

● 综合报道 ●

TLR4 基因多态性与儿童 ARDS 易感性的相关性研究 *

邓宇虹¹ 郑祝剑² 邱晓露³ 徐琨¹

(1 江西省儿童医院 南昌 330006; 2 江西医学院上饶分院 上饶 334000; 3 南昌大学医学院 南昌 330006)

摘要:目的:探讨 Toll 样受体 4(TLR4)-Thr399Ile、Asp299Gly 基因多态性与儿童急性呼吸窘迫综合征(ARDS)易感性的关系。
方法:收集江西省儿童医院 PICU 和 NICU 儿童急性呼吸窘迫综合征(ARDS)诊断病例为病例组,类似年龄的健康儿童为对照组,应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 分析技术及基因测序技术检测 TLR4 等位基因 Asp299Gly 和 Thr399Ile 基因型的多态性,观察两组间基因型频率和等位基因频率的差异。
结果:2007~2012 年儿童 ARDS 组 48 例,对照组 59 例,TLR4 受体基因 Asp299Gly、Thr399Ile 两位点的基因型之间差异无统计学意义($\chi^2=0.010, P=0.920$; $\chi^2=0.412, P=0.52$)。
结论:儿童 ARDS 患者的 TLR4 基因 Asp299Gly 和 Thr399Ile 多态性与感染性 ARDS 发病无显著相关性。

关键词:Toll 样受体 4;急性呼吸窘迫综合征;基因多态性

中图分类号:R 725.6

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2012.06.034

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是肺对不同情况下严重损伤时的非特异性反应,其特征是严重的进行性呼吸衰竭,尽管吸入高浓度氧仍不能纠正,是在抢救或治疗的过程中发生以肺微循环障碍为主的小儿急性呼吸窘迫和低氧血症综合征。TLR4 是一种跨膜蛋白,人类编码的基因定位在 9q32-q33,这种蛋白由胞外区、跨膜段和胞内区 3 部分组成。胞外区主要含十几到二十几个串连的富含亮氨酸重复序列(leucine rich repeats,LRRs)。LRRs 有利于促进蛋白质间的相互粘附,识别病原体或其产物。胞内区由 Toll 同源结构域(Toll Homology domain, TH domain)和分子羧基端长短不同的短尾肽组成。TH 结构域是下游进行信号转导的核心元件,此区域关键位点的突变或序列缺失将阻断信号向下传递。当编码的基因突变,就会导致其编码蛋白改变,从而使信号传导发生变化,影响一系列反应。ALI / ARDS 中病原微生物抗原和内源性抗原等配体被肺内中性粒细胞、内皮细胞等细胞表面的 TLR4 识别后,早期激活 NF- κ B 和 AP-1 等转录因子以激活细胞,诱导以中性粒细胞浸润、微血管内皮细胞损伤与蛋白液体渗漏为特征的炎症反应。后期,TLR4 介导炎症反应修复,以维持肺泡上皮细胞的修复,促进 ALI / ARDS 的康复^[1]。本研究通过聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析技术及基因测序技术检测儿童 ARDS 患者 TLR4 等位基因 Asp299Gly 和 Thr399Ile 基因型的多态性,分析 TLR4 基因多态性与儿童 ARDS 之间是否存在相关性。

1 对象与方法

1.1 对象 ARDS 组儿童急性呼吸窘迫综合征患者为 2007 年 10 月~2012 年 8 月就诊于江西省儿童医院 PICU 和 NICU 的 48 例患者,对照组为儿童

保健科 59 名体检者。儿童 ARDS 患者诊断均符合 2006 年中华医学会重症医学分会制定的急性肺损伤 / 急性呼吸窘迫综合征诊断和治疗指南。样本提取:每个人均抽 3 mL 抗凝静脉血,使用蛋白酶 / 酚 / 氯仿法提取基因组 DNA, -20 ℃ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 TLR4-Thr399Ile、Asp299Gly 基因多态性检测 根据 GenBank 中 TLR4 受体基因序列 (基因号: AH009665) 设计引物,引物序列由上海生工公司合成。引物如下:Thr399Ile 引物的序列为:A1: 5'-GGT TGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA-3'; A2: 5'-CCTGAAGACTGGAGAGTAGTTAAATGCT-3'。Asp299Gly 引物的序列为:B1: 5'-GATTAGC ATACTTAGACTACTACCTCCATG-3'; B2: 5'- GAT CAACTTCTG AAAAAGCATTCCCAC-3'。

1.2.2 PCR 反应体系 在 25 μ L 反应体系中含有 DNA 2.0 μ L, 10 $\times$ buffer 2.5 μ L, ddH₂O 17.5 μ L, dNTPs 0.5 μ L, 1 μ mol/L 引物各 1.5 μ L。Tap 聚合酶 1.0 μ L。循环条件:95 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s, 36 个循环,最后 72 ℃ 充分延伸 5 min。取 5 μ L 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 限制性内切酶长度多态性技术(RFLP)分析 取检测有目的条带的 PCR 产物进行酶切。取 5 μ L PCR 反应产物并加入 10 $\times$ buffer 1 μ L, 针对位点 Asp299Gly 用限制性内切酶 NcoI 1 μ L, 针对位点 Thr399Ile 用限制性内切酶 Hinf-I 1 μ L, 在恒温水浴箱 37 ℃ 水浴 20 h。酶切产物和相应的 PCR 产物在 3%琼脂糖凝胶电泳, B 紫外透射凝胶成像仪系统观察结果,并用数码相机拍摄图像保存。

1.3 统计学处理 常用 Hardy-Weinberg 平衡规律计算基因型和等位基因频率,所有统计学分析均采用 SPSS11.5 软件,等位基因频率在组间的差异分析

* 江西省卫生厅普通课题计划(编号:20123141)

• 54 •
采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。
2 结果

2.1 TLR4 基因多态性结果 Thr399Ile 基因多态性 PCR 产物可被 Hinf-I 内切酶解成 377 bp 和 29 bp 的两个片段。电泳后仅出现 406 bp 条带的基因型为 Thr/Thr,同时出现 377、29 bp 条带的基因型为 Ile/Ile, 同时出现 406、377、29 bp 的基因型为 Thr/Ile。 Asp299Gly 基因多态性 PCR 产物可被 Nco1 内切酶解成 223 bp 和 26 bp 的两个片段。电泳后仅出现 249 bp 条带的基因型为 Asp/Asp, 同时出现 223、26 bp 条带的基因型为 Gly/Gly, 同时出现 249、223、26 bp 的基因型为 Asp/Gly。

2.2 TLR4 基因 Thr399Ile、Asp299Gly 与儿童 ARDS 的相关性 儿童 ARDS 组和对照组 Thr399Ile 和 Asp299Gly 基因型频数分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。TLR4 基因 Thr399Ile 位点差异无统计学意义 ($P>0.05$), 相应等位基因间差异也无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。Asp299Gly 的基因突变率较低, 所有样本仅在儿童 ARDS 组检测到 2 例,其余均为纯合子。儿童 ARDS 组与对照组相比, TLR4 基因 Asp299Gly 位点差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 1 两组 TLR4 Thr399Ile 的基因型和等位基因频率 例						
组别	n	基因型频率			等位基因频率(次)	
		Thr/Thr	Thr/Ile	Ile/Ile	Thr	Ile
ARDS 组	48	38	4	6	80	16
对照组	59	45	7	7	97	21

表 2 两组 TLR4 Asp299Gly 的基因型和等位基因频率 例						
组别	n	基因型频率			等位基因频率(次)	
		Asp/Asp	Asp/Gly	Gly/Gly	Asp	Gly
ARDS 组	48	38	6	4	82	14
对照组	59	44	10	5	98	20

3 讨论

病原微生物具有一些保守分子结构,如细胞壁含有的肽聚糖、脂多糖等,这些物质对 TLR4 具有活化作用, 称为病原相关分子模式 (Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMPs)。TLR4 是识别类脂 PAMP 的,其作用较为局限,可能主要参与内毒素的识别与信号传导过程^[2]。TLR4 主要在肺巨噬细胞、腹腔巨噬细胞、枯否细胞、脂肪细胞以及人类胚胎肾细胞、齿龈纤维母细胞及人表皮内皮细胞等^[3]分布。TLR4 的信号传导途径可以通过髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88) 依赖途径和 MyD88 非依赖途径。病原微生物抗原和内源性抗原等配体被肺内皮细胞等细胞表面的 TLR2、TLR4 识别后, 通过依赖 MyD88 或非依赖 MyD88 信号传导途径激活核转录因子 (NF)-kB,进而诱导肿瘤坏死因子(TNF)-α、IL-1、环氧合酶 2、细

实用中西医结合临床 2012 年 11 月第 12 卷第 6 期
胞内黏附分子 1、胶原酶等多种细胞因子及化学因子的生成与释放,引发以中性粒细胞浸润、微血管内皮细胞损伤与蛋白液体渗漏为特征的炎症反应^[4]。Togbe 等报道吸入脂多糖诱导的急性肺部炎症和气管上皮损害程度以及肺泡损伤后渗漏的蛋白量与 TLR4 表达水平呈剂量依赖关系, 而不表达 TLR4 的 TLR4 基因突变的小鼠(C57BuloscNQ)肺泡蛋白量与正常对照组没有差异^[5]。阻断 TLR4 可抑制内毒素对内皮细胞的激活作用, 提示 TLR4 也可能是内毒素作用于血管内皮细胞的受体途径。TLR4 主要识别脂多糖、紫杉醇、HSWoO、HSP70、HSP96、呼吸道合胞病毒融合蛋白、血纤维蛋白原和透明质酸寡糖等^[6]。

近年来关于 TLR4 基因多态性与感染性疾病易感性的相关研究已逐步引起关注, 目前对 TLR4 研究最多的单核苷酸多态性 (SNP) 是 Asp299Gly 和 Thr399Ile 两个位点的突变,位于 TLR4 转录起始处第三外显子上即编码 LRR 的区域, 一种 SNP 是位于 1 196 位的 C/T 碱基转换, 使位于 399 的苏氨酸变为异亮氨酸,而另一种 SNP 是位于第 896 位点的 A/G 碱性转换, 使氨基酸序列第 299 位置的天门冬氨酸转变为甘氨酸^[6]。

本研究我们采用多聚酶链反应 - 限制性片段长度多态性方法,对 48 例 ARDS 患儿和 59 名健康儿童进行 TLR4 等位基因 Thr399Ile 和 Asp299Gly 的基因型检测。结果发现在 ARDS 患儿和健康体检者中,TLR4 受体基因 Thr399Ile、Asp299Gly 两位点的基因型之间差异无统计学意义 ($\chi^2=0.010, P=0.920$; $\chi^2=0.412, P=0.52$)。表明感染性 ARDS 患者的 TLR4 基因 Asp299Gly 和 Thr399Ile 多态性与儿童 ARDS 发病无显著相关性,这可能与样本量有关,需要进一步研究。

参考文献

[1]Jiang D,Liang J,Fan J,et al.Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan[J].Nat Med,2005,11:1 173-1 179
[2]Takeda K,kaisho T,Akira S.Toll-like receptor[J].Annu Rev Immunol, 2003,21(4):335-376
[3]Bacher O,Adner M,Uddmam R,et al.Toll-like receptor stimulation induces airway hyper-responsiveness to bradykinin,an effect mediated by JNK and NF-kappa B signaling pathways [J].Eur J Immunol,2004,34(4):1 196-1 207
[4]O'Neil LA.How Toll-like receptors signal:what we know and what don't know[J].Curt Opin Immunol,2006,18(1):3-9
[5]Togbe D,Schnyder-Candrian S,Schnyder B,et al.TLR4 gene dosage contributes to endotoxin-induced scute respiratory inflammation[J].J Leukoc Biol,2006,80(3):451-457
[6]Arbourn C,Lorenz E.TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans[J].Nat Genet,2000,25(2):187-191

(收稿日期: 2012-09-21)