

• 论 著 •

Toll 样受体-4、9 基因多态性与胃癌发病风险的相关性研究*

周 琳^{1,2}, 张青松³, 朱燕忠², 赵吉光⁴, 顾园园^{2△}

1. 前海人寿广州总医院检验科, 广东广州 511330; 2. 江苏省太湖康复医院检验科, 江苏无锡 214086; 安徽宣城市中心医院; 3. 检验科; 4. 肿瘤科, 安徽宣城 242000

摘要:目的 研究 Toll 样受体(TLR)-4、TLR-9 基因多态性与胃癌发病风险的相关性。方法 选取 2016 年 1 月至 2019 年 12 月招募江苏省无锡市及安徽省宣城市 325 例胃癌患者(病例组)及同期招募该地区经体检检测结果为健康且自述无消化道疾病史的人群 402 例(对照组)作为研究对象,TLR-4、TLR-9 基因多态性分析采用 Mass-array 基因芯片分析,幽门螺杆菌(Hp)感染检测采用免疫胶体金法检测抗体。结果 病例组中吸烟、饮酒比例高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。TLR-9 rs187084 基因多态性位点的 GA、GA/GG 基因型与胃癌发病风险相关。年龄 >60 岁胃癌患者的 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的 GA 及 GA/GG 基因型均与胃癌发病风险相关($P<0.05$)。非贲门部位的胃癌患者 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的 GA 及 GA/GG 基因型均与胃癌发病风险相关($P<0.05$)。结论 年龄 >60 岁及非贲门部位胃癌患者 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的 GA 及 GA/GG 基因型均与胃癌发病风险相关。

关键词:胃癌; Toll 样受体-4; Toll 样受体-9; 基因多态性; 幽门螺杆菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.18.007 **中图法分类号:**R573.3

文章编号:1673-4130(2021)18-2204-05 **文献标志码:**A

Study on the correlation between Toll-like receptor 4,9 gene polymorphism and the risk of gastric cancer*

ZHOU Lin^{1,2}, ZHANG Qingsong³, ZHU Yanzhong², ZHAO Jiguang⁴, GU Yuanyuan^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Foresea Life Insurance Guangzhou General Hospital, Guangzhou, Guangdong 511330, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Taihu Rehabilitation Hospital of Jiangsu Province, Wuxi, Jiangsu 214086, China; 3. Department of Clinical Laboratory; 4. Department of Oncology, Xuancheng City Central Hospital, Xuancheng, Anhui 242000, China

Abstract:Objective To investigate the association between toll-like receptor (TLR)-4 and TLR-9 gene polymorphism and the risk of gastric cancer. **Methods** A total of 325 gastric cancer patients (case group) recruited from Wuxi, Jiangsu province and Xuancheng, Anhui Province from January 2016 to December 2019, and a total of 402 healthy people (control group) who reported no history of digestive tract diseases and were recruited from the same period in the same area were selected as the study subjects. TLR-4, TLR-9 gene polymorphism were analyzed by Mass array gene chip analysis, and Helicobacter pylori (Hp) infection was detected by immunocolloidal gold assay. **Results** The proportion of smoking and drinking in the case group was higher than that in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). GA and GA/GG genotypes of TLR-9 rs187084 polymorphism loci were associated with the risk of gastric cancer. GA and GA/GG genotypes of TLR-9 rs187084 polymorphism loci in patients older than 60 years in case group were correlated with the risk of gastric cancer ($P<0.05$). GA and GA/GG polymorphisms of TLR-9 rs187084 gene in patients with non-cardiac tumor site in case group were correlated with the risk of gastric cancer ($P<0.05$). **Conclusion** GA and GA/GG polymorphic loci of TLR-9 rs187084 gene are associated with the risk of gastric cancer in patients older than 60 years or with non-cardiac tumor site.

Key words:gastric cancer; toll-like receptors-4; toll-like receptors-9; polymorphism; Helicobacter pylori

* 基金项目:江苏省干部保健课题基金(BJ17035)。

作者简介:周琳,男,副主任技师,主要从事临床分子诊断研究。△ 通信作者,E-mail:154339794@qq.com。

本文引用格式:周琳,张青松,朱燕忠,等. Toll 样受体-4、9 基因多态性与胃癌发病风险的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42

胃癌是我国发病率及病死率较高的恶性肿瘤之一。目前研究普遍认为环境因素与遗传因素交互作用导致疾病的进展并最终导致胃癌的发生,其中环境因素如饮食结构与习惯、吸烟、饮酒等被认为是胃癌的诱发因素,病原菌感染如幽门螺杆菌(Hp)、EB 病毒感染是胃癌的致病因素^[1]。这些易感因素的探明为胃癌的预警及重点人群的早期筛查提供了重要依据^[2]。Toll 样受体(TLR)是一种进化上高度保守的 I 型跨膜蛋白,主要表达于巨噬细胞和树突细胞表面,其是一组重要的模式识别受体,在病原体入侵人体时发挥屏障作用。TLR-4 与病原体入侵机体的早期免疫应答及感染后的适应性免疫应答相关。研究表明 TLR-4 是细菌脂多糖的受体,Hp 脂多糖可以通过 TLR-4 诱导致炎因子分泌,通过活化单核细胞和胃上皮细胞诱导一氧化氮和氧自由基,导致胃部炎症及疾病进展^[3]。因此,TLR-4 与肿瘤特别是炎症相关性肿瘤密切相关。TLR-9 主要表达于多种免疫细胞,如记忆性 B 淋巴细胞、T 细胞、浆细胞样树突细胞等,其在多种肿瘤细胞中亦有表达;在胃癌的发生过程中 TLR-9 介导的炎性反应发挥着重要的作用^[4]。有研究指出,TLR-9 基因多态性与 Hp 感染相关,是胃癌潜在易感基因^[5]。本研究对江苏省无锡市及安徽省宣城市胃癌及健康人群进行调查,探讨 TLR-4 及 TLR-9 基因多态性与胃癌发病风险及病理的相关性,为胃癌的临床及基础研究积累分子流行病学资料,探讨其临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月至 2019 年 12 月招募江苏省无锡市及安徽省宣城市经病理确诊的 325 例胃癌患者(病例组),以及同期招募该地区经体检检测结果为健康且自述无消化道疾病史的健康者 402 例(对照组)作为研究对象。

1.2 方法 所有受试者均采集乙二胺四乙酸抗凝的静脉血 3 mL,分离血浆与血细胞。Hp 感染采用胶体金法(上海凯创生物技术公司产品)检测抗体。基因组 DNA 提取采用纳米磁技术(西安金磁纳米生物技术有限公司产品)按照试剂说明书步骤进行。基因组提取后检测 DNA 浓度与纯度(NaniDrop2000c 型蛋白核酸检测仪,美国 Thermo 公司)。基因分型采用 MassARRAY 技术进行(点样仪及质谱仪为美国 Sequenom 公司产品;Iplex Gold Reagent kit 试剂盒为美国 Sequenom 公司产品),该平台分析基因型主要为以下步骤:目标序列的扩增、虾碱性磷酸酶纯化、单碱基延伸、树脂纯化、MassArray 点样仪、质谱分析、结果解读。PCR 所用引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 扩增仪为美国 ABI 公司产品(GeneAmp PCR System 9700 型)。

1.3 多态性位点的选择 在公共数据库中(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)检索 TLR-4 及 TLR-9 基因多态性位点的信息。基因多态性位点的选择符合以下条件:(1)现有研究显示有潜在的胃癌相关性风险;(2)基因多态性位点在人群的最小等位基因频率为大于 0.05;(3)基因多态性位点位于 TLR-4 或 TLR-9 基因相关区域位置见表 1。

表 1 TLR-4 及 TLR-9 基因多态性位点信息

基因	多态性位点	等位基因	对照组 HWE* (χ^2/P)
TLR-4	rs10759932	T/C	0.020/0.889
TLR-4	rs1927911	G/A	0.524/0.469
TLR-4	rs11536889	G/C	0.194/0.659
TLR-9	rs187084	G/A	1.151/0.283

注:*表示对照组为哈迪-温伯格平衡检测结果, $P>0.05$ 说明选取对照组群体具有代表性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行数据分析,计数资料的组间比较采用 χ^2 检验。基因型比例采用 χ^2 检验进行,对照组样本采用 Hardy-Weinberg 平衡检测选择样本是否符合要求。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,如不符合正态分布采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用非参数秩和检验或 t 检验。基因型风险采用二分类因变量 Logistic 回归分析,以校正后的风险比(OR)及 95%CI 表示各基因型对胃癌发病的相对风险度, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床与基本特征比较 两组年龄、性别比较,差异无统计学意义($P>0.05$);病例组中吸烟、饮酒比例高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。对照组的 Hardy-Weinberg 遗传平衡(HWE)检验结果($P>0.05$)显示样本具有群体代表性,见表 2。

2.2 两组 TLR-4、TLR-9 基因多态性位点的基因型分布及与胃癌发病风险的关系 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的 GA、GA/GG 基因型与胃癌发病风险相关,见表 3。

2.3 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的基因型与胃癌发病风险的相关因素分析 为明确 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的基因型与胃癌发病风险的相关因素之间关系,对年龄、性别、Hp 感染、肿瘤部位、肿瘤分期进行分析,结果显示年龄 >60 岁的胃癌患者 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的 GA 及 GA/GG 基因型均与胃癌发病风险相关($P<0.05$),年龄 ≤ 60 岁胃癌患者的 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的所有基因型均与胃癌发病风险无关。病例组 Hp 感染阳性患者的 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的 GA 及 GA/GG 基因型均与胃癌发病风险相关($P<$

0.05),而病例组 Hp 感染阴性患者的 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的所有基因型均与胃癌发病风险无关。肿瘤部位为非贲门的胃癌患者 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的 GA 及 GA/GG 基因型

均与胃癌发病风险相关($P<0.05$)。胃癌患者肿瘤分期 T3~T4 期患者的 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的 GA 及 GA/GG 基因型与胃癌发病风险相关($P<0.05$),见表 4。

表 2 两组临床资料比较

项目	病例组	对照组	$\chi^2/t/Z$	P
n	325	402		
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	65.24±11.98	63.91±12.34	1.467	0.143
性别[$n(\%)$]				
男性	242(74.46)	273(67.91)	3.734	0.053
女性	83(25.54)	129(32.09)		
吸烟[$n(\%)$]				
是	69(21.23)	51(12.69)	9.520	0.002
否	256(78.77)	351(87.31)		
饮酒[$n(\%)$]				
是	31(9.54)	15(3.73)	10.225	0.001
否	294(90.46)	387(96.27)		
血细胞计数				
白细胞($\bar{x}\pm s,\times 10^9$)	6.03±2.12	6.67±2.03	4.105	<0.001
中性粒细胞($\bar{x}\pm s,\times 10^9$)	4.08±1.98	4.21±1.67	0.992	0.322
淋巴细胞[$M(P_{25},P_{75}),\times 10^9$]	1.35(1.02,1.83)	1.87(1.43,2.37)	9.585	<0.001
单核细胞[$M(P_{25},P_{75}),\times 10^9$]	0.33(0.23,0.42)	0.30(0.24,0.39)	1.564	0.118
Hp 感染[$n(\%)$]				
阳性	174(53.54)	193(48.01)	2.197	0.138
阴性	151(46.46)	209(51.99)		
临床分期[$n(\%)$]				
T1~T2 期	110(33.85)	—	—	—
T3~T4 期	215(66.15)	—		
肿瘤部位[$n(\%)$]				
贲门	103(31.69)	—	—	—
非贲门	222(68.31)	—		

注:—表示无数据。

表 3 两组 TLR-4、TLR-9 基因多态性位点的基因型分布及与胃癌发病风险的关系

项目	对照组[$n(\%)$]	病例组[$n(\%)$]	$OR(95\%CI)^*$	χ^2	P
rs10759932					
TT	213(52.99)	167(51.38)	参照	1.621	0.447
TC	160(39.80)	126(38.77)	0.96(0.70~1.31)	0.082	0.775
CC	29(7.21)	32(9.85)	1.44(0.83~2.50)	1.674	0.196
TC/CC	189(47.01)	158(48.62)	1.03(0.76~1.38)	0.030	0.863
rs1927911					
GG	145(36.07)	120(36.92)	参照	0.120	0.942
GA	187(46.52)	147(45.23)	0.93(0.67~1.29)	0.193	0.661
AA	70(17.41)	58(17.85)	1.00(0.65~1.54)	0.000	0.987
GA/AA	257(63.93)	205(63.08)	0.94(0.69~1.28)	0.135	0.713

续表 3 两组 TLR-4、TLR-9 基因多态性位点的基因型分布及与胃癌发病风险的关系

项目	对照组[n(%)]	病例组[n(%)]	OR(95%CI) *	χ ²	P
rs11536889					
GG	246(61.19)	202(62.15)	参照	0.973	0.615
GC	135(33.58)	111(34.15)	0.97(0.70~1.33)	0.039	0.843
CC	21(5.22)	12(3.69)	0.66(0.32~1.39)	1.195	0.274
CT/TT	156(38.81)	123(37.85)	0.93(0.68~1.26)	0.221	0.638
rs187084					
AA	168(41.79)	101(31.08)	参照	10.041	0.007
GA	176(43.78)	178(54.77)	1.69(1.22~2.36)	10.009	0.002
GG	58(14.43)	46(14.15)	1.30(0.81~2.08)	1.176	0.278
GA/GG	103(33.55)	83(32.81)	1.60(1.17~2.19)	8.770	0.003

注：* 表示经过性别、年龄、Hp 感染等相关影响因素校正后的值。

表 4 两组 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的基因型与胃癌发病风险的相关因素分析

项目	GA 对比 AA			GG 对比 AA			GA/GG 对比 AA		
	OR(95%CI) *	χ ²	P	OR(95%CI) *	χ ²	P	OR(95%CI) *	χ ²	P
年龄									
≤60 岁	1.42(0.80~2.50)	1.461	0.227	1.04(0.45~2.38)	0.007	0.935	1.31(0.76~2.26)	0.967	0.326
>60 岁	1.95(1.30~2.93)	10.353	0.001	1.52(0.85~2.72)	1.972	0.160	1.83(1.25~2.69)	9.447	0.002
性别									
男性	1.51(1.03~2.24)	4.409	0.036	1.22(0.70~2.14)	0.477	0.490	1.45(1.00~2.10)	3.792	0.052
女性	2.12(1.13~3.96)	5.526	0.019	1.61(0.67~3.88)	1.140	0.286	2.01(1.11~3.63)	5.352	0.021
Hp 感染									
阳性	1.89(1.18~3.03)	7.043	0.008	1.72(0.90~3.31)	2.669	0.102	1.85(1.19~2.89)	7.347	0.007
阴性	1.50(0.95~2.38)	2.921	0.087	0.95(0.47~1.91)	0.021	0.884	1.38(0.88~2.14)	2.010	0.157
肿瘤部位									
贲门	1.17(0.72~1.92)	0.398	0.528	1.32(0.68~2.54)	0.668	0.414	1.22(0.78~1.94)	0.771	0.380
非贲门	2.04(1.40~2.96)	13.792	0.000	1.30(0.75~2.27)	0.869	0.351	1.86(1.30~2.67)	11.387	0.001
肿瘤分期									
T1~T2 期	1.44(0.90~2.30)	2.316	0.128	0.92(0.45~1.91)	0.048	0.827	1.31(0.84~2.06)	1.391	0.238
T3~T4 期	1.86(1.27~2.72)	10.253	0.001	1.55(0.91~2.63)	2.648	0.104	1.79(1.24~2.56)	9.867	0.002

注：* 表示经过性别、年龄、Hp 感染等相关影响因素校正后的值。

3 讨 论

TLR-9 rs187084 位点位于该基因的启动子-1 486 位,该位点的多态性导致形成转录因子 SP1 的结合位点^[6],影响了 TLR-9 表达^[7]。研究显示,与浅表性胃炎、萎缩性胃炎及异常增生的患者相比,TLR-9 在胃癌患者中呈现高表达,且与 Hp 感染相关^[4,8]。有研究表明,在宫颈癌研究中发现该位点与患者外周血单核细胞中的 TLR-9 mRNA 及血清中的 TLR-9 蛋白水平相关,并与人乳头瘤病毒感染关联^[9]。本研究结果显示,TLR-9 rs187084 基因多态性位点的 GA 及 GA/GG 基因型与胃癌发病风险相关。此外,另有研究进一步证实 GA 或 GG 基因型与胃癌、宫颈癌发病风险相关^[10-11],与本研究结果一致。

本研究发现年龄>60 岁的胃癌患者 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的 GA 及 GA/GG 基因型均与胃癌发病风险相关($P<0.05$),可能是由于在年龄较大的人群中受到 Hp 持续感染,暴露时间长,致胃部炎症水平升高,引起 TLR-9 表达增加,进而增加胃癌的发病风险^[12]。胃癌患者肿瘤部位为非贲门的患者 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的 GA 及 GA/GG 基因型均与胃癌发病风险相关($P<0.05$),与 TLR-9 参与胃癌的发病进程相关机制一致^[12]。有研究显示,TLR-9 rs187084 基因多态性位点的基因型与胃癌的预后相关,G 等位基因与预后较差相关^[10],此与本研究结论一致。本研究结果显示,TLR-9 rs187084 基因多态性与胃癌发病风险相关,且与 Hp

感染有潜在关联,是非贲门胃癌的风险因素,该位点的基因型与胃癌的分期相关,是潜在的预后不良因素。

有研究发现 TLR-4 rs10759932 基因多态性位点^[14]及 rs1927911 基因多态性位点^[15]的基因型与胃癌发病风险相关,与本研究的结论不一致。此可能与病例选择及研究的方法不一样有关,上述两个研究均采用聚合酶链反应-限制性内切酶法,而本研究采用的 Mass-array 基因分析平台结果相对可靠。还有研究显示 TLR-4 rs11536889 的基因型与胃癌发病风险相关^[16],与本研究结论不一致,其所纳入病例相对较少,而本研究病例数虽相对较大,但本研究的病例数统计学效应还较弱,有待于更多的大样本研究进一步证实。胃癌是一个多基因多因素参与的复杂疾病,TLR-9 rs187084 基因多态性位点的功能研究还不清晰。

综上所述,年龄>60 岁及非贲门部位的胃癌患者 TLR-9 rs187084 基因多态性位点的 GA 及 GA/GG 基因型均与胃癌发病风险相关。

参考文献

[1] MOCELLIN S, VERDI D, POOLEY K A, et al. Genetic variation and gastric cancer risk: a field synopsis and meta-analysis[J]. Gut, 2015, 64(8): 1209-1219.

[2] JIN G, LV J, YANG M, et al. Genetic risk, incident gastric cancer, and healthy lifestyle: a meta-analysis of genome-wide association studies and prospective cohort study[J]. Lancet Oncol, 2020, 21(10): 1378-1386.

[3] 赵亚刚, 张小瑞, 吴炜景, 等. 诱导性一氧化氮合酶在幽门螺杆菌与胃癌关系中的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(7): 1166-1167.

[4] 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): 6950-6955.

[5] 曾红梅, 潘凯枫, 张阳, 等. Toll 样受体 2 及 Toll 样受体 9 基因多态性与胃癌易感性的关系[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(7): 588-592.

[6] HAMANN L, GLAESER C, HAMPRECHT A, et al. Toll-like receptor (tlr)-9 promotor polymorphisms and atherosclerosis[J]. Clin Chim Acta, 2006, 364(1/2): 303-307.

[7] TAO K, FUJII M, TSUKUMO S, et al. Genetic variations

of toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in japanese population [J]. Ann Rheum Dis, 2007, 66(7): 905-909.

[8] SUSI M D, LOURENCO C M, RASMUSSEN L T, et al. Toll-like receptor 9 polymorphisms and helicobacter pylori influence gene expression and risk of gastric carcinogenesis in the brazilian population[J]. World J Gastrointest Oncol, 2019, 11(11): 998-1010.

[9] MARTINEZ-CAMPOS C, BAHENA-ROMAN M, TORRE S-POVEDA K, et al. Tlr9 gene polymorphism -1486t/c (rs187084) is associated with uterine cervical neoplasm in mexican female population[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2017, 143(12): 2437-2445.

[10] WANG X, XUE L, YANG Y, et al. Tlr9 promoter polymorphism is associated with both an increased susceptibility to gastric carcinoma and poor prognosis[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65731.

[11] TIAN S, ZHANG L, YANG T, et al. The associations between toll-like receptor 9 gene polymorphisms and cervical cancer susceptibility[J]. Mediators Inflamm, 2018, 25(1): 912-923.

[12] DIAKOWSKA D, NIENARTOWICZ M, GRABOWSKI K, et al. Toll-like receptors tlr-2, tlr-4, tlr-7, and tlr-9 in tumor tissue and serum of the patients with esophageal squamous cell carcinoma and gastro-esophageal junction cancer[J]. Adv Clin Exp Med, 2019, 28(4): 515-522.

[13] XUE L, ZHANG X, LI Y, et al. Differences of immunophenotypic markers and signaling molecules between adenocarcinomas of gastric cardia and distal stomach [J]. Hum Pathol, 2011, 42(4): 594-601.

[14] HUANG H, WU J, JIN G, et al. A 5'-flanking region polymorphism in toll-like receptor 4 is associated with gastric cancer in a chinese population[J]. J Biomed Res, 2010, 24(2): 100-106.

[15] HUANG L, YUAN K, LIU J, et al. Polymorphisms of the tlr4 gene and risk of gastric cancer[J]. Gene, 2014, 537(1): 46-50.

[16] CASTANO-RODRIGUEZ N, KAAKOUSH N O, PARDO A L, et al. Genetic polymorphisms in the toll-like receptor signalling pathway in helicobacter pylori infection and related gastric cancer[J]. Hum Immunol, 2014, 75(8): 808-815.