

# Toll 样受体 10 基因 rs10004195 位点多态性与 Hp 感染以及相关疾病的关系

舒颖,张平安,童永清

**摘要** 目的 探讨 Toll 样受体 10 (TLR10) 基因 rs10004195 位点多态性与幽门螺杆菌 (Hp) 感染以及相关疾病的关系。方法 收集行胃镜活检的患者 652 例,同时采集患者外周血标本。采用免疫胶体金法检测患者外周血中 Hp 抗体, DNA 直接测序方法检测 TLR10 基因 rs10004195 位点基因型。结果 TLR10 基因 rs10004195 位点 AA、TT 和 AT 基因型分别为 30.98%、20.71%、48.31%; Hp 抗体阳性组 TT 基因型频率明显高于 Hp 抗体阴性组 ( $P < 0.05$ )。Hp 抗体阳性组中各疾病组与对照组基因型分布的比较,以及 Hp 抗体阴性组中各疾病组与对照组基因型分布的比较,差异均无统计学意义。结论 TLR10 基因 rs10004195 位点多态性与 Hp 感染有易感相关性,而与 Hp 感染相关疾病无相关性。**关键词** Toll 样受体 10 基因;单核苷酸多态性;幽门螺杆菌中图分类号 R 735.2 文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)05-0728-04

幽门螺杆菌 (*helicobacter pylori*, Hp) 是人类最常见的慢性感染之一,不同的人群中,感染率有所不同,我国人群感染率为 20% ~ 80%<sup>[1]</sup>。个体感染 Hp 后也并非全都发病,部分可能仅为 Hp 抗体阳性,而无任何病症,且 Hp 感染后所表现的疾病类型也不尽相同, Hp 感染患者最终大约只有 1% ~ 2% 会发展为胃癌<sup>[2]</sup>,不同个体针对 Hp 感染产生不同程度的生理病理反应,这可能与细菌毒力、环境因素以及宿主本身的遗传易感性密切相关。近年来,宿主的遗传易感性在 Hp 的感染中的作用备受关注。IL-1B 基因 C-31T<sup>[3]</sup> 以及 FCGR2A 基因 rs368433 位点<sup>[4]</sup> 等基因多态性与 Hp 感染有易感相关性,其他一些基因多态性位点与 Hp 感染的相关目前也有研究。该研究拟探讨 TLR10 基因 rs10004195 位点基因多态性与 Hp 感染以及 Hp 感染所致相关疾病的关系。

2016-02-22 接收

基金项目:国家临床重点专科建设项目(编号:财社[2010]305)

作者单位:武汉大学人民医院检验科,武汉 430060

作者简介:舒颖,女,技师;

张平安,男,主任技师,责任作者, E-mail: zhangpingan@aliyun.com

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集 2012 年 12 月 ~ 2014 年 7 月在武汉大学人民医院内镜中心进行胃镜活检的就诊患者 652 例。其中男 416 例,女 236 例,年龄 17 ~ 73 ( $46.8 \pm 6.3$ ) 岁。根据胃镜及活组织病理学诊断,胃癌患者 146 例,消化道溃疡患者 90 例,非萎缩性胃炎患者 140 例,胃黏膜组织正常者 276 例。本研究经医院医学伦理委员会批准,研究对象均签订知情同意书。

**1.2 试剂与仪器** 全血基因组 DNA 提取试剂盒(上海莱枫公司);琼脂糖(英国 OXIOD 公司);DNA marker DL 2000(日本 TaKaRa 公司);PCR 试剂盒(深圳富酶泰斯生物技术有限公司);胃 Hp 抗体检测试剂盒(深圳市惠安公司);ABI 9700 基因扩增仪、测序所用试剂和 ABI 3130 测序仪(美国 Applied Biosystem 公司);DYY-6C 电泳仪(北京六一公司);凝胶成像系统(SYNGENE 公司)。

**1.3 标本的采集** 采集所有研究对象空腹静脉血 3 ml,取 1 ml,3 000 r/min 离心 5 min,分离出血清,-20 °C 保存备用;2 ml 置于乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na<sub>2</sub>)抗凝试管中充分混匀,-20 °C 保存备用。

**1.4 Hp 抗体检测** 采用免疫胶体金法,按照 Hp 抗体检测试剂盒说明书操作进行 Hp 抗体检测,灵敏度 92.3%,特异性 97.7%。

**1.5 基因组 DNA 提取** 取 EDTA-Na<sub>2</sub> 抗凝血 200  $\mu$ l,按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作提取外周血基因组 DNA,操作过程参照试剂盒使用说明书。所提取基因组 DNA 于 -20 °C 保存备用。

**1.6 rs10004195 位点基因型的检测** 参照 Genbank 中 TLR10 基因序列,采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。上游引物:5'-TTGCACTCTCTCAG-CAGAGCT-3',下游引物:5'-GACATTTGCGGGACT GAGAA-3',扩增目的片段为 376 bp。PCR 总扩增体系为 20  $\mu$ l:mix 10  $\mu$ l, diH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ l, DNA 2  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L 引物 1  $\mu$ l。扩增条件:95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 30

个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。取 10 μl PCR 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳,回收并纯化上述 DNA 条带,最后在 ABI 3130 测序仪上进行测序分析。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 软件进行分析。检测数据采用百分比表示,基因型和等位基因型频率的比较,以及是否符合 Hardy-Weiberg 遗传平衡采用  $\chi^2$  检验。关联程度用 OR 值(95% CI)表示。

**2 结果**

**2.1 Hp 抗体检测结果** 胃癌患者 Hp 抗体阳性率为 71.2% (104/146), 消化性溃疡患者为 86.7% (78/90), 慢性非萎缩性胃炎患者为 68.6% (96/140), 胃黏膜组织正常者为 50.7% (140/276)。

**2.2 TLR10 基因 rs10004195 位点基因型分析** 经 PCR 扩增后,所得目的条带片段大小为 376 bp, 见图 1。对 652 例 DNA 样本进行分析,TLR10 基因 rs10004195 位点 AA、TT 和 AT 基因型分别为 30.98% (202/652)、20.71% (135/652)、48.31% (315/652),其中 Hp 阳性组 AA、TT 和 AT 基因型分别为 31.10% (130/418)、23.44% (98/418)、45.46% (190/418), Hp 阴性组 AA、TT 和 AT 基因型分别为 30.77% (72/234)、15.81% (37/234)、53.42% (125/234)。总群体、Hp 阳性组以及 Hp 阴性组各基因型的分布均符合 Hardy-Weiberg 遗传平衡定律( $\chi^2 = 0.35, 3.06, 2.02, P > 0.05$ ),具有群体代表性。3 种基因型测序结果见图 2。

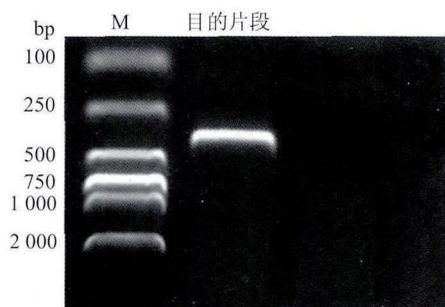


图 1 PCR 产物电泳结果  
M: Marker

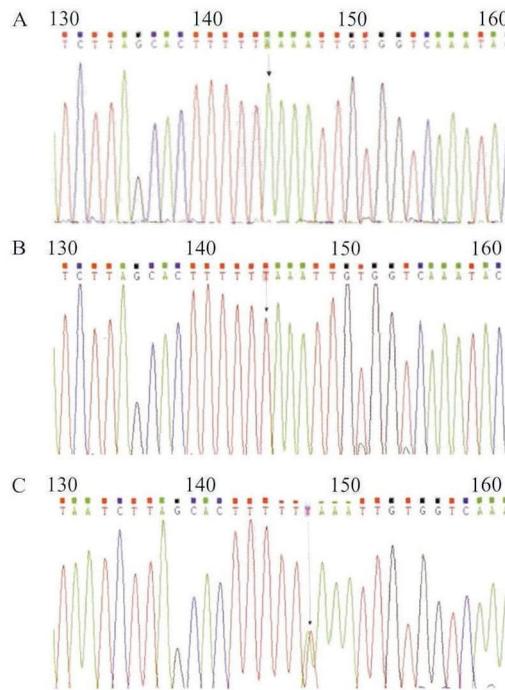


图 2 rs10004195 位点 3 种基因型测序图  
A: AA 型; B: TT 型; C: AT 型; 箭头示多态性位点

**2.3 TLR10 基因 rs10004195 位点多态性与 Hp 感染及相关疾病的关系** 胃癌组、消化性溃疡组、非萎缩性胃炎组以及胃黏膜组织正常组 TLR10 基因 rs10004195 位点基因型的分布均符合 Hardy-Weiberg 遗传平衡定律( $\chi^2 = 1.53, 0.11, 0.24, 0.02, P > 0.05$ )。TLR10 基因 rs10004195 位点各基因型在 Hp 抗体阳性组和阴性组中的分布差异有统计学意义( $\chi^2 = 6.2, P = 0.04$ ); Hp 抗体阳性组 TT 基因型频率明显高于 Hp 抗体阴性组,差异有统计学意义( $\chi^2 = 5.32, P = 0.02, OR = 1.63, 95\% CI: 1.07 \sim 2.48$ )。Hp 抗体阳性组中各疾病组与正常组基因型分布的比较以及 Hp 抗体阴性组中各疾病组与正常组基因型分布的比较差异均无统计学意义,见表 1。

**3 讨论**

Toll 样受体家族(Toll-like receptors, TLRs)是近

表 1 Hp 抗体阳性组中以及阴性组各疾病组与正常组基因型分布的比较

分组	Hp 抗体阳性组基因型			$\chi^2$ 值	P 值	Hp 抗体阴性组基因型			$\chi^2$ 值	P 值
	AA 型	TT 型	AT 型			AA 型	TT 型	AT 型		
胃癌	33	28	43	0.12	0.94	14	6	22	0.34	0.84
消化性溃疡	24	14	40	1.96	0.38	3	3	6	0.89	0.64
非萎缩性胃炎	30	20	46	0.81	0.67	16	8	20	1.67	0.43
胃黏膜组织正常	43	36	61	-	-	39	20	77	-	-
合计	130	98	190			72	37	125		

年来发现的在抗病原微生物免疫防御反应中起重要作用的受体蛋白,能通过识别细菌、病毒等病原体的相关模式分子,启动天然免疫和调节免疫反应,在联系天然免疫和获得性免疫中也起着桥梁的作用。至今为止,在哺乳动物中已经发现的 TLRs 家族成员有 13 种,其中在人类中发现的为 TLR1 ~ TLR10<sup>[5]</sup>。TLR10 基因位于染色体 4p14(第 4 染色体短臂 1 区 4 带),有 4 个外显子,mRNA 全长 3 990 bp(NM\_030956.3),由于缺少啮齿类动物模型,目前对 TLR10 基因的研究甚少,其功能以及内外源性配体仍不是很清楚。文献<sup>[6-7]</sup>报道,TLR10 基因高表达于淋巴组织系统,如脾脏、淋巴结、胸腺和扁桃体等,可能作为一种易感因素参与了人类感染以及免疫性疾病的发生。研究<sup>[8]</sup>证实,TLR10 基因启动子区 rs10004195 位点基因多态性与儿童 IgA 肾病有易感相关性。

该位点总群体 3 种基因型分布的频率与亚洲地区日本人群以及欧洲地区人群的分布差异都较大,而 Hp 阴性组 3 种基因型的分布频率与中国北京人群的分布相类似([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=10004195](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=10004195)),表明不同人种中 rs10004195 位点各基因型分布存在很明显的差异。本研究显示 TLR10 基因 rs10004195 位点各基因型在 Hp 抗体阳性组和阴性组中的分布差异有统计学意义,与 Mayerle et al<sup>[4]</sup>通过全基因组关联分析得出的结论相一致,并且通过测序的方法检测出 TLR10 基因 rs10004195 位点 TT 基因型频率在 Hp 抗体阳性组中明显高于 Hp 抗体阴性组,表明 rs10004195 位点 TT 基因型可能为人群感染 Hp 的易感因素,但确切的作用机制目前尚不清楚,有待进一步的研究。除此之外,本文还比较了 rs10004195 位点 Hp 抗体阳性组各疾病组与对照组基因型分布以及 Hp 抗体阴性组各疾病组与对照组基因型分

布,显示 Hp 抗体阳性组以及阴性组中疾病组与对照组相比较差异均无统计学意义,表明 rs10004195 位点单核苷酸多态性可能与胃癌、消化道溃疡以及慢性萎缩性胃炎的发生不存在相关性。

综上所述,本研究得出结论 TLR10 基因 rs10004195 位点 TT 基因型与 Hp 感染有易感相关性,表明了宿主的遗传因素在 Hp 的感染过程中发挥了重要的作用,但确切的作用机制目前尚不清楚,有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 张万岱,胡伏莲,萧树东,等. 中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J]. 现代消化及介入诊疗,2010,15(5):265-70.
- [2] de Oliveira J G, Silva A E. Polymorphisms of the TLR2 and TLR4 genes are associated with risk of gastric cancer in a Brazilian population[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(11): 1235-42.
- [3] Katsuda N, Hamajima N, Tamakoshi A, et al. Helicobacter pylori seropositivity and the myeloperoxidase G-463A polymorphism in combination with interleukin-1B C-31T in Japanese health checkup examinees[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2003, 33(4): 192-7.
- [4] Mayerle J, den Hoed C M, Schurmann C, et al. Identification of genetic loci associated with helicobacter pylori serologic status G-WAS of H pylori Infection susceptibility[J]. *JAMA*, 2013, 309(18): 1912-20.
- [5] O'Neill L A J, Golenbock D, Bowie A G. The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(6): 453-60.
- [6] Stevens V L, Hsing A W, Talbot J T, et al. Genetic variation in the toll-like receptor gene cluster (TLR10-TLR1-TLR6) and prostate cancer risk[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(11): 2644-50.
- [7] Morgan A R, Lam W J, Han D Y, et al. Genetic variation within TLR10 is associated with Crohn's disease in a New Zealand population[J]. *Hum Immunol*, 2012, 73(4): 416-20.
- [8] Park H J, Hahn W H, Suh J S, et al. Association between Toll-like receptor 10 (TLR10) gene polymorphisms and childhood IgA nephropathy[J]. *Eur J Pediatr*, 2011, 170(4): 503-9.

## Association of rs10004195 single nucleotide polymorphisms in Toll like receptor 10 gene with helicobacter pylori infection and associated diseases

Shu Ying, Zhang Pingan, Tong Yongqing

(Dept of Laboratory Science, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060)

**Abstract Objective** To investigate the association of rs10004195 single nucleotide polymorphisms in Toll like receptor 10(TLR 10) gene with helicobacter pylori infection and associated diseases. **Methods** A total of 652 patients who has been examined by gastroscopy were obtained, and then peripheral blood samples were collected from all the patients. Immune colloidal gold method was used to test the serological Hp antibody of all the patients. The

## 直肠癌术前容积旋转调强放疗 和五野静态调强放疗的剂量学比较

汪琳,张红雁,钱立庭,吴爱东,方为,闫冰

**摘要** 目的 比较直肠癌术前患者应用五野静态调强放疗(5F-IMRT)和容积弧形调强放疗(VMAT)两种计划的剂量学差别。方法 分别将16例术前行同期放化疗的直肠癌患者进行5F-IMRT和VMAT两种计划设计,应用剂量体积直方图比较分析靶区和危及器官的剂量学差异及治疗参数。结果 两种治疗计划均能满足临床剂量要求。5F-IMRT计划的适形指数(CI)为 $0.88 \pm 0.04$ ,VMAT计划的CI为 $0.90 \pm 0.03$ ,两种计划均能很好满足95%等剂量曲线对100%PTV体积的完全覆盖;VMAT和IMRT计划的均匀性指数(HI)分别为 $1.06 \pm 0.01$ 和 $1.05 \pm 0.01$ ,差异无统计学意义( $t=1.37, P>0.05$ )。5F-IMRT和VMAT计划中重要的危及器官如小肠、膀胱和股骨头等的关键剂量评价指标(Dmean、Dmax)及受照射体积的关键评价指标(V20、V30、V40和V50)在两种放疗计划中差异无统计学意义( $P>0.05$ )。VMAT计划组较5F-IMRT计划组机器跳数(MU)平均值减少39%( $P=0.000$ )。结论 直肠癌术前放疗中采用VMAT技术可获得等同于5F-IMRT计划的剂量分布,危及器官均能得到较好的保护,VMAT计划MU明显降低,治疗时间明显缩短。

**关键词** 直肠癌;容积弧形调强放射治疗;静态调强放射治疗;剂量学

**中图分类号** R 735.3+7;R 730.55

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2016)05-0731-04

2016-03-08 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2010B380)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院肿瘤放疗科,合肥 230001

作者简介:汪琳,女,主治医师;

钱立庭,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: money2004@sina.com

放疗在直肠癌综合治疗中有重要的价值。直肠癌辅助放疗模式经历了从术后到术前的改变。目前,术前同步放化疗联合全直肠系膜切除术是可切除的局部进展期[T3-4或N(+)]直肠癌的标准治疗模式,其不但可降低肿瘤分期、提高局控率与R0切除率及获得约20% pCR率,且可潜在改善总生存率<sup>[1-2]</sup>。近年来,直肠癌术前放疗的主要技术为调强放疗(intensity modulated radiotherapy, IM-RT),其较其他放疗模式具有剂量学优势,并且能减少腹泻等不良反应的发生<sup>[3-5]</sup>。该研究通过比较VMAT和5F-IMRT两种计划的剂量学特点及各治疗参数的差异,为直肠癌术前放疗的患者提供临床参考。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 选取2012年~2015年在我科行术前同期放化疗的16例直肠癌患者,CT机模拟定位扫描后,分别对CT图像进行5F-IMRT和VMAT放疗计划设计。16例患者均经直肠镜检查取病理证实为直肠腺癌,其中男12例,女4例;年龄32~70岁,中位年龄53岁。患者放疗前均签定知情同意书。

**1.2 CT定位** 采用西门子16排螺旋CT下行增强扫描,所有患者在定位前1h排空膀胱,随即口服20%泛影葡胺10ml+600ml生理盐水,充盈小肠及膀胱,定位时采用仰卧位,扫描范围为L<sub>2</sub>下缘至坐骨结节下5cm,扫描层厚为5mm,按2.5mm重建,

TLR10 gene rs10004195 polymorphisms were examined by direct DNA sequencing of the PCR products. **Results** The frequencies of AA, TT and AT genotype on TLR10 rs10004195 were 30.98%, 20.71%, 48.31%; there was significant difference between Hp antibody positive group and Hp antibody negative group in the TT frequencies of TLR10 rs10004195 ( $P<0.05$ ). No significant difference between controls and Hp associated diseases groups in Hp antibody positive group or in Hp antibody negative group were observed. **Conclusion** There was correlation between the TLR10 rs10004195 loci genotype and the risk of Hp infection, but no correlation with Hp associated diseases.

**Key words** Toll like receptor 10 gene; single nucleotide polymorphism; *helicobacter pylori*