科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

計畫名稱：	人類轉化生長因子beta-1、基質金屬蛋白水解?-9、與介白質素-17基因多形性與兒童氣喘之相關

執行計畫學生： 陳亭安
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-054-B
研究期間： 102年07月01日至103年02月28日止，計8個月
指導教授： 翁瑞宏

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學公共衛生學系（所）

中華民國 103年03月28日

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊
計畫名稱：

人類轉化生長因子 beta-1、基質金屬蛋白水解酶-9、介白質素-17 基因多形性與兒童氣喘之相關

＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊

執行計畫學生：陳亭安

學生計畫編號：NSC　102－2815－C－040－054-B

研 究 期 間 ：　年 7 月 1 日至　年 2 月底止，計 8 個月

指 導 教 授 ：翁瑞宏

處理方式(請勾選)：□立即公開查詢

■涉及專利或其他智慧財產權，■一年□二年後可公開查詢

執 行 單 位：中山醫學大學公共衛生學系

中華民國　103 年　3 月　28　日

摘要

呼吸道重塑 (airway remodeling) 是氣喘 (asthma) 的一項特徵，具有細胞與細胞外基質 (extracellular matrix [ECM]) 所組成的上皮間質單位的增加替換之特性。轉化生長因子 (transforming growth factor [TGF])-β1 可影響纖維母細胞向上皮下方的區域移行 (migration) 及活化，導致基底膜增厚與上皮下方區域纖維化；而基質金屬蛋白水解酶-9 (matrix metalloproteinase-9 [MMP-9]) 也作用於發炎導致上皮細胞傷害的修補過程，具有調節氣喘重塑的功能。此外，介白質素 (interleukin [IL])-17A 與 IL-17F 可促進輔助性 T 細胞 17 (Th17) 細胞表現與嗜中性白血球浸潤，進而導致氣喘重塑。因此，本研究探討 TGF-β1 C-509T (rs1800469)、MMP-9 A+2659G (rs17576) 和 G+5546A (rs2274756)、IL-17A rs17880588、與 IL-17F rs763780 基因型與兒童氣喘發生之相關。我們以一個醫院為基礎的病例對照研究，選取 249 名氣喘兒童為病例以及 249 名非氣喘兒童為對照進行分析。研究對象的個人特徵資料，經由問卷訪視所收集；TGF-β1、MMP-9 和 IL-17 基因型則是以聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction) 加以辨識。結果顯示 TGF-β1 rs1800469 CT 基因型 (matched relative risk, [RR_m] = 2.42；95% confidence interval [C.I.] = 1.13-5.23)、MMP-9 rs17576 AG 基因型 (RR_m = 0.50；95% C.I. = 0.31-0.81)、MMP-9 rs2274756 AG 基因型 (RR_m = 0.45；95% C.I. = 0.26-0.75)、MMP-9 rs2274756 A 對偶基因 (RR_m = 0.54；95% C.I. = 0.35-0.84)、IL-17A rs17880588 GG 基因型 (RR_m = 0.18；95% C.I. = 0.08-0.43) 以及 IL-17A rs17880588 G 對偶基因 (RR_m = 0.23；95% C.I. = 0.10-0.48) 顯著相關於兒童氣喘發生之效應。在調整干擾因子效應後，MMP-9 rs17576 AG 基因型 (相較於 GG 基因型，RR_m = 0.48；95% C.I. = 0.26-0.90) 與 rs2274756 AG 基因型 (相較於 GG

基因型，RR_m = 0.34；95% C.I. = 0.17-0.68) 在過敏原測試陽性的兒童中仍呈現出對於兒童氣喘發生具有顯著的保護效應。同樣地，IL-17A rs17880588 GG 基因型則不論在過敏原測試陽性 (相較於 AG 基因型；RR_m = 0.17, 95% C.I. = 0.05-0.56) 或陰性 (相較於 AG 基因型；RR_m = 0.27, 95% C.I. = 0.10-0.73) 的兒童中皆呈現出對於兒童氣喘發生具有顯著的保護效應。此外，在每天暴露二手菸 1-5 支的兒童中，MMP-9 rs17576 AG 基因型 (相較於 GG 基因型；RR_m = 0.12, 95% C.I. = 0.02-0.74) 對於兒童氣喘發生也具有顯著的保護效應。因此，TGF-β1、MMP-9 和 IL-17 基因型可能是台灣兒童氣喘發生的調控因子。

關鍵詞：氣喘、人類轉化生長因子beta-1、基質金屬蛋白水解酶-9、介白質素-17、過敏原、二手菸暴露。

前言

氣喘 (asthma) 是種與呼吸道阻塞相關的支氣管失調，明顯地伴隨著反覆性突發的呼吸困難 (dyspnea)，以及因為支氣管痙攣收縮所導致的哮喘 (wheeze) [1]。而呼吸道重塑 (airway remodeling) 是氣喘的特徵，具有細胞與細胞外基質 (extracellular matrix [ECM]) 所組成的上皮間質單位的增加替換之特性 [2]，並且也被發現可能與氣喘病患的肺功能數值之降低具有相關性 [3]。慢性的重塑會造成呼吸道基底膜 (basement membrane) 纖維化的產生；而在慢性氣喘的病患中，中支氣管 (medium-sized bronchi) 與小支氣管 (small-sized bronchi) 周圍的基質細胞，如肌纖維母細胞，亦會出現轉化的現象 [2]。

轉化生長因子 (transforming growth factor [TGF])-β1 是種細胞激素，表現

在呼吸道上皮細胞 (airway epithelial cells)、嗜伊紅性白血球 (eosinophils)、幫手 T 第二型淋巴球 (helper T type 2 lymphocytes)、巨噬細胞 (macrophages) 和纖維母細胞 (fibroblasts)，並且可能被限制及儲存在呼吸道上皮下方的細胞外基質 [4]。此細胞激素促進白血球細胞的分化，但是在 T 淋巴球細胞的增生和巨噬細胞的活化上則為抑制的作用，並且已被建議在發炎狀態中具有調控的角色 [5]。TGF-β1 之 mRNA 濃度在重度氣喘者之嗜伊紅性白血球中相較於輕度氣喘者是增加的 [6, 7]，在氣喘病患相較於無氣喘病患之支氣管肺泡灌洗液也具有較高的 TGF-β1 表現，並且進一步地呈現出對於過敏原更為敏感 [8]。呼吸道重塑的主要特徵之一為上皮下方 (subepithelial) 的組織纖維化，並且在重度氣喘患者中有增加的趨勢 [6]。TGF-β1 會影響纖維母細胞向上皮下方的區域移行 (migration) 及活化，導致基底膜增厚與上皮下方區域纖維化 [9]；這相關於纖維化的許多特徵，包括細胞外基質蛋白如膠原蛋白與纖維連接蛋白 (fibronectin) 的沉澱 [9-11]。TGF-β1 的表現受到 TGF-β1 基因所影響，此基因位於染色體 19q13.1-19q13.2 的位置 [12]，並且於 TGF-β1 基因編碼內的部分基因多形性已經被辨識；特別的是，位於鹼基對-509 位置 (rs1800469) 的啟動子多形性改變了 Yin Yang 1 (YY1) 轉錄因子合理鍵結位置 (–CCATCT<u>C</u>/<u>T</u>G–)，並且也相關於在循環中較高的 TGF-β1 濃度 [13]。T 對偶基因可增強在 TGF-β1 啟動子上的 YY1 鍵結位置，並且可能進而增加 TGF-β1 的轉錄 [14]；雖然，如此的假說尚未被證實。

在嗜中性白血球 (neutrophils) 所誘發的呼吸道發炎反應中，反覆的組織修復可能貢獻於呼吸道重塑與肺部傷害，而基質金屬蛋白水解酶 (matrix metalloproteinases [MMPs]) 家族的降解細胞外基質功能在此修復與重塑過程

中扮演關鍵的角色 [15, 16]。基質金屬蛋白水解酶家族也具有調節蛋白水解酵素 (proteases) 活性與細胞激素分泌的功能，進而影響發炎反應的產生 [17, 18]。基質金屬蛋白水解酶 (MMP)-9 是一種前發炎細胞激素 [19]，在發炎導致上皮細胞傷害的修補過程中，具有向下調節氣喘重塑的功能 [16]。嗜中性白血球在穿透基底膜的過程會釋放 MMP-9 來破壞基底膜的組成物第四型膠原蛋白，同時組織會釋放 MMP-9 抑制物金屬蛋白水解酶組織抑制者 (tissue inhibitor of metalloproteinase [TIMP])-1；而 TIMP-1 會抑制細胞外基質的破壞，導致細胞外基質沉積和基底膜變厚 [17]。在成人氣喘的痰液中發現，MMP-9 的表現與呼吸道發炎具有正向相關性，同時也與呼吸道增厚具有負向相關 [16]。另一方面，MMP-9 的表現亦可能受到 TGF-β1 所調控 [18]；在鼻腔息肉組織的嗜中性白血球發炎中，MMP-9 與 TGF-β1 具有顯著的正向相關，並且 MMP-9 與 TGF-β1 可能貢獻於鼻腔息肉組織的嗜中性白血球與肥大細胞的遷移，而 TIMP-1 則並無此相關性 [19]。MMP-9 基因位於人類染色體 20q12.2-13.1 [20]，先前研究已經發現這個位置與支氣管過度反應 (bronchial hyperresponsiveness) [21] 和特異致敏性 (specific sensitization) [22] 具有相關。在外顯子 (exon) 6 的 2659 位置有一個 A 至 G 的鹼基置換 (rs17576)，密碼子由 G<u>A</u>G 轉變成 G<u>C</u>G，結果會導致氨基酸密碼子在+279 的位置發生變異，由麩醯胺酸 (glutamine [Glu]) 變異成精胺酸 (arginine [Arg])，這可能會影響蛋白結構改變與外顯子的裁剪 (exonic splicing) [23]。此外，此變異點位於 MMP-9 基因的第二型纖維連接蛋白素 (fibronectin II) 區域，此區域可能增加 MMP-9 與細胞外基質的結合 [24]，並且 AA 基因型相較於 GG 基因型具有顯著較高的血清 MMP-9 表現 [25]。在 exon 12 的 5546 位置有個 G 至 A 的鹼基置換 (rs2274756)，導致氨基酸由精

胺酸 (Arg) 變異成麩醯胺酸 (Glu)，並且此變異位於血紅素結合蛋白功能區 (hemopexin domain)，可能會向下調節活化 MMP-9 的生體利用率 (bioavailability) [26]。此外，一項德國研究則發現 MMP-9 T-1702A、C-1562T、R279Q (rs17576) 與 C+6T 並非是兒童氣喘的易感受性基因 [27]。因此，MMP-9 rs17576 與 rs2274756 基因多形性與兒童氣喘發生之相關性，值得來加以探討。

輔助性 T 細胞 17 (T help cell 17 [Th17]) 是由介白質素 (interleukin [IL])-17A、IL-17F 和 IL-22 所誘發，是自體免疫的重要調節者 [28]。氣喘成人相較於健康對照具有顯著較高的 Th17 細胞、IL-17 細胞激素、與 IL-17A 和 IL-17F mRNA 表現 [29, 30]，IL-17A 的高度表現也與呼吸道過度反應 (airway hyperresponsiveness) 具有相關 [31]。此外，Th17 細胞和 IL-17 可能藉由嗜中性白血球的累積與刺激基質金屬蛋白酶 (MMPs) 分泌來誘發氣管重塑 [32, 33]。Chang 等人 [34] 發現，IL-17A 和 IL-17F 會誘發 p38 絲裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase [MAPK]) 抑制者 BIRB0796 促使人類氣管平滑肌細胞 (airway smooth muscle cells [ASMC]) 的移行，進而導致氣管重塑。在 IL-17 家族成員中，IL-17A 與 IL-17F 是由位於第六對染色體上的 adjacent 基因 (6p12) 所轉錄 [35]。IL-17A 基因上的 rs17880588 多形性包含一個 G 至 A 的鹼基置換 [36]，此置換可能會影響 IL-17A 蛋白表現 [36]。在 IL-17F 基因 exon 3 的+7488 位置上有個 A 至 G 的鹼基置換 (rs763780)，導致氨基酸由組氨酸 (histidine [His]) 變異成精胺酸 (Arg)，而此變異會影響 IL-17F 表現，較不易誘發 IL-6 和 TGF-β 表現 [37]。然而，IL-17A rs17880588 與 IL-17F rs763780 基因多形性是否為台灣兒童氣喘的易感受性因子仍不清楚。

因此，本研究探討 TGF-β1、MMP-9 與 IL-17 基因多形性是否相關於台灣兒

童氣喘之危險。

材料與方法

病例確認與對照選取

本研究經由中山醫學大學倫理委員會的認可後執行。我們的研究對象來自兩個不同的族群，患有氣喘的兒童是從位於中台灣的中山醫學大學附設醫院中選取，此醫院對於來自所有社會經濟階級的病患皆具有可近性。符合美國胸腔協會 (American Thoracic Society) 所制定的可逆性呼吸道疾病標準 (如支氣管氣喘) [38] 之患者經由小兒科醫生確診後，從中山醫學大學附設醫院小兒氣喘門診選取。此外，對照組由同樣位於中台灣的一所小學與一所幼稚園中選取，納入者條件如下：(1) 先前不具氣喘的診斷、沒有持續性的發喘；(2) 無慢性痰液 (phlegm) 增生；以及 (3) 過去一年內，沒有呼吸急促的現象產生。本研究的病例與對照之配對比例為 1：1，健康對照是個別地與病例之年齡 (±5 歲) 與性別進行配對；研究對象之年齡介於四至十二歲，並且研究對象之親生父母皆為華人，以確保我們的研究對象有同樣的種族來源。總計，249 名病例和 249 名對照在此納入本研究進行分析；所有研究對象皆能夠提供臨床病歷以及同意書。

流行病學資料

研究對象的個人資料，在獲取所有參與者的家長同意書後，經由面對面的問卷訪視所收集。問卷內容採用中文版的兒童氣喘及過敏國際研究之標準化問卷，涵蓋的問題包括人口學特質、父母親教育程度、生活型態 (包含與兒童共同生活之家戶成員抽菸狀態、室內其它污染狀態如燒香、潮濕狀況、是否飼養寵物、孩

童的臥房是否有蟑螂)、以及一等親氣喘家族史。研究對象的家戶成員抽菸狀態包括每天抽菸支數及年數;兒童的室內二手菸暴露量是以每天平均暴露的香菸包數乘上暴露年數計算,亦即父母親於兒童在家時,抽菸之數的總和。住家的潮濕程度在最近一年內符合以下條件之一者即定義為潮濕:可以看見家戶內部表面具有黴菌滋生、家戶內積水、或漏水。氣喘家族病史則是以受測者之一等親家族具有氣喘來加以定義。

氣喘、過敏和肺功能的臨床評估

所有研究參與者藉由臨床疾病史以及透過面訪來確認為氣喘。簡單地說,藉由評估支氣管過度反應 (bronchial hyper-responsiveness) 來確定氣喘的表徵,這是定義為在發病時並且給予支氣管擴充劑之後的第一秒用力呼氣量 (forced expiratory volume in one second [FEV1]) 與用力肺活量 (forced vital capacity [FVC]) 之比值< 80%。肺功能檢驗則是以標準肺功能量計 (spirometry) 測試肺活量 (vital capacity [VC])、用力肺活量以及第一秒用力呼氣量。所有測量皆依照肺功能量計之標準程序,由醫師及受訓過的研究人員所進行。此外,氣喘也被定義為在過去一年中至少符合以下問題之一:(1) 請問您在休息時是否有呼吸困難及發喘的現象? (2) 請問您是否曾於夜間氣喘發作? (3) 請問您是否曾因氣喘發作而就醫? (4) 請問您是否有服用氣喘治療藥物?

針對台灣常見的過敏原,包括家中灰塵 (house dust)、蟑螂 (cockroach mix)、以及家塵蹣 (standardize mite *dermatophagoides farinae* [D.F.] 與 standardize mite *dermatophagoides pteronyssinus* [D.P.]),進行皮膚測試或多重抗原同時測試 (Multiple Antigen Simultaneous Test [MAST])。如果最大的紅斑直徑超過 3 mm 時,

陽性皮膚測試則被考慮存在。而過敏被定義為，具有至少一種過敏原測試反應為陽性。血清 IgE 濃度是以免疫螢光法 (AutoCAP System; Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden) 測量，周邊血液中嗜伊紅性白血球之濃度以每立方毫米 (mm^3) 之實際計數表示。

<u>基因多形性分析</u>

所有研究對象的靜脈血液被收集在含肝素的採血管中，然後進一步地萃取出 DNA。對於 TGF-β1 基因之分析，是根據 De Ruyck 等人 [39] 所描述之研究來進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction [PCR]) 增幅後，接續執行限制片段長度多形性 (restriction fragment length polymorphism [RFLP]) 分析。用以增幅包含 TGF-β1 rs1800469 基因型的引發子序列為 5’-GCA GTT GGC GAG AAC AGT TG-3’以及 5’-TGG GTC ACC AGA GAA AGA GG-3’。以下列條件執行 DNA 的增幅：首先在 95℃ 執行五分鐘，接續在 95℃ 一分鐘進行變性、在 62℃ 一分鐘進行重鍊、在 72℃ 一分鐘進行延展，總共進行 35 回合。而 PCR 的產物然後在 37℃ 下以 Bsu 36I 隔夜消化，並且在 2.5%的瓊膠中分離。同型 TT 基因型的個體表現出 681 bp 一個產物片斷，同型 CC 基因型的個體顯現出一段 193 bp 以及一段 488 bp 片斷，而異型 CT 基因型的個體則有全部三個片斷。

相似於 TGF-β1 基因分析，以 PCR 為基礎的 RFLP 被執行來偵測 MMP-9 rs17576 與 rs2274756 基因多形性的差異。用以增幅包含 rs17576 基因型的引發子序列為 5’-ACT CTG GGC CCA ATT TTC TC-3’以及 5’-GCC TTG GAA GAT GAA TGG AA-3’。以下列條件執行 DNA 的增幅：首先在 95℃ 執行五分鐘，接續在 95℃ 30 秒進行變性、在 60℃ 30 秒進行重鍊、在 72℃ 30 秒進行延展，總

共進行 35 回合。而 PCR 的產物然後在 37℃ 下以 MspI 隔夜消化，並且在 3%的瓊膠中分離。同型 AA 基因型的個體表現出 211 bp 一個產物片斷，同型 GG 基因型的個體顯現出一段 157 bp 以及一段 54 bp 片斷，而異型 AG 基因型的個體則有全部三個片斷。用以增幅包含 rs2274756 基因型的引發子序列為 5'-GCA CGA CGT CTT CCA GTA T(mismatch)C-3'以及 5'-GGA AAT CTG GGT CCT GGT CT-3'。以下列條件執行 DNA 的增幅：首先在 95℃ 執行五分鐘，接續在 95℃ 30 秒進行變性、在 58℃ 30 秒進行重鍊、在 72℃ 30 秒進行延展，總共進行 35 回合。而 PCR 的產物然後在 65℃ 下以 Taq$^{\alpha}$I 隔夜消化，並且在 4%的瓊膠中分離。同型 AA 基因型的個體表現出 225 bp 一個產物片斷，同型 GG 基因型的個體顯現出一段 204 bp 以及一段 21 bp 片斷，而異型 AG 基因型的個體則有全部三個片斷。

IL-17A rs17880588 基因型是使用 StepOne Real-Time PCR System 與 SDS v3.0 software 以 TaqMan assay 進行判定，每個反應的總體積是 5 µl，包含 2.5 µl TaqMan Genotyping Master Mix、0.125 µl TaqMan probes mix、1 µl (10 ng) genomic DNA、與 1.375 µl 二次水。PCR 循環參數組成為 95^{o}C 下 10 分鐘之先前培養，接續於 95^{o}C 下 15 秒鐘與 60^{o}C 下一分鐘，並且重複 40 次的循環後終止。IL-17F rs763780 基因多形性，是根據 Chen 等人 [40] 所描述之方法來執行 PCR-RFLP 辨識。用以增幅包含 IL-17F rs763780 基因型的引發子序列為 5'-GTT CCC ATC CAG CAA GAG AC-3'和 5'-AGC TGG GAA TGC AAA CAA AC-3'，PCR 循環參數組成為 94^{o}C 下五分鐘之先前培養，接續於 94^{o}C 下 30 秒鐘之變性步驟、58^{o}C 下 30 秒鐘之重鍊、以及 72^{o}C 下 30 秒鐘之延展，並且重複 32 次的循環後，反應於最後的 72^{o}C10 分鐘之延展後終止。該 PCR 產物也在 37^{o}C 以 NlaIII 作用 16 小時，同型

CC 基因型個體表現出 412-bp 一段產物片段；同型 TT 基因型個體顯現出 288-bp 和 124-bp 兩段產物片段；而異型 CT 基因型個體則有全部三個片段。

統計分析

對於TGF-β1基因型、MMP-9基因型、IL-17A基因型、IL-17F基因型、氣喘家族史、室內二手菸暴露狀態、室內燒香狀態、在家是否做紡織類的工作、過去是否在臥房內觀察到蟑螂、寵物飼養、家戶潮濕狀態、以及過敏原測試等對於兒童氣喘發生的配對之相對危險性 (matched relative risk [$RR_{m]}$) 以及相對應的95% 信賴區間 (95% confidence interval [C.I.]) 是使用條件式邏輯斯迴歸模式 (conditional logistic regression model) 來進行評估，，並且以Goodness-of-fit χ^2-test 檢驗基因型是否符合哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium)。另外，分層分析被執行以檢定過敏原測試、室內二手菸暴露狀態分別與TGF-β1基因型、MMP-9基因型、IL-17A基因型、IL-17F基因型對於兒童氣喘之發生危險之間是否具有合併效應存在，likelihood ratio χ^2-test被執行以檢定過敏原暴露、室內二手菸暴露狀態分別與基因型對於氣喘發生危險性的交互作用。在交互作用的檢定中，將僅納入兩個主效應項的條件式邏輯斯迴歸模式與同時納入兩個主效應項和交互作用項的模式進行比較，交互作用效應是定義為兩項模式的偏差(deviance) 之差異。所有的P值將是以用雙尾檢定來判定。

結果

總計，498 名兒童 (249 名病例與 249 名健康對照) 參與本研究，其年齡範圍從四歲至十五歲 (平均 9.7 歲)。研究對象之基本特徵與各種環境因子對於氣喘

發生之配對相對危險性，被呈現於表一。父母的教育程度為大學以上 (RR_m = 4.48; 95% C.I. = 2.23-9.04) 或高中以上 (RR_m = 2.21; 95% C.I. = 1.12-4.24) 之兒童相較於父母的教育程度為高中以下之兒童，具有較高的氣喘發生危險性。具氣喘家族史的兒童 (RR_m = 4.61; 95% C.I. = 2.77-7.67)、二手菸暴露狀況每天> 5 支的兒童 (RR_m = 1.49; 95% C.I. = 1.01-2.20)、過敏原測試為陽性的兒童 (RR_m = 2.58; 95% C.I. = 2.75-3.79)、以及 FEV1%預測值< 80%的兒童 (RR_m = 8.80; 95% C.I. = 5.16-15.01) 分別相較於無氣喘家族史、二手菸暴露狀況每天 0 支、過敏原測試為陰性、以及 FEV1%預測值≥ 80%的兒童，具有顯著較高的氣喘發生危險性。反向相關則在家中燒香 (RR_m = 0.65; 95 % C.I. = 0.45-0.95) 及二手菸暴露狀況每天 1-5 支的兒童 (RR_m = 0.43; 95 % C.I. = 0.23-0.77) 與兒童氣喘發生之間被發現。然而，家中是否從事紡織業工作之兒童、飼養寵物、家中潮濕程度、以及寢室是否有蟑螂，在病例與對照組之間的分布並未呈現統計顯著差異。

兒童氣喘病例及對照之 TGF-β1 rs1800469、MMP-9 rs17576、MMP-9 rs2274756、IL-17A rs17880588 以及 IL-17F rs763780 基因型與對偶基因分布頻率，呈現於表二。健康對照之 TGF-β1 rs1800469 (P = 0.71)、MMP-9 rs2274756 (P = 0.88)、IL-17A rs17880588 (P = 0.69) 以及 IL-17F rs763780 (P = 0.36) 基因型分布均符合哈溫平衡定律；然而 MMP-9 rs17576 (P = 0.01) 基因型分布並未符合哈溫平衡定律。攜帶 TGF-β1 CT 基因型者相較於攜帶 CC 基因型者具有顯著較高的氣喘發生危險性 (RR_m = 2.42; 95% C.I. = 1.13-5.23)；攜帶 MMP-9 rs17576 AG 基因型者相較於攜帶 GG 基因型者 (RR_m = 0.5; 95% C.I. = 0.31-0.81)、攜帶 MMP-9 rs2274756 AG 基因型者相較於攜帶 GG 基因型者 (RR_m = 0.45; 95% C.I. = 0.26-0.75)、以及攜帶 IL-17A rs17880588 GG 基因型者相較於攜帶 AG 基因型者

(RR_m = 0.18; 95% C.I. = 0.08-0.43) 均具有氣喘之顯著保護作用。攜帶 MMP-9 rs2274756 A 對偶基因的兒童相較於攜帶 G 對偶基因的兒童 (RR_m = 0.54; 95% C.I. = 0.35-0.84) 與 IL-17A rs17880588 G 對偶基因的兒童相較於攜帶 A 對偶基因的兒童 (RR_m = 0.23; 95% C.I. = 0.10-0.48) 也具有氣喘之顯著保護作用。然而，在 IL-17F rs76378 基因型與兒童氣喘發生之間並未被觀察到具有統計上的顯著相關。

隨後，我們以多變項條件式邏輯斯迴歸分析過敏原測試結果與 TGF-β1、MMP-9 以及 IL-17 基因型於調整後之氣喘發生危險合併效應，結果呈現於表三。在調整父母親教育程度、氣喘家族史、二手菸暴露以及家中燒香等變項之效應後，我們以過敏原測試陽性且攜帶 MMP-9 rs17576 GG 基因型的兒童為參考組 (RR_m = 1.00)，過敏原測試陽性且攜帶 MMP-9 rs17576 AG 基因型的兒童則具有 0.48 倍 (95% C.I. = 0.26-0.90) 的氣喘發生危險性；以過敏原測試陽性且攜帶 MMP-9 rs2274756 GG 基因型為參考組 (RR_m = 1.00)，過敏原測試陽性且攜帶 MMP-9 rs2274756 AG 基因型的兒童具有 0.34 倍 (95% C.I. = 0.17-0.68) 的氣喘發生危險性。當以過敏原測試陰性且攜帶 IL-17A rs17880588 AG 基因型的兒童為參考組 (RR_m = 1.00)，則過敏原測試陰性且攜帶 IL-17A rs17880588 GG 基因型的兒童具有氣喘之顯著保護作用 (RR_m = 0.27; 95% C.I. = 0.10-0.73)。同樣地，當以過敏原測試陽性且攜帶 IL-17A rs17880588 AG 基因型的兒童為參考組 (RR_m = 1.00)，則 GG 基因型的兒童具有氣喘的顯著保護作用 (RR_m = 0.17; 95% C.I. = 0.05-0.56)。然而，過敏原暴露與 TGF-β1、MMP-9、IL-17 基因型對於兒童氣喘的發生並未具有顯著的交互作用存在。

接續著，我們同樣以多變項條件式邏輯斯迴歸模式分析二手菸暴露狀況與

TGF-β1、MMP-9 以及 IL-17 基因型於調整後之氣喘發生危險合併效應，結果呈現於表四。我們以每天暴露於二手菸 1-5 支且攜帶 MMP-9 rs17576 GG 基因型的兒童為參考組 (RR_m = 1.00)，則每天暴露於二手菸 1-5 支且攜帶 MMP-9 rs17576 AG 基因型的兒童具有 0.12 倍 (95% C.I. = 0.02-0.74) 的氣喘發生危險性。以無暴露於二手菸且攜帶 IL-17A rs17880588 AG 基因型的兒童為參考組 (RR_m = 1.00)，則無暴露於二手菸且攜帶 IL-17A rs17880588 GG 基因型的兒童具有 0.12 倍 (95% C.I. = 0.04-0.37) 的氣喘發生危險。然而，二手菸暴露狀況與 TGF-β1、MMP-9、IL-17 基因型對於兒童氣喘的發生也未具有顯著的交互作用存在。

討論

本研究中，TGF-β1 rs1800469 CT 基因型、MMP-9 rs17576 AG 基因型、MMP-9 rs2274756 AG 基因型、MMP-9 rs2274756 A 對偶基因、IL-17A rs17880588 GG 基因型、以及 IL-17A rs17880588 G 對偶基因皆顯著相關於兒童氣喘發生之效應。在調整干擾因子效應後，MMP-9 rs17576 AG 基因型與 rs2274756 AG 基因型在過敏原測試陽性的兒童中仍呈現出對於兒童氣喘發生具有顯著的保護效應。同樣地，IL-17A rs17880588 GG 基因型則不論在過敏原測試陽性或陰性的兒童中皆呈現出對於兒童氣喘發生具有顯著的保護效應。此外，在每天暴露二手菸 1-5 支的兒童中，MMP-9 rs17576 AG 基因型對於兒童氣喘發生也具有顯著的保護效應。

氣喘是多因子的症狀，許多種誘因會導致氣喘發作的開始或惡化，包括暴露於過敏原 [41,42] 以及香菸 [43, 44]；而台灣常見過敏原 [45]，包括家中的灰塵、家塵蟎與美洲蟑螂則被用來加以評估。過敏原致敏是氣喘發生的重要危險因子之一 [41,42]，在本研究中，63.9%的氣喘兒童病例呈現具有至少一種過敏原致敏反

應。過敏原的暴露可能會增加呼吸道上皮細胞的增生及發炎 [46]，而過敏性呼吸道的發炎反應可能是藉由 T 輔助細胞產生的細胞激素所造成，進一步形成氣喘 [47]。雖然，室內二手菸暴露對於兒童氣喘發生的致病機轉至今仍不清楚，但氣態的香菸中包含氧化分子，能夠導致呼吸道上皮的發炎 [48, 49]，也可促使上皮細胞產生損害並且需要進行結構重塑 (remodeling)。在本研究，我們亦觀察到台灣兒童氣喘的發生是相關於過敏原暴露與室內二手菸暴露。

進一步地，本研究觀察到 TGF-β1 rs1800469 基因型是相關於兒童氣喘的發生，並且攜帶 CT 基因型的兒童將具有較高的氣喘發生危險性。先前研究已經建議 TGF-β1 在發炎狀態中具有調控的角色 [5]，也可以影響纖維母細胞向上皮下方的區域移行及活化，導致基底膜增厚與上皮下方區域纖維化 [6]；在氣喘病患相較於無氣喘病患之支氣管肺泡灌洗液也具有較高的 TGF-β1 表現，並且進一步地呈現出對於過敏原更為敏感 [8]。TGF-β1 的表現受到 TGF-β1 基因所影響；特別的是，位於鹼基對-509 位置 (rs1800469) 的啟動子多形性改變了 Yin Yang 1 (YY1) 轉錄因子合理鍵結位置，並且也相關於在循環中較高的 TGF-β1 濃度 [25]。然而，在本研究中，我們並未分別在 TGF-β1、過敏原測試以及二手菸暴露狀況之間觀察到對於兒童氣喘發生的顯著交互作用，這建議著 TGF-β1 可能並不足以影響環境中的危害物質對於兒童氣喘發生之效應。

呼吸道重塑主要特徵之一為上皮下方的組織纖維化 [6]。重要的是，MMPs 與 TIMPs 之間的失衡可導致細胞外基質過度沉積而形成纖維化 [50]。此外，MMP-9 在發炎導致上皮細胞傷害的修補過程中，具有向下調節氣喘重塑的功能 [51]。MMP-9 rs17576 基因多形性具有一個 A 至 G 的鹼基置換，這可能會影響蛋白結構改變與外顯子的裁剪 [30]，並且 AA 基因型也已被報告相較於 GG 基因

型具有顯著較高的血清 MMP-9 表現 [32]。此外，MMP-9 rs2274756 基因也具有一個 G 至 A 的鹼基置換，如此可能會向下調節活化 MMP-9 的生體利用率。我們現今的研究也發現，MMP-9 rs17576 AG 基因型相較於 GG 基因型，以及 rs17576 AG 基因型相較於 GG 基因型分別對於兒童氣喘之發生具有保護的顯著效應。進一步地，我們也觀察到 MMP-9 rs17576 AG 基因型與 rs2274756 AG 基因型在過敏原測試陽性的兒童中對於兒童氣喘發生具有顯著的保護效應。此外，在每天暴露二手菸 1-5 支的兒童中，MMP-9 rs17576 AG 基因型對於兒童氣喘發生也具有顯著的保護效應。重要的是，環境中的過敏原與二手菸都易引起呼吸道發炎、減少上皮細胞黏膜附著並增加分離以及支氣管過度反應，進而造成氣管重塑 [52]。因此，MMP-9 rs17576 和 rs2274756 基因型可能分別對於台灣兒童暴露於過敏原或室內二手菸所導致之氣喘發展具有調控作用。

在氣喘者中，可以觀察到相較於健康對照具有顯著較高的 Th17 細胞、IL-17 細胞激素、與 IL-17A 和 IL-17F mRNA 表現 [18, 19]。IL-17A 基因上的 rs17880588 多形性包含一個 G 至 A 的鹼基置換 [36]，可能會影響 IL-17A 蛋白表現 [36]，在 IL-17F 基因上的 rs763780 多形性亦會影響 IL-17F 表現 [37]。然而，IL-17A rs17880588 與 IL-17F rs763780 基因多形性是否為氣喘的易感受性因子，目前仍不清楚。一項在中東的研究發現，攜帶 rs17880588 GG 基因型者相較於攜帶 AG 基因型者具有較高的 IL-17A 蛋白表現與氣喘發生危險 [36]。然而，本研究卻觀察到歧異的結果，攜帶 rs17880588 GG 基因型者相較於攜帶 AG 基因型者反而具有較低的氣喘發生危險。進一步地在我們的研究中，IL-17A rs17880588 GG 基因型不論在過敏原測試陽性或陰性的兒童中皆呈現出對於兒童氣喘發生具有顯著的保護效應；再者，IL-17A rs17880588 GG 基因型在無暴露於二手菸的兒童中也

同樣對於兒童氣喘之發生具有保護效應。如此岐異的結果之可能的解釋為種族差異所致，此單一核苷酸多形性在沙烏地阿拉伯人的 A 對偶基因頻率是 5.4% [36]，台灣兒童的 A 對偶基因頻率是 8.4%，而未來需要更多涵蓋不同種族的研究來加以驗證 IL-17A rs17880588 基因多形性與氣喘發生之關係。此外，現今的研究中並未觀察到 IL-17F rs763780 基因多形性與台灣兒童氣喘發生之關係。

在本研究中，我們也觀察到父母親的高教育程度、氣喘家族史也相關於兒童氣喘的發生。Martinez 等人 [53] 指出隨著個體成長而逐漸遭受外來物的暴露，可使抗原呈現細胞 (antigen-presenting cell [APC]) 漸漸成熟；當成熟的抗原呈現細胞持續受到刺激時，則可使 CD4+Th 朝 Th1 分化 [54, 55]。因此，高教育程度的父母一旦過度保護自己的子女，減少與環境的接觸，將可能影響幼兒時期 Th1 及 Th2 分化的重要因素；這也可能是兒童氣喘的貢獻因素。氣喘家族聚集性已被證實 [56]，而這也建議著具有氣喘家族史之兒童有較高的氣喘發生危險性，如同我們的結果所顯示；這可能是基因因素或共同環境因素所導致之結果。兒童大部分的時間都待在室內，因此考慮暴露到室內污染源而導致氣喘發生之影響是重要的。這可能是因為室內過敏原可附著在棉屑上，而使兒童在吸入這些過敏原後產生氣喘 [57]。然而在本研究顯示，家中燒香行為與氣喘危險之間具有一個顯著的反相關；可能由於這些指標是倚賴自我報告，因此是主觀的，而造成暴露的分組錯誤並且減弱相關的危險性。

總結，我們的研究觀察到 TGF-β1、MMP-9 和 IL-17 基因型可能是台灣兒童氣喘發展的重要調控因子，值得未來的研究加以驗證我們的發現。

致謝

本研究感謝國科會大專生研究計劃的經費補助 (NSC102-2815-C-040-054-B)，以及研究室全體同學的幫忙。

參考文獻

1. Braunwald E. Fauci AS. Kasper DL. Hauser SL. Longo DL. Jameson JL. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing. pp1456-63, 2001.
2. Finotto S. Neurath MF. Glickman JN. Qin S. Lehr HA. Green FH. Ackerman K. Haley K. Galle PR. Szabo SJ. Drazen JM. De Sanctis GT. Glimcher LH. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. Science. 295(5553):336-8, 2002.
3. Lange P. Parner J. Vestbo J. Schnohr P. Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilator function in adults with asthma. N Engl J Med. 339(17):1194-200, 1998.
4. Redington AE. Roche WR. Holgate ST. Howarth PH. Co-localization of immunoreactive transforming growth factor-beta 1 and decorin in bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects. J Pathol. 186(4):410-5, 1998.
5. Blobe GC. Schiemann WP. Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. N Engl J Med. 342(18):1350-8, 2000.
6. Minshall EM. Leung DY. Martin RJ. Song YL. Cameron L. Ernst P. Hamid Q. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 17(3):326-33, 1997.
7. Ohno I. Nitta Y. Yamauchi K. Hoshi H. Honma M. Woolley K. O'Byrne P. Tamura G. Jordana M. Shirato K. Transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) gene expression by eosinophils in asthmatic airway inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. 15(3):404-9, 1996.

8. Redington AE. Roche WR. Madden J. Frew AJ. Djukanovic R. Holgate ST. Howarth PH. Basic fibroblast growth factor in asthma: measurement in bronchoalveolar lavage fluid basally and following allergen challenge. J Allergy Clin Immunol. 107(2):384-7, 2001.
9. Roche WR. Beasley R. Williams JH. Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. Lancet. 1(8637):520-4, 1989.
10. Sime PJ. Xing Z. Graham FL. Csaky KG. Gauldie J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. J Clin Invest. 100(4):768-76, 1997.
11. Ignotz RA. Massagué J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J Biol Chem. 261(9):4337-45, 1986.
12. Jatakanon A. Uasuf C. Maziak W. Lim S. Chung KF. Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. Am J Respir Crit Care Med. 160(5 Pt 1):1532-9, 1999.
13. Matsumoto H. Niimi A. Takemura M. Ueda T. Minakuchi M. Tabuena R. Chin K. Mio T. Ito Y. Muro S. Hirai T. Morita S. Fukuhara S. Mishima M. Relationship of airway wall thickening to an imbalance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in asthma. Thorax. 60(4):277-81, 2005.
14. Nagase H. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 274(31):21491-4, 1999.
15. Parks WC. Wilson CL. López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. Nat Rev Immunol. 4(8):617-29, 2004.
16. Lee YM. Kim SS. Kim HA. Suh YJ. Lee SK. Nahm DH. Park HS. Eosinophil

inflammation of nasal polyp tissue: relationships with matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and transforming growth factor-beta1. J Korean Med Sci. 18(1):97-102, 2003.

17. Fouser LA. Wright JF. Dunussi-Joannopoulos K. Collins M. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. Immunol Rev. 226:87-102, 2008.
18. Zhao Y. Yang J. Gao YD. Guo W. Th17 immunity in patients with allergic asthma. Int Arch Allergy Immunol. 151(4):297-307, 2010.
19. Al-Ramli W. Préfontaine D. Chouiali F. Martin JG. Olivenstein R. Lemière C. Hamid Q. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. J Allergy Clin Immunol. 123(5):1185-7, 2009.
20. Lajoie S. Lewkowich IP. Suzuki Y. Clark JR. Sproles AA. Dienger K. Budelsky AL. Wills-Karp M. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. Nat Immunol. 11(10):928-35, 2010.
21. Lindén A. Interleukin-17 and airway remodelling. Pulm Pharmacol Ther. 19(1):47-50, 2006.
22. Sergejeva S. Ivanov S. Lötvall J. Lindén A. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. 33(3):248-53, 2005.
23. Chang Y. Al-Alwan L. Risse PA. Roussel L. Rousseau S. Halayko AJ. Martin JG. Hamid Q. Eidelman DH. TH17 cytokines induce human airway smooth muscle cell migration. J Allergy Clin Immunol. 127(4):1046-53, 2011.
24. Fujii D. Brissenden JE. Derynck R. Francke U. Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7.

Somat Cell Mol Genet. 12(3):281-8, 1986.

25. Grainger DJ. Heathcote K. Chiano M. Snieder H. Kemp PR. Metcalfe JC. Carter ND. Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. Hum Mol Genet. 8:93-7, 1999.
26. Hobbs K. Negri J. Klinnert M. Rosenwasser LJ. Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. Am J Respir Crit Care Med. 158(6):1958-62, 1998.
27. Zhang B. Henney A. Eriksson P. Hamsten A. Watkins H. Ye S. Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. Hum Genet. 105(5):418-23, 1999.
28. Daniels SE. Bhattacharrya S. James A. Leaves NI. Young A. Hill MR. Faux JA. Ryan GF. le Söuef PN. Lathrop GM. Musk AW. Cookson WO. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. Nature. 383(6597):247-50, 1996.
29. Wjst M. Specific IgE--one gene fits all? German Asthma Genetics Group. Clin Exp Allergy. 29 Suppl 4:5-10, 1999.
30. Yuan HY. Chiou JJ. Tseng WH. Liu CH. Liu CK. Lin YJ. Wang HH. Yao A. Chen YT. Hsu CN. FASTSNP: an always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization. Nucleic Acids Res. 34(Web Server issue):W635-41, 2006.
31. Hu Z. Huo X. Lu D. Qian J. Zhou J. Chen Y. Xu L. Ma H. Zhu J. Wei Q. Shen H. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. Clin Cancer Res. 11(15):5433-9, 2005.
32. Yasmin. McEniery CM. O'Shaughnessy KM. Harnett P. Arshad A. Wallace S.

Maki-Petaja K. McDonnell B. Ashby MJ. Brown J. Cockcroft JR. Wilkinson IB. Variation in the human matrix metalloproteinase-9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26(8):1799-805, 2006.

33. Pinto LA. Depner M. Klopp N. Illig T. Vogelberg C. von Mutius E. Kabesch M. MMP-9 gene variants increase the risk for non-atopic asthma in children. Respir Res. 11:23, 2010.
34. Ganter K. Deichmann KA. Heinzmann A. Association study of polymorphisms within matrix metalloproteinase 9 with bronchial asthma. Int J Immunogenet. 32(4):233-6, 2005.
35. Awasthi A. Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. Int Immunol. 21(5):489-98, 2009
36. Bazzi MD. Sultan MA. Al Tassan N. Alanazi M. Al-Amri A. Al-Hajjaj MS. Al-Muhsen S. Alba-Concepcion K. Warsy A. Interleukin 17A and F and asthma in Saudi Arabia: gene polymorphisms and protein levels. J Investig Allergol Clin Immunol. 21(7):551-5, 2011.
37. Kawaguchi M . Takahashi D. Hizawa N. Suzuki S. Matsukura S. Kokubu F. Maeda Y. Fukui Y. Konno S. Huang SK. Nishimura M. Adachi M. IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity. J Allergy Clin Immunol. 117(4):795-801, 2006.
38. Chen B. Zeng Z. Hou J. Chen M. Gao X. Hu P. Association of interleukin-17F 7488 single nucleotide polymorphism and inflammatory bowel disease in the Chinese population. Scand J Gastroenterol. 44(6):720-6, 2009.
39. Anonymous. Global strategy for asthma management and prevention

NHLBI/WHO workshop report. Global initiative for asthma. Washington, DC: NHLBI, 1994.

40. Lee CS. Tang RB. Chung RL. The evaluation of allergens and allergic diseases in children. J Microbiol Immunol Infect. 33(4):227-32, 2000.
41. De Ruyck K. Van Eijkeren M. Claes K. Bacher K. Vral A. De Neve W. Thierens H. TGFbeta1 polymorphisms and late clinical radiosensitivity in patients treated for gynecologic tumors. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 65(4):1240-8, 2006.
42. Custovic A. Taggart SC. Francis HC. Chapman MD. Woodcock A. Exposure to house dust mite allergens and the clinical activity of asthma. J Allergy Clin Immunol. 98(1):64-72, 1996.
43. Leaderer BP. Belanger K. Triche E. Holford T. Gold DR. Kim Y. Jankun T. Ren P. McSharry Je JE. Platts-Mills TA. Chapman MD. Bracken MB. Dust mite, cockroach, cat, and dog allergen concentrations in homes of asthmatic children in the northeastern United States: impact of socioeconomic factors and population density. Environ Health Perspect. 110(4):419-25, 2002.
44. Zheng T. Niu S. Lu B. Fan X. Sun F. Wang J. Zhang Y. Zhang B. Owens P. Hao L. Li Y. Leaderer B. Childhood asthma in Beijing, China: a population-based case-control study. Am J Epidemiol. 156(10):977-83, 2002.
45. Gilliland FD. Li YF. Dubeau L. Berhane K. Avol E. McConnell R. Gauderman WJ. Peters JM. Effects of glutathione S-transferase M1, maternal smoking during pregnancy, and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. Am J Respir Crit Care Med. 166(4):457-63, 2002.
46. Ricciardolo FL. Di Stefano A. van Krieken JH. Sont JK. van Schadewijk A. Rabe KF. Donner CF. Hiemstra PS. Sterk PJ. Mauad T. Proliferation and inflammation in bronchial epithelium after allergen in atopic asthmatics. Clin Exp Allergy.

33(7):905-11, 2003.

47. Nakajima H. Takatsu K. Role of cytokines in allergic airway inflammation. Int Arch Allergy Immunol. 142(4):265-73, 2007.

48. Pryor WA. Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate, and peroxynitrite. Ann N Y Acad Sci. 686:12- 27, 1993.

49. Rahman I. Skwarska E. MacNee W. Attenuation of oxidant/antioxidant imbalance during treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Thorax. 52(6):565-8, 1997.

50. Indelicato M. Chiarenza V. Libra M. Malaponte G. Bevelacqua V. Marchini M. McCubrey JA. Stivala F. Scorza R. Mazzarino MC. Analysis of TIMP-1 gene polymorphisms in Italian sclerodermic patients. J Clin Lab Anal. 20(5):173-6, 2006.

51. Meijer MJ. Mieremet-Ooms MA. van Hogezand RA. Lamers CB. Hommes DW. Verspaget HW. Role of matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 13(21):2960-6, 2007.

52. Holgate ST. Polosa R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. Lancet. 368(9537):780-93, 2006.

53. Martinez FD. Maturation of immune responses at the beginning of asthma. J Allergy Clin Immunol. 103(3 Pt 1):355-61, 1999.

54. Acatonia SE. Hosken NA. Litton M. Vieira P. Hsieh CS. Culpepper JA. Wysocka M. Trinchieri G. Murphy KM. O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. J Immunol. 154(10):5071-9, 1995.

55. Frischer T. Kuehr J. Meinert R. Karmaus W. Urbanek R. Risk factors for childhood asthma and recurrent wheezy bronchitis. Eur J Pediatr. 152(9):771-5, 1993.

56. Burke W. Fesinmeyer M. Reed K. Hampson L. Carlsten C. Family history as a predictor of asthma risk. Am J Prev Med. 24(2):160-9, 2003.

57. Christiani DC. Ye TT. Zhang S. Wegman DH. Eisen EA. Ryan LA. Olenchock SA. Pothier L. Dai HL. Cotton dust and endotoxin exposure and long-term decline in lung function: results of a longitudinal study. Am J Ind Med. 35(4):321-31, 1999.

表一：兒童氣喘病例及配對對照之基本特徵與環境因子的配對相對危險性

	病例	對照		
變項	n = 249	n= 249	RR_m (95% C.I.)[a]	*P* 值
年齡	9.6 ± 2.3	9.9 ± 2.1		0.82
性別				
男生	138 (55.4%)	138 (55.4%)	1.00 (0.70-1.42)	
女生	111 (44.6%)	111 (44.6%)	1.00 (reference)	
父母教育程度				
大學以上	119 (47.8%)	76 (30.5%)	4.48 (2.23-9.04)	< 0.01
高中	109 (43.8%)	128 (51.4%)	2.21 (1.15-4.24)	0.02
高中以下	21 (8.4%)	45 (18.1%)	1.00 (reference)	
氣喘家族史				
有	95 (38.2%)	30 (12.0%)	4.61 (2.77-7.67)	< 0.01
無	154 (61.8%)	219 (88.0%)	1.00 (reference)	
二手菸暴露狀況				
＞5 支/天	115 (46.2%)	84 (33.7%)	1.49 (1.01-2.20)	0.04
1-5 支/天	17 (6.8%)	44 (17.7%)	0.43 (0.23-0.77)	< 0.01
0 支/天	117 (47.0%)	121 (48.6%)	1.00 (reference)	
家中燒香				
有	159 (63.9%)	183 (73.5%)	0.65 (0.45-0.95)	0.03
無	90 (36.1%)	66 (26.5%)	1.00 (reference)	
家中從事紡織類工作				
有	28 (11.2%)	22 (8.8%)	1.28 (0.72-2.27)	0.38
無	221 (88.8%)	227 (91.2%)	1.00 (reference)	
飼養寵物				
有	56 (22.5%)	58 (23.3%)	0.95 (0.63-1.45)	0.83
無	193 (77.5%)	191 (76.7%)	1.00 (reference)	
家中潮濕度				
有	45 (18.1%)	32 (12.9%)	1.50 (0.91-2.46)	0.11
無	204 (81.9%)	217 (87.1%)	1.00 (reference)	
寢室有無蟑螂				

有	129 (51.8%)	117 (47.0%)	1.20 (0.85-1.69)	0.29
無	120 (48.2%)	132 (53.0%)	1.00 (reference)	
過敏原測試				
陽性	159 (63.9%)	102 (41.0%)	2.58 (1.75-3.79)	< 0.01
陰性	90 (36.1%)	147 (59.0%)	1.00 (reference)	
FEV1%預測值				
< 80%	171 (68.7%)	54 (21.7%)	8.80 (5.16-15.01)	< 0.01
≥ 80%	78 (31.3%)	195 (78.3%)	1.00 (reference)	
血清 IgE 濃度 > 100 IU/ml	177 (71.1%)			
Q1-Q3	146.0-1038			
Log_{10} (IgE)	2.5 ± 0.6			
嗜伊紅性白血球數目 > 100/mm	180 (72.3%)			
Q1-Q3	150.0-640.0			
Log_{10} (嗜伊紅性白血球)	2.5 ± 0.5			

[a] 病例和對照是以性別及年齡進行配對。

表二：兒童氣喘病例與健康對照之 TGF-β1、MMP-9 以及 IL-17 基因頻率

變項		病例 n = 249	對照 n = 249	RR_m (95% C.I.)[a]	*P* 值
TGF-β1 rs1800469					
基因型	TT	70 (28.1%)	92 (36.9%)	0.99 (0.45-2.20)	0.99
	CT	154 (61.9%)	121 (48.6%)	2.42 (1.13-5.23)	0.02
	CC	25 (10.0%)	36 (14.5%)	1.00 (reference)	
對偶基因	T	294 (59.0%)	305 (61.2%)	0.81 (0.59-1.09)	0.17
	C	204 (41.0%)	193 (38.8%)	1.00 (reference)	
MMP-9 rs17576					
基因型	AA	40 (16.1%)	26 (10.4%)	1.18 (0.56-2.48)	0.65
	AG	93 (37.3%)	135 (54.2%)	0.50 (0.31-0.81)	< 0.01
	GG	116 (46.6%)	88 (35.3%)	1.00 (reference)	
對偶基因	A	173 (34.7%)	187 (37.5%)	0.87 (0.63-1.18)	0.37
	G	325 (65.3%)	311 (62.5%)	1.00 (reference)	
MMP-9 rs2274756					
基因型	AA	9 (3.6%)	10 (4.0%)	0.65 (0.18-2.29)	0.53
	AG	47 (18.9%)	78 (31.3%)	0.45 (0.26-0.75)	< 0.01
	GG	193 (77.5%)	161 (64.7%)	1.00 (reference)	
對偶基因	A	65 (13.1%)	98 (19.7%)	0.54 (0.35-0.84)	< 0.01
	G	433 (86.9%)	400 (80.3%)	1.00 (reference)	
IL-17A rs17880588					
基因型	GG	207 (83.1%)	237 (95.2%)	0.18 (0.08-0.43)	< 0.01
	AG	42 (16.9%)	12 (4.8%)	1.00 (reference)	
	AA	0 (0.0%)	0 (0.0%)		
對偶基因	G	456 (91.6%)	486 (97.6%)	0.23 (0.10-0.48)	< 0.01
	A	42 (8.4%)	12 (2.4%)	1.00 (reference)	
IL-17F rs763780					
基因型	TT	187 (75.1%)	195 (78.3%)	0.72 (0.21-2.51)	0.60
	CT	51 (20.5%)	49 (19.7%)	0.83 (0.22-3.10)	0.78
	CC	11 (4.4%)	5 (2.0%)	1.00 (reference)	

對偶基因	T	425 (85.3%)	439 (88.2%)	0.84 (0.53-1.32)	0.46
	C	73 (14.7%)	59 (11.8%)	1.00 (reference)	

[a] 相對危險性是調整父母親教育程度、氣喘家族史、家中燒香、二手菸暴露以及過敏原測試等變項；並且對照是以病例之年齡與性別進行配對。

[b] rs17576 無符合哈溫平衡

表三：過敏原測試結果與 TGF-β1、MMP-9 以及 IL-17 基因型於調整後之氣喘發生危險合併效應

	過敏原測試陽性			過敏原測試陰性		
	病例	對照		病例	對照	
變項	n = 159	n = 102	RR_m (95% C.I.)[a]	n = 90	n = 147	RR_m (95% C.I.)[a]
TGF-β1 rs1800469						
TT	51 (32.1%)	42 (41.2%)	1.86 (0.42-3.32)	19 (21.1%)	50 (34.0%)	0.83 (0.33-2.10)
CT	96 (60.4%)	49 (48.0%)	2.48 (0.91-6.78)	58 (64.5%)	72 (49.0%)	1.68 (0.73-3.85)
CC	12 (7.5%)	11 (10.8%)	1.00 (reference)	13 (13.4%)	25 (17.0%)	1.00 (reference)
交互作用檢定			χ^2 = 0.01 (1 df); P = 0.91			
MMP-9 rs17576						
AA	26 (16.4%)	11 (10.8%)	1.21 (0.47-3.15)	14 (15.5%)	15 (10.2%)	1.16 (0.47-2.88)
AG	60 (37.7%)	63 (61.8%)	0.48 (0.26-0.90)*	33 (36.7%)	72 (49.0%)	0.62 (0.33-1.47)
GG	73 (45.9%)	28 (27.4%)	1.00 (reference)	43 (47.8%)	60 (40.8%)	1.00 (reference)
交互作用檢定			χ^2 = 0.08 (1 df); P = 0.78			
MMP-9 rs2274756						
AA	6 (3.8%)	3 (2.9%)	0.68 (0.13-3.60)	3 (3.3%)	7 (4.8%)	0.43 (0.09-1.89)
AG	24 (15.1%)	29 (28.5%)	0.34 (0.17-0.68)**	23 (25.6%)	49 (33.3%)	0.62 (0.32-1.18)
GG	129 (81.1%)	70 (68.6%)	1.00 (reference)	64 (71.1%)	91 (61.9%)	1.00 (reference)
交互作用檢定			χ^2 = 0.30 (1 df); P = 0.59			
IL-17A rs17880588						
GG	132 (83.0%)	98 (96.1%)	0.17 (0.05-0.56)*	75 (83.3%)	139 (94.6%)	0.27 (0.10-0.73)*
AG	27 (17.0%)	4 (3.9%)	1.00 (reference)	15 (16.7%)	8 (5.4%)	1.00 (reference)

AA	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	0 (0%)	
交互作用檢定			χ^2 = 0.28 (1 df); P = 0.605			
IL-17F rs763780						
TT	119 (74.8%)	78 (76.5%)	0.58 (0.13-2.53)	68 (76.6%)	117 (79.6%)	0.34 (0.05-2.06)
CT	33 (20.8%)	21 (21.0%)	0.82 (0.17-3.96)	18 (20.0%)	28 (19.0%)	0.39 (0.05-2.58)
CC	7 (4.4%)	3 (2.9%)	1.00 (reference)	4 (4.4%)	2 (1.4%)	1.00 (reference)
交互作用檢定			χ^2 = 0.002 (1 df); P = 0.96			

[a] 相對危險性是以條件式邏輯斯迴歸模式計算，並且調整父母親教育程度、氣喘家族史、二手菸暴露以及家中燒香之變項。

$^{**}P < 0.01$，$^{*}0.01 < P < 0.05$。

表四：二手菸暴露狀況與 TGF-β1、MMP-9 以及 IL-17 基因型於調整後之氣喘發生危險合併效應

	二手菸暴露狀況								
	＞5 支/天			1-5 支/天			0 支/天		
	病例	對照		病例	對照		病例	對照	
變項	n = 115	n = 84	RR_m (95% C.I.)[a]	n = 17	n = 44	RR_m (95% C.I.)[a]	n = 117	n = 121	RR_m (95% C.I.)[a]
TGF-β1 rs1800469									
TT	36 (31.3%)	36 (42.9%)	0.85 (0.27-2.61)	3 (17.6%)	12 (27.3%)	2.09 (0.12-37.37)	31 (26.5%)	44 (36.4%)	1.16 (0.45-3.00)
CT	68 (59.1%)	38 (45.2%)	1.48 (0.51-4.36)	13 (76.5%)	26 (59.1%)	5.81 (0.37-89.76)	73 (62.4%)	57 (47.1%)	2.30 (0.95-5.58)
CC	11 (9.6%)	10 (11.9%)	1.00 (reference)	1 (5.9%)	6 (13.6%)	1.00 (reference)	13 (11.1%)	20 (16.5%)	1.00 (reference)
交互作用檢定	χ^2 = 0.12 (1 df); P = 0.73								
MMP-9 rs17576									
AA	24 (20.9%)	5 (6.0%)	2.75 (0.86-8.81)	2 (11.8%)	7 (15.9%)	0.20 (0.02-2.08)	14 (12.0%)	14 (11.6%)	0.78 (0.31-2.02)
AG	40 (34.8%)	48 (57.1%)	0.54 (0.37-1.08)	6 (35.3%)	23 (52.3%)	0.12 (0.02-0.74)*	47 (40.1%)	64 (52.9%)	0.60 (0.32-1.11)
GG	51 (44.3%)	31 (36.9%)	1.00 (reference)	9 (52.9%)	14 (31.8%)	1.00 (reference)	56 (47.9%)	43 (35.5%)	1.00 (reference)
交互作用檢定	χ^2 = 0.49 (1 df); P = 0.49								
MMP-9 rs2274756									
AA	71(6.1%)	6 (7.1%)	0.75 (0.18-3.03)	11 (5.9%)	11 (2.3%)	3.91 (018-84.67)	11(0.8%)	31(2.5%)	0.24 (0.02-2.71)
AG	23 (20.0%)	24 (28.6%)	0.47 (0.22-1.04)	3 (17.6%)	13 (29.5%)	0.42 (0.07-2.23)	21 (17.9%)	41 (33.9%)	0.52 (0.26-1.02)
GG	85 (73.9%)	54 (64.3%)	1.00 (reference)	13 (76.5%)	30 (68.2%)	1.00 (reference)	95 (81.2%)	77 (63.6%)	1.00 (reference)
交互作用檢定	χ^2 = 0.26 (1 df); P = 0.61								

IL-17A rs17880588									
GG	101 (87.8%)	78 (92.9%)	0.56 (0.18-1.68)	13 (76.5%)	42 (95.5%)	0.18 (0.03-1.29)	93 (79.5%)	117 (96.7%)	0.12 (0.04-0.37)*
AG	14 (12.2%)	6 (7.1%)	1.00 (reference)	4 (23.5%)	2 (4.5%)	1.00 (reference)	24 (20.5%)	4 (3.3%)	1.00 (reference)
AA	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-
交互作用檢定	χ^2 = 0.32 (1 df); P = 0.57								
IL-17F rs763780									
TT	84 (73.0%)	64 (76.2%)	0.58 (0.12-2.81)	10 (58.8%)	33 (75.0%)	0.53 (0.12-2.27)	93 (79.5%)	98 (81.0%)	0.36 (0.06-2.14)
CT	25 (21.7%)	17 (20.2%)	0.75 (0.13-4.01)	7 (41.2%)	11 (25.0%)	1.00 (reference)	19 (16.2%)	21 (17.4%)	0.46 (0.07-3.03)
CC	6 (5.3%)	3 (3.6%)	1.00 (reference)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-	5 (4.3%)	2 (1.6%)	1.00 (reference)
交互作用檢定	χ^2 = 2.01 (1 df); P = 0.16								

[a] 相對危險性是以性是以條件式邏輯斯迴歸模式計算，並且調整父母親教育程度、氣喘家族史、過敏原測試以及家中燒香之變項。

**$P < 0.01$，*$0.01 < P < 0.05$。