

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.02.016

TLR4 基因 rs1927914 位点多态性与甲状腺疾病的关联分析*

何雪娟,唐雯,杨艳梅,庞雅贤,许蕊,刘明清[△]

(沧州医学高等专科学校,河北沧州 061001)

[摘要] **目的** 探讨 Toll 样受体 4(TLR4)基因的单核苷酸多态性与 Graves 病(GD)、桥本甲状腺炎(HT)、单纯性甲状腺肿(SG)的相关性。**方法** 选取 2016 年河北省沧州市居民甲状腺疾病调查的 GD 患者(GD 组, $n=94$)、HT 患者(HT 组, $n=54$)、SG 患者(SG 组, $n=56$)及对照组为研究对象,应用 PCR 酶切鉴定结合直接测序方法进行基因分型。**结果** 等位基因 C 和 T 在 3 种甲状腺疾病和对照组中比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);3 种基因型 CC、CT、TT 在 GD 组、HT 组中的分布与对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);SG 组与对照组比较,隐性遗传模型显示基因突变与疾病呈正相关($P=0.040$, $OR=1.923$, $95\%CI:1.025\sim3.609$)。**结论** TLR4 基因多态性可能与 GD、HT 的发病风险无相关性,携带 TT 基因型可能会增加 SG 的发病风险。

[关键词] TLR4 基因;rs1927914;多态性,单核苷酸;甲状腺疾病**[中图分类号]** R181.13 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)02-0244-04

Correlation analysis of the polymorphism of TLR4 gene rs1927914 locus with thyroid diseases*

HE Xuejuan, TANG Wen, YANG Yanmei, PANG Yaxian, XU Rui, LIU Mingqing[△]

(Cangzhou Medical College, Cangzhou, Hebei 061001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between single nucleotide polymorphism (SNP) of Toll-like receptor 4 (TLR4) gene and Graves' disease (GD), Hashimoto's thyroiditis (HT) or simple goiter (SG). **Methods** Data was collected from GD patients (the GD group, $n=94$), HT patients (the HT group, $n=54$), SG patients (the SG group, $n=56$), and healthy people (the control group) of 2016 Thyroid Disease Survey in Hebei Cangzhou. Genetic typing was detected by polymerase chain reaction-restriction combined with direct sequencing. **Results** There was no significant difference in allele C and T at TLR4-C/T between the three thyroid diseases and the control group ($P>0.05$). The distribution of CC, CT, TT genotypes in the GD group and the HT group was not significantly different from the control group ($P>0.05$). And by comparing the SG group and the control group, the recessive genetic model showed that gene mutation was positively correlated with the disease ($P=0.040$, $OR=1.923$, $95\%CI:1.025-3.609$). **Conclusion** There might be no correlation between TLR4 gene polymorphism and the incidence of GD or HT, and carrying with the TT genotype may increase the incidence of SG.

[Key words] TLR4 gene;rs1927914;polymorphism, single nucleotide;thyroid diseases

近年来,甲状腺疾病发病率明显上升^[1-2],如何预防及治疗甲状腺疾病成为当前医学研究的热点。目前已知甲状腺疾病的发生除了与年龄、性别、碘摄入量等有关外,还与遗传因素、自身免疫、感染等因素相关,尤其是考虑到某些基因的多态性可能影响到机体对疾病易感性而受到研究者的重视。Toll 样受体 4 (TLR4)是近年来发现的重要的原体识别受体,在介导免疫反应及免疫相关的炎性反应中起着重要的作用^[3]。本研究旨在探讨 TLR4 基因 rs1927914 位点多态性与 Graves 病(GD)、桥本甲状腺炎(HT)和单纯性甲状腺肿(SG)发病风险的相关性,为甲状腺疾

病高危人群的筛检及诊治提供有利的分子生物学依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究选取 2016 年河北省沧州市居民甲状腺疾病流行病学调查项目确诊的部分病例为病例组研究对象,共纳入 GD 患者 94 例(GD 组),其中男 24 例、女 70 例;HT 患者 54 例(HT 组),其中男 13 例、女 41 例;SG 患者 56 例(SG 组),其中男 12 例、女 44 例;选取当地与病例组性别组成、年龄在±5 岁范围内的健康人为对照组。纳入标准:(1)GD 组,根据临床症状和甲状腺功能亢进的生化证实,包括弥

* 基金项目:2015 年度河北省科技计划资助项目(152777167)。

作者简介:何雪娟(1967—),副教授,硕士,主要从事流行病与卫生统计学

研究。△ 通信作者,E-mail:2223903604@qq.com。

表 1 研究对象的性别和年龄分布

项目	GD 组(n=94)	对照组(n=146)	P	HT 组(n=54)	对照组(n=139)	P	SG 组(n=56)	对照组(n=126)	P
性别(n)			0.932			0.717			0.366
女	70	108		41	102		44	91	
男	24	38		13	37		12	35	
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	37.5 \pm 8.2	36.3 \pm 7.7	1.132	43.2 \pm 8.9	42.9 \pm 8.4	0.214	36.8 \pm 7.3	37.1 \pm 7.1	0.273

慢性甲状腺肿、高放射碘摄取和高甲状腺素水平。(2)HT 组,弥漫性对称性甲状腺肿大且质韧,生化检验甲状腺功能减退,并有甲状腺过氧化物酶自身抗体(TPOAb),带或不带甲状腺球蛋白抗体(TgAb)。(3)SG 组,甲状腺弥漫性肿大或结节性肿大,生化检验甲状腺功能正常,¹³¹I 摄取率正常,血清 TPOAb、TgAb 阴性。(4)对照组,来自同期同地区社区健康人群,所有对照无急慢性疾病和炎症,无免疫疾病家族史,与患者无亲缘关系。本研究得到伦理委员会批准,每个研究对象均知情同意。各组与对照组性别、年龄比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 所有研究对象均抽取肘静脉血 2 mL,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,24 h 内送往实验室。用血液基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Blood DNA Kit,北京,中国)按说明书提取全基因组 DNA。

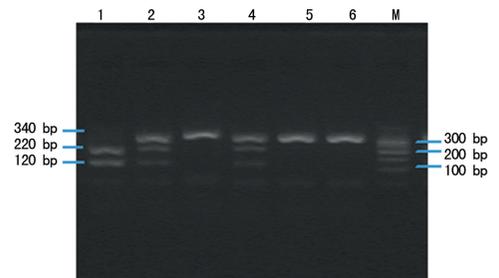
1.2.2 基因分型 采用限制片段内切酶法(RFLP)确定 TLR4 基因 rs1927914(C/T,C 是野生型)的基因型。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成(生工® Sangon Biotech),上游引物:5'-ACG TCT AGT CTA GAG CAT CA-3',下游引物 5'-GGA GTC TAC AAG AGT TTG TG-3'。采用天根公司 PCR 试剂盒(2×Taq PCR MasterMix)和 TC-XP-G XP 基因扩增仪按照实验步骤实行目标基因片段扩增。PCR 反应条件:开始预变性 94 °C 5 min,变性 94 °C 30 s、退火 54 °C 30 s、72 °C 延伸 1 min 循环 35 次,72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经限制性内切酶 Nsi I (Thermo)消化、通过 2.5% 琼脂糖凝胶电泳确定基因型。若等位基因为 C,则被酶切为 2 段;若为 T,则不能被酶切。所以当基因型为 TT 时,电泳显示 1 条条带,长 340 bp;若基因型为 CC,显示 2 条条带,长 220、120 bp;若基因型为 CT,显示 3 条条带,长 340、220、120 bp。为了证实方法的准确度,抽取 5% 的标本进行基因片段测序(ABI PRISM 3730xl,测序试剂为 BigDye terminator v3.1),检测结果一致率达 100%;与基因库中序列进行比对,序列相同。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验;计数资料以频数或百分率表示,比较采用拟合优度 χ^2 检验进行 Hardy-Weinberg 平衡分析;组别间比较采用 χ^2 检

验和 Fisher's 确切概率法;采用非条件 Logistic 回归模型求比值比(OR)及其 95% 置信区间(CI),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 产物酶切鉴定及测序结果 PCR 产物酶切鉴定及测序结果,见图 1、2。



M:Marker;1:CC 基因型;2,4:TC 基因型;3,5,6:TT 基因型

图 1 TLR4 基因 rs1927914 位点酶切电泳图

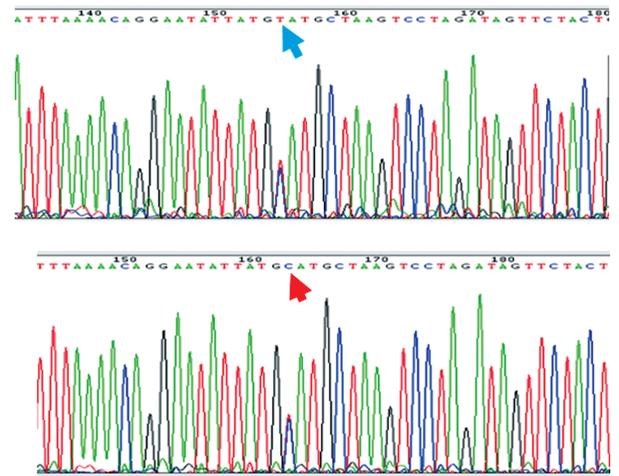


图 2 TLR4 基因 rs1927914 位点 T/C 多态性测序结果

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验 TLR4 基因 rs1927914 位点多态性的等位基因和基因型频率在所有受试者中都未偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$),本次研究人群具有群体代表性。

2.3 基因型和等位基因的比较

2.3.1 等位基因比较 TLR4 基因 rs1927914 位点等位基因 T 和 C,在 GD 组、HT 组、SG 组的分布,分别与对照组进行比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3.2 基因型比较 TLR4 基因 rs1927914-T/C 位点基因型(TT/TC/CC)在 3 种疾病中的分布,分别与对照组进行比较,经非条件 Logistic 回归计算其相关性。采用共显性、显性和隐性模式分析,3 者对基因型

表 2 TLR4 基因 rs1927914 位点单核苷酸多态性与 GD 关联分析

项目	基因型	对照组 (n=146)	GD 组 (n=94)	共显性遗传模型			显性模型			隐性模型		
				χ^2	P	OR(95%CI)	χ^2	P	OR(95%CI)	χ^2	P	OR(95%CI)
基因型	T/T	56	39									
	T/C	72	42	0.480	0.845	0.961(0.908,1.015)	0.115	0.735	0.876(0.407,1.884)	0.235	0.628	1.140(0.672,1.934)
	C/C	18	13									
等位基因	T	184	120	0.033	0.856	0.965(0.660,1.413)						
	C	108	68									

表 3 TLR4 基因 rs1927914 位点单核苷酸多态性与 HI 关联分析

项目	基因型	对照组 (n=139)	HT 组 (n=54)	共显性遗传模型			显性模型			隐性模型		
				χ^2	P	OR(95%CI)	χ^2	P	OR(95%CI)	χ^2	P	OR(95%CI)
基因型	T/T	53	24									
	T/C	69	19	3.947	0.139	1.298(0.687,2.453)	2.078	0.149	0.545(0.237,1.255)	0.647	0.421	1.298(0.687,2.453)
	C/C	17	11									
等位基因	T	175	67	0.028	0.868	1.040(0.657,1.645)						
	C	103	41									

表 4 TLR4 基因 rs1927914 位点单核苷酸多态性与 SG 关联分析

项目	基因型	对照组 (n=126)	SG 组 (n=56)	共显性遗传模型			显性模型			隐性模型		
				χ^2	P	OR(95%CI)	χ^2	P	OR(95%CI)	χ^2	P	OR(95%CI)
基因型	T/T	51	30									
	T/C	60	20	4.533	0.104	1.134(0.681,1.888)	0.004	0.949	1.033(0.379,2.815)	4.201	0.040	1.923(1.025,3.609)
	C/C	15	6									
等位基因	T	162	80	2.361	0.124	0.688(0.426,1.110)						
	C	90	32									

的赋值方法分别为(1,2,3)、(1,1,3)和(1,3,3)。结果显示 TLR4 基因 rs1927914 位点在 3 种遗传模式下与 GD、HT 均无关联;而在该位点与 SG 的相关分析中,在隐性遗传模式下显示相关性,即 TT 基因型个体对 SG 的易感性显著增加(隐性遗传模式:OR = 1.923, 95% CI = 1.025 ~ 3.609, P = 0.040),见表 2~4。

3 讨论

TLRs 是一个介导天然免疫的跨膜信号传递受体家族,它通过识别病原相关的分子模式,激活受体后级联反应产生相关的免疫应答^[4]。TLR4 是人类发现的首个 TLR 相关蛋白。人类 TLR4 基因位于染色体 9q33.1,全长 11.6 kb,由 4 个外显子组成,编码 800 个氨基酸的 I 型跨膜糖蛋白,多态位点位于 TLR4 基因的启动子区域,推测其多态性可能影响到基因的转录、翻译,进而改变 TLR4 蛋白质的结构和功能,使机体对有害环境因素的反应产生变化,从而导致疾病的发生。

基于以上原因,有关 TLR4 基因 rs1927914 位点多态性与疾病的相关研究多有报道。徐翔等^[5]探讨了我国北方汉族人群 TLR4 基因多态性与大动脉粥样硬化性脑梗死及脑动脉粥样硬化血管床选择性的关系,发现在中国北方汉族人中位点多态性与脑梗死

相关,与血管床选择性不相关。而梁宝云^[6]的研究则发现 TLR4 基因位点可能对男性缺血性脑卒中具有保护作用。张丽菊^[7]应用 1:1 匹配的病例对照研究,确定位点多态性与 2 型糖尿病之间无相关性。古联等^[8]在对 TLR4 基因 rs1927914 位点多态性与汉族男性中风易感性的研究中,发现了阳性相关结果。印度有关该位点与糖尿病足和糖尿病视网膜病变关系的研究表明,两者之间无关联^[9-10]。有关该位点多态性与癌症的研究也有报道,WENG 等^[11]收集了 3 937 例病例和 7 382 例对照关于 TLR4 基因多态性与浸润性前列腺癌相关的研究做了 Meta 分析,显示出阴性结果。

甲状腺疾病是一类环境因素、生活方式及多基因联合作用的病因复杂疾病。GD、HT、SG 在人群筛查中比较常见。目前认为,这 3 种甲状腺疾病的发生除了与碘的摄入、吸烟、感染等外部因素有关外,都表现出强烈的遗传特点。为了探讨 TLR4 基因 rs1927914 位点多态性与甲状腺疾病之间的关系,以河北省沧州市甲状腺疾病调查人群为研究对象进行本研究。河北省沧州市东面临海,西接太行山,不同区域环境及饮食饮水中碘的差异很大,各地生活习惯也各有不同。本研究在研究对象的选择中,不仅获得了人群调查所得病例,同时同地区同人群中选择同性别且年

龄相近的人群做对照,很好地平衡了影响甲状腺疾病发生的一些外部条件,以突出单基因在疾病发生中的作用。

本研究未发现 TLR4 基因 rs1927914-T/C 位点多态性与 GD 和 HT 的发病风险存在关联,而在该基因位点突变与 SG 的基因型相关分析中,发现其隐性遗传模型与疾病有关联,即 TT 基因型与 SG 病变呈正相关。其研究稳定性和作用机制还需进一步研究。曾有研究报道有关感染与甲状腺疾病发生的作用机制。刘奕婷等^[12]报道幽门螺杆菌感染与自身免疫性甲状腺炎存在相关性;MORI 等^[13]指出肠道内菌群的失调可造成肠道免疫屏障受损,从而影响肠外免疫系统并参与 HT 的发生;DESAILLOUD 等^[14]认为是高度同源病毒肽段通过分子模拟机制诱发免疫反应,导致 TLRs 激活机体固有免疫和适应性免疫,从而损伤甲状腺细胞。SANTANA 等^[15]观察到 TLR4 基因 rs1927914 携带 T 等位基因,增加了血清中白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-17 的水平,而 IL-1 β 对于增强 T 细胞特异性免疫反应至关重要。因此,笔者推测 rs1927914 位点的多态性可能影响到某些重要的细胞因子的生产水平,进而改变了免疫系统对感染等外界环境因素的反应调控作用,从而影响到 SG 的发生。

尽管本研究发现了 TLR4 基因 rs1927914 位点多态性与 SG 相关,但本研究也存在一定的局限性。考虑到甲状腺疾病的发生还与地理环境、种族差异、遗传异质性等有关,也不能完全排除吸烟、喝酒等其他一些混杂因素的影响;此外,单核苷酸多态性与疾病在统计学上的关联和真正的因果联系之间还有很长的距离,仍需要了解基因如何参与复杂的人体免疫系统调控最终影响疾病的发生。

综上所述,本研究发现了 TLR4 基因 rs1927914TT 基因型与 SG 的相关性,提示该基因在该病发生中的重要性。目前有关 TLR4 基因 rs1927914 位点多态性与甲状腺疾病相关性研究报道较少,需要进一步通过不同群体进行研究,来揭示基因突变在疾病发生、发展中的作用及作用机制,为基于遗传学背景的个性化治疗和人群预防奠定基础。

参考文献

- [1] 樊贵东. 甲状腺疾病相关参数、因素分析[J]. 医药前沿, 2015,5(6):5-6.
- [2] 钱晶. 健康体检人群甲状腺疾病检出率分析[J]. 现代预

防医学,2014,41(23):4324-4327.

- [3] KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5):373-384.
- [4] MANDREKAR P, PRUETT S, ARTEEL G, et al. RSA 2004: combined basic research satellite symposium-session two: toll-like receptors and organ damage[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005, 29(9):1744-1748.
- [5] 徐翔, 那娜, 潘旭东, 等. TLR4 基因多态性与大动脉粥样硬化性脑梗死及血管床选择性的关联分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2014, 31(4):455-461.
- [6] 梁宝云. TLR4 基因多态性与缺血性脑卒中及其中医证型遗传易感性的关联研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2015.
- [7] 张丽菊. TLR4 介导的信号通路基因多态性与 2 型糖尿病遗传易感性的关联研究[D]. 广州: 暨南大学, 2014.
- [8] 古联, 黄静妍, 苏莉, 等. Toll 样受体 4 基因多态性与汉族男性中风证型关联性研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2016, 32(6):513-518.
- [9] SINGH K, SINGH V K, AGRAWAL N K, et al. Association of Toll-like receptor 4 polymorphisms with diabetic foot ulcers and application of artificial neural network in DFU risk assessment in type 2 diabetes patients[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013(2):318686.
- [10] SINGH K, KANT S, SINGH V K, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and their haplotypes modulate the risk of developing diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients[J]. *Mol Vis*, 2014, 20(5):704-713.
- [11] WENG P H, HUANG Y L, PAGE J H, et al. Polymorphisms of an innate immune gene, toll-like receptor 4, and aggressive prostate cancer risk: a systematic review and Meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10):e110569.
- [12] 刘奕婷, 王巍, 于晓松. 幽门螺杆菌感染与甲状腺疾病的相关性研究[J]. *现代预防医学*, 2016, 43(13):2423-2426.
- [13] MORI K, NAKAGAWA Y, OZAKI H. Does the gut microbiota trigger Hashimoto's thyroiditis? [J]. *Discov Med*, 2012, 14(78):321-326.
- [14] DESAILLOUD R, HOBER D. Viruses and thyroiditis: an update[J]. *Virology*, 2009, 6(1):5.
- [15] SANTANA N L, RÉGO J L, OLIVEIRA J M, et al. Polymorphisms in genes TLR1, 2 and 4 are associated with differential cytokine and chemokine serum production in patients with leprosy[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2017, 112(4):260-268.

(收稿日期:2018-06-25 修回日期:2018-10-11)