

TLR4基因Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu、Arg677Trp多态性与中国湖北汉族炎症性肠病无相关性

熊利芬, 夏冰, 姜黎, 郭秋莎, 孙泽群

■背景资料

炎症性肠病(IBD)是病因不明慢性肠道炎症性疾病,临床上分为克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)二种类型。IBD具有遗传易感性。Toll命名来源于果蝇的一个具有先天性抗感染作用的受体蛋白,TLR超家族有近10个成员已被鉴定出来,其中TLR4和TLR2研究最深入。近来研究显示TLR4是细菌LPS的受体,具有宿主防御革兰氏阴性菌感染作用。TLR2具有防御革兰氏阳性菌、分枝杆菌、真菌感染的作用。

■研发前沿

目前对IBD的免疫遗传学机制是研究热点,微生物与IBD的关系也已引起人们的重视。对于TLR基因的研究主要集中在TLR2和TLR4的功能。

熊利芬, 夏冰, 姜黎, 郭秋莎, 孙泽群, 武汉大学中南医院内科消化系病研究中心 武汉大学医学院过敏与免疫疾病重点实验室 湖北省武汉市 430071
湖北省卫生厅科研基金重点项目, No. JX1A14
通讯作者: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市武昌东湖路169号, 武汉大学中南医院内科, bingxia2004@yahoo.com.cn
电话: 027-67812985
收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-11-24

No association of TLR4 gene Asp299Gly, TLR2 gene Arg753Glu and Arg677Trp polymorphisms with inflammatory bowel disease in Chinese Han population of Hubei province

Li-Fen Xiong, Bing Xia, Li Jiang, Qiu-Sha Guo, Ze-Qun Sun

Li-Fen Xiong, Bing Xia, Li Jiang, Qiu-Sha Guo, Ze-Qun Sun, Department of Internal Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Research Center of Digestive Diseases, Laboratory of Allergy and Immune-related Diseases, Medical College of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China
Supported by the Key Science Research Foundation of Health Department of Hubei Province, No. JX1A14
Correspondence to: Bing Xia, Department of Internal Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 169 Donghu Street, Wuhan 430071, Hubei Province, China. bingxia2004@yahoo.com.cn
Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-11-24

Abstract

AIM: To explore the distribution of Toll-like receptor 4 (TLR4) gene Asp299Gly, and TLR2 gene Arg753Glu and Arg677Trp polymorphisms in inflammatory bowel disease (IBD) in Chinese Han patients of Hubei province.

METHODS: The polymorphisms of TLR4 gene Asp299Gly, and TLR2 gene Arg753Glu and Arg677Trp were genotyped in 120 patients with IBD and 110 healthy controls by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. The association between the polymorphism and IBD as well as its clinical pheno-

type was analyzed.

RESULTS: The mutant genotypes of the TLR4 gene Asp299Gly, TLR2 gene Arg753Glu and Arg677Trp were not found in both the IBD patients and healthy controls.

CONCLUSION: TLR4 gene Asp299Gly and TLR2 gene Arg753Glu, Arg677Trp polymorphisms are not associated with IBD in Chinese Han patients of Hubei province.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Toll like receptor 4; Toll-like receptor 2; Gene polymorphism

Xiong LF, Xia B, Jiang L, Guo QS, Sun ZQ. No association of TLR4 gene Asp299Gly, TLR2 gene Arg753Glu and Arg677Trp polymorphisms with inflammatory bowel disease in Chinese Han population of Hubei province. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):212-215

摘要

目的: 研究TLR4基因Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu及Arg677Trp多态性在中国汉族人群中的分布,探讨其与炎症性肠病的相关性。

方法: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法,检测120例中国湖北汉族炎症性肠病患者与110例正常对照者TLR4基因Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu及Arg677Trp基因型,分析该基因多态性与炎症性肠病以及临床亚型的相关性。

结果: 炎症性肠病患者和健康对照者均未检测出TLR4基因Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu及Arg677Trp突变型。

结论: TLR4基因Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu及Arg677Trp基因多态性与中国湖北汉族人群炎症性肠病的易感性无相关性。

关键词: 炎症性肠病; Toll样受体4; Toll样受体2; 基因多态性

熊利芬, 夏冰, 姜黎, 郭秋莎, 孙泽群. TLR4基因Asp299Gly及

TLR2基因Arg753Glu、Arg677Trp多态性与中国湖北汉族炎症性肠病无相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(2):212-215
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/212.asp>

0 引言

Toll样受体(toll-like receptor, TLR)作为革兰氏阴性菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的受体, 其基因第四外显子Asp299Gly的突变, 可改变TLR4的细胞外结构, 导致对革兰阴性菌的LPS无反应或LPS信号途径抑制. 炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是涉及多基因的肠黏膜免疫性疾病, 在正常情况下几乎无法在肠黏膜表面检测到TLR4, 但在IBD的肠上皮表面却可检测到TLR4的表达呈显著上调^[1]. 研究发现, LPS可促进结肠癌细胞株的生长, 具有促癌作用^[2], 提示TLR4在IBD和大肠癌发病机制中可能具有一定的功能. TLR2基因Arg753Glu多态性在白人中出现频率1%-4%, 明显高于亚洲人(尚未见阳性报道), 而且与感染性疾病的关系引人注目, 尤其是带有TLR2激动剂的有机体, 如革兰阳性菌、分枝杆菌和螺旋体等^[3]. TLR2基因Arg677Trp多态性在瘤型麻风患者中已经检出突变型^[4]. 研究发现, 把带有TLR2 Arg753Glu和Arg677Trp突变基因嵌入编码TLR2基因的表达载体中, 会减低中国仓鼠卵巢细胞对合成脂肽刺激的反应^[5]. 因此, 小鼠TLR2突变导致TLR2信号途径明显抑制, 机体对上述细菌感染的易感性增强. NOD2/CARD15是克罗恩病(CD)的第一个易感基因, Netea *et al*^[6]研究表明, NOD2基因3 020位点插入移码突变与CD相关的机制是细胞受到TLR2配体、肽聚糖或者Pam3Cys-KKK等刺激后血单核细胞释放IL-10, 而不是由于TLR4配体LPS刺激所致, 表明NOD2是PGN的受体而不是LPS. TLR的功能与NOD2类似, 与先天性免疫有关. 然而, 目前未见TLR2基因多态性与炎症性肠病(IBD)的相关性报道. 在人类, 肠腔内存在大量的微生物, 但在正常情况下肠黏膜上皮细胞(IEC)对绝大多数TLR2配体无应答. IEC上TLR2蛋白表达相对缺乏, 而Toll抑制蛋白高表达对于阻止由于肠腔内共生革兰氏阳性菌诱导慢性炎症因子的释放有重要作用. 我们假设TLR基因变异的个体, 肠黏膜先天性免疫细胞和肠上皮TLR分子结构改变, 使机体的先天性免疫系统不能正常处理肠腔内的大量的细菌微生物. 肠黏膜在大量的革兰阳性菌的长期刺激下, 易产生感染和炎症、过敏和易激, 甚至癌变. 因

此, 作为粗筛, 我们研究TLR4和TLR2基因多态性与IBD的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2001/2004在武汉大学中南医院以及武汉市其他大型医院就诊的湖北汉族无亲缘关系的IBD患者120例, 其中溃疡性结肠炎(UC)104例, CD16例. UC及CD诊断标准参照中华医学会消化病学分会2001年对IBD诊断治疗规范的建议^[7]. 此外, 收集参加正常体检的健康对照者110例, 在年龄与性别上相匹配.

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 采血5 mL, 乙二胺四乙酸(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 TLR4: 在25 μL的反应体系中分别加入引物. (引物设计参照文献[8]F1、R1(F1-5'TTAGAAATGAAGGAACTTGAAAAG3, R1-5'TTTGTCAAACAATTAATAAGTGATTAATA3)和F2、R2(F2-5'AGCATACTTAGACTACCACCTCGATG3', R2-5'GTTGCCATCCGAAATTATAGAAAAG3'). 94℃预变性3 min. 94℃变性45 s; 51℃退火45 s; 72℃延伸45 s; 共38次循环. 最后72℃彻底延伸5 min. TLR2: 在25 μL的反应体系中分别加入引物(引物设计参照文献[9], F1、R1(F1: 5'-GCCTACTGGGTGGAGAACCCT-3', R1: 5'-GGCCACTCCAGGTAGGTCTT-3'). 95℃预变性5 min. 95℃变性40 s; 58℃退火50 s; 72℃延伸60 s; 共30次循环. 最后72℃彻底延伸5 min. PCR产物于20 g/L琼脂糖凝胶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) TLR4: 将两组PCR产物各取10 μL, 分别用*Bsa*B I及*Bsa*X I两种限制性内切酶消化. 前者于55℃酶切4 h后于65℃灭活20 min, 后者于65℃酶切4 h后于80℃灭活20 min. 前者的PCR产物为139 bp, 当Asp299Gly多态性位点为A(腺嘌呤, 野生型)时, 可被*Bsa*B I酶切为112 bp和27 bp. 后者的PCR产物为131 bp, 当Asp299Gly多态性位点为G(鸟嘌呤, 突变型)时, 可被*Bsa*X I酶切为108 bp和23 bp. 酶切产物均以80 g/L非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(100 V, 1.5 h)分离、硝酸银染色. TLR2: 取5 μL PCR产物, 用*Aci*I限制性内切酶消化. 于37℃酶切2 h后于65℃灭活20 min. PCR产物为340 bp, 当TLR2基因为野生型(TLRwt)时, 可被*Aci*I酶切为三个片段:

■创新亮点

本文研究了TLR4基因Asp299Gly多态性及TLR2基因Arg753Glu及Arg677Trp多态性与中国湖北汉族炎症性肠病的相关性, 此前尚无中国人人群TLR2基因多态性报道及其与IBD的关系研究.

应用要点

本文将TLR2基因研究与IBD联系起来,研究TLR2基因突变与IBD的相关性,为阐明IBD的遗传易感性和先天性免疫机制提供依据,具有重要的科学意义和临床价值。

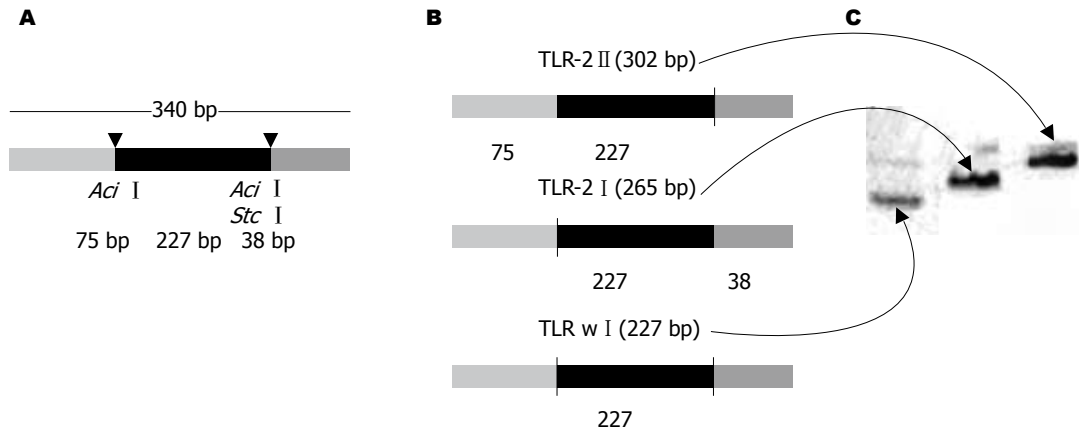


图1 TLR2基因多态性RFLP基本原理.设计的引物跨越两种多态性,PCR产物为340 bp,箭头所指为限制性内切酶*AcI* I切割位点,用*AcI* I消化产生302 bp (TLR2-II), 265 bp (TLR2-I), 或者227 bp (野生型).

75 bp, 227 bp, 38 bp; 当TLR2基因为Arg753Glu突变(TLR2 I)时,可被*AcI* I酶切为二个片段: 265 bp, 75 bp; 当TLR2基因为Arg677Trp(TLR2 II)突变时,可被*AcI* I酶切为二个片段: 302 bp, 38 bp. 酶切产物均以80 g/L非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(100 V, 3 h)分离、硝酸银染色(图1)^[9].

统计学处理 通过SPSS 11.5软件包进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性.

2 结果

对230份DNA样本进行基因分析,均未发现TLR4 Asp299Gly和TLR2基因Arg753Glu, Arg677Trp位点的突变.所有DNA样本139 bp的PCR产物均可被*Bsa* B I酶切为112 bp和27 bp两个片段,而131 bp的PCR产物均不能被*Bsa* X I酶切为108 bp和23 bp.即在全部检测样本中TLR4基因Asp299Gly多态性位点均为野生型A,未见突变型G.所有DNA样本340 bp的PCR产物均可被*AcI* I酶切为75 bp, 227 bp, 38 bp三个片段.既在全部检测样本中,TLR2基因Arg753Glu多态性位点均为野生型A,未见突变型G. Arg677Trp多态性位点也均为野生型A,未见突变型T.

3 讨论

TLR4参与先天性免疫应答的激活,还诱导共刺激分子CD80表达,为获得性免疫的启动提供必要的活化信号. TLR4通过协同分子CD14、LPS结合蛋白(LPS inbinding protein, LBP)的共同作用,将LPS传导通路的信号迅速传至核内,激活NF- κ B及相关细胞因子的表达. TLR4基因的非同义单核苷酸多态性Asp299Gly和Thr399Ile与LPS的反应减低有关,TLR4基因突变可导致

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. TLR2主要识别多种病原微生物的产物以及革兰氏阳性菌、分枝杆菌、螺旋体和支原体^[10], TLR2通过识别PAMPs激活NF- κ B,导致炎症因子(如IL-8)表达,同时激活的NF- κ B还可促进TLR2的转录表达,形成了TLR2-NF- κ B-TLR2的自身循环.研究表明TLRs/NF- κ B信号传导通路是IBD发病机制发展过程中的重要环节.最近Matsuguchi *et al*^[11]观察到,经腹腔注射LPS或体外LPS刺激后,小鼠脾巨噬细胞的TLR2基因表达增高,而TLR4并未见增高. Yang *et al*^[12]和Kirsching *et al*^[13]也分别发现转染了人TLR2的人胚肾细胞的293可获得对LPS的反应能力,因此,认为TLR2参与人体内对LPS的反应. LPS不仅在感染疾病、过敏性疾病中起重要作用,还可促进结肠癌细胞株的生长,有促癌作用. TLR4、TLR2基因突变可改变肠黏膜先天性免疫细胞和肠上皮TLR4、TLR2分子结构,使机体的免疫系统失去正常处理肠腔内大量细菌和LPS等病原分子的能力,进而使肠黏膜在其长期刺激下产生感染、炎症、过敏、易激乃至癌变.

通过对TLR4基因Asp299Gly及TLR2基因Arg753Glu和Arg677Trp多态性进行检测,在所有310例样本中均未发现TLR4、TLR2基因的上述突变,提示此等位基因突变在中国湖北汉族人群中极少见,而且说明TLR4Asp299Gly、TLR2基因Arg753Glu和Arg677Trp位点多态性可能与我国IBD无关. Mane研究白人IBD患者TLR2基因突变,只发现A7484T位点有意义,亚洲人和黑人未见阳性报道.本实验结果与之相符.

此外,我们将中国汉族与其他种族的TLR4基因的Asp299Gly、TLR2基因的Arg753Glu

和Arg677Trp多态性分布进行了比较,发现在不同人群中,该等位基因频率及基因型频率的分布有差异,其中中国湖北汉族人与日本人的等位基因频率及基因型频率相似,均未检测到TLR4基因Asp299Gly、TLR2基因Arg753Glu和Arg677Trp的突变位点,德国人TLR4基因的Asp299Gly突变频率5.6%,Arg753Glu突变频率9.4%、西班牙Arg753Glu突变频率1%^[14],突尼斯Arg677Trp为31%^[15],差异有显著性.由此认为,其等位基因的多态性随人种和地区的不同而异.各人种在TLR2基因频率分布的不同,将有助于阐明不同种族和不同地区人群在进化和免疫发病机制上的差异.

4 参考文献

- 1 Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; 68: 7010-7017
- 2 Kojima M, Morisaki T, Izuhara K, Uchiyama A, Matsunari Y, Katano M, Tanaka M. Lipopolysaccharide increases cyclo-oxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor-kappa B activation. *Oncogene* 2000; 19: 1225-1231
- 3 Malhotra D, Relhan V, Reddy BS, Bamezai R. TLR2 Arg677Trp polymorphism in leprosy: revisited. *Hum Genet* 2005; 116: 413-415
- 4 Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 31: 53-58
- 5 Schroder NWJ, Hamann LUBG, Schumann RR. High frequency of polymorphism Arg753Gln of the Toll like receptor-2 gene detected by a novel allele-specific PCR. *J Mol Med* 2003; 81: 368-372
- 6 Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, Franke B, Sprong T, Naber THJ, Drenth JPH, Van der Meer JWM. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2052-2059
- 7 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
- 8 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
- 9 Kang TJ, Lee SB, Chae GT. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine* 2002; 20: 56-62
- 10 Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2001; 2: 346-352
- 11 Matsuguchi T, Takagi K, Musikacharoen T, Yoshi-kai Y. Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and 4, are differently regulated in mouse T lymphocytes. *Blood* 2000; 95: 1378-1385
- 12 Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 1998; 395: 284-288
- 13 Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T, Rothe M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1998; 188: 2091-2097
- 14 Sanchez E, Orozco G, Lopez-Nevot MA, Jimenez-Alonso J, Martin J. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2004; 63: 54-57
- 15 Ben-Ali M, Barbouche MR, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K. Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 625-626

■同行评价
内容新颖,对读者
也有一定启发.

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁