

引用本文: 苏丹丹, 王春红, 夏璐, 等. Toll样受体4基因单核苷酸多态性与白内障发病的相关性研究[J]. 安徽医药, 2024, 28(1): 177-180. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2024.01.037.

◇临床医学◇



## Toll样受体4基因单核苷酸多态性与白内障发病的相关性研究

苏丹丹, 王春红, 夏璐, 吴凡

作者单位: 皖南医学院第二附属医院眼科, 安徽 芜湖 241000

**摘要** 目的 研究Toll样受体4(TLR4)基因单核苷酸多态性(SNPs)与白内障发病的相关性。方法 收集皖南医学院第二附属医院2021年1—12月100例年龄相关性白内障(ARC)病例为观察组, 86例年龄、性别相匹配的无亲属关系的健康志愿者为对照组, 采用单碱基延伸法(SNaPshot)对TLR4两个SNPs位点rs4986790及rs4986791进行基因分型, 检验两组2个SNPs基因型与等位基因频率, 分离研究对象外周血单个核细胞(PBMC), 酶联免疫吸附法(ELISA)检测其PBMC上清液中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及白细胞介素-6(IL-6)水平, 分析其与ARC病人TLR4基因SNPs之间的关系。结果 Hardy-Weinberg平衡试验结果提示, 两组病人TLR4基因rs7986790位点及rs4986791位点的基因型频率分布实际值与理论值符合Hardy-Weinberg遗传平衡( $P>0.05$ ); 观察组与对照组TLR4基因rs7986790位点基因型及其等位基因占比比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。rs7986790基因分型为GA及GG者PBMC上清液中TNF- $\alpha$ 及IL-6水平[(22.36 $\pm$ 4.15) $\mu$ g/L、(846.69 $\pm$ 179.68)ng/L]均高于基因型为AA者[(17.02 $\pm$ 2.36) $\mu$ g/L、(613.45 $\pm$ 163.59)ng/L]( $P<0.05$ )。结论 ARC病人TLR4基因rs7986790位点基因型分布与正常者间存在差异, rs7986790位点等位基因G可能通过促进炎症反应, 增加ARC患病风险。

**关键词** 白内障; Toll样受体4; 多态性, 单核苷酸; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; rs4986790; rs4986791

### Correlation of single nucleotide polymorphisms in the toll-like receptor 4 gene with cataract development

SU Dandan, WANG Chunhong, XIA Lu, WU Fan

Author Affiliation: Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241000, China

**Abstract Objective** To investigate the correlation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the Toll-like receptor 4 (TLR4) gene with cataract development. **Methods** A total of 100 age-related cataract (ARC) cases were collected from January to December 2021 from the Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College as the observation group and 86 age- and gender-matched unrelated healthy volunteers as the control group. A single nucleotide extension assay (SNaPshot) was used to perform genotyping of the two SNP loci of TLR4, rs4986790 and rs4986791, and the genotypes and allele frequencies of the two SNPs in the two groups were examined. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of the studied subjects were isolated. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in the supernatant of PBMCs, and to analyze their relationship with SNPs of the TLR4 gene in ARC patients. **Results** The results of the Hardy-Weinberg equilibrium test indicated that the actual and theoretical values of the genotype frequency distribution of the TLR4 gene rs7986790 locus and rs4986791 locus in the two groups of patients conformed to the Hardy-Weinberg genetic equilibrium ( $P > 0.05$ ). There was a statistically significant difference between the genotype of the rs7986790 locus of the TLR4 gene and its allele percentage in the observation group compared with the control group ( $P < 0.05$ ). The levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the PBMC supernatants of those with rs7986790 genotyped as GA and GG [(22.36 $\pm$ 4.15)  $\mu$ g/L, (846.69 $\pm$ 179.68) ng/L] were higher than those with genotyped as AA [(17.02 $\pm$ 2.36)  $\mu$ g/L, (613.45 $\pm$ 163.59) ng/L] ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** There is a difference in the genotype distribution of the rs7986790 locus in the TLR4 gene between ARC patients and normal individuals, and allele G of the rs7986790 locus may increase the risk of developing ARC by promoting inflammatory responses.

**Keywords** Cataract; Toll-like receptor 4; Polymorphism, single nucleotide; Interleukin-6; Tumor necrosis factor-alpha; rs4986790; rs4986791

年龄相关性白内障(ARC)是最常见的白内障类型,也是全球致盲主要的原因<sup>[1-3]</sup>。国内外研究均表明,ARC是环境、代谢、遗传等因素共同作用的结果<sup>[4]</sup>。单核苷酸多态性(SNPs)是人类基因组中

DNA序列变异及遗传多态性最常见的表现形式,作为一种良好的分子标记,SNPs已成为研究ARC遗传易感性的重要手段<sup>[5]</sup>。有研究<sup>[6]</sup>表示,TLR4可刺激机体释放多种炎症因子,参与原发性开角型青光眼

的发生与进展。为研究TLR4基因的单核苷酸多态性(SNPs, rs4986790及rs4986791位点)是否与ARC之间存在关系,我院开展如下研究。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 将皖南医学院第二附属医院2021年1—12月收治的100例白内障病人纳入观察组。纳入标准:病人年龄>50岁;最佳矫正视力<0.5;经晶状体病理及视力检查确诊为白内障。排除标准:青光眼、高度近视、葡萄膜炎及眼部外伤等其他原因引起的白内障者;合并糖尿病、肾脏疾病或全身性疾病及视网膜疾病者。

对照组为年龄、性别与观察组相匹配的86例健康志愿者,其晶状体透明,最佳矫正视力 $\geq 0.5$ ,未合并其他眼科疾病。观察组中男53例,女47例,年龄范围为52~85岁,年龄(71.15 $\pm$ 13.33)岁,白内障分型:皮质型38例,核型36例,后囊下型13例,混合型13例,对照组中男44例,女42例,年龄范围为51~82岁,年龄(72.63 $\pm$ 12.14)岁,两组性别及年龄比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。病人或其近亲属知情同意,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

## 1.2 方法

**1.2.1 外周血细胞基因组DNA制备** 采集被研究者外周静脉血4 mL,置于EDTA抗凝管,按照基因组DNA提取试剂盒(美国Qiagen公司)相关步骤提取DNA。吸取4 mL血液至15 mL离心管,加入8 mL红细胞裂解液,裂解红细胞,半径10 cm离心机3 000 r/min离心10 min,留下管底白细胞团。漩涡震荡30 s,充分分散白细胞团,加入4 mL白细胞裂解液与40  $\mu$ L蛋白酶K,再漩涡震荡5 s,放入65  $^{\circ}$ C恒温水浴60 min后取出,待其自然冷却至室温后,加入1.5 mL饱和氯化钠溶液,漩涡震荡15 s,半径10 cm、3 000 r/min离心10 min,加入4 mL异丙醇,上下颠倒混匀10~15次至出现沉淀,室温、半径10 cm、3 000 r/min离心10 min,去掉上清液,留下管底白色沉淀。加入2 mL 75%乙醇,振荡洗涤沉淀,半径10 cm、3 000 r/min离心10 min,弃上清液。离心管室温干燥1~2 h,加入200  $\mu$ L灭菌双蒸水充分溶解,低温低速离心2 min,将液体集中保存在管底。NANODROP-2000紫外分光光度仪检测DNA纯度,OD260/OD280为1.7~2.0即符合扩增要求。

**1.2.2 SNPs分型** (1)SNPs引物设计:在NCBI网站中找到rs7986790及rs4986791的DNA序列,使用Primer Premier 5软件设计SNPs位点的扩增引物及SNaPshot引物,rs7986790正向引物5'-AGACCTGTGGGTGAACCCTA-3',反向引物5'-GCATTCACCTTTGTTGGA-3',PCR引物长度为474 bp。

rs4986791正向引物5'-CTCTAGAGGGCCTGTGCAATTT-3',反向引物5'-CTGGACAAGCCATTGAA-GATGC-3',PCR引物长度为589 bp。(2)PCR扩增反应体系:2 $\times$ Es MasterMix(Dye) 5  $\mu$ L,正、反向引物各0.5  $\mu$ L,模板DNA 1  $\mu$ L,双蒸水3  $\mu$ L。(3)PCR反应条件:94  $^{\circ}$ C预变性2 min,94  $^{\circ}$ C变性30 s,最适退火温度30 s,72  $^{\circ}$ C延伸30 s,从第二步到第四步时循环35次,72  $^{\circ}$ C延伸5 min,扩增产物放于4  $^{\circ}$ C保存。(4)SNaPshot单碱基延伸测序:PCR产物纯化后进行SNaPshot单碱基延伸测序,反应体系:PCR纯化产物2  $\mu$ L, SNaPshot产物0.2  $\mu$ L $\times$ 4, SNaPshot Multiplex 0.5  $\mu$ L,双蒸水1.7  $\mu$ L。反应条件:96  $^{\circ}$ C预变性1 min,96  $^{\circ}$ C变性10 s,50  $^{\circ}$ C退火5 s,60  $^{\circ}$ C延伸30 s,第二步到第四步循环25次,4  $^{\circ}$ C低温备用。(5)二次纯化后上机检测基因型:取4  $\mu$ L二次纯化产物,依次加入96孔板,分别向每孔加入6  $\mu$ L双蒸水稀释,启动ABI-3730XL测序仪,开启完毕后打开软件,设定Gene Mapper程序,将样品放入测序仪内,采用Gene Mapper 5.0软件分析。(6)随机挑选观察组与对照组中5%样本进行Sanger测序,验证采用SNaPshot单碱基延伸序列法基因分型结果是否准确。

**1.2.3 外周血单核细胞内肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及白细胞介素(IL)-6水平检测** (1)分离外周血单个核细胞(PBMC):抽取被研究者外周静脉血5 mL,置于肝素抗凝离心管内,加入等体积磷酸缓冲液(PBS)混匀,将稀释后的血液加入淋巴细胞分离液表面,保持两者之间的清晰分界,室温下800 $\times$ g离心25 min,把位于玻璃管中间部位的PBMC细胞层小心吸出,加入适量PBS洗涤,室温下800 $\times$ g离心10 min,得到PBMC。(2)制备PBMC上清液。(3)收集PBMC上清液,酶联免疫吸附法(ELISA)检测PBMC上清液中TNF- $\alpha$ 及IL-6水平。

**1.3 统计学方法** 采用SPSS 19.0统计软件处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均行正态分布和方差齐性检验,不符合正态分布的变量进行自然对数转化使其成正态或近似正态分布。两组间均数比较采用独立样本 $t$ 检验,两组TLR4基因两个多肽位点Hardy-Weinberg平衡采用 $\chi^2$ 检验,基因型个数通过计数方式获得,两组等位基因、基因型频率比较采用 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Toll样受体4基因SNPs位点等位基因Hardy-Weinberg平衡检验** Hardy-Weinberg平衡试验结果提示,观察组及对照组TLR4基因rs7986790位点及rs4986791位点的基因型频率分布实际值与理论值符合Hardy-Weinberg遗传平衡,说明吻合度良好

( $P>0.05$ ), 所纳入的样本具有群体代表性。

**2.2 两组 Toll 样受体 4 基因 SNPs 位点等位基因及基因型分布比较** 两组 TLR4 基因 rs7986790、rs4986791 位点基因型及其等位基因占比比较均差异无统计学意义(均  $P>0.05$ )。见表 1。

表 1 两组 Toll 样受体 4 基因 SNPs 位点等位基因及基因型分布比较 [ $n/N(\%)$ ]

SNPs 位点	对照组	观察组	$\chi^2$ 值	P 值
rs7986790			6.07	0.048
AA	71/86(82.56)	68/100(68.00)		
GA	12/86(13.95)	21/100(21.00)		
GG	3/86(3.49)	11/100(11.00)		
等位基因			8.21	0.004
A	154/172(89.53)	157/200(78.50)		
G	18/172(10.47)	43/200(21.50)		
rs4986791			0.88	0.644
TT	2/86(2.33)	3/100(3.00)		
TC	13/86(15.12)	20/100(20.00)		
CC	71/86(82.56)	77/100(77.00)		
等位基因			0.88	0.349
T	17/172(9.88)	26/200(13.00)		
C	155/172(90.12)	174/200(87.00)		

**2.3 rs7986790 不同基因型病人外周血单个核细胞上清液 TNF- $\alpha$  及 IL-6 水平比较** rs7986790 基因型为 GA(21 例)及 GG(11 例)者 PBMC 上清液中 TNF- $\alpha$  及 IL-6 水平 [(22.36 $\pm$ 4.15)  $\mu$ g/L、(846.69 $\pm$ 179.68)ng/L]均高于基因型为 AA(68 例)者 [(17.02 $\pm$ 2.36)  $\mu$ g/L、(613.45 $\pm$ 163.59)ng/L], 差异有统计学意义( $t=8.19$ 、6.44, 均  $P<0.001$ )。

### 3 讨论

流行病学调查结果提示,遗传因素在 ARC 中发挥着重要作用,既往研究<sup>[7-8]</sup>已发现眼发育相关基因、DNA 修复相关基因以及转录相关基因等多种基因的 SNPs 均与 ARC 之间存在联系。有研究<sup>[9-10]</sup>在白内障病人房水中检测到 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  等多种炎症因子。

TLRs 是参与连接特异性免疫与非特异性免疫的一类重要的蛋白质分子,广泛表达于中性粒细胞、单核-巨噬细胞等多种免疫细胞<sup>[11-12]</sup>,是免疫系统中重要的成员,其主要负责识别病原分子与传递信号。TLR4 是目前研究最多的 TLRs 基因,其与恶性肿瘤及自身免疫性疾病的发生间均相关<sup>[13-14]</sup>。许致玉、张璐<sup>[15]</sup>研究报道,TLR4 基因多态性还与年龄相关黄斑病变有关。TLR4 激活后可促进细胞组织纤维化,促进小梁网与细胞外基质结构发生改变;一些全身性免疫性疾病如类风湿关节炎、强直性脊柱炎等,TLR4 参与这些疾病的发病机制,而全身性免疫性疾病常伴有眼部的炎症,如葡萄膜炎<sup>[16-17]</sup>。

本研究选取 100 例 ARC 病人作为观察组,86 例年龄、性别相似,且与 ARC 病人间无血缘关系的健康者作为对照组,比较发现,两组 TLR4 基因 rs7986790 位点基因型及其等位基因占比比较,差异有统计学意义,而两组 TLR4 基因 rs4986791 位点的基因型及其等位基因占比间差异无统计学意义。其中 ARC 病人 rs7986790 位点 GA 及 GG 型病人占比均高于健康对照组,提示 G 基因可能增加 ARC 病变风险。

对于 rs7986790 位点不同基因型的 ARC 病人外周血 PBMC 上清液中 TNF- $\alpha$  以及 IL-6 水平发现,GG+GA 基因型病人 PBMC 上清液中 TNF- $\alpha$  以及 IL-6 水平均高于 AA 型基因者。其中 TNF- $\alpha$  主要由单核细胞、巨噬细胞及胸腺依赖淋巴细胞产生,可参与免疫反应<sup>[18]</sup>,IL-6 是一种多效应细胞因子,可调节包括免疫及炎症反应在内的多种生物过程<sup>[19]</sup>,在正常情况下,TNF- $\alpha$  及 IL-6 均处于低水平,但在大量组织受到刺激后,以上炎症介质水平将异常升高,引起全身炎症反应<sup>[20]</sup>。本研究结果提示等位基因 G 可能通过加重机体炎症反应,促进 ARC 的发生。但受限于研究条件与研究设计,本文并未对其中的具体作用机制进行研究,存在一定的局限性。

综上所述,ARC 病人 TLR4 基因 rs7986790 位点基因型分布与健康者间存在差异,rs7986790 位点等位基因 G 可能通过促进炎症反应,增加 ARC 患病风险。

### 参考文献

- [1] 霍敏,董玉红,张静.年龄相关性白内障患者人工晶状体植入术后不同 SA 值与视觉质量的关系[J].安徽医学,2021,42(8):912-915.
- [2] SHARMA S, LANG C, KHADKA J, et al. Association of age-related cataract with skin cancer in an australian population[J].Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020, 61(5):48.
- [3] 焦剑,李学东,邱怀雨,等.年龄相关性白内障术后视力再下降患者的临床特征分析[J].眼科新进展,2021,41(5):456-460.
- [4] 李帅杰,徐国旭,冯柯红.UCHL1 基因多态性中的 S18Y 异构体与年龄相关性白内障发病机制的相关性[J].国际眼科杂志,2019,19(10):1633-1636.
- [5] 邹茜,邓国华,张骏,等.LSS 和 HMGR 基因的单核苷酸多态性与年龄相关性白内障的关系[J].国际眼科杂志,2021,21(5):776-780.
- [6] 李丽,吴志鸿.Toll 样受体 4 与原发开角型青光眼关系的研究进展[J].安徽医药,2021,25(10):1916-1920.
- [7] 吴泽华,刘向远,李瑜颖,等.基因敲除白内障小鼠模型回顾及分析[J].中华实验眼科杂志,2020,38(8):710-714.
- [8] 黄雄飞,张跃红,张柳,等.术前双氯芬酸钠滴眼液联合术后妥布霉素地塞米松滴眼液对家兔白内障术后炎症反应的影响[J].中国药师,2021,24(1):64-69.
- [9] 张楚,朱子诚,应充慧,等.葡萄膜炎并发白内障患者晶状体前囊膜中 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达和前囊膜超微结构改变[J].眼科新进展,2020,40(7):638-641.
- [10] SIVAPRASAD PS. Cataract surgery in patients with age-related

- macular degeneration[J]. Can J Ophthalmol, 2021, 56(6): 347.
- [11] 李宝花, 宁博彪, 魏宇娇, 等. TLRs 信号通路在干眼发病机制中的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2021, 21(5): 827-831.
- [12] 高明, 敖越, 栾新红. Toll 样受体信号转导的负调控机制研究进展[J]. 动物医学进展, 2015, 36(1): 96-101.
- [13] 夏宇, 李健, 高鸿亮. TLR2、TLR4 和 NOD2/CARD15 基因多态性与溃疡性结肠炎相关性的 meta 分析[J]. 胃肠病学, 2021, 26(2): 82-90.
- [14] SHOUMAN MM, ABDELSALAM RM, TAWFICK MM, et al. Antisense tissue factor oligodeoxynucleotides protected diethyl nitrosamine/carbon tetrachloride-induced liver fibrosis through toll like receptor4-tissue factor-protease activated receptor1 pathway [J]. Front Pharmacol, 2021, 12(5): 676608. DOI: 10.3389/fphar.2021.676608.
- [15] 许致玉, 张璐. 年龄相关性黄斑变性及相关基因的单核苷酸多态性研究新进展[J]. 国际免疫学杂志, 2021, 44(4): 430-434.
- [16] 张玮琼, 吴正正, 接传红, 等. 糖尿病性干眼患者血清炎症细胞因子的变化及意义[J]. 中国中医眼科杂志 2018; 28(1): 46-49.
- [17] 王周美, 李勇, 杨杭. 变应性鼻炎患者血清 IL-34 水平及与血清炎症因子的相关性 [J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(18): 82-85.
- [18] HE W, XU F, CHEN L, et al. Association of high-mobility group box-1 with inflammation-related cytokines in the aqueous humor with acute primary angle-closure eyes [J]. Curr Mol Med, 2021, 21(3): 237-245.
- [19] STEPP MA, MENKO AS. Immune responses to injury and their links to eye disease [J]. Transl Res, 2021, 236: 52-71.
- [20] LIN XC, PAN M, ZHU LP, et al. NFAT5 promotes arteriogenesis via MCP-1-dependent monocyte recruitment [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(2): 2052-2063.
- (收稿日期: 2022-02-10, 修回日期: 2022-04-22)

引用本文: 甘平, 蓝军. 重症肺炎 64 例外周血微 RNA-34a、沉默信息调节因子 1 的表达 [J]. 安徽医药, 2024, 28(1): 180-184. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2024.01.038.

◇ 临床医学 ◇



## 重症肺炎 64 例外周血微 RNA-34a、沉默信息调节因子 1 的表达

甘平, 蓝军

作者单位: 武警重庆总队医院呼吸与危重症医学科, 重庆 400061

通信作者: 蓝军, 男, 副主任医师, 研究方向为呼吸与危重症相关的临床研究, Email: lanjun646144@qq.com

**摘要** 目的 研究重症肺炎病人外周血微 RNA-34a(miR-34a)、沉默信息调节因子 1(Sirt1) 的表达变化及临床意义。方法 选取 2017 年 10 月至 2020 年 4 月武警重庆总队医院收治的 64 例重症肺炎病人为重症肺炎组, 同期收治的 80 例普通肺炎病人为普通肺炎组, 进行健康体检的 70 例健康志愿者为对照组。采用实时荧光定量 PCR 法(qRT-PCR)检测外周血 miR-34a 表达水平, 采用酶联免疫吸附法检测血清 Sirt1、炎症细胞因子表达水平; Kaplan-Meier 生存分析研究 miR-34a 与 Sirt1 表达水平与重症肺炎组病人预后的关系; Cox 回归分析影响重症肺炎病人预后的因素。结果 重症肺炎组 miR-34a 的表达水平高于普通肺炎组和对照组 (1.65±0.28 比 1.32±0.33、1.00±0.25), Sirt1 表达水平低于普通肺炎组和对照组 [(6.83±1.59) μg/L 比 (8.94±1.62) μg/L、(12.11±1.77) μg/L] (P<0.05); miR-34a 表达水平与 Sirt1 表达水平存在明显负相关 (P<0.05)。高危、中危病人 miR-34a 表达水平高于低危病人, Sirt1 表达水平低于低危病人 (P<0.05), 高危病人 miR-34a 表达水平高于中危病人, Sirt1 表达水平低于中危病人 (P<0.05)。miR-34a 高表达病人血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、白细胞介素(IL)-6 和高迁移率族蛋白 B-1(HMGB1) 水平高于 miR-34a 低表达病人, 30 d 累积生存率低于 miR-34a 低表达病人 (P<0.05); Sirt1 高表达病人血清 TNF-α、ICAM-1、IL-6、HMGB1 水平低于 Sirt1 低表达病人, 30 d 累积生存率高于 Sirt1 低表达病人 (P<0.05)。ICAM-1、miR-34a 及 Sirt1 均是影响重症肺炎病人预后的独立危险因素 (P<0.05)。结论 重症肺炎病人外周血中 miR-34a 表达增加与血清 Sirt1 表达降低具有相关性, 且 miR-34a、Sirt1 的变化与病情加重、炎症反应激活、预后不良有关。

**关键词** 肺炎; 微 RNA-34a; 沉默信息调节因子 1; 肿瘤坏死因子 α; 细胞黏附分子; 白细胞介素 6; 高迁移率族蛋白类; 预后

### Expression of peripheral blood microRNA in and silencing information regulator 1 in 64 cases of severe pneumonia

GAN Ping, LAN Jun

Author Affiliation: Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Chongqing Municipal Corps Hospital of PAP, Chongqing 400061, China