Control	100	84(0.42)		140(0.70)	

表 2　β_2-AR 等位基因在哮喘患儿中的分布

Tab 2　β_2-AR allele frequency for mild, moderate and severe asthmatic groups

Group	n	Gly16		Gln27	
		n	frequency	n	Frequency
Mild	37	30	0.41	47	0.64
Moderate	22	18	0.41	30	0.68
Severe	17	24	0.71 *	26	0.76

*: $P<0.01$ *vs* mild, $P<0.01$ *vs* moderate

2.4　β_2-AR 单倍型与哮喘病情分度的关系

由于 Arg16/Gln27 频率非常小, 我们把 Arg 单倍型并为一组, 采取 3×3 表形式, 得出 Gly16/Gln27 在 3 组分布有显著差异, 且这种差异并不是 Arg 单倍型。因此, 排除 Arg 单倍型, 采取 3×2 表形式, 比较 Gly16/Gln27 及 Gly16/Glu27 在 3 组中的分布, 得出 Gly16/Gln27 单倍型在 3 组中的分布有显著差异($\chi^2=8.91$, $P<0.01$), 分别与轻度、中度组比较差异显著($P=0.014$, 0.033), 见表 3。

表 3　β_2-AR 单倍型与哮喘病情分度的关系

Tab 3　β_2-AR haplotypes of asthmatic group

Group	n	Haplotypes frequency			
		Gly16/Glu27	Gly16/Gln27	Arg16/Glu27	Arg16/Gln27
Mild	37	0.46	0.16 *	0.33	0.05
Moderate	22	0.55	0.15 *	0.25	0.05
Severe	17	0.29	0.47 *	0.29	0

*: $P<0.05$ *vs* severe

3　讨论

3.1　Gly16、Gln27 等位基因在重庆汉族人群中的分布

自 Szentivanyi 1968 年提出哮喘发病中 β_2-AR 阻滞学说以来, β_2-AR 在哮喘发病中种种假说几乎延续一个世纪, 但都停留在 β_2-AR 数量、功能及自身抗体等水平方面的研究。近 10 多年, 随着 PCR 技术的问世, 从分子水平研究 β_2-AR 与哮喘关系已成为哮喘发病机制最为活跃领域之一。研究表明, Gln27 等位基因在一定人群中分布与哮喘、IgE 水平及气道高反应性具有关联性[8], 本研究显示, 中国重庆汉族人群 β_2-AR16 及 27 位存在基因多态性, Gly16 等位基因频率为 0.42, 较高加索人群及黑种人群均较低, Gln27 等位基因频率为 0.70, 处于高加索人群及黑种人群之间[4]; 哮喘儿童 Gly16 及 Gln27 等位基因频率与健康人群比较均差异不显著($P>0.05$), 说明 Gly16 及 Gln27 等位基因不是重庆汉族儿童哮喘发病的因素, 其与哮喘的表型、IgE 水平及气道高反应性的关系, 需进一步研究。

3.2　β_2-AR 多态性与哮喘病情分度关系

Reishaus 等[11] 发现 β_2-AR Arg16→Gly16 多态性的哮喘患者需要持续的激素治疗(强的松用量 20 mg/d, 超过 6 个月), 并认为 β_2-AR 多态性与哮喘临床状态相关; Cooper 等[7] 同时证实 Gly16 型的患者在激素依赖型夜间型哮喘患者的比数为 25.5, 提示 Gly16 型 β_2-AR 在高加索人群与哮喘严重度存在一定程度相关性。我们据中华医学会呼吸学会 1997 年颁布的支气管哮喘防治指南中哮喘病情分度将患儿分为间歇发作-轻度、中度及重度, 结果显示具有 Gly16 等位基因频率在重度哮喘患儿中的分布比例较高($P<0.05$), 提示 Gly16 等位基因可能是重庆汉族儿童哮喘表型的遗传因子, 即 β_2-AR16 多态性与哮喘病情严重程度存在关联性, 与 Reishaus 等的结论一致。Weir 等[4] 在高加索人群中证实 Gln 等位基因在中度哮喘患者的分布显著高于轻度哮喘患者, 而我们的研究示 Gln 等位基因在三度病情中的分布无显著差异, 出现此种情况的原因可能是人群、种族不同, β_2-AR 多态性与哮喘的关联性也不尽相同。

3.3　β_2-AR 单倍型与哮喘病情分度关系

近年研究表明, 变异型 Gly16 与气道高反应性, 血清 IgE 水平, 对 β_2 激动剂产生失敏作用方面存在相关性; 而 Glu27 型与气道低反应性存在相关性, 且抑制 β_2 激动剂产生的失敏作用, Gly16 与 Glu27 相比时, Gly16 的失敏促进作用远远超过 Glu27 抑制失敏作用[8]; 考虑到 Gly16 及 Gln27 等位基因与哮喘密切的关系, 我们把二者联合起来研究 β_2AR 单倍型与哮喘的关系, 发现 Gly16/Gln27 单倍型在重度哮喘组中的分布与轻度及中度度比较有显著差异($P<0.01$), 这与 Weir 等人在高加索人群中研究的结论一致。

哮喘的发病并不是单一的某种遗传基因控制, 而是由于环境的不同引起的大量基因相互作用的多基因遗传病, 具遗传易质性, 随着环境因素及研究人群不同, β_2-AR 遗传多态性与哮喘的关联性也不尽相同, 扩大人群及种族研究对象, 并深入研究其与 β_2-AR 功能、气道高反应性、IgE 水平及对 β_2 激动剂的反应性的关系, 能进一步阐明 β_2-AR 遗传多同性在汉族儿童哮喘中的地位。

参考文献:

[1] Reihsaus E, Innis M, Macintyre N, *et al*. Mutaions in the gene encoding

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

for the Beta 2 adrenoceptor in normal and asthmatic subjects[J]. Am Rev Respir Cell Mol Biol, 1993, 8(6): 334—339.
[2] Green S A, Turki J, Innis M, *et al*. Amino-terminal polymorphisms of the human Beta 2 adrenoceptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties[J]. Biochemistry, 1994, 33(47): 9 414—9 419.
[3] Green S A, Cole M, Jacinto M, *et al*. A polymorphism of the human Beta 2 adrenoceptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor[J]. Biol Chem, 1993, 268(19): 23 116—23 121.
[4] Weir T D, Mallek N, Sandford A J, *et al*. Beta 2 adrenergic receptor haplotypes in mild, moderate and fatal/near fatal asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158(3): 787—791.
[5] 全国儿科哮喘协作组. 儿童哮喘诊断标准和治疗常规[J]. 中华儿科杂志, 1993, 31(4): 222—224.
[6] 中华医学会呼吸病学分会. 支气管哮喘防治指南诊断标准[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1997, 20(5): 261—263.
[7] Cooper D M, Troisi J K, Grobhoiz M, *et al*. Epidemiology of a polymorphism of the Beta 2 adrenoceptor gene in asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 153(Suppl): A254.
[8] 廖 伟, 李为明. β_2-肾上腺素受体遗传多态性与哮喘[J]. 国外医学: 遗传学分册, 2000, 23(1): 4—7.

(编辑 潘式文)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)01-0108-01

留取中段尿细菌培养方法的探讨

Exploration on the method of collecting midstream urine

何 静[1], 周晓梅[2], 王玉兰[1] (第三军医大学附属新桥医院肾内科, 重庆 400037; [2] 重庆市第八人民医院急诊科, 重庆 400000)

留取中段尿培养是一项基本护理操作常规, 正确的留取方法应为: 留取前夕, 嘱患者用肥皂温水洗净外阴(男性着重洗龟头与冠状沟处), 留尿前, 先用1∶5 000高锰酸钾溶液洗外阴, 继用棉签沾消毒液消毒尿道口, 然后嘱患者排尿, 将中段尿置于无菌试管中, 无菌试管口及塞子在留尿前后均须用火焰消毒[1]。但是在临床工作中, 由于护士晨间护理工作量极大, 在不少地方, 护士采取了变通的方法留取中段尿培养, 即嘱患者自行用肥皂水清洗外阴后, 用无菌试管留取中段尿送检培养, 为了解这种变通方法作中段尿细菌培养的准确性和可靠性, 以及检验用正规方法留取中段尿培养的临床价值, 我们在1997年10月至1998年9月, 与本科医生配合, 分别采用上述两种方法与膀胱穿刺尿培养, 观察了50例病人, 现将实验过程及结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

门诊、急诊及住院病人共50例。其中男性4例, 女性46例。年龄70~90岁4例, 60~69岁8例, 50~59岁7例, 40~49岁12例, 30~39岁8例, 20~29岁11例。临床表现包括尿频, 尿急, 尿痛3例, 夜尿多7例, 浮肿14例, 腰痛17例, 排尿困难2例, 发热4例, 血尿3例, 以上病人随机分为2组, 按正规方法留取标本组称为常规组, 按变通方法留取标本组称为变通组, 每组各25人。

1.2 方法

2组病人均首先于第1天22:00~23:00排空膀胱后休息, 次日7:30~8:00由医生按常规操作行耻骨上膀胱穿刺术, 抽出膀胱内尿液4~6 ml, 注入无菌试管内, 立即送检。变通组的病人在膀胱穿刺术后, 用肥皂水清洗外阴, 留取中段尿送检, 而常规组的病人则同样在膀胱穿刺术后, 用1∶1 000新洁尔灭棉球洗外阴后, 再用1∶1 000新洁尔灭棉球行尿道口消毒, 再留取中段尿送检[2]。

2 结果

2.1 变通组中段尿培养与膀胱穿刺尿培养结果比较, 见表1

表1 变通组中段尿培养与膀胱穿刺尿培养结果比较

膀胱穿刺法	变通法		合计
	+	−	
+	4	0	4
−	14	7	21
合计	18	7	25

2.2 常规组中段尿培养与膀胱穿刺尿培养结果比较, 见表2

表2 常规组中段尿培养与膀胱穿刺尿培养结果比较

膀胱穿刺法	常规法		合计
	+	−	
+	5	0	5
−	1	19	20
合计	6	19	25

2.3 统计学处理

χ^2检验, 常规法中段尿培养结果与膀胱穿刺尿培养结果差异无显著性, 变通法中段尿培养结果与膀胱穿刺尿培养结果差异有显著性。与膀胱穿刺法比较, 变通法与常规法准确率存在差异有显著性。

(下转111页)

作者简介: 何 静(1973—), 女, 重庆市荣昌县人, 护师。电话: (023)68755571
收稿日期: 1999-04-13; 修回日期: 2000-07-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net