

TLR4 基因 rs4986790 和 rs4986791 位点多态性与幽门螺杆菌感染的研究*

舒 颖, 张平安[△], 童永清(武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

【摘要】 目的 检测湖北地区人群 Toll 样受体 4(TLR4) 基因 rs4986790 和 rs4986791 位点单核苷酸多态性, 以及与幽门螺杆菌(Hp)感染的关系。**方法** 收集 2012 年 12 月至 2013 年 6 月在武汉大学人民医院内镜中心进行胃镜活检的就诊患者 326 例, 同时采集患者外周血。采用免疫胶体金法检测患者外周血中 Hp 抗体。采用等位基因特异性聚合酶链反应检测 TLR4 基因 rs4986790 和 rs4986791 位点多态性。**结果** TLR4 基因 rs4986790 位点在所有研究对象中基因型均为 AA 型, TLR4 基因 rs4986791 位点在所有研究对象中基因型均为 CC 型。**结论** 湖北地区人群 TLR4 基因 rs4986790 和 rs4986791 位点不存在多态性, 湖北地区人群 Hp 感染与 rs4986790 和 rs4986791 2 个位点多态性不存在相关性。

【关键词】 Toll 样受体 4 基因; 单核苷酸多态性; 幽门螺杆菌

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.03.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)03-0295-03

Research of rs4986790 and rs4986791 single nucleotide polymorphisms in TLR4 and susceptibility of helicobacter pylori infection* SHU Ying, ZHANG Ping-an[△], TONG Yong-qing (Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

【Abstract】 Objective To access the the possible contribution of Toll like receptor 4(TLR4) gene rs4986790 and rs4986791 polymorphism and to define association between TLR4 genotype and susceptibility of helicobacter pylori infection. **Methods** A total of 326 patients who had been examined by gastroscopy were obtained from the endoscopy center of Renmin Hospital of Wuhan University between December 2012 and June 2013. Immune colloidal gold method was used to testing the serological Hp antibody of all the patients. The TLR4 gene rs4986790 and rs4986791 polymorphisms were examined by alleles specific polymerase chain reaction. **Results** All the individuals had the same TLR4 rs4986790 genotypes(AA), and all the individuals had the same TLR4 rs4986791 genotypes(CC). **Conclusion** None polymorphisms of rs4986790 and rs4986791 were detected in Hubei populations, and showed no relationship between TLR4 genotype and susceptibility of helicobacter pylori infection.

【Key words】 Toll like receptor 4 gene; single nucleotide polymorphism; helicobacter pylori

幽门螺杆菌(Hp)是一种多鞭毛、螺旋状、微需氧的革兰阴性菌,是人类最常见的慢性感染菌之一,定居在人体胃黏膜表层的黏膜层,感染后不予治疗可能会终生定植。1982 年 Warren 和 Marshall 从人胃黏膜中分离培养出 Hp 后,经过 20 多年的研究表明, Hp 为慢性活动性胃炎的主要致病菌,是消化性溃疡的重要致病因素,是胃癌重要的危险因素,世界卫生组织已将其列为一类致癌物^[1]。然而,在不同人群中, Hp 感染率并不相同,全球 Hp 感染率大约占 50.00%^[2-3],我国自然人群 Hp 总感染率为 56.22%^[4],湖北地区 Hp 感染率为 58.90%^[5]。Hp 感染除了与所接触到的细菌数量、细菌毒力及环境因素存在一定的关系外,还可能与宿主本身的遗传易感性有一定的关系。Toll 样受体 4(TLR4)是革兰阴性细菌脂多糖(LPS)的受体,在 LPS 诱导的信号转导途径中起着重要作用。因此,本文拟探讨湖北地区人群中 TLR4 基因 rs4986790 和 rs4986791 位点多态性与 Hp 感染的关系,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 12 月至 2013 年 6 月在武汉大学人民医院内镜中心进行胃镜活检的就诊患者 326 例,男 202 例,女 124 例,平均年龄(46.8±6.3)岁。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 采集所有研究对象空腹静脉血 3 mL,取 1 mL 分离出血清,-20℃保存备用;2 mL 置于乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)抗凝试管中充分混匀,-20℃保存备用。

1.2.2 Hp 抗体检测 采用免疫胶体金法检测 Hp 抗体,试剂盒由深圳市惠安生物科技有限公司提供,灵敏度 92.3%,特异性 97.7%。

1.2.3 仪器与试剂 全血基因组 DNA 提取试剂盒(上海莱枫生物科技有限公司),超微量核酸分析仪 ND-2000(美国 Thermo Scientific 公司),ABI 9700 基因扩增仪和 DYY-6C 电泳仪(北京六一公司),ABI3130 测序仪和测序所用试剂(美国 Applied Biosystem 公司)。

* 基金项目:国家临床重点专科建设项目资助[财社(2010)305 号]。

作者简介:舒颖,女,在读硕士,主要从事感染性疾病的免疫遗传学研究。△ 通讯作者,E-mail:zhangpingan@aliyun.com。

1.2.4 引物设计 参照 Genbank 中 TLR4 基因序列,采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。针对单核苷酸多态性(SNP)位点 rs4986790 设计 2 对特异性引物,用来鉴别 rs4986790 基因的 3 种基因型(GG 型、AA 型和 GA 型)。针对

SNP 位点 rs4986791 设计 2 对特异性引物,用来鉴别 rs4986791 基因的 3 种基因型(CC 型、TT 型和 CT 型)。引物序列见表 1。

表 1 SNP 位点基因多态性扩增引物

检测位点	基因型及引物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
TLR4 rs4986790	GG 型(4986790G)	F:GCATACTTAGACTACTACCTCGATCG R:CTCAAGGCTTGGTAGATCAACTTC	257
	AA 型(4986790A)	F:GCATACTTAGACTACTACCTCGATCA R:GAGAGATTTGAGTTTCAATGTGGG	189
	内参照(4986790S)	F:CCTGTGCAATTTGACCATTG R:CAAGGCTTGGTAGATCAACTTCTG	290
TLR4 rs4986791	CC 型(4986791C)	F:CAACGTGATTTTGGGACAGC R:GTGTGAGTATGAGAAATGTCAAGG	200
	TT 型(4986791T)	F:TCAAAGTGATTTTGGGACGAT R:TTGCCAGCCATTTTCAAGAC	266
	内参照(4986791S)	F:CTGTAAATTTGGACAGTTTCCCA R:GTGTGAGTATGAGAAATGTCAAGG	360

1.2.5 基因组 DNA 提取 采用基因组 DNA 提取试剂盒提取外周血基因组 DNA,操作过程参照试剂盒使用说明书。DNA 提取完成后-20℃保存备用。

1.2.6 等位基因特异性聚合酶链反应(AS-PCR)扩增 采用 MBI Ferments 2×PCR mix 反应液配制 PCR 扩增体系。rs4986790 PCR 扩增条件:95℃ 3 min;95℃ 30 s,58℃ 50 s,72℃ 1 min,35 个循环;最后 72℃ 10 min。rs4986791 PCR 扩增条件:95℃ 3 min;95℃ 30 s,58℃ 50 s,72℃ 1 min,35 个循环;最后 72℃ 10 min。整个反应过程在 ABI 9700 基因扩增仪上完成。

1.2.7 基因型判读 取 10 μL PCR 产物行 2%琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶成像系统分析 rs4986790 和 rs4986791 基因型。对于同一位点,如果仅出现突变型引物扩增产物,则判定该位点为突变型,如果仅出现野生型引物扩增产物,则判定该位点为野生型,如两种引物均出现扩增产物,则为杂合子。

1.2.8 DNA 测序验证 采取简单随机抽样的方法挑选 30 份不同基因型的 DNA 样本,进行 PCR 后将扩增产物进行凝胶电泳,回收并纯化上述 DNA 条带,在 ABI3130 测序仪上进行测序分析。

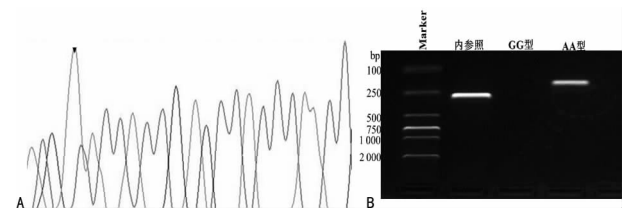
2 结 果

2.1 Hp 抗体检测结果 采用免疫胶体金法检测 326 例研究对象血清标本,Hp 抗体阳性患者有 210 例,Hp 抗体阴性患者 116 例。

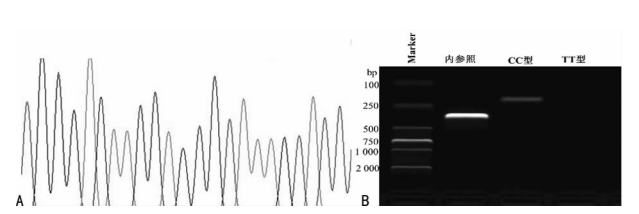
2.2 DNA 测序法与 AS-PCR 检测 rs4986790 和 rs4986791 位点多态性的比较 见图 1、2。以 DNA 测序法作为金标准,两种方法检测的 30 份标本 rs4986790 和 rs4986791 基因型符合率为 100%。

2.3 TLR4 基因 rs4986790 和 rs4986791 位点基因型检测情况 对 326 例 DNA 样本进行分析,均未发现 TLR4 基因

rs4986790 位点和 rs4986791 位点有突变。即 rs4986790 多态性位点均为野生型 A 而未见突变型 G,rs4986791 位点均为野生型 C 而未见突变型 T(图 3)。



注:A 为 DNA 测序法检测结果;B 为 AS-PCR 检测结果。
图 1 DNA 测序法与 AS-PCR 检测 rs4986790 基因型结果



注:A 为 DNA 测序法检测结果;B 为 AS-PCR 检测结果。
图 2 DNA 测序法与 AS-PCR 检测 rs4986791 基因型结果

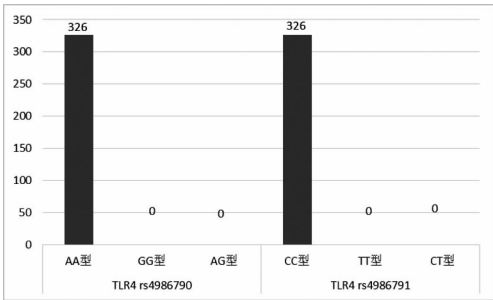


图 3 TLR4 基因 rs4986790 和 rs4986791 位点各基因型分布

3 讨 论

Toll 样受体家族(TLRs)是近年来发现的在抗病原微生物免疫防御反应中起重要作用的受体蛋白,能通过识别细菌、病毒等病原体的相关模式分子,启动天然免疫和调节免疫反应,在联系天然免疫和获得性免疫中也起桥梁作用。近年来有研究表明,TLR 在 Hp 感染所致胃部炎性反应中起至关重要的作用。迄今,在人类已发现了 10 个 TLRs(TLR1~TLR10),它们多表达于抗原提呈细胞及上皮细胞^[6]。TLR4 基因是当前研究最为广泛的 TLRs,其主要配体为细菌 LPS、病毒的包膜蛋白等^[6]。有研究表明,TLR4 能将 LPS 传导通路的信号迅速传至核内,激活核转录因子 κ B 通路,刺激一氧化氮分泌,消灭病原;此外,还能激活有关细胞因子表达,释放促炎细胞因子,激活特异性免疫反应,最终在机体的先天性免疫中起重要作用^[7]。

对于 TLR4 基因 rs4986790 和 rs4986791 2 个位点多态性与 Hp 感染相关性疾病的研究,不同学者有不同的意见。Bagheri 等^[8]的研究表明,在伊朗人群中,TLR4 基因 rs4986790 突变能够增加 Hp 感染相关性胃炎患病风险;Oliveira 和 Silva^[9]的研究表明,在巴西人群中,TLR4 基因 rs4986790 突变与胃癌有明显的易感相关性;Santini 等^[10]在研究意大利人群 TLR4 基因多态性与胃癌的关系中表明,rs4986791 突变能明显增加胃癌的患病风险;Garza-Gonzalez 等^[11]报道墨西哥人群中 TLR4 基因 rs4986790 和 rs4986791 的突变均与晚期胃癌的患病无易感相关性。在本研究中,通过对 TLR4 基因 rs4986790 和 rs4986791 2 个位点的多态性进行检测,发现 326 例研究对象中均未发现有上述突变,这与 Zheng 等^[12]和 Hang 等^[13]的研究结果一致。此外,类似的结果在日本人群中也有报道^[14]。由此提示上述 2 个位点等位基因突变在中国人群乃至亚洲人群中可能极少见或者根本没有突变。这也说明,由于种族和地域差异,TLR4 基因 rs4986790 和 rs4986791 基因多态性有一定差别,并且与疾病的关系也存在明显差异。

综上所述,本研究在湖北地区人群中并没有检测到 TLR4 基因 rs4986790 和 rs4986791 位点多态性,TLR4 基因 rs4986790 和 rs4986791 位点多态性可能与湖北地区人群 Hp 感染并无相关性。至于 TLR4 基因其他多态性位点及 TLR 家族的其他一些基因多态性位点与 Hp 感染关系还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Ferlay J, Autier P, Boniol M, et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006[J]. *Ann Oncol*, 2007, 18(3):581-592.
- [2] 朱琴芳,俞钱,赵星,等.苏州地区健康体检人群幽门螺杆菌感染情况调查研究[J]. *检验医学与临床*, 2012, 9(18): 2269-2270.
- [3] 蒋红妹,周锦仪,蒋立新,等.幽门螺杆菌感染与胃癌术后

- 复发的关系分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2012, 11(20):1615-1616.
- [4] 张万岱,胡伏莲,萧树东,等.中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2010, 15(5):265-270.
- [5] 严红,邱昕光.2 857 例健康体检人员幽门螺杆菌感染调查分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(2):329-330.
- [6] Laj O, Golenbock D, Bowie AG. The history of toll-like receptors-redefining innate immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(6):453-460.
- [7] Guijarro-Munoz I, Compte M, Alvarez-Cienfuegos A, et al. Lipopolysaccharide activates Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF- κ B signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(4):2457-2468.
- [8] Bagheri N, Azadegan-Dehkordi F, Sanei H, et al. Associations of a TLR4 single-nucleotide polymorphism with H. pylori associated gastric diseases in Iranian patients[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2014, 38(3):366-371.
- [9] Oliveira JG, Silva AE. Polymorphisms of the TLR2 and TLR4 genes are associated with risk of gastric cancer in a Brazilian population[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(11):1235-1242.
- [10] Santini D, Angeletti S, Ruzzo A, et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in gastric cancer of intestinal and diffuse histotypes[J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 154(3):360-364.
- [11] Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, et al. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8-251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2007, 7(1):70-76.
- [12] Zheng B, Li Q, Wei C, et al. Lack of association of TLR4 gene Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with rheumatoid arthritis in Chinese Han population of Yunnan Province[J]. *Rheumatol Int*, 2010, 30(9):1249-1252.
- [13] Hang J, Zhou W, Zhang H, et al. TLR4 asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms are very rare in the Chinese population[J]. *J Endotoxin Res*, 2004, 10(4):238-240.
- [14] Tahara T, Arisawa T, Shibata T, et al. Absence of common polymorphisms of toll like receptor 4 (TLR4): asp299Gly, Thr399Ile in patients with gastroduodenal diseases in Japan[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2007, 40(1): 62-65.

(收稿日期:2014-08-20 修回日期:2014-10-22)