

# TLR5 基因多态性与非贲门胃癌的关联研究

高 芳<sup>1</sup>, 卫星如<sup>2</sup>, 马立聪<sup>2,3</sup>, 田旭阳<sup>3</sup>, 党 彤<sup>3</sup>, 贾彦彬<sup>2,3,4</sup>

**摘要** 目的 探讨 TLR5 基因单核苷酸多态性与非贲门胃癌发病风险的关系, 为非贲门胃癌的早期诊断和治疗提供理论基础和实验依据。方法 用病例对照关联研究的方法, 在包头地区汉族人群中收集了 288 例经组织病理学诊断为非贲门胃癌的患者和 281 例正常对照。用 TaqMan 法对 TLR5 基因 SNP rs34270714、rs5744174、rs851139、rs17163737 进行基因分型; Haploview 4.0 软件被用来构建单体型, 同时运用非条件性 Logistic 回归计算比值比(OR)及其 95% 可信区间

(CI), 评估各等位基因、基因型及单体型与非贲门胃癌发病风险的关系。结果 包头地区汉族人群中 TLR5 基因 SNP rs17163737 与非贲门胃癌的发病风险相关联, 与携带 GG 基因型的人群比较, GT 基因型携带者非贲门胃癌的发病风险提高 1.605 倍( GT vs GG: OR = 1.605, 95% CI = 1.131 ~ 2.280), 其余 SNP 与非贲门胃癌的发病风险无关联( P > 0.05)。同时, 单体型分析结果显示: rs5744174 - rs851139 - rs17163737 存在强连锁不平衡, 构成单体型区域( Block); 然而各单体型均与非贲门胃癌发病风险无关联。结论 包头汉族人群中 TLR5 基因 SNP rs17163737 GT 基因型携带者非贲门胃癌的发病风险增高。

**关键词** TLR5; 基因多态性; 非贲门胃癌

**中图分类号** R 394.5

**文献标志码** A **文章编号** 1000 - 1492( 2020) 01 - 0114 - 04  
**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2020.01.024

2019 - 10 - 14 接收

**基金项目:** 国家自然科学基金( 编号: 30960169、81250024、81650017); 内蒙古自然科学基金[编号: 2016MS0805、2017MS( LH) 0807]; 包头医学院科学研究基金项目( 编号: BYJJ-DF 201603)

**作者单位:** 包头医学院<sup>1</sup> 医学技术与麻醉学院、<sup>2</sup> 基础医学与法医学院、<sup>4</sup> 护理学院, 包头 014060

<sup>3</sup> 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:** 高 芳, 女, 硕士, 讲师;

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

党 彤, 女, 教授, 责任作者, E-mail: dtong999@ sina.com

在全球范围内, 胃癌( gastric cancer, GC) 仍是发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一。2015 年, 国家癌症中心统计数据显示, 我国 GC 每年新发病例约 67.9 万例, 其发病率在恶性肿瘤中高居第 2

observe liver pathology, ELASA was used to detect alanine aminotransferase ( ALT) and aspartate aminotransferase ( AST) protein levels at different times ( 0 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 5 d, 7 d) after surgery. Western blot analysis was used to detect the expression of TRPM7 and PCNA in liver tissues at different times after operation. L-02 cells proliferation was induced by recombinant human interleukin 6 ( IL-6), and the expression of TRPM7 was detected by Western blot method. TRPM7 channel was blocked by 2-Aminoethoxydiphenyl borate ( 2-APB), L-02 cells viability was detected by MTT assay, and protein expressions of proliferating cell nuclear antigen ( PCNA), phosphorylated signal transducers and activators of transcription 3 ( p-STAT3) were detected by Western blot method. **Results** After PHx, it was observed that tissue hyperplasia was obvious, the cell volume became larger, the proliferating hepatocyte cord was arranged with different degrees of disorder while inflammatory cell infiltration was accompanied. ALT and AST protein levels increased significantly after PHx and peaked at 12 h, and then gradually decreased to normal levels. The protein level of TRPM7 in mouse liver tissue increased significantly after PHx and lasted for 72 h ( P < 0.05), which was correlated with changes in cell proliferation protein PCNA expression levels. IL-6 induced a significant increase in L-02 cell viability and TRPM7 protein levels. IL-6-induced increase of hepatocyte viability was inhibited by 2-APB in a concentration-dependent manner, and PCNA and P-STAT3 levels were also decreased after blocking TRPM7 channel. **Conclusion** TRPM7 increased expression during liver regeneration and hepatocyte proliferation, and inhibition of TRPM7 channel by 2-APB inhibited hepatocyte proliferation through reducing STAT3 phosphorylation, indicating that TRPM7 plays an important role in hepatocyte proliferation.

**Key words** TRPM7; hepatocyte proliferation; STAT3

位<sup>[1]</sup>;且每年 GC 新发病例占世界 GC 总人数的 47% ,大部分患者就诊时已为局部晚期或进展期 5 年生存率为 28%<sup>[2]</sup> ,形势十分严峻。GC 已是我国公民最主要的疾病负担 ,如何对 GC 进行有效防治是我们面临的一个公共卫生问题。

近年来 ,Toll 样受体家族 ( toll-like receptors , TLRs) 被发现是一种受体蛋白 ,在抗病原微生物免疫防御反应中起重要作用 ,与多种胃黏膜疾病的发生、发展有着密切的联系<sup>[3]</sup>。目前 ,人们普遍认为 GC 的发生与环境、幽门螺杆菌感染等因素密切相关。一些单核苷酸多态性 ( single nucleotide polymorphism , SNP) 与胃癌变的遗传易感性关联<sup>[4]</sup> ,提示在 GC 的发病过程中 ,遗传因素起非常重要的作用<sup>[5]</sup>。此外 ,TLR5 由于可识别幽门螺杆菌的鞭毛蛋白 ,与 GC 的易感性相关<sup>[6]</sup>。现在中国包头地区汉族人群中 ,探讨 TLR5 基因多态性与非贲门胃癌的相关性 ,旨在为非贲门胃癌的早期诊断和治疗提供理论基础和实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 选取 2008 年 9 月 ~2010 年 6 月间包头市肿瘤医院经组织病理学诊断为非贲门胃癌的 288 例患者为病例组。所有患者均为新发病例且未接受过放化疗。其中男性 224 例 ,女性 64 例 ,年龄 26 ~ 83 ( 59. 48 ± 11. 23) 岁。选取同期 281 例社区体检人群作为对照组 ,其中男性 220 例 ,女性 61 例 ,年龄 26 ~ 85 ( 59. 10 ± 11. 57) 岁;正常对照均无癌症病史和明显的胃部疾病。病例组和对照组在年龄和性别方面相匹配 ( 年龄:  $t = 0. 40$  ,  $P = 0. 69$ ; 性别:  $\chi^2 = 0. 02$  ,  $P = 0. 88$ )<sup>[7]</sup>。569 例研究样本均为汉族 ,相互之间无血缘关系且在包头居住 5 年以上 ,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 Tag-SNPs 的筛选** 根据 HapMap 数据库 ( <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) 中中国人的数据 ,使用 Algorithm-Tagger-pairwise Tagging 软件筛选基因的 tagSNPs ( 参数设定为  $MAF > 5\%$ 、 $r^2 > 0. 8$ )。筛选范围包括 TLR5 基因第一个外显子上游 20 kb 和最后一个外显子下游 10 kb 的序列 ,最终初步筛选出 4 个 SNPs ,即 rs34270714、rs5744174、rs851139、rs17163737 进行研究。

**1.2.2 基因分型** 抽取所有研究对象静脉血 3 ml ,用 DNA 提取试剂盒 ( 北京天根公司) 提取外周血白

细胞中的 DNA ,用 TaqMan 法对 4 个 SNP 进行基因分型。引物、FAM 和 VIC 标记探针由 Applied Biosystems 公司 ( Applied Biosystems , Foster City , CA , USA) 设计并合成 ,实验设阴性和阳性对照 ,实验操作严格按照说明书进行。基因分型在北京诺赛基因组有限公司完成 4 个 SNP 基因分型的成功率均大于 98%。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16. 0 统计软件进行统计分析。在对照组中用  $\chi^2$  检验来检测基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡;采用  $t$  检验比较分析年龄在病例组及对照组间的分布差异;采用  $\chi^2$  检验比较性别在病例组和对照组的分布差异。用 Haploview 4. 0 软件构建单体型。用非条件性 Logistic 回归计算比值比 ( odds ratio , OR) 及其 95% 可信区间 ( confidence interval , CI) ,评估各等位基因、基因型以及单体型与非贲门胃癌的发病风险是否存在关联 ,以  $P < 0. 05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各 SNP 位点等位基因与非贲门胃癌发病风险的关系** 通过对两组人群 TLR5 基因 SNP rs34270714、rs5744174、rs851139、rs17163737 位点的等位基因进行分析 ,结果显示 4 个位点的 SNP 均与非贲门胃癌的发病风险没有关联 ( $P > 0. 05$ )。见表 1。

表 1 各 SNP 位点等位基因与非贲门胃癌的关系 [n( % )]

SNP	等位基因	病例组*	对照组*	OR ( 95% CI) #
rs34270714	G	476 ( 86. 9)	473 ( 86. 0)	1
	A	72 ( 13. 1)	77 ( 14. 0)	0. 930 ( 0. 660 ~ 1. 311)
rs5744174	T	465 ( 82. 7)	443 ( 80. 6)	1
	C	97 ( 17. 3)	107 ( 19. 4)	0. 871 ( 0. 643 ~ 1. 172)
rs851139	G	472 ( 82. 5)	447 ( 80. 4)	1
	A	100 ( 17. 5)	109 ( 19. 6)	0. 873 ( 0. 649 ~ 1. 175)
rs17163737	G	410 ( 71. 7)	415 ( 76. 0)	1
	T	162 ( 28. 3)	131 ( 24. 0)	1. 259 ( 0. 958 ~ 1. 655)

\* 由于有缺失的数据 ,因此 ,列之和不及样本的等位基因总数; #平衡了性别和年龄因素

**2.2 各 SNP 位点基因型与非贲门胃癌发生的关系** 在正常对照中 ,SNP rs34270714、rs5744174、rs851139、rs17163737 的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 ( $P > 0. 05$ )。SNP rs17163737 与非贲门胃癌的发病风险相关联 ,与携带 GG 基因型的人群比较 ,GT 基因型携带者非贲门胃癌的发病风险可提高 1. 605 倍 ( GT vs GG:  $OR = 1. 605$  , 95% CI

= 1.131 ~ 2.280) ,其余 SNP 与非贲门胃癌发病风险无关联( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 各 SNP 位点基因型与非贲门胃癌的关联分析 [ $n$ (%) ]

SNP	等位基因	病例组*	对照组*	OR(95% CI) #
rs34270714	GG	207 (75.6)	204 (74.2)	1
	AG	62 (22.6)	65 (23.6)	0.938 (0.630 ~ 1.398)
	AA	5 (1.8)	6 (2.2)	0.829 (0.249 ~ 2.762)
rs5744174	TT	195 (69.4)	180 (65.4)	1
	CT	75 (26.7)	83 (30.2)	0.837 (0.576 ~ 1.215)
	CC	11 (3.9)	12 (4.4)	0.845 (0.364 ~ 1.963)
rs851139	GG	197 (68.9)	180 (64.7)	1
	AG	78 (27.3)	87 (31.3)	0.819 (0.568 ~ 1.182)
	AA	11 (3.8)	11 (4.0)	0.916 (0.388 ~ 2.166)
rs17163737	GG	140 (49.0)	161 (59.0)	1
	GT	130 (45.4)	93 (34.1)	1.605 (1.131 ~ 2.280)
	TT	16 (5.6)	19 (6.9)	0.967 (0.479 ~ 1.953)

\* 由于有缺失的数据 因此 列之和不及样本总数; #平衡了性别和年龄因素

**2.3 TLR5 基因的单体型与非贲门胃癌发生的关系** 对 TLR5 基因的 4 个 SNP 进行连锁不平衡分析 结果显示: rs5744174 - rs851139 - rs17163737 存在强连锁不平衡 构成单体型区域 (Block); 然而各单体型与非贲门胃癌发病风险无关联。见表 3。

表 3 TLR5 基因单体型与非贲门胃癌的关系 (%)

Haplotype*	病例组	对照组	OR(95% CI)
TGG	37.4	39.0	1
TGT	28.2	23.9	1.241 (0.924 ~ 1.668)
CAG	17.5	19.7	0.930 (0.669 ~ 1.293)

\* SNP 顺序为 rs5744174 - rs851139 - rs17163737

### 3 讨论

GC 是一种受多因素影响、发病机制复杂的癌症 虽然在临床治疗及基础研究中取得了一些进展 ,但 GC 的发生发展机制还没有完全阐明 [8]。研究显示 TLR5 在正常胃上皮细胞的顶部和基底外侧特异性表达 ,可识别细菌鞭毛蛋白 但感染幽门螺旋杆菌后 顶部表达就消失了。Lagunes-Servin et al [9] 发现 TLR5 与幽门螺旋杆菌感染密切相关。也有研究显示幽门螺旋杆菌可通过避开 TLR5 而逃避免疫系统的监测 [10-11]。这些结果提示 ,TLR5 基因可能与幽门螺旋杆菌感染以及其导致的 GC 的发生有关 ,是研究 GC 发病风险的重要的候选基因。

TLR5 基因位于染色体 1q41 包含 6 个外显子。TLR5 功能异常与 GC、宫颈癌、子宫内膜癌和卵巢癌

的发生有关 [12]。Zeng et al [13] 发现 TLR5 遗传变异和幽门螺旋杆菌感染之间的交互作用与 GC 的发病风险关联。Xu et al [6] 的研究显示 ,TLR5 基因多态性与 GC 风险显著关联。然而 ,非贲门胃癌和贲门癌在病因、病理、癌变以及预后等方面都存在较大差异 [14]。因此 ,为了保证样本的均质性 ,本研究将病例限定为非贲门胃癌的患者。

本研究以中国包头汉族人群为样本 ,检测了 TLR5 基因多态性 与非贲门胃癌遗传易感性的关系。研究结果显示: 包头地区汉族人群中 TLR5 基因 SNP rs17163737 与非贲门胃癌的发病风险相关联 ,与携带 GG 基因型的人群比较 ,GT 基因型携带者非贲门胃癌的发病风险可提高 1.605 倍 (GT vs GG: OR = 1.605 ,95% CI = 1.131 ~ 2.280) ,SNP rs34270714、rs5744174、rs851139 与非贲门胃癌发病风险没有关联 ( $P > 0.05$ )。同时我们的研究显示: rs5744174 - rs851139 - rs17163737 存在强连锁不平衡 构成单体型区域 ,然而各单体型与非贲门胃癌发病风险无关联。Xu et al [6] 收集了 1 300 例 GC 患者和 1 300 例正常对照 ,并探讨了 TLR5 基因 SNP rs5744174 和 rs17163737 与 GC 遗传易感性的关系。结果显示 rs5744174、rs17163737 与 GC 的发病风险相关联 ,其中与 TT 基因型相比 ,rs5744174 CC 基因型可增加 GC 的发病风险; 与 GG 基因型携带者相比 ,携带 rs17163737 GT 和 TT 基因型者 GC 的发病风险上升。我们的研究结果与 Xu et al [6] 的不太一致 ,可能的原因: ①两项研究样本的遗传亚结构不同 ,我们的样本是中国西北部包头市的汉族人群 ,而他们的样本主要来自中国南方地区; ②两项研究病例的选择标准有差异 ,我们研究的病例限定为非贲门胃癌患者 ,而 Xu et al [6] 的研究病例没有如此限定; ③我们的样本量偏低 ,可能导致了结果的差异。

本研究我们筛选 4 个 tagSNPs rs34270714、rs5744174、rs851139、rs17163737 ,进行了初步探讨 ,在今后的研究中我们将继续筛选位于外显子区和其他非编码区的 SNP 进行证实 ,同时扩大样本量继续深入地研究。

### 参考文献

[1] Chen W , Zheng R , Baade P D , et al. Cancer statistics in China , 2015 [J]. CA Cancer J Clin , 2016 , 66( 2) : 115 - 32.  
 [2] Zeng H , Zheng R , Guo Y , et al. Cancer survival in China , 2003 - 2005: a population-based study [J]. Int J Cancer , 2015 , 136 ( 8) : 1921 - 30.  
 [3] 舒 颖 ,张平安 ,董永清. Toll 样受体 10 基因 rs1000415 位点

- 多态性与 Hp 感染以及相关疾病的关系 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(5): 728-31.
- [4] 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.
- [5] Zhou C J, Zhang L W, Gao F, et al. Association analysis of common genetic variations in MUC5AC gene with the risk of non-cardia gastric cancer in a Chinese population [J]. *Asian Pac J Cancer Prev Apjcp*, 2014, 15(10): 4207-10.
- [6] Xu T, Fu D, Ren Y, et al. Genetic variations of TLR5 gene interacted with Helicobacter pylori infection among carcinogenesis of gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19): 31016-22.
- [7] 高芳, 鲁林, 秦金东, 等. COX-2 基因多态性与非贲门胃癌的发病风险关联 [J]. *肿瘤防治研究*, 2015, 42(5): 470-3.
- [8] Hunt R H, Camilleri M, Crowe S E, et al. The stomach in health and disease [J]. *Gut*, 2015, 64(10): 1650-68.
- [9] Lagunes-Servin H, Torres J, Maldonado-Bernal C, et al. Toll-like receptors and cytokines are upregulated during Helicobacter pylori infection in children [J]. *Helicobacter*, 2013, 18(6): 423-32.
- [10] Melit L E, Mărginean C O, Mărginean C D, et al. The relationship between Toll-like receptors and Helicobacter pylori-related gastropathies: still a controversial topic [J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 8197048.
- [11] Varga M G, Peek R M. DNA transfer and Toll-like receptor modulation by Helicobacter pylori [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 400: 169-93.
- [12] Castao-Rodríguez N, Kaakoush N O, Mitchell H M. Pattern-recognition receptors and gastric cancer [J]. *Front Immunol*, 2014, 5(3): 336.
- [13] Zeng H M, Pan K F, Zhang Y, et al. Genetic variants of toll-like receptor 2 and 5, Helicobacter pylori infection, and risk of gastric cancer and its precursors in a Chinese population [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011, 20(12): 2594-602.
- [14] Shi Y, Hu Z, Wu C, et al. A genome-wide association study identifies new susceptibility loci for non-cardia gastric cancer at 3q13.31 and 5p13.1 [J]. *Nat Genet*, 2011, 43(12): 1215-8.

## An association study between polymorphisms in the TLR5 gene and risk of non-cardia gastric cancer

Gao Fang<sup>1</sup>, Wei Xingru<sup>2</sup>, Ma Licong<sup>2,3</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Medical Technology, <sup>2</sup>Dept of Basic Medicine and Forensic Medicine, Baotou Medical College, Baotou 014060; <sup>3</sup>Inner Mongolia Institute of Digestive Diseases, The Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014030)

**Abstract Objective** To investigate the association between single nucleotide polymorphisms (SNP) of the TLR5 gene and the risk of non-cardia gastric cancer, and to supply theoretical and experimental basis for early diagnosis and treatment of non-cardia gastric cancer. **Methods** Using case-control study design, 288 non-cardia gastric cancer patients diagnosed by histopathology were selected as the case group while 281 community physical examinees were selected as the normal control group, and they were all Han population in Baotou. SNP rs34270714, rs5744174, rs851139 and rs17163737 were genotyped using TaqMan method. Haplotype was constructed by Haploview software 4.0. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were measured by unconditional Logistic regression analysis to evaluate the correlations of the alleles, genotypes and haplotypes to the susceptibility to non-cardia gastric cancer. **Results** In Baotou Han population, the SNP rs17163737 of TLR5 was associated with the risk of non-cardia gastric cancer. Compared to GG genotype, the GT genotype was associated with a significantly increased risk of non-cardia gastric cancer (GT vs GG: OR = 1.605, 95% CI = 1.131 ~ 2.280). Other SNPs were not associated with the risk of non-cardia gastric cancer ( $P > 0.05$ ). In addition, there was a strong linkage disequilibrium between rs5744174, rs851139 and rs17163737, which constituted a haplotype region (Block). However, there was no association between any haplotypes and the risk of non-cardia gastric cancer. **Conclusion** The carriers of TLR5 rs17163737 GT genotype have an increased risk of non-cardia gastric cancer in Baotou Han population.

**Key words** TLR5; gene polymorphism; non-cardia gastric cancer