

Toll 样受体 4(896A/G) 基因多态性与溃疡性结肠炎易感性的 Meta 分析

黄萃园,张洪,白瑞丹

(武汉大学人民医院药学部,湖北 武汉 430060)

摘要:目的 研究 Toll 样受体 4(TLR4)896A > G 位点基因多态性与溃疡性结肠炎(UC)发病风险的关系。**方法** 检索相关英文及中文数据库筛选文献,以 OR 值及 95% CI 为效应指标,运用 RevMan 5.2 和 Stata 11.0 进行 Meta 分析和敏感性分析,并采用 Egger's test 评价发表偏倚。**结果** 研究共纳入 14 篇文献,包括 2 174 例 UC 患者和 3 134 例对照者。Meta 分析结果表明携带等位基因 G 的人群较携带等位基因 A 的人群患 UC 的风险性增加,在各个基因模型下均差异有统计学意义[等位基因模型 G/A;OR = 1.41,95% CI(1.21 ~ 1.66), $P < 0.000 1$;显性模型 AG + GG/AA;OR = 1.37,95% CI(1.16 ~ 1.62), $P = 0.000 2$;隐性模型 GG/AA + AG;OR = 3.74,95% CI(1.78 ~ 7.86), $P = 0.000 5$;共显性模型 AG/AA;OR = 1.42,95% CI(1.07 ~ 1.87), $P = 0.01$;共显性模型 GG/AA;OR = 3.85,95% CI(1.82 ~ 8.12), $P = 0.000 4$]。亚组分析结果表明,在等位基因模型 G/A、显性模型 AG + GG/AA、共显性模型 AG/AA 下,差异仅在白种人中存在。**结论** TLR4 896A > G 基因多态性与 UC 易感性相关,携带等位基因 G 会增加白种人患 UC 的发病风险。由于该研究纳入有关亚洲人群及非洲人群的文献数量较少,相关结果需要更多研究予以验证。

关键词:Toll 样受体 4;基因多态性;冠心病;Meta 分析

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.01.015

Association between the polymorphism (896A/G) of TLR4 gene and susceptibility of ulcerative colitis: a Meta-analysis

HUANG Cuiyuan, ZHANG Hong, BAI Ruidan

(Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

Abstract: Objective To study the relationship between toll like receptor 4(TLR4) 896A > G polymorphism and the risk of ulcerative colitis (UC). **Methods** The English and Chinese database were searched to screen the relevant literatures. RevMan 5.2 and Stata 11.0 software were used for the meta-analysis and sensitivity analysis, the odds ratio (OR value) and 95% confidence interval (95% CI) were calculated. Egger's test was used for publication bias. **Results** A total of 14 articles were included in the study with 2174 UC patients and 3134 controls. Meta-analysis showed that compared with allele A, the allele G increased the risks of ulcerative colitis significantly [allele model G/A; OR = 1.41, 95% CI (1.21-1.66), $P < 0.000 1$]; dominant model AG + GG/AA; OR = 1.37, 95% CI (1.16-1.62), $P = 0.000 2$; recessive model GG/AA + AG; OR = 3.74, 95% CI (1.78-7.86), $P = 0.000 5$; co-dominant model AG/AA; OR = 1.42, 95% CI (1.07-1.87), $P = 0.01$; co-dominant model GG/AA; OR = 3.85, 95% CI (1.82-8.12), $P = 0.000 4$]. But, the results of subgroup analysis showed that the differences only existed among caucasians in allele model G/A, dominant model AG + GG/AA and co-dominant model AG/AA. **Conclusions** TLR4 896A > G polymorphism is associated with the susceptibility of ulcerative colitis, and the allele G increases the risks of ulcerative colitis significantly in caucasians. Due to the limited quantity of the included studies about Asian and African population, further studies are needed to validate our findings.

Keywords: TLR4; polymorphism; ulcerative colitis; meta-analysis

溃疡性结肠炎(UC)是炎症性肠病(IBD)的一种,已成为全球性的健康问题^[1],病因复杂,机制尚未阐明。目前普遍认为IBD的发病与环境、遗传、感染等因素的共同作用有关。其中,遗传因素对IBD的发病机制有重要的影响^[2]。近年来,已有大量研究表明单核苷酸多态性(SNP)与IBD发病风

险具有相关性^[3-5]。Toll 样受体 4(TLR4)是一种跨膜蛋白,是革兰阴性菌脂多糖(LPS)的受体^[6],在LPS识别和诱导免疫反应中发挥了重要的作用^[7]。在正常的肠上皮表面TLR4水平较低,而在IBD患者中TLR4的表达显著上调^[8],提示TLR4与IBD的发病机制有关。TLR4基因896A > G、1196 C > T位点的突变会导致编码TLR4蛋白的氨基酸及蛋白功能的改变,研究表明TLR4 896A > G、1196 C > T位点的

通信作者:张洪,男,教授,主任药师,研究方向:消化系统疾病治疗药物的药剂学与药理学研究,E-mail:cuiandli92@163.com

SNP 会降低其与 LPS 的反应性或者抑制 LPS 诱导的信号通路^[9-10],这可能使得机体免疫系统不能正常处理肠腔内微生物而导致炎症的加剧。目前,有许多有关 TLR4 896A > G 基因多态性与 UC 的报道,但结论不尽相同。因此,为了进一步明确 TLR4 896A > G 位点基因多态性与 UC 发病风险的关系,本文对已公开发表的文献进行筛选并进行 Meta 分析,以期明确 UC 的发病机制提供循证医学证据。

1 资料与方法

1.1 文献检索策略 计算机检索 PubMed、Science direct、Wiley online library、CNKI、WanFang Data 和 VIP 数据库有关 TLR4 基因多态性与 UC 发病风险的病例对照研究,检索时限均为建库至 2016 年 10 月 11 日。同时查阅并筛选纳入文献的参考文献。采用的方式为主题词与自由词相结合。英文检索词为 TLR4 or toll-like receptor 4、mutation or polymorphism or variant、Inflammatory bowel disease or IBD or ulcerative colitis or UC; 中文检索词包括 TLR4、Toll 样受体 4、基因多态性、炎症性肠病、UC。

1.2 纳入与排除标准

1.2.1 纳入标准 (1) 文献为公开发表的;(2) 研究类型为病例-对照研究;(3) 经病理或和内镜下检查明确诊断为 UC 的患者;(4) 文献内容为 TLR4 基因多态性与 UC 发病风险关系的研究;(5) 文献统计方法恰当,数据报道完整。

1.2.2 排除标准 (1) 综述性文献、会议摘要等;(2) 研究未设立对照组;(3) 重复发表文献的研究;(4) 数据不全或无法获得数据的研究;(5) 不符合 Hardy-Weinberg 遗传定律。

1.3 文献筛选、资料提取和方法学质量评价 由 2 位评价者根据纳入标准独立对文献进行筛选,相互核对后讨论达成一致。资料提取内容包括:(1) 第

一作者信息及文章发表年份;(2) 病例-对照研究信息,包括:研究地域、研究人种、疾病分型、基因型检测方法和疾病组与对照组基因型数量等;(3) 质量评价的关键要素。采用 NOS 标准^[11]评价纳入各个原始文献的质量。

1.4 统计学方法 Meta 分析运用 RevMan 5.2 和 Stata 11.0 软件进行。各研究异质性检验采用 χ^2 检验和 I^2 检验。根据结果采用固定效应模型($P \geq 0.05$ 且 $I^2 < 50\%$)或者随机效应模型($P < 0.05$ 或 $I^2 \geq 50\%$)进行 Meta 分析。分别计算 5 种遗传模型(G/A、AG + GG/AA、GG/AA + AG、AG/AA、GG/AA)的 OR 值及 95% CI。运用 Stata 11.0 进行敏感性分析及 Egger's test,计算 t 值及 P 值评估发表偏倚, $P < 0.05$ 则认为存在发表偏倚。

2 结果

2.1 文献检索结果 初步检索得到 81 篇文献,包括 3 篇中文文献和 78 篇英文文献。通过阅读摘要及全文后,初步纳入 15 篇文献^[12-26],其中 Gazouli 等^[26]研究的对照组基因型分布不符合 HWE 被排除。因此,最终纳入 14 篇文献(包括 2 174 例患者和 3 134 例对照)。纳入文献的基本信息及方法学质量评价见表 1。NOS 平均得分 7.4 分,提示纳入文献的方法学质量较好。

2.2 Meta 分析结果

2.2.1 TLR4 896A > G 基因位点的 5 种基因模型异质性分析 各研究采用 χ^2 检验和 I^2 检验进行异质性检验,结果为:等位基因模型下 $I^2 = 26\%$, $P = 0.18$;显性模型下 $I^2 = 37\%$, $P = 0.08$;隐性模型下 $I^2 = 0\%$, $P = 0.79$;共显性模型下 AG/AA: $I^2 = 46\%$, $P = 0.03$;GG/AA: $I^2 = 0\%$, $P = 0.81$ 。因此,除了共显性模型 AG/AA($P < 0.05$)采用随机效应模型,其他模型异质性较小均采用固定效应模型。考虑到

表 1 纳入文献的基本信息及方法学质量评价

第一作者	年份	国家	种族	基因型检测方法	病例组基因型			对照组基因型			对照组是否符合 HWE	NOS 标准评分/分
					AA	AG	GG	AA	AG	GG		
Arnott ^[12]	2004	Scottish	Caucasians	PCR-RFLP	212	32	2	157	31	1	是	8
Browning ^[13]	2007	New Zealand	Caucasians	Taqman	356	47	2	359	43	0	是	8
De Ridder ^[14]	2007	Netherlands	Caucasians	TaqMan	222	33	2	224	20	0	是	6
Franchimont ^[15]	2004	Belgium	Caucasians	Taqman	133	28	2	126	12	1	是	7
Manolakis ^[16]	2013	Greece	Caucasian	PCR-RFLP	146	41	0	242	31	1	是	8
Meena ^[17]	2013	India	Asian	PCR-RFLP	151	37	11	154	46	1	是	9
Mohammadi ^[18]	2013	Iran	Asian	PCR-RFLP	75	10	0	216	39	1	是	8
Oostenbrug ^[19]	2005	Netherlands	Caucasians	TaqMan	159	19	1	269	27	0	是	8
Queiroz ^[20]	2009	Brazil	Caucasian	PCR-RFLP	38	3	1	489	50	0	是	8
Rigoli ^[21]	2008	Italy	Caucasians	PCR-RFLP	42	3	0	95	8	0	是	8
Senhaji ^[22]	2014	Morocco	African	PCR-RFLP	28	6	0	103	8	1	是	6
Sivaram ^[23]	2012	India	Asian	PCR-RFLP	107	30	2	153	23	0	是	6
Stankovic ^[24]	2015	Serbia	Caucasians	PCR-RFLP	80	15	0	94	7	0	是	7
Torok ^[25]	2004	Germany	Caucasians	PCR-RFLP	81	16	1	93	9	0	是	7

群中均存在[白种人:OR = 2.99,95% CI(1.14 ~ 7.85), $P = 0.03$; 亚洲人群:OR = 6.73,95% CI(1.74 ~ 26.00), $P = 0.006$],见图5。

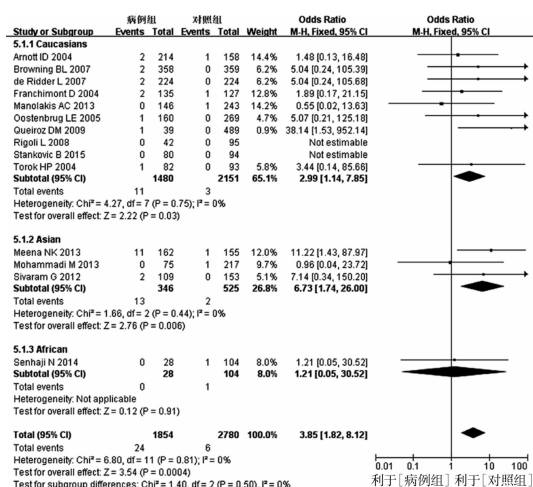


图5 共显性模型 GG/AA 与 UC 的相关性

2.3 敏感性分析 运用 stata 11.0 软件进行敏感性分析,逐一排除分析后,各合并效应量无明显改变。但在共显性模型中 AG/AA 模型中,剔除 Arnett 等^[12]或 Manolakis 等^[16]文献时,各研究间异质性消失($P = 0.075$ 和 $P = 0.077$)。因此,Arnett 等^[12]和 Manolakis 等^[16]文献可能是异质性产生的原因之一。

2.4 发表偏倚分析 TLR4 896A > G 基因多态性与 UC 易感性 Meta 分析发表偏倚见表 2。Egger's test 表明 $t = 0.62$, $P = 0.546 > 0.05$,95% CI 为 (-1.59 ~ 2.86) 包含 0,因此本研究无发表偏倚。

表2 各遗传模型发表偏倚结果

基因型	Std	t 值	P 值	95% CI
A/G	1.02	0.62	0.546	-1.59 ~ 2.86
AG + GG/AA	1.13	0.73	0.479	-1.63 ~ 3.28
GG/AA + AG	1.51	-0.62	0.546	-4.30 ~ 2.42
AG/AA	1.21	0.72	0.484	-1.76 ~ 3.50
GG/AA	1.48	-0.55	0.593	-4.12 ~ 2.48

3 讨论

UC 是一种与直肠、结肠黏膜相关的慢性非特异性疾病,伴有癌变的可能性,其发病机制尚未阐明。TLR4 是 Toll 样受体蛋白家族中的一员,在识别病原微生物相关分子构型和激活天然免疫应答中发挥了重要作用。TLR4 被激活后可引起细胞信号级联,最终激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/核因子- κ B(NF- κ B)等信号通路调节炎症反应。LPS 是 TLR4 特异性配体。TLR4 基因位于 9 号染色体,由于其在天然免疫中的重要作用,其 SNP 也备受关注。肿瘤坏死因子拮抗剂(anti-TNF)可以用来治疗

包括 UC 和克罗恩病(CD)在内的重症 IBD 患者,然而 anti-TNF 对将近 1/3 的患者的治疗无效,这与遗传因素有重要的关系。Bank 等^[27]研究认为,TLR4 基因多态性可以调节肿瘤坏死因子- α 信号通路及其他细胞因子,从而来预测 anti-TNF 对 IBD 患者的治疗效果。同时,Henckaerts 等^[28]研究发现在 IBD 患者中,TLR4 基因多态性与抗体的形成相关,从而影响其对细菌抗原的作用。

Arbour 等^[29]研究发现 TLR4 基因的非同义单核苷酸多态性 896A > G 与 LPS 反应性降低有关,而这可能会导致机体免疫系统无法正常识别 LPS 等病原分子和处理肠腔内的细菌,使肠黏膜在长期刺激下产生或加剧炎症乃至癌变。TLR4 基因 896A > G 等位基因频率的分布在不同种族中差别较大,其突变型等位基因 G 在欧洲人群中频率较高^[30-31],而在亚洲人群中频率较低,许多有关亚洲人群 TLR4 896A > G 基因多态性与 UC 发病率相关文献中均未检测到突变型基因^[30,32-33]。研究不同种族 TLR4 基因 896A/G 等位基因频率及基因型频率分布的不同将有助于阐明不同种族在 UC 发生机制上的差异。

本文 Meta 分析结果表明,携带 TLR4-896G 等位基因会增加 UC 的患病风险。进一步亚组分析显示,仅欧洲人 TLR4 896A > G 基因多态性与 UC 易感性有关,而亚洲人群患 UC 与该基因多态性无相关性。Egger's test 表明在各个遗传模型中均无发表偏倚,因此结果较为可靠。由于本研究存在一定的局限性,例如缺乏灰色文献,部分纳入文献未进行性别及年龄匹配以及未对基因-基因、基因-环境交互作用进行讨论。同时,有关亚洲人群和非洲人群 TLR4 896A > G 基因多态性与 UC 易感性的文献纳入较少。因此,TLR4 896A > G 基因多态性与 UC 发病风险仍需更多高质量、同质性好、设计严谨的研究进行验证,以明确 UC 的发病机制。

参考文献

- [1] HILMI I,TAN YM,GOH KL. Crohn's disease in adults: observations in a multiracial Asian population[J]. World J Gastroenterol, 2006,12(9):1435-1438.
- [2] CORTOT A,PINETON DE CHAMBRUN G,VERNIER-MASSOUILLE G,et al. Inflammatory bowel disease:genetic or environmental diseases? [J]. Gastroenterol Clin Biol, 2009, 33 (8/9): 681-691.
- [3] SUN M,ZHANG L,SHI S. Associations between NRAMP1 Polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis/crohn's disease: A meta-analysis[J]. Immunol Invest,2016,45(3):255-270.
- [4] ZHANG C,WANG W,ZHANG H,et al. Association of FCGR2A rs1801274 polymorphism with susceptibility to autoimmune diseases: A meta-analysis[J]. Oncotarget,2016,7(26):39436-39443.

- [5] LEE YH,BAE SC. Association between functional CD24 polymorphisms and susceptibility to autoimmune diseases:A meta-analysis [J]. Cell Mol Biol,2015,61(8):97-104.
- [6] HORNEF MW,NORMARK BH,VANDEWALLE A,et al. Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells [J]. J Exp Med, 2003, 198 (8) : 1225-1235.
- [7] TAKEDA K,KAISHO T,AKIRA S. Toll-like receptors [J]. Annu Rev Immunol,2003,21:335-376.
- [8] CARIO E,PODOLSKY DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease [J]. Infect Immun,2000,68(12):7010-7017.
- [9] SCHMITT C,HUMENY A,BECKER CM,et al. Polymorphisms of TLR4:rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles [J]. Clin Chem,2002,48(10):1661-1667.
- [10] ERRIDGE C,STEWART J,POXTON IR. Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling [J]. J Exp Med,2003,197(12):1787-1791.
- [11] STANG A. Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses [J]. Eur J Epidemiol,2010,25(9):603-605.
- [12] ARNOTT ID,NIMMO ER,DRUMMOND HE,et al. NOD2/CARD15,TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients;evidence for genetic heterogeneity within Europe [J]. Genes Immun,2004,5(5):417-425.
- [13] BROWNING BL,HUEBNER C,PETERMANN I,et al. Has toll-like receptor 4 been prematurely dismissed as an inflammatory bowel disease gene? Association study combined with meta-analysis shows strong evidence for association [J]. Am J Gastroenterol, 2007,102(11):2504-2512.
- [14] DE RIDDER L,WEERSMA RK,DIJKSTRA G,et al. Genetic susceptibility has a more important role in pediatric-onset Crohn's disease than in adult-onset Crohn's disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2007,13(9):1083-1092.
- [15] FRANCHIMONT D,VERMEIRE S,EL HOUSNI H,et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. Gut,2004,53(7):987-992.
- [16] MANOLAKIS AC,KAPSORITAKIS AN,KAPSORITAKI A,et al. Readdressing the role of Toll-like receptor-4 alleles in inflammatory bowel disease;colitis,smoking,and seroreactivity [J]. Dig Dis Sci, 2013,58(2):371-380.
- [17] MEENA NK,VERMA R,VERMA N,et al. TLR4 D299G polymorphism modulates cytokine expression in ulcerative colitis [J]. J Clin Gastroenterol,2013,47(9):773-780.
- [18] MOHAMMADI M,ZAHEDI MJ,NIKPOOR AR,et al. Interleukin-17 serum levels and TLR4 polymorphisms in ulcerative colitis [J]. Iran J Immunol,2013,10(2):83-92.
- [19] OOSTENBRUG LE,DRENT JP,DE JONG DJ,et al. Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease [J]. Inflamm Bowel Dis,2005,11(6):567-575.
- [20] QUEIROZ DM,OLIVEIRA AG,SARAIVA IE,et al. Immune response and gene polymorphism profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. Inflamm Bowel Dis,2009,15(3):353-358.
- [21] RIGOLI L,ROMANO C,CARUSO RA,et al. Clinical significance of NOD2/CARD15 and Toll-like receptor 4 gene single nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol,2008,14(28):4454-4461.
- [22] SENHAJI N,DIAKITÉ B,SERBATI N,et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms:New data and a meta-analysis [J]. BMC Gastroenterol,2014,14(14):1-15.
- [23] SIVARAM G,TIWARI SK,BARDIA A,et al. Macrophage migration inhibitory factor, Toll-like receptor 4, and CD14 polymorphisms with altered expression levels in patients with ulcerative colitis [J]. Hum Immunol,2012,73(2):201-205.
- [24] STANKOVIC B,DRAGASEVIC S,POPOVIC D,et al. Variations in inflammatory genes as molecular markers for prediction of inflammatory bowel disease occurrence [J]. J Dig Dis, 2015, 16 (12) : 723-733.
- [25] TÖRÖK HP,GLAS J,TONENCHI L,et al. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease;association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis [J]. Clin Immunol,2004,112(1):85-91.
- [26] GAZOULI M,MANTZARIS G,KOTSINAS A,et al. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population [J]. World J Gastroenterol,2005,11(5):681-685.
- [27] BANK S,ANDERSEN PS,BURISCH J,et al. Associations between functional polymorphisms in the NF- κ B signaling pathway and response to anti-TNF treatment in Danish patients with inflammatory bowel disease [J]. The Pharmacogenomics Journal,2014,14(6):526-534.
- [28] HENCKAERTS L,PIERIK M,JOOSSENS M,et al. Mutations in pattern recognition receptor genes modulate seroreactivity to microbial antigens in patients with inflammatory bowel disease [J]. Gut, 2007,56(11):1536-1542.
- [29] ARBOUR NC,LORENZ E,SCHUTTE BC,et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans [J]. Nat Genet,2000,25(2):187-191.
- [30] OKAYAMA N,FUJIMURA K,SUEHIRO Y,et al. Simple genotype analysis of the Asp299Gly polymorphism of the Toll-like receptor-4 gene that is associated with lipopolysaccharide hyporesponsiveness [J]. J Clin Lab Anal,2002,16(1):56-58.
- [31] READ RC,PULLIN J,GREGORY S,et al. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease [J]. J Infect Dis,2001,184(5):640-642.
- [32] GUO QS,XIA B,JIANG Y,et al. Polymorphisms of CD14 gene and TLR4 gene are not associated with ulcerative colitis in Chinese patients [J]. Postgrad Med J,2005,81(958):526-529.
- [33] CHEN L,LIN MJ,ZHAN LL,et al. Analysis of TLR4 and TLR2 polymorphisms in inflammatory bowel disease in a Guangxi Zhuang population [J]. World J Gastroenterol,2012,18(46):6856-6860.