

CD14 基因 C-260T 多态性与溃疡性结肠炎的相关性

郭秋莎, 夏冰

郭秋莎, 夏冰, 武汉大学中南医院综合医疗科, 武汉大学中南医院消化病研究中心 湖北省武汉市 430071
国家自然科学基金资助课题, No. 30370638
湖北省卫生厅重点项目(2003)
通讯作者: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市东湖路 169 号, 武汉大学中南医院综合医疗科, 武汉大学中南医院消化病研究中心. bingxia2004@yahoo.com.cn
电话: 027-67812985 传真: 027-87330795
收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

摘要

目的: 研究我国湖北汉族人 CD14 基因 C-260T 多态性的分布及 CD14 基因 C-260T 位点的突变是否与溃疡性结肠炎(UC)相关。

方法: 采用 PCR-RFLP 方法检测 114 例 UC 患者以及 160 例正常对照者 CD14-260 基因型及等位基因频率。

结果: 对上述 274 份 DNA 标本的基因型分析, 发现 CD14-260 基因型在正常对照组与 UC 组间无显著性差异。此基因多态性与 UC 无相关性。

结论: CD14 基因 C-260T 多态性与中国湖北汉族 UC 无明显相关性。CD14 基因不是溃疡性结肠炎的易感基因。

郭秋莎, 夏冰. CD14 基因 C-260T 多态性与溃疡性结肠炎的相关性. 世界华人消化杂志 2005;13(12):1452-1454
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1452.asp>

0 引言

CD14 分子表达于成熟的单核巨噬细胞和活化的中性粒细胞表面, 他与 TLR4、MD2、LPS 结合蛋白(LBP) 共同作用识别病原 LPS 并激活巨噬细胞^[1-3], 产生免疫应答。膜 CD14 与 LPS 结合后激活细胞产生前炎症因子, 氧自由基, 一氧化氮和抗炎症细胞因子, 并上调共刺激分子活化特异性免疫应答^[4-5]。可溶性 CD14(soluble CD14, sCD14) 亦可以识别低浓度 LPS^[6]。近来 CD14 启动子区的多态性位点被发现。在 CD14-260 位点可发生 T → C 的突变^[7]。研究表明携带 T 等位基因者较 C 等位基因者血浆中 sCD14 的浓度显著增高^[8]。有报道发现 CD14-260 基因多态性与炎症性肠病(IBD) 相关^[9-11]。这些研究都表明了 CD14 在激活肠道的免疫反应及 IBD 的发病过程中有一定的作用。鉴于 CD14 在炎症反应中重要作用及其与 IBD 的相关性, 其启动子区的多态性位点可能对溃疡性结肠炎(UC) 的基因易感性及早期预测疾病的转归有一定的影响。故我们对湖北汉族 114 例 UC 患者与 160 例正常对照的 CD14-260 位点的基因型分布进行检测, 以明确中国湖北汉族人 CD14-260 基因多态性的正常分布或基因型频率及与 UC 是否有相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 收集 2001/2003 在武汉大学中南医院以及武汉市其他大型综合医院就诊的湖北汉族无亲缘关系的 UC 患者 114 例以及健康对照者 160 例。UC 诊断标准参照中华医学会消化病学分会 2001 “对炎症性肠病诊断治疗规范的建议”^[12]。健康对照者来自正常体检者。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采血 5 mL, EDTA 抗凝, 常规蛋白酶 K 消化, 苯酚-氯仿提取。提取的 DNA 溶解于 TE 中, -25℃ 保存。

1.2.2 PCR 扩增 在 25 μL 的反应体系中分别加入引物 P₁ (5' -CCTGCAGAATCCTTCCTGTT-3') 和 P₂ (5' -TCACCTCCCCACCTCTCTT-3'), 94℃ 预变性 5 min. 变性 94℃, 30 s; 退火 59℃, 30 s; 延伸 72℃, 60 s; 共 35 次循环。最后彻底延伸于 72℃ 7 min. PCR 产物于 20 g/L 琼脂糖电泳, 并在紫外分析仪下分析鉴定。

1.2.3 PCR 限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP) 将 107 bp 的 PCR 产物用限制性内切酶 *Hae* III 于 37℃ 酶切。当该多态性位点为 C 时, 可酶切为 83 bp 和 24 bp; 当多态性位点为 T 时, 则切不开。酶切产物以 80 g/L 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(100 V, 1.5 h) 分离、硝酸银染色, 以检测基因突变。

统计学处理 通过 SPSS11.0 软件包, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

对 274 份 DNA (160 名正常对照者、114 例 UC 患者) 进行基因型分析, 发现在正常组与 UC 组中, CC 基因型的频率分别为 15.6% 和 8.8%, 而 CT 基因型的分布频率分别为 48.1% 和 54.4%。但无显著性差异 ($P = 0.2267$, 表 1)。将 UC 患者根据性别和病变部位进行分组比较, 在 UC 组各亚型间亦未发现明显差异(表 2)。

表1 CD14-260 等位基因与基因型频率在健康对照组与 UC 组的分布

基因型	健康对照组(n = 160)n(%)	UC(n = 114)n(%)
T/T	58(36.3)	42(36.8)
C/T	77(48.1)	62(54.4)
C/C	25(15.6)	10(8.8)
等位基因	%	%
T	60.3	64.0
C	39.7	36.0

表2 CD14-260 的等位基因频率与基因型频率在 UC 患者性别组与病变部位组中的分布

	基因型频率(%)			等位基因频率(%)	
	TT	CT	CC	T	C
性别					
男性(<i>n</i> = 64)	23(35.9)	37(57.8)	4(6.3)	83(64.8)	45(35.2)
女性(<i>n</i> = 50)	19(38.0)	25(50.0)	6(12.0)	63(63.0)	37(37.0)
部位					
左半结肠炎(<i>n</i> = 51)	6(11.8)	25(49.0)	20(39.2)	37(36.3)	65(63.7)
直肠炎(<i>n</i> = 19)	2(10.5)	10(52.6)	7(36.9)	14(36.8)	24(63.2)
全结肠炎(<i>n</i> = 44)	2(4.5)	27(61.4)	15(34.1)	31(35.2)	57(64.8)

3 讨论

CD14, 作为 TLR4 对 LPS 的协同受体, 以两种形式存在—膜型和可溶型^[13-14]. 膜型 CD14 (mCD14) 表达于单核/巨噬细胞表面, 可被 TLR4 活化; sCD14 则促进 LPS 结合蛋白与不表达 mCD14 的细胞结合. CD14 基因位于 5 号染色体长臂 (5q23-31), 该区包含一个位于 5q22-32 区的细胞因子基因簇和位于 CD14 启动子区 -260 位点的单个碱基的替换^[15]. 该等位基因的突变可通过调节单核细胞表面 CD14 的表达激活单核细胞识别 LPS, 分泌炎症细胞因子如 TNF- α 等^[7].

目前发现 T 等位基因与循环中的 mCD14 的表达增加有关^[7], 故 CD14-260 位点的 C 到 T 的突变可能导致 CD14 基因启动子区的活性增强, 促进 CD14 基因的转录, 使单核细胞高表达 CD14, 从而使炎症应答增强. 此外, 携带 T 等位基因者较携带 C 等位基因者, sCD14 的水平明显增高^[8]. Zareie *et al*^[16] 发现克罗恩病 (CD) 患者的肠固有层单核细胞 (LPMC) 在内毒素 LPS 的作用下自发被激活. 处于活动期的 IBD 患者其 LPMC 的 CD14 表达明显升高^[17-18]. 因此, 肠上皮细胞或 LPMC 的 CD14 通路的活化可能是由炎症反应导致的前炎症细胞因子过度分泌及黏膜损伤的最初的触发机制. 因此, CD14-260 可能是导致个体在对肠道炎症的免疫应答中不同的 CD14 表达水平及免疫应答程度的基因方面的因素. 目前已有关于 CD14 的基因多态性与 IBD 的相关性研究. 在德国人群中的研究显示, CD 与 CD14 基因的等位基因 T、TT 基因型有明显相关性^[10]. 而对日本、加拿大人群及犹太人家庭^[9, 11, 19] 的研究发现该基因与 UC 而不是与 CD 相关.

我们通过 PCR 限制性片段长度多态性分析的方法对 160 名正常人、114 例 UC 患者的 CD14-260 位点的基因多态性进行了检测, 发现该多态性位点的 CC 基因型在正常人群中 (15.6%) 高于 UC 患者 (8.8%), 而 TC 基因型在 UC 患者中 (54.4%) 高于正常人群 (48.1%), 但其无显著性差异. 我们也未发现在 UC 组各亚型间存在显著差异. 提示 CD14 基因与中国汉族 UC 患者无关. 将中国、日本^[9] 及德国^[10] 人群的 CD14-260 位点的等位基因频率及基因型频率进行比较发现存在显著差异 ($P < 0.01$), 提示存在种族差异性. CD14 基因 C-260T 等位基因频率及基因型频率分布

的不同, 将有助于阐明不同种族和不同地区人群在疾病发生机制上的差异.

4 参考文献

- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249:1431-1433
- da Silva CJ, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 2001;276:21129-21135
- Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, Glauser MP, Tobias PS, Ulevitch RJ. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1994;1:509-516
- Schutt C. CD14. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:545-549
- Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338-344
- Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB, Wright SD. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1992;176:1665-1671
- Hubacek JA, Rothe G, Pit'ha J, Skodova Z, Stanek V, Poledne R, Schmitz G. C (-260) -->T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 1999;99:3218-3220
- Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A Polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:976-983
- Obana N, Takahashi S, Kinouchi Y, Negoro K, Takagi S, Hiwatashi N, Shimosegawa T. Ulcerative colitis is associated with a promoter polymorphism of lipopolysaccharide receptor gene, CD14. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:699-704
- Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Duerig N, Epplen JT. A polymorphism in the CD14 gene is associated with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:189-191
- Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton A, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2000;66:1863-1870
- 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华消化杂志* 2001;21:236-239
- Simmons DL, Tan S, Tenen DG. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 1989;73:284-289
- Schutt C, Schilling T, Grunwald U, Schonfeld W, Kruger C. Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD14. *Res Immunol* 1992;143:71-78
- Goyert SM, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata F, Le Beau MM. The CD14 monocyte differentiation antigen

- maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science* 1988;239:497-500
- 16 Zareie M, Singh PK, Irvine EJ, Sherman PM, McKay DM, Perdue MH. Monocyte/macrophage activation by normal bacteria and bacterial products: implications for altered epithelial function in Crohn's disease. *Am J Pathol* 2001;158:1101-1109
- 17 Grimm MC, Pavli P, Van de PE, Doe WF. Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa--implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol*

- 1995;100:291-297
- 18 Rugtveit J, Haraldsen G, Hogasen AK, Bakka A, Brandtzaeg P, Scott H. Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD14+L1+ monocyte derived cells. *Gut* 1995;37:367-373
- 19 Ma Y, Ohmen JD, Li Z, Bentley LG, McElree C, Pressman S, Targan SR, Fischel-Ghodsian N, Rotter JJ, Yang H. A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:271-278

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

可逆型梗阻性黄疸动物模型探讨

王天然, 周 伟, 黄 海, 胡小丽, 李继红, 曾祥元

王天然, 周伟, 黄海, 胡小丽, 李继红, 曾祥元, 成都军区总医院中心实验科
四川省成都市 610083

通讯作者: 王天然, 610083, 四川省成都市天回镇, 成都军区总医院中心实验科, wtr1957@126.com

电话: 028-86570224

收稿日期: 2005-01-21 接受日期: 2005-03-03

摘要

目的: 建立可逆型梗阻性黄疸实验动物模型。

方法: 将兔麻醉、开腹, 以 15 cm 止血钳钳夹胆总管, 闭腹。3、7、14、30 d 测定血清胆红素(TBIL 和 DBIL)、胆汁酸(BA)。

结果: 术后 7 d, 不施钳夹的假手术对照组 TBIL、DBIL 为 5.90 ± 1.50 、 1.60 ± 0.58 mmol/L、BA 为 21.10 ± 13.50 μ mol/L, 与正常兔无明显差异($P > 0.1$); 钳夹实验组 TBIL、DBIL 为 31.10 ± 16.90 、 16.70 ± 9.20 mmol/L, BA 为 61.50 ± 24.50 μ mol/L, 显著高于对照组($P < 0.01$)。钳夹时扣二格、夹 3 min 以上, 全部实验兔 TBIL、DBIL 和 BA 都高于正常兔上限。术后 3-30 d, 各实验组 TBIL、DBIL、BA 均逐渐增加。与对照组比较, 实验组均发生胆管损伤性炎症, 造成胆管阻塞; 30 d 时胆管损伤有所恢复。

结论: 以止血钳钳夹胆总管可造成实验动物可逆型梗阻性黄疸。该病理模型适用于梗阻性黄疸及其对机体各器官、细胞损害和防治研究。

王天然, 周伟, 黄海, 胡小丽, 李继红, 曾祥元. 可逆型梗阻性黄疸动物模型探讨. 世界华人消化杂志 2005;13(12):1454-1456

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1454.asp>

0 引言

梗阻性黄疸是一种常见临床病症, 可引起诸多器官、组织

不同程度损害, 严重危害机体健康甚至生命。近年对梗阻性黄疸对肝、肾、心等器官的损害及防治的研究较多^[1-5], 实验方法均为结扎胆总管造成梗阻性黄疸。此种实验模型是不可逆胆管阻塞, 与多数临床梗阻性黄疸症病情不相符, 故研究结论受到限制。我们旨在建立一种可逆型梗阻性黄疸实验动物模型。

1 材料和方法

1.1 材料 新加坡长耳白兔, 雌雄兼用, 体重 2.5-3.5 kg。共 99 只。标准饲养条件常规饲养。实验开始前禁食 1 d。

1.2 方法 各实验组兔以盐酸氯胺酮(上海第一生化药业有限公司生产; 剂量 20-25 mg/kg, iv) 麻醉, 剪去上腹部毛, 严格消毒皮肤。沿腹壁中线切开约 4-5 cm 开腹, 轻轻翻出十二指肠, 在胆总管结合点上游约 1 cm 处钝性分离胆总管。用 15 cm 止血钳中部钳夹胆总管。然后立即消毒, 缝合创口, 注射硫酸庆大霉素(乐山三九长征药业股份有限公司生产; 剂量 0.8 万单位/只, im), 常规饲养。实验分三批进行。第一批造模时止血钳扣 3 格, 钳 6 min, 分别于术后 3、7、14、30 d 观察, 每时间点 5 只; 每时间点均设假手术对照 5 只。第二批造模时止血钳扣 3 格, 钳 0.5、3、6 min 各 5 只, 对照组 5 只; 术后 7 d 观察。第三批造模时止血钳分别扣 1、2、3 格各 5 只, 钳 3 min, 对照组 5 只; 术后 7 d 观察。各实验组若有死亡, 均以同批实验兔及时补充。各对照组除不钳夹胆管外, 手术过程相同。

观测指标: 血清总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)和胆汁酸(BA)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、 γ -谷氨酰转肽酶