

TLR4基因多态性与慢性胃炎幽门螺杆菌感染无相关性

华开罗, 夏冰, 李春, 郭秋莎

■背景资料

幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染是慢性胃炎的主要病因。脂多糖(LPS)通过Toll样受体4(TLR4)激活NF- κ B, 在抗感染免疫应答中起着启动及调节作用。TLR4基因发生Asp299Gly突变可中断TLR4介导LPS信号传导。本文旨在研究人群TLR4基因-299位点A/G多态性与慢性胃炎及幽门螺杆菌感染的关系。

华开罗, 武汉大学医学院附属中山医院消化内科 湖北省武汉市 430033

夏冰, 武汉大学中南医院综合医疗科 湖北省武汉市 430071
李春, 武汉大学中南医院综合医疗科, 湖北省武汉市 430071

通讯作者: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市东湖路169号, 武汉大学中南医院消化内科. bingxia2004@yahoo.com.cn

电话: 027-67812985-2985 传真: 027-87330795

收稿日期: 2005-12-22 接受日期: 2006-01-26

No association between Toll-like receptor-4 gene polymorphism and *Helicobacter pylori* infection in chronic gastritis

Kai-Luo Hua, Bing Xia, Chun Li, Qiu-Sha Guo

Kai-Luo Hua, Department of Gastroenterology, the Affiliated Zhongshan Hospital of Wuhan University School of Medicine, Wuhan 430033, Hubei Province, China
Bing Xia, Department of Internal Medicine and Geriatrics, Research Center of Digestive Diseases, Zhongnan Hospital, Wuhan University School of Medicine, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Chun Li, Qiu-Sha Guo, Department of Internal Medicine and Geriatrics, Research Center of Digestive Diseases, Zhongnan Hospital, Key Lab of Allergy and Immune-related Diseases, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Bing Xia, Department of Internal Medicine and Geriatrics, Research Center of Digestive Diseases, Zhongnan Hospital, Wuhan University School of Medicine, 169 Donghu Road, Wuhan 430071, Hubei Province, China. bingxia2004@yahoo.com.cn

Received: 2005-12-22

Accepted: 2006-01-26

Abstract

Aims: To study the distribution of Toll-like receptor-4 (TLR4) gene Asp299Gly polymorphism and to define association between TLR4 genotype and *Helicobacter Pylori* associated chronic gastritis in Han Chinese of Hubei province.

Methods: One hundred and fifteen patients with chronic superficial gastritis and 264 healthy controls were genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for TLR4 gene Asp299Gly polymorphism. Meanwhile, *H. pylori* infection was also detected in all the individuals.

Results: The rate of *H. pylori* infection was 89.6% in patients with chronic superficial gastritis, and 61.7% in the healthy controls, and there was significant difference between them ($P < 0.0001$, $OR = 5.319$, 95% CI: 2.784-10.162). All the individuals had the same TLR4 Asp299Gly genotypes (AA). The distributions of the genotypes and allele frequencies of TLR4 Asp299Gly were not significantly different between gastritis patients and healthy controls.

Conclusion: There is no marked correlation between TLR4 Asp299Gly polymorphism and *H. pylori* associated chronic gastritis in Han Chinese of Hubei province.

Key Words: Toll-like receptor 4; *Helicobacter Pylori*; lipopolysaccharide; gene polymorphism

Hua KL, Xia B, Li C, Guo QS. No association between Toll-like receptor-4 gene polymorphism and *Helicobacter pylori* infection in chronic gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(7):718-721

摘要

目的: 研究我国湖北汉族人群TLR4基因Asp299Gly多态性与慢性浅表性胃炎及幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染的关系。

方法: 采用病例-对照研究和多聚酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法, 检测115例慢性浅表性胃炎患者115例和正常对照者264例的TLR4等位基因Asp299Gly基因型分布。

结果: 慢性浅表性胃炎患者的*H. pylori*阳性率89.6%, 显著高于正常对照组61.7% ($P < 0.0001$, $OR = 5.319$, 95% CI: 2.784-10.162)。在*H. pylori*感染相关性的慢性胃炎组和正常对照组中TLR4基因Asp299Gly基因型所有个体均为AA纯合子, 未发现的突变型, 其基因型、等位基因以及携带者频率总体分布无显著性差异。

结论: TLR4基因Asp299Gly基因多态性与*H. pylori*相关性慢性胃炎无明显相关性。

关键词: Toll样受体4; 幽门螺杆菌; 基因多态性

华开罗, 夏冰, 李春, 郭秋莎. TLR4基因多态性与慢性胃炎幽门螺杆菌感染无相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(7):718-721

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/718.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)是人类最常见的慢性感染之一,也是慢性胃炎病因之一。然而,仅极少部分的*H pylori*感染者发展成为慢性胃炎,具体机制除了可能与细菌数量、毒力以及环境因素有关外,可能与宿主的易感性、胃肠黏膜内环境也存在一定的关系。TLR4是细菌LPS的受体^[1],在LPS诱导的信号传导中起着重要作用^[2]。TLR4将LPS传导通路的信号迅速传至核内,激活NF- κ B通路,刺激NO分泌,消灭病原;此外,激活相关细胞因子表达,释放促炎细胞因子,激活特异性免疫反应^[3],因而在机体的先天性免疫中起到重要作用。近年来,Arbour *et al*^[4]证实Asp299Gly多态性与LPS的反应减低有关,Asp299Gly等位基因杂合子和纯合子个体与野生型基因型的个体相比,吸入性LPS的气道反应明显减低。小鼠TLR4基因突变导致对LPS无反应,或LPS信号途径的抑制。野生型TLR4的表达增强可使LPS信号传导增强。我们将TLR4基因与*H pylori*感染相关性慢性胃炎研究联系起来,研究TLR4基因突变与*H pylori*感染相关性慢性胃炎先天性免疫的关系,为阐明*H pylori*感染相关性慢性胃炎的遗传易感性和先天性免疫机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 慢性浅表性胃炎疾病患者115例来源武汉大学中南医院,于2001-12/2003-04经临床、实验室、放射学、内镜及组织学检查综合性诊断,符合悉尼分类标准^[5]。男60例,女55例,平均年龄55.2岁。正常体检者264例,男134例,女130例,平均年龄39.2岁。DNA提取:取3 mL抗凝血,用蛋白酶K(Merck公司)/酚/氯仿法提取基因组DNA。

1.2 方法 TLR4 Asp299Gly基因PCR扩增:PCR引物根据文献[6]设计(PCR(I))primers For *BsaB* I. F1: 5'-ttagaatgaaggaaacttgaaaag-3'. R1: 5'-ttgtcaacaattaataagtgaata-3'. PCR(II)primers For *BstX* I. F2: 5'-agcactactagactaccctcgatg-3'. R2: 5'-gttgccatccgaattataagaaaag-3'),由上海生物工程技术有限公司合成。PCR反应体系总体积25 μ L,含灭菌双蒸水18.5 μ L,10 \times

PCR反应缓冲液2.5 μ L,每侧引物各10 pmol, dNTPs(Clontech公司)(10 mmol/L)0.5 μ L, Taq DNA聚合酶(Biostar公司)1 U, DNA模板1 μ L(约40-100 ng)。反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性3 min,接着38个循环,94 $^{\circ}$ C变性45 s,51 $^{\circ}$ C退火45 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,72 $^{\circ}$ C终末循环5 min,最后置于4 $^{\circ}$ C终止反应。限制性内切酶消化PCR扩增产物:取10 μ L PCR(I)产物,用限制性内切酶*BsaB* I(MBI公司)0.5 μ L(10 MU/L)于65 $^{\circ}$ C消化酶切4 h,于80 $^{\circ}$ C灭活20 min;取10 μ L PCR(II)产物,用限制性内切酶*BstX* I(MBI公司)0.5 μ L(10 MU/L)于55 $^{\circ}$ C消化酶切4 h,后于65 $^{\circ}$ C灭活20 min。对消化后的PCR产物片段采用80 g/L的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(100 V, 1.5 h)分离,硝酸银染色分析基因型。所有研究对象均采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),测定*H pylori*-IgG,检测*H pylori*感染,按照说明常规操作,Detect-ELISA试剂盒由香港大学玛利亚医院惠赠。慢性浅表性胃炎疾病患者同时采用胃窦黏膜组织快速尿素酶试验(pH值指示剂法,试纸提供为福建三强生物化工有限公司),检测*H pylori*感染。正常体检者采用¹⁴C-尿素呼气试验,检测*H pylori*感染。检测前所有研究对象均未行抗*H pylori*治疗。诊断*H pylori*感染参照安徽桐城会议通过的共识意见^[7],2项均为阳性诊断*H pylori*感染。

统计学处理 直接判读个体基因型,以 χ^2 检验和精确概率法检验分析病例组和对照组TLR4 Asp299Gly基因型及等位基因分布差异,统计在SPSS 11.0软件包中进行。 $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 TLR4基因Asp299Gly多态性 在中国湖北汉族人群中,TLR4基因Asp299Gly等位基因位点均为野生型A,未见突变型G等位基因,A频率及AA基因型频率均为100%。扩增的PCR(I)产物长139 bp,PCR(II)产物长131 bp。若TLR4基因Asp299Gly多态性位点碱基为A(腺嘌呤,野生型),则PCR(I)产物被内切酶*BsaB* I酶切后有112 bp和27 bp两个片段;若Asp299Gly多态性位点碱基为G(鸟嘌呤,突变型)时,则PCR(II)产物被内切酶*BstX* I酶切成108 bp和23 bp。故基因型AA纯合子其PCR(I)产物可为*BsaB* I酶切为112 bp和27 bp片段,其PCR(II)产物则不能为*BstX* I切开;基因型GG纯合子其PCR(I)产

■名词解释

Toll样受体(Toll like receptor, TLR)是一类跨膜受体,与I型IL-1受体结构同源,信号传导途径相同,通过识别并结合相应的病原相关模式(PAMP),在免疫应答的诱导和炎症反应中发挥重要作用。TLR4表达于胃肠上皮细胞、DC等多种细胞表面,识别LPS。

■同行评价

疾病发病的遗传学研究是当今临床医学研究的热点,遗传学研究的方法常包括研究参与发病的相关分子基因多态性、以及基因突变等。本文的目的为研究TLR4基因多态性与慢性胃炎幽门螺杆菌感染的相关性,选题较新颖、准确。

物不能为*Bsa*B I 切开,其PCR(II)产物则被*Bst*X I 酶切为108 bp和23 bp片段;基因型AG杂合子其PCR(I)产物可为*Bsa*B I 酶切为112 bp和27 bp片段,PCR(II)产物则被*Bst*X I 酶切为108 bp和23 bp片段。

2.2 TLR4基因Asp299Gly多态性与*H pylori*感染的相关性 慢性胃炎*H pylori*感染率为89.6%,正常对照*H pylori*携带率为61.7%;两组TLR4基因Asp299Gly基因型频率,等位基因频率及携带者频率总体分布无显著性差异,二组TLR4基因Asp299Gly基因型所有个体均为AA纯合子。

3 讨论

研究证明*H pylori*的感染率与社会经济地位是密切相关的,发达国家的感染率是明显低于发展中国家,其成人的感染率<40%,我国人群感染率为20%-80%,在我们的研究中,正常人的*H pylori*感染率是61.7%,与以上的研究结果一致。同时大量研究资料显示:*H pylori*感染率高的地区和国家人群的胃炎的发病率也较高。如发展中国家同发达的欧美国家比较,*H pylori*感染相关胃炎的发病率也高。通过对湖北汉族人群*H pylori*感染的检测,发现胃炎组*H pylori*感染率显著高于对照组($P<0.0001$, $OR = 5.319$, 95% CI: 2.784-10.162)。我们通过PCR限制性片段长度多态性分析的方法,对115例慢性浅表性胃炎患者及264例正常对照者TLR4基因Asp299Gly基因型及等位基因分布进行检测,发现所有样本均为野生型基因型,提示突变基因型在中国湖北汉族人群中少见。

研究发现胃上皮中树突状细胞能通过胃上皮细胞间的紧密连接,到达胃黏液层与*H pylori*接触^[8-9],*H pylori*能够特异地定植于胃黏膜的黏液层下、上皮细胞表面。在活体内胃上皮细胞可以表达TLR^[10]。Bauditz *et al*^[11]对*H pylori*感染相关性胃炎进行研究,发现LPS引起胃黏膜单核细胞分泌大量IL-12,在胃上皮细胞表达的TLRs可以与*H pylori*的LPS相互作用后,通过TLR4/CD14可激活单核巨噬细胞分泌细胞因子^[12],如TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8等,引起胃黏膜的炎症。Su *et al*^[13]发现临床相关的I型*H pylori*和II型*H pylori*感染能激活TLR4基因的表达, Kawahara *et al*^[14]发现I型*H pylori*的脂质A可以激活TLR4途径。我们将慢性胃炎患者按*H pylori*感染分类后,TLR4基因Asp299Gly多态性突变型并不多见,与正常对照组相比无显著差异。我们的研究提示TLR4

基因多态性不影响中国汉族*H pylori*感染相关性慢性浅表性胃炎。

将中国汉族与日本人、英国及德国白种人的TLR4基因的Asp299Gly多态性分布进行了比较,我们发现不同人群中TLR4基因Asp299Gly等位基因频率及基因型频率的分布存在显著性差异。其中中国汉族人与日本人^[6]的分布频率及基因型频率的分布无明显差异性,即均未在所检测的样本中发现TLR4基因Asp299Gly的突变位点,与德国人(5.6%)^[15]、英国人^[16](6.23%)的突变频率存在明显差异。因此,亚洲人该等位基因频率及基因型频率分布较欧洲白种人明显减低,而且TLR4基因Asp299Gly突变基因型并不多见。在中国汉族人群中AA基因型频率(100%)显著高于德国人群(85%)($P<0.0001$, $OR = 99.881$, 95% CI: 5.862-1 701.0)。欧亚人种在TLR4基因Asp299Gly等位基因及基因型频率分布的不同,表明种族差异和遗传背景的不同,可能影响TLR4基因多态性在慢性浅表性胃炎发病的遗传机制中的作用。另外也可能与有CD14协同与TLR4在*H pylori* LPS的抗原呈递和胞内的信号传导中发挥作用有关。TLR4基因多态性在慢性浅表性胃炎疾病的作用,有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 20-26
- 2 Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 2000; 164: 966-972
- 3 Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; 274: 10689-10692
- 4 Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25: 187-191
- 5 Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-1181
- 6 Okayama N, Fujimura K, Suehiro Y, Hamanaka Y, Fujiwara M, Matsubara T, Maekawa T, Hazama S, Oka M, Nohara H, Kayano K, Okita K, Hinoda Y. Simple genotype analysis of the Asp299Gly polymorphism of the Toll-like receptor-4 gene that is associated with lipopolysaccharide hyporesponsiveness. *J Clin Lab Anal* 2002; 16: 56-58
- 7 Consensus on the management of *Helicobacter Pylori* infection: Tongcheng, Anhui Province, 2003. *Chin J*

- Dig Dis* 2004; 5: 186-188
- 8 Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001; 2: 361-367
- 9 Scheinecker C, McHugh R, Shevach EM, Germain RN. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 2002; 196: 1079-1090
- 10 Schmausser B, Andrulis M, Endrich S, Lee SK, Josephans C, Muller-Hermelink HK, Eck M. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter Pylori* infection. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 521-526
- 11 Bauditz J, Ortner M, Bierbaum M, Niedobitek G, Lochs H, Schreiber S. Production of IL-12 in gastritis relates to infection with *Helicobacter Pylori*. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 316-323
- 12 Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002; 347: 185-192
- 13 Su B, Ceponis PJ, Lebel S, Huynh H, Sherman PM. *Helicobacter Pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infect Immun* 2003; 71: 3496-3502
- 14 Kawahara T, Teshima S, Oka A, Sugiyama T, Kishi K, Rokutan K. Type I *Helicobacter Pylori* lipopolysaccharide stimulates toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells. *Infect Immun* 2001; 69: 4382-4389
- 15 Schmitt C, Humeny A, Becker CM, Brune K, Pahl A. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. *Clin Chem* 2002; 48: 1661-1667
- 16 Read RC, Pullin J, Gregory S, Borrow R, Kaczmarek EB, di Giovine FS, Dower SK, Cannings C, Wilson AG. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2001; 184: 640-642

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十二届全国胆道外科学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会外科学分会胆道外科学组拟定于2006-07在辽宁省沈阳市召开第12届全国胆道外科学术会议。此次会议由全国胆道外科学组委托中国医科大学附属第二医院(盛京医院)承办, 中国实用外科杂志社协办。大会将全面展示我国胆道外科近年来的新进展、新成果。届时将邀请国内外知名肝、胆外科专家作专题演讲。凡参会者均颁发国家级继续教育学分证书。现将征集论文的有关事项通知如下:

1 征文内容

(1)胆道外科学基础研究(胆道解剖与胆道疾病、胆石成因、胆道感染、胆道肿瘤、胆胰管结合部异常与胆道先天性疾病); (2)胆道外科的临床研究(胆囊、胆管结石、胆道肿瘤、意外性胆囊癌、胆道损伤、肝移植后胆道狭窄等); (3)胆道外科诊断与治疗的新技术、新方法(腹腔镜技术、内镜技术、介入技术、影像技术等); (4)胆道外科疾病的其他诊疗经验等。

2 征稿要求

(1)请寄论文全文及800字以内的摘要各一份。4号字打印, 附电子稿件。无摘要者恕不受理。(2)论文要求科学性、数据可靠、重点突出、文字精炼且未经发表者。论文须由作者所在单位审查盖章同意, 请在信封正面注明会议征文字样。(3)截稿时间: 2006-05-08(邮戳为准)。稿件邮寄地址: 辽宁省沈阳市和平区三好街36号 中国医科大学附属第二医院 第一微创、胆道外科; 邮政编码: 110004。联系人: 吴硕东。E-mail: wushuodong@yahoo.com.cn