

VGLL4 基因多态性与幽门螺杆菌感染的关系

杨霞¹,董文杰¹,武金宝²,马立聪²,孟宪梅²,高芳³,贾彦彬^{1,2,4}

摘要 目的 探讨残留样蛋白质家族成员 4 (VGLL4) 基因单核苷酸多态性 (SNP) 与幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 感染的关系。方法 选取 450 例体检者的血液样本,采用 ELISA 法将样本分为幽门螺杆菌阴性组 ($n=220$) 和幽门螺杆菌阳性组 ($n=230$)。采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术对 VGLL4 SNP rs1803489、rs7617620、rs13078528 位点进行基因分型。结果 内蒙古包头地区汉族人群中 VGLL4 基因 SNP rs1803489、rs7617620、rs13078528 与幽门螺杆菌感染没有关联。结论 在内蒙古包头地区的汉族人群中 VGLL4 基因 SNP rs1803489、rs7617620、rs13078528 在幽门螺杆菌感染中不起主要作用。

关键词 残留样蛋白质家族成员 4;单核苷酸多态性;幽门螺杆菌;遗传易感性

中图分类号 R 394.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0115-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.019

国际癌症研究机构 (IARC) 研究显示,78% 的胃癌病例归因于幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 的感染,其中非贲门胃癌的 *H. pylori* 感染率为 94.6%。因此 *H. pylori* 被认为是胃癌的主要致癌原,是非贲门胃癌发生的必要原因^[1]。*H. pylori* 感

染者大多数无明显症状,因此不易受到关注,往往感染可潜伏数年之久直到发展为慢性萎缩性胃炎及胃溃疡等癌前病变,甚至发展为胃癌^[2]。*H. pylori* 的感染及临床转归受环境和遗传等因素的共同作用,最终仅有不到 3% 的 *H. pylori* 感染者发展成为胃癌,提示宿主的遗传因素在 *H. pylori* 的感染及临床转归中发挥了重要作用^[3]。研究^[4]显示,一些基因的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与 *H. pylori* 感染的遗传易感性相关联。一些 SNPs 可以作为 *H. pylori* 感染的重要遗传标志物,用于筛查 *H. pylori* 感染的高危人群和防治 *H. pylori* 感染相关疾病的重要靶点。前期课题组研究了残留样蛋白质家族成员 4 (Vestigial like family member 4, VGLL4) 基因的 3 个 SNP rs1803489、rs7617620 和 rs13078528,发现在包头汉族人群中 SNP rs1803489 与非贲门胃癌的发病风险相关联^[5]。由于同一 SNP 在疾病的不同阶段可能起的作用不相同,目前关于 VGLL4 基因多态性与胃癌发病的始动因子 *H. pylori* 感染的关系还未见有报道,因此,该研究检测了 VGLL4 基因多态性与 *H. pylori* 感染之间的关系,探讨 VGLL4 SNPs 增加胃癌发病风险是否是通过增加 *H. pylori* 感染风险介导的,为以 VGLL4 为基础的抗 *H. pylori* 感染相关疾病的治疗和胃癌的早期预防提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 450 例正常体检者,其中男性 336 例,女性 114 例。所有研究对象的纳入标准为:① 在包头地区生活 5 年以上互无血缘关系的汉族人群;② 三代之内未有与其他民族通婚史。排除

2022-08-31 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81650017);内蒙古自然科学基金项目(编号:2020LH08004)

作者单位:包头医学院¹基础医学与法医学院、³医学技术与麻醉学院、⁴护理学院,包头 014060

² 包头医学院第二附属医院内蒙古消化病研究所,包头 014030

作者简介:杨霞,女,硕士研究生;

贾彦彬,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: jyb690318@hotmail.com;

高芳,女,副教授,责任作者, E-mail:34646929@qq.com

Results The increase of brain volume and the thickness of calvaria increased synchronously, the expression of FAK was positively correlated with the changes of meridians, and the expression of FAK was positively correlated with the expression of PI3K/AKT. **Conclusion** The expression of FAK is related to the growth and development of rat skull. FAK plays a role in calvaria by activating PI3K/AKT signal pathway. FAK may be used as a marker of rapid skull growth and development, which provides a basic theoretical basis for the timing of clinical skull defect repair and treatment.

Key words cranial bone; FAK; PI3K/AKT; growth and development

标准为:① 自述有明显的胃部不适、胃部疾病史及胃部手术史;② 幽门螺旋杆菌清除治疗史;③ 癌症病史;④ 遗传性疾病史。所有纳入研究的对象均签署了知情同意书,本研究已获得包头医学院伦理学委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 *H. pylori* 的检测 采用 ELISA 法检测样本血清中抗 *H. pylori* 的特异性抗体。严格按照人幽门螺旋杆菌抗体(HP-Ab)ELISA 检测试剂盒(苏州艾莱萨生物科技有限公司)说明书推荐的结果判定标准:阳性对照孔 OD 值平均值 ≥ 1.00 , 阴性对照孔 OD 值平均值 ≤ 0.15 , 则判定实验有效;临界值(Cut off) = 阴性对照孔平均值 + 0.15, 样品 OD 值 < 临界值, 则判定为阴性;样品 OD 值 > 临界值, 则判定为阳性。

1.2.2 SNPs 的选择 根据文献^[5-8]报道, VGLL4 基因 SNP rs1803489、rs7617620 和 rs13078528 可能与人类的一些疾病关联,因此,本研究选择了这三个位点探讨 VGLL4 基因多态性与 *H. pylori* 感染的关系。HapMap 数据库(<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>)数据显示,这三个 SNP 在中国汉族人群中的最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF)均 > 5%。

1.2.3 基因分型 采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)技术对 VGLL4 rs1803489、rs7617620、rs13078528 进行基因分型,人血液基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根公司。PCR 反应体系为 25 μ l, 含 DNA 50 ng、2 \times Taq Master Mix 12.5 μ l、上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ l。采用 Primer 5 软件设计的引物序列分别为: rs1803489: (F) 5'-CTGGTTTTCTTTGCTAGCCCA-3', (R) 5'-AACCGAACCTAAGAAACGCC-3'; rs7617620: (F) 5'-AGAGTCCGAGTTCAGAAAGAGAA-3', (R) 5'-CTGTTGGCTGAAACCTCTCG-3'; rs13078528: (F) 5'-CCATCTTCCAAAGCGCCATTC-3', (R) 5'-AAGTGGTTTTGCAGGATGTATGAAC-3', 引物由北京博迈德基因技术有限公司合成。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后以 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s 模式进行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。SNP rs1803489、rs7617620、rs13078528 的 PCR 产物长度分别为 250、227、242 bp, 见图 1 ~ 3。三个 SNP 的 PCR 产物分别用限制性内切酶 ScaI、AlwNI、BsrI (英国 New England BioLabs 公司)

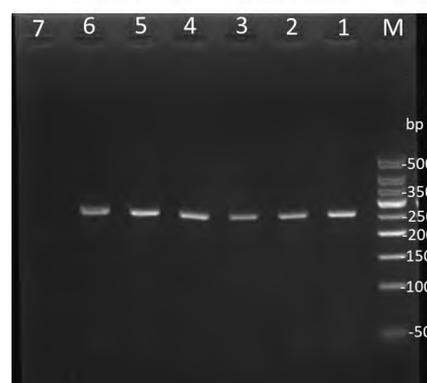


图1 rs1803489 位点 PCR 产物电泳图

M: 50 bp DNA Ladder; 1 ~ 6: PCR 产物; 7: 阴性对照

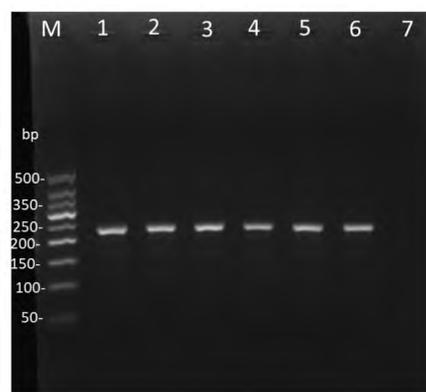


图2 rs7617620 位点 PCR 产物电泳图

M: 50 bp DNA Ladder; 1 ~ 6: PCR 产物; 7: 阴性对照

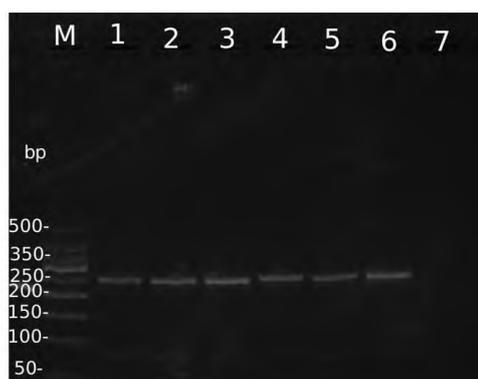


图3 rs13078528 位点 PCR 扩增产物的电泳图

M: 50 bp DNA Ladder; 1 ~ 6: PCR 产物; 7: 阴性对照

进行酶切, 酶切反应体系为 10 μ l, 包括 PCR 产物 3 μ l、10 \times NE Buffer 1 μ l、限制性内切酶 5 U。SNP rs1803489 和 rs7617620 的酶切体系置于 37 $^{\circ}$ C, rs13078528 的酶切体系置于 65 $^{\circ}$ C, 恒温水浴 4 h 后对酶切产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。SNP rs1803489 被切割后, GG 基因型为 188、62 bp 两个片段, AG 基因型为 250、188、62 bp 三个片段, AA 基

因型为 250 bp 一个片段。SNP rs7617620 被切割后,TT 基因型为 177、50 bp 两个片段,CT 基因型为 227、177、50 bp 三个片段,CC 基因型为 227 bp 一个片段。SNP rs13078528 被切割后,GG 基因型为 54、93、95 bp 三个片段,AG 基因型为 188、93、95、54 bp 四个片段,AA 基因型为 188、54 bp 两个片段,见图 4~6。

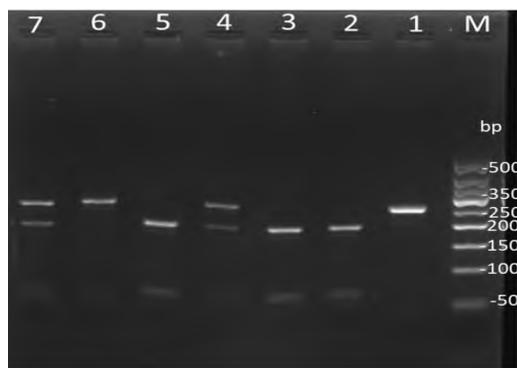


图4 rs1803489 位点酶切电泳图

M:50 bp DNA Ladder;1:PCR 产物;2,3,5:GG 基因型;4,7:AG 基因型;6:AA 基因型

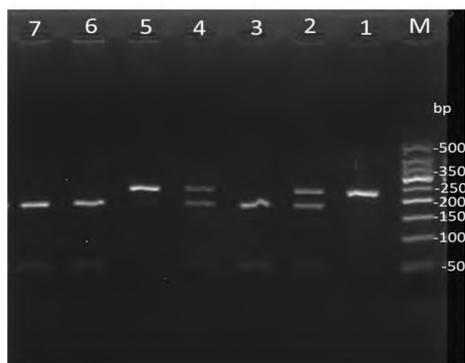


图5 rs7617620 位点酶切电泳图

M:50 bp DNA Ladder;1:PCR 产物;2,4:CT 基因型;3,6,7:TT 基因型;5:CC 基因型

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。采用拟合优度 χ^2 检验检测样本中 *VGLL4* 基因各 SNP 位点的基因型分布是否符合哈德温伯格平衡(hardy-weniberg equilibrium, HWE)。用非条件性 Logistic 回归检测在共显性、显性、隐性三种遗传模式下各 SNP 位点与 *H. pylori* 感染的关系,计算比值比(odds ratio, OR)和 95% 可信区间(confidence interval, CI),以及最小信息准则(an information criterion, AIC)、贝叶斯信息准则(bayesian information criterion, BIC)。采用 Haploview 4.2 软件对 *VGLL4*

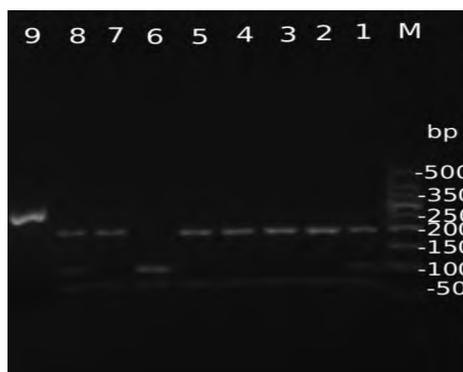


图6 rs13078528 位点酶切电泳图

M:50 bp DNA Ladder;1,8:AG 基因型;2,3,4,5,7:AA 基因型;6:GG 基因型;9:PCR 产物

基因各 SNP 位点的连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)进行分析并构建单体型。

2 结果

2.1 病例资料分析 在 450 例研究对象中, *H. pylori* 感染阳性者 230 例,阳性率为 51.1%。其中男性感染者 174 例,女性感染者 56 例,年龄 29~93 (59.97 ± 10.94)岁; *H. pylori* 感染阴性者 220 例,其中男性 162 例,女性 58 例,年龄 26~90 (59.34 ± 11.93)岁。 *H. pylori* 感染阳性组和阴性组在性别及年龄分布方面的差异无统计学意义(年龄: $t = -0.583, P = 0.560$;性别: $\chi^2 = 0.242, P = 0.623$)。

2.2 各 SNP 位点在不同遗传模型下与 *H. pylori* 感染的关系 在 450 例研究样本中, *VGLL4* 基因的 rs1803489、rs7617620、rs13078528 位点的基因型分布符合 HWE 平衡。在共显性、显性、隐性等三种遗传模型下, SNP rs1803489、rs7617620、rs13078528 与 *H. pylori* 感染均没有关联。见表 1。

2.3 *VGLL4* 基因单体型与 *H. pylori* 感染的关系 对 *VGLL4* 基因的三个 SNP 进行连锁不平衡分析,显示:rs1803489、rs7617620、rs13078528 三个位点连锁程度低,未能形成单体型块。

3 讨论

课题组在内蒙古包头地区汉族人群中检测了 *VGLL4* SNP rs1803489、rs13078528、rs7617620 三个位点与 *H. pylori* 感染的关系。结果显示,在包头地区汉族人群中 SNP rs1803489、rs13078528、rs7617620 与 *H. pylori* 感染均没有关联。

H. pylori 是革兰阴性螺旋菌,微需氧,有鞭毛。

表1 3个位点SNP与*H. pylori*感染的关联[n(%)]

SNP	模型	基因型	<i>H. pylori</i> ⁽⁻⁾	<i>H. pylori</i> ⁽⁺⁾	OR(95% CI)*	AIC	BIC
rs1803489	共显性	GG	175(79.5)	190(82.6)	1	621.4	629.6
		AG	43(19.6)	38(16.5)	0.814(0.503~1.318)		
		AA	2(0.9)	2(0.9)	0.921(0.128~6.609)		
	显性	GG	175(79.5)	190(82.6)	1	626.9	935.1
		AG+AA	45(20.5)	40(17.4)	0.819(0.510~1.314)		
		GG+AG	218(99.1)	228(99.1)	1		
rs7617620	共显性	TT	157(71.4)	168(73.0)	1	624.7	632.9
		CT	61(27.7)	62(27.0)	0.950(0.627~1.438)		
		CC	2(0.9)	0(0)	0.987(0.970~1.005)		
	显性	TT	157(71.4)	168(73.0)	1	627.5	635.7
		CT+CC	63(28.6)	62(27.0)	0.920(0.609~1.389)		
		TT+CT	218(99.1)	230(100)	1		
rs13078528	共显性	AA	169(76.8)	179(77.8)	1	623.4	631.6
		AG	50(22.7)	49(21.3)	0.925(0.592~1.446)		
		GG	1(0.5)	2(0.9)	1.888(0.170~21.016)		
	显性	AA	169(76.8)	179(77.8)	1	627.5	635.8
		AG+GG	51(23.2)	51(22.2)	0.944(0.607~1.468)		
		AA+AG	219(99.5)	228(99.1)	1		
隐性	GG	1(0.5)	2(0.9)	1.921(0.173~21.338)	627.3	635.5	

* 平衡了性别和年龄因素

近年的流行病学调查显示,*H. pylori*感染了全球50%以上的人口,确定其引起胃癌风险大约为75%,是胃的I类致癌原^[9-10]。*H. pylori*进入宿主胃后定植于胃黏膜导致一种慢性持久性炎症-慢性萎缩性胃炎,这种慢性炎症在未经干预和治疗的情况下有时会持续数年至数十年。持续的慢性萎缩性胃炎经过肠上皮化生-低级别上皮内瘤变-高级别上皮内瘤变,最终会导致胃癌^[11]。*H. pylori*感染是这一过程的始动因子,其在胃黏膜炎性反应、萎缩和肠化生中均起重要作用。研究^[12-13]显示转录共激活因子Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)在*H. pylori*感染的黏膜中高表达,尤其是在胃炎和肠上皮化生中*H. pylori*通过释放CagA以刺激YAP的核积累和YAP/TEAD转录,从而诱导下游靶基因表达。YAP作为Hippo信号通路下游至关重要的效应因子可以与转录因子TEA域蛋白质家族成员(TEA domain family members, TEADs)结合,驱动细胞的增殖、转化和侵袭,与胃癌的发生发展密切相关^[14]。VGLL4直接竞争性结合TEADs并抑制YAP和TEADs之间的相互作用,从而抑制下游基因的表达^[15]。Jiao et al^[16]研究显示模仿VGLL4功能的肽可以有效抑制幽门螺杆菌感染的小鼠模型中胃癌瘤体的生长。表明VGLL4是研究胃癌变的重要候选基因,是针对YAP驱动的人类疾病的有前途的治疗

策略。

目前,仅有几项研究显示VGLL4基因多态性与人类疾病相关。SNP rs1803489位于编码区,在中国汉族人群中与肺癌的发病风险相关,是肺癌发病的危险因素^[6];SNP rs13078528位于内含子,在欧洲人群中筛选与成人身高相关常见基因突变的大型meta分析中,确定其与身高相关^[7]。SNP rs7617620位于内含子,在非裔美国人群中分析合并尼古丁依赖和严重抑郁症的风险基因,是合并尼古丁依赖和严重抑郁症的易感基因^[8]。而课题组的研究显示VGLL4的SNP rs1803489、rs13078528、rs7617620与*H. pylori*感染无关联,提示这三个位点可能在*H. pylori*感染的风险中不起主要作用。同时,研究也提示相同的遗传改变在不同的疾病中所起的作用可能不同,即使在同一种疾病中,SNP的作用也受种族以及人群基因亚结构的影响,导致人群对疾病的易感性也不同。此外,由于研究的样本量偏低,关于VGLL4与*H. pylori*感染的确切关系还需要扩大样本量进一步研究。

参考文献

- [1] Plummer M, de Martel C, Vignat J, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis[J]. Lancet Glob Health, 2016, 4(9): e609-16.
- [2] Servetas S L, Bridge D R, Merrell D S. Molecular mechanisms of

- gastric cancer initiation and progression by *Helicobacter pylori*[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2016, 29(3): 304–10.
- [3] Mommersteeg M C, Yu J, Peppelenbosch M P, et al. Genetic host factors in *Helicobacter pylori*-induced carcinogenesis: emerging new paradigms[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2018, 1869(1): 42–52.
- [4] 卫星如, 马立聪, 田旭阳, 等. Toll 样受体 9 基因多态性和幽门螺杆菌感染的关系[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(1): 142–5.
- [5] 杨霞, 董文杰, 高芳, 等. VGLL4 基因多态性与非贲门胃癌遗传易感性的关系[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(4): 636–9.
- [6] 黄小丽. VGLL4 和 NOTCH4 基因单核苷酸多态性与肺癌易感性的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [7] Wood A R, Esko T, Yang J, et al. Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(11): 1173–86.
- [8] Zhou H, Cheng Z, Bass N, et al. Genome-wide association study identifies glutamate ionotropic receptor GRIA4 as a risk gene for comorbid nicotine dependence and major depression[J]. *Transl Psychiatry*, 2018, 8(1): 208.
- [9] Chmiela M, Gonciarz W. Molecular mimicry in *Helicobacter pylori* infections[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(22): 3964–77.
- [10] Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, et al. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23(5): 700–13.
- [11] Amieva M, Peek R M. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer[J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(1): 64–78.
- [12] Silvia E M C, Camille T, Julie G, et al. The hippo kinase LATS2 controls *Helicobacter pylori*-induced epithelial-mesenchymal transition and intestinal metaplasia in gastric mucosa[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2020, 9(2): 257–76.
- [13] Li N S, Feng Y, Hu Y, et al. *Helicobacter pylori* CagA promotes epithelial mesenchymal transition in gastric carcinogenesis via triggering oncogenic YAP pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 280.
- [14] Li N, Yu N, Wang J, et al. miR-222/VGLL4/YAP-TEAD1 regulatory loop promotes proliferation and invasion of gastric cancer cells[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(3): 1158–68.
- [15] Zhang Y, Shen H, Withers H G, et al. VGLL4 selectively represses YAP-dependent gene induction and tumorigenic phenotypes in breast cancer[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6190.
- [16] Jiao S, Wang H, Shi Z, et al. A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP antagonist therapy against gastric cancer[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(2): 166–80.

Association analysis between SNPs in VGLL4 gene and *Helicobacter pylori* infection

Yang Xia¹, Dong Wenjie¹, Wu Jinbao², Ma Licong², Meng Xianmei², Gao Fang³, Jia Yanbin^{1,2,4}

(¹School of Basic Medicine and Forensic Medicine, ³School of Medical Technology and Anesthesiology,

⁴School of Nursing, Baotou Medical College, Baotou 014060; ²Inner Mongolia Institute of Digestive Diseases, The Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014030)

Abstract Objective To investigate the associations between the single nucleotide polymorphism(SNP) in vestigial like family member 4(VGLL4) gene and *Helicobacter pylori*(*H. pylori*) infection. **Methods** The blood samples of 450 normal physical examiners were collected, and the samples were divided into *H. pylori* negative group($n = 220$) and *H. pylori* positive group($n = 230$) using enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). SNP rs1803489, rs7617620, and rs13078528 in VGLL4 gene were genotyped using polymerase chain reaction(PCR)-restriction fragment length polymorphism(RFLP) technology. **Results** SNP rs1803489, rs7617620, and rs13078528 in VGLL4 gene were not associated with *H. pylori* infection in the Han population in Baotou, Inner Mongolia. **Conclusion** SNP rs1803489, rs7617620, and rs13078528 in VGLL4 gene may not play a major role in *H. pylori* infection in Baotou Han population.

Key words vestigial like family member 4; single nucleotide polymorphism; *Helicobacter pylori*; genetic susceptibility