

网络出版时间: 2019-12-18 17:13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20191217.1516.030.html>

Toll 样受体 9 基因多态性和幽门螺杆菌感染的关系

卫星如¹, 马立聪^{1,2}, 田旭阳², 党彤², 高芳³, 贾彦彬^{1,2,4}

摘要 目的 探讨 Toll 样受体 9 (TLR9) 基因多态性与幽门螺杆菌感染的关系。方法 选取体检者 683 例的血液样本, 采用酶联免疫吸附测定方法 (ELISA) 将样本分为幽门螺杆菌阴性组 ($n=305$) 和幽门螺杆菌阳性组 ($n=378$), 采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 法对 TLR9 rs187084、rs352140、rs164640 位点进行基因分型。结果 TLR9 rs187084 TC 基因型可使幽门螺杆菌感染风险降低 (TC vs TT: $OR=0.520$, $95\% CI=0.329 \sim 0.820$); rs164640 携带 AG+GG 基因型者幽门螺杆菌感染风险增加 (AG+GG vs AA: $OR=1.569$, $95\% CI=1.126 \sim 2.187$); rs352140 与幽门螺杆菌感染没有关联。结论 TLR9 rs187084、rs164640 可

能在幽门螺杆菌的感染中起到了一定的作用。

关键词 幽门螺杆菌; TLR9; 单核苷酸多态性

中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)01-0142-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.01.030

幽门螺杆菌 (*helicobacter pylori*, *H. pylori*) 是革兰阴性细菌, 感染了全球 50% 左右的人口^[1]。*H. pylori* 感染与胃肠道疾病的发生发展有关^[2]。然而关于其作用机制尚不明确, 影响 *H. pylori* 感染的因素也不明确。环境和宿主等多种因素的综合作用引起了 *H. pylori* 的感染, 其中宿主因素起着很重要的作用^[3], 而且宿主的遗传改变可以影响 *H. pylori* 的感染状况及临床转归^[4]。研究^[5]发现, Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 作为一种重要的模式受体可以识别多种病原体关联的分子模式, 进而触发信号传导的级联反应, 致使多种炎症因子的生成, 其对于识别 *H. pylori* 感染以及刺激机体产生免疫应答极其重要。该研究旨在检测 TLR9 基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与 *H. pylori* 感染之间的关系, 为以 TLRs 为基础的抗 *H. pylori* 感染治疗提供一定的理论依据。

2019-10-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30960169、81250024、81650017); 内蒙古自然科学基金 [编号: 2016MS0805、2017MS(LH)0807]; 包头医学院科学研究基金 (编号: BYJJ-DF 201603)

作者单位: 包头医学院¹ 基础医学与法医学院、³ 医学技术学院、⁴ 护理学院, 包头 014060

² 包头医学院第二附属医院内蒙古消化病研究所, 包头 014030

作者简介: 卫星如, 女, 硕士研究生;

贾彦彬, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: jyb690318@hotmail.com;

高芳, 女, 讲师, 责任作者, E-mail: 34646929@qq.com

based inhibitory domains (TIGIT) on peripheral natural killer (NK) cells from patients with rheumatoid arthritis (RA) and its significance and to clarify its relation in the development of RA. **Methods** The peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from 33 patients and 27 healthy controls (HCs) were collected and TIGIT expression in the NK cells were detected by flow cytometry. The correlations of TIGIT expression on NK cells with clinical data were analyzed. Student's t test or Mann-Whitney U test was used for comparison between the two groups, and the correlation between the two variables was analyzed by Pearson or Spearman correlation. **Results** ① The percentage of NK cells and NK cells counts were significantly decreased in RA patients compared to the HC ($P=0.0051$; $P<0.0001$); ② The expression mean fluorescence intensity (MFI) of TIGIT on NK cells was significantly decreased in RA patients compared to the HC ($P<0.0001$); ③ The expression MFI of TIGIT on NK cells in RA patients was found to negatively correlate with CRP ($r=-0.3463$, $P=0.0484$); ④ MFI of TIGIT expression in NK cells of RA patients is negatively correlated with rheumatoid factor (RF) and positive RF ($r=-0.3607$, $P=0.0426$; $r=-0.4005$, $P=0.0473$); ⑤ The expression MFI of TIGIT on NK cells was significantly lower early RA patients than in non-early RA patients ($P=0.0385$). **Conclusion** The expression MFI of TIGIT on NK cells is decreased and associated with the inflammation markers, the production of antibodies in RA.

Key words rheumatoid arthritis; NK cells; TIGIT

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 683 例正常体检者,其中男性 459 例,女性 224 例。所有研究样本均为在包头生活 5 年以上,互无血缘关系的汉族人。所有入选者均无癌症病史,无高血压、糖尿病,未接受过 *H. pylori* 清除治疗及胃部手术,并通过内镜窄带成像术(narrow band imaging, NBI)胃镜检查排除了萎缩性胃炎、不完全肠转化、胃及十二指肠溃疡等疾病患者,所用样本采集血样 2 ml,并提供了知情同意书,本研究经包头医学院医学伦理学委员会批准。

1.2 *H. pylori* 的检测 用酶联免疫吸附测定方法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测样本中抗 *H. pylori* 的特异性抗体,人幽门螺旋杆菌抗体(helicobacter pylori antibody, HP-Ab) ELISA 检测试剂盒购自泉州市睿信生物科技有限公司,操作及结果判断严格按照说明书进行。

1.3 SNP 的筛选 根据 Hap Map 数据库(<http://www.Hapmap.org>)所提供的中国汉族人群的信息,使用 Algorithm-Tagger-pairwise Tagging 软件筛选标记单核苷酸多态性(tag-SNP),要求最小等位基因频率(minimum allele frequency, MAF) $\geq 5\%$ 连锁不平衡值 $r_2 > 0.8$ 。在筛选出的 SNP 中,选择文献报道可能和疾病关联的 SNP 进行研究,本研究选择了 3 个 SNP,即 rs187084、rs352140 和 rs164640 进行研究。

1.4 基因分型 采用 DNA 提取试剂盒(天根生物科技有限公司)提取外周血白细胞 DNA。采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)技术对 TLR9 rs187084、rs352140、rs164640 进行基因分型。用 Primer 3 设计引物,由上海捷瑞生物工程有限公司合成引物。PCR 反应体系共 25 μ l,内含 DNA 50 ng、PCR mix 12.5 μ l、上下游引物(5 μ mol/L)各 1 μ l。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,32 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR

引物序列及产物长度见表 1。扩增产物用相应的限制性内切酶进行酶切,酶切反应体系共 10 μ l,内含 PCR 反应产物 3 μ l,10 \times Buffer 1 μ l,内切酶 3 U。在内切酶最适反应温度下作用 60 min 后,2% 琼脂糖凝胶电泳,根据酶切割后出现的片段大小判断基因型,内切酶及相应的反应温度和酶切片段长度见表 1。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。采用检验检测样本是否符合 Hardy-Weinberg 平衡(hardy-weinberg equilibrium, HWE)。采用 Haploview 4.0 软件对 SNP 位点进行连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)分析,用 D' 置信区间法构建单体型块(Haplotype block)。采用非条件 Logistic 回归检测各 SNP 在共显性(codominant)、显性(dominant)、隐性(recessive)遗传模型下与 *H. pylori* 感染的关系,以比值比(odds ratio, OR)值以及 95% 置信区间(confidence intervals, CI)表示,并计算最小信息准则(an information criterion, AIC)、贝叶斯信息准则(bayesian information criterion, BIC)。其中, AIC、BIC 是对模型拟合效果进行评价的指标, AIC、BIC 越小,则模型对数据的拟合越好,模型则为最佳模型。

2 结果

2.1 一般临床资料比较 在 683 例样本中, *H. pylori* 阴性 305 例,年龄 39 ~ 88(58.71 \pm 10.86)岁;男性 206 例,占 67.54%,女性 99 例,占 32.46%。*H. pylori* 阳性 378 例,年龄 38 ~ 89(58.77 \pm 11.36)岁;男性 253 例,占 66.93%,女性 125 例,占 33.07%。研究对象的年龄和性别分布在 *H. pylori* 阴性组和阳性组间的差异无统计学意义(年龄: $t = 0.072$, $P = 0.365$; 性别: $t = 0.028$, $P = 0.866$)。

2.2 TLR9 基因 SNP 位点与 *H. pylori* 感染的关系

在 683 例样本中,TLR9 基因 rs187084、rs352140 和 rs164640 位点的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。分别用 3 种遗传模式对 TLR9 与

表 1 TLR9 rs187084、rs352140 和 rs164640 引物序列、内切酶和反应温度及酶切片段长度

SNP	引物序列(5'-3')	PCR 长度(bp)	内切酶	反应温度($^{\circ}$ C)	酶切后的片段长度(bp)
rs187084	F: CATTCAATCAGCCCTTCACTCAG	356	AflIII	37	TT: 209,147
	R: TATGTCTCTGCTCCCATGTCAC				TC: 356,209,147 CC: 356
rs352140	F: CTTGGCTGTGGATGTTGTTG	237	BstUI	60	CC: 140,97
	R: TCAATGGCTCCCAAGTTC				TC: 237,97,140 TT: 237
rs164640	F: GGAAGAAGCTGCTCCAACAC	206	BstYI	37	GG: 119,87
	R: CTGCCCCGTGGTTCTATACT				AG: 206,119,87 AA: 206

表2 不同遗传模式下,TLR9 基因 SNP 位点与 *H. pylori* 感染风险的关系 [n(%)]

SNP	模型	基因型	<i>H. pylori</i> (-)	<i>H. pylori</i> (+)	OR (95% CI) *	AIC	BIC
rs187084	codominant	TT	80 (26.2)	130 (34.4)	1	936.9	950.5
		TC	160 (52.5)	193 (51.1)	0.520 (0.329 ~ 0.820)		
		CC	65 (21.3)	55 (14.6)	0.701 (0.462 ~ 1.063)		
	dominant	TT	80 (26.2)	130 (34.4)	1	939.7	953.3
		TC + CC	225 (73.8)	248 (65.6)	0.678 (0.486 ~ 0.946)		
	recessive	TT + TC	240 (78.7)	323 (85.4)	1	939.7	953.3
rs352140	codominant	CC	65 (21.3)	55 (14.6)	0.629 (0.423 ~ 0.935)	943.5	957.1
		TT	106 (34.8)	114 (30.2)	1		
		TC	143 (46.9)	187 (49.5)	1.277 (0.827 ~ 1.975)		
	dominant	CC	56 (18.4)	77 (20.4)	1.048 (0.697 ~ 1.577)	943.3	956.9
		TT	106 (34.8)	114 (30.2)	1		
	recessive	TC + CC	199 (65.2)	264 (69.8)	1.235 (0.895 ~ 1.706)	944.6	958.1
rs164640	codominant	TT + TC	249 (81.6)	301 (79.6)	1	940.1	953.6
		CC	56 (18.4)	77 (20.4)	1.136 (0.774 ~ 1.666)		
		AA	105 (34.4)	95 (25.1)	1		
	dominant	AG	147 (48.2)	209 (55.3)	1.566 (0.990 ~ 2.445)	937.9	951.5
		GG	53 (17.4)	74 (19.6)	0.989 (0.654 ~ 1.496)		
	recessive	AA	105 (34.4)	95 (25.1)	1	944.4	958.0
		AG + GG	200 (65.6)	283 (74.9)	1.569 (1.126 ~ 2.187)		
		AA + AG	252 (82.6)	304 (80.4)	1		
		GG	53 (17.4)	74 (19.6)	1.165 (0.786 ~ 1.726)		

* 调整了年龄和性别因素

H. pylori 感染的关系进行分析。SNP rs187084 在 codominant、dominant、recessive 模型中均与 *H. pylori* 感染关联,其中 codominant 模型为最佳模型,与 TT 基因型相比,携带 TC 基因型可使 *H. pylori* 感染的风险降低(TC vs TT: OR = 0.520, 95% CI = 0.329 ~ 0.820)。rs352140 在 3 种遗传模式下,均未发现其与 *H. pylori* 感染具有相关性。rs164640 在 dominant 模型中,与野生型 AA 基因型相比,携带 AG + GG 基因型者 *H. pylori* 感染风险增加 1.569 倍(95% CI = 1.126 ~ 2.187)。见表 2。对 TLR9 基因的 3 个 SNP 进行连锁不平衡分析发现: rs164640、rs352140、rs187084 三个位点连锁程度低,未能构建出单体型块。

3 讨论

病原微生物侵入人体时受到模式识别受体的识别,进而触发信号传导的级联反应,使机体产生免疫应答。TLRs 特异性地识别多种病原体关联的分子模式,在机体的非特异性免疫应答和承载特异性免疫应答中起到了重要作用^[5]。研究^[6]表明 TLRs 基因多态性与 *H. pylori* 的感染有关联。*H. pylori* 感染人体后,寄居在胃黏膜上皮的黏液层,而 TLR9 可以识别 *H. pylori* 非甲基化的双链 DNA 分子^[7]。研究^[8]表明 TLR9 通过 cag 岛激活可以改变 *H. pylori*

感染环境中的恶性风险,而且 *H. pylori* 感染与胃黏膜中 TLR9 的表达增加有关^[9]。因此,TLR9 基因多态性可能在 *H. pylori* 感染和临床结果的转归中起到重要作用。基于此,在本研究中,课题组利用 PCR-RFLP 方法检测包头汉族人群中 *H. pylori* 感染与 TLR9 rs187084、rs352140、rs164640 的关系,发现在 codominant 遗传模式下,携带 rs187084 TC 基因型者较 TT 基因型者 *H. pylori* 感染风险降低; SNP rs352140 与 *H. pylori* 感染无关联;在 dominant 遗传模式下,携带 rs164640 AG + GG 基因型者较 AA 基因型者 *H. pylori* 感染风险增加。

rs187084 位于 TLR9 启动子区,一些研究显示了其与某些疾病的关系,如林茂虎等^[10]发现 rs187084 携带 C 等位基因与鲍氏不动杆菌感染有关联。也有研究显示其与一些疾病无关,如卫美蓉^[11]和石源源等^[12]研究显示 rs187084 与胃癌的易感性无关。课题组研究结果显示与 TT 基因型相比,rs187084 携带 TC 基因型可使 *H. pylori* 感染的风险降低 0.520 倍(95% CI = 0.329 ~ 0.820)。然而关于 rs187084 与 *H. pylori* 感染的关系还未见报道,因此本研究需要扩大样本量进一步验证。

TLR9 有两个外显子,第二外显子是主要编码区。rs352140 位于第二外显子,本研究结果显示: rs352140 与 *H. pylori* 感染没有关联,这与舒颖

等^[13]研究结果一致。Loganathan et al^[14]研究发现 TLR9 rs352140 多态性是影响印度泰米尔人 *H. pylori* 感染的疾病易感性和临床表现的潜在遗传风险因素,结果的差异可能是由于研究人群的种族不同造成。本研究还检测了 TLR9 基因的 3'端下游的 SNP rs164640 与 *H. pylori* 感染的关系,结果显示,rs164640 与 *H. pylori* 感染相关联。在 dominant 遗传模式下,与野生型 AA 基因型相比,携带 AG + GG 基因型者 *H. pylori* 感染风险增加 1.569 倍 (95% CI = 1.126 ~ 2.187)。目前,关于 SNP rs164640 与 *H. pylori* 感染的关系尚未见报道,所以,课题组的研究还需要进一步验证。

参考文献

- [1] Melese A, Genet C, Zeleke B, et al. *Helicobacter pylori* infections in Ethiopia; prevalence and associated factors: a systematic review and meta-analysis [J]. BMC Gastroenterol, 2019, 19(1): 8.
- [2] 刘德地, 王亚雷, 张 磊. 根除幽门螺杆菌对萎缩性胃炎患者血清学指标的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(8): 1329-32.
- [3] Camilo V, Sugiyama T, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection [J]. Helicobacter, 2017, 22 Suppl 1, doi: 10.1111/hel.12405.
- [4] Tongtawee T, Simawaranon T, Wattanawongdon W, et al. Toll-like receptor 2 and 4 polymorphisms associated with *Helicobacter pylori* susceptibility and gastric cancer [J]. Turk J Gastroenterol, 2019, 30(1): 15-20.
- [5] Chmiela M, Karwowska Z, Gonciarz W, et al. Host pathogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(9): 1521-40.
- [6] Tongtawee T, Bartpho T, Kaewpitoon S, et al. Genetic polymorphisms in TLR1, TLR2, TLR4, and TLR10 of *Helicobacter pylori*-associated gastritis: a prospective cross-sectional study in Thailand [J]. Eur J Cancer Prev, 2018, 27(2): 118-23.
- [7] Varga M G, Piazzuelo M B, Romero-Gallo J, et al. TLR9 activation suppresses inflammation in response to *Helicobacter pylori* infection [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016, 311(5): G852-8.
- [8] Varga M G, Shaffer C L, Sierra J C, et al. Pathogenic *Helicobacter pylori* strains translocate DNA and activate TLR9 via the cancer-associated cag type IV secretion system [J]. Oncogene, 2016, 35(48): 6262-9.
- [9] Wang T R, Peng J C, Qiao Y Q, et al. *Helicobacter pylori* regulates TLR4 and TLR9 during gastric carcinogenesis [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(10): 6950-5.
- [10] 林茂虎, 朱晓应, 苗 芮, 等. TLR-9 单核苷酸多态性与鲍氏不动杆菌感染相关性研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(13): 2894-5, 2898.
- [11] 卫美蓉. TOLL 样受体基因多态性与胃癌及 EBV 相关胃癌易感性的研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2016.
- [12] 石源源, 韩 璐, 舒 君, 等. TLR9-1486 和 TLR9-2848 基因多态性与胃癌易感性关系 [J]. 齐鲁医学杂志, 2015, 30(3): 260-2, 265.
- [13] 舒 颖, 张平安, 童永清. Toll 样受体 9 基因 rs187084 和 rs352140 位点多态性与 Hp 感染及其相关疾病易感性的关系 [J]. 临床检验杂志, 2014, 32(8): 610-4.
- [14] Loganathan R, Nazeer M, Goda V, et al. Genetic variants of TLR4 and TLR9 are risk factors for chronic *Helicobacter pylori* infection in South Indian Tamils [J]. Hum Immunol, 2017, 78(2): 216-20.

Associations of TLR9 gene polymorphisms with *Helicobacter pylori* infection

Wei Xingru¹, Ma Licong^{1,2}, Tian Xuyang², et al

(¹School of Basic Medicine and Forensic Medicine, Baotou Medical College, Baotou 014060; ²Inner Mongolia Institute of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014030)

Abstract Objective To investigate the relationship between Toll-like receptor 9 (TLR9) gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection. **Methods** A total of 683 blood samples were collected. The samples were divided into *H. pylori* negative group ($n = 305$) and *H. pylori* positive group ($n = 378$) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. **Results** TLR9 rs187084, rs352140 and rs164640 were genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). TLR9 rs187084 TC genotype reduced the risk of *H. pylori* infection (TC vs. TT: OR = 0.520, 95% CI = 0.329 ~ 0.820). The risk of *H. pylori* infection increased in rs164640 AG + GG genotype carriers (AG + GG vs. AA: OR = 1.569, 95% CI = 1.126 ~ 2.187). rs352140 was not associated with the risk of *H. pylori* infection. **Conclusion** TLR9 rs187084 and rs164640 might play a role in *H. pylori* infection.

Key words *Helicobacter pylori*; TLR9; single nucleotide polymorphism