

浙江地区汉族人群 Toll 样受体 2 基因 Arg753Gln 多态性和肺结核病相关性

金 蕾 丁世萍 朱秀芳¹ 钟建平² 李继承*

(浙江大学细胞生物学研究所, 杭州 310031; ¹义乌市中心医院, 义乌 322000; ²绍兴市第四医院, 绍兴 312007)

摘要 应用聚合酶链反应-序列特异性引物方法(polymerase chain reaction with sequence specific primer, PCR-SSP), 研究浙江地区汉族人群中 Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, TLR2) Arg753Gln (G2408A) 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP) 分布及其与肺结核病的易感性的关系。分析了 170 名肺结核病患者和 199 名正常献血者 TLR2 基因 Arg753Gln 位点的基因型分布频率。结果表明, 在 170 名肺结核病患者和 199 名正常献血者中, TLR2 Arg753Gln 位点 G/G 基因型频率分别为 58.23% 和 84.2%, G/A 基因型频率分别为 41.77% 和 15.8%, 两种基因型在两组中相比较, 差异显著, $P < 0.001$ 。两组人群中均未发现有 A/A 基因型存在。TLR2 基因 Arg753Gln 位点在浙江地区汉族人群中有其独特的分布规律, 这个位点的多态性分布对肺结核病的发展有潜在的危险影响。

关键词 Toll 样受体 2; 单核苷酸多态性; 肺结核病

Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, TLR-2) 是哺乳动物 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)家族的一员, 作为细胞表面的天然受体蛋白, 主要参与病原微生物产物的识别及炎症信号转导, 介导天然抗感染免疫^[1, 2]。最近的研究表明^[3, 4], TLR2 基因多态性是增加对感染性疾病易感性的危险因素之一。其中, TLR2 一个位于保守 C 端的 SNP 位点, Arg753Gln (G2408A, SNP ID: rs573708) 可降低巨噬细胞对细菌多肽的反应能力^[3]。因此, 不同的 TLR2 基因型有可能影响不同个体的 TLR2 表达水平和功能差异, 进而影响到宿主免疫反应性的下降。肺结核的发病不仅有环境因素也可能有遗传因素, 为从遗传角度探讨中国人肺结核病的发病机制, 我们对浙江地区汉族人群进行 TLR2 Arg753Gln 多态性的分布特点研究, 并分析其与肺结核病的相关性^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料

标本来自三代无血缘关系的浙江籍汉族无偿献血人群, 为 199 名(男 121 名, 女 78 名, 年龄 19~55 岁), 浙江地区肺结核病患者 170 名(男 99 名, 女 71 名, 年龄 26~63 岁)。抽取 3 ml 静脉血样, 以 EDTA 抗凝备用。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 参照 TLR2 基因序列及

有关文献^[6], 由上海生工生物技术有限公司合成。PCR-SSP 分型引物, 上游共同引物 TLR2-F: 5'-TATG-GTCCAGGAGCTGGAGA-3'; 下游引物 TLR2-R1 (CGG): 5'-GGTCTTGGTGTTCATTATCTTCC-3' TLR2-R2 (CAG): 5'-GGTCTTGGTGTTCATTATCTTCT-3'; 扩增片段长度均为 328 bp。以人类生长激素基因(HGH)作为内参照, 引物序列为 HGH-F: 5'-TGCCTTCCCC-AACCATTCCCTTA-3'; HGH-R: 5'-CCTCTCACGG-ATTCTGTGTGTTTC-3' 扩增片段长度为 432 bp。

1.2.2 模板 DNA 提取 用盐析法抽提 DNA, 方法参见文献^[7]。

1.2.3 PCR-SSP 方法 总反应体积为 25 μ l, 其中 2.5 μ l 模板 DNA (约 200 ng), 引物终浓度为 0.4 μ mol/L, $MgCl_2$ 终浓度为 1.25 mmol/L, 2.5 μ l 10 $\times$ 缓冲液, 0.5 μ l dNTPs, 0.125 μ mol/L 内质控引物浓度。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}C$ 预变性 5 min, 然后按 95 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}C$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 30 s, 循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min, 冷却至 4 $^{\circ}C$ 。将 PCR-SSP 扩增产物 5 μ l, 加入 2% 琼脂糖凝胶(含 EB)中电泳, 根据出现的电泳条带判断结果。

1.3 统计分析

基因型频率采用基因计数法计算, 病例组和正常

收稿日期: 2006-07-25 接受日期: 2006-11-16

浙江省教育厅项目资助(No.20020820)

* 通讯作者。Tel: 0571-88208088, E-mail: lijichen@zju.edu.cn

对照组间基因型频率的差异用 χ^2 检验, TLR2 Arg753 Gln 位点基因型与肺结核病的发病的关系比较用方差分析, 以上均在 SPSS 软件上完成。

2 结果

2.1 PCR-SSP 琼脂糖凝胶电泳

以 TLR2-F 与 TLR2-R1 引物对特异性扩增精氨酸(CGG)位点, TLR2-F 与 TLR2-R2 引物对扩增谷氨酰胺(CAG)位点, 扩增片段长度均为 328 bp。以 HGH-F 和 HGH-R 引物对作内参照, 其扩增片段长度为 432 bp, 见图 1。

2.2 肺结核组和正常对照组 TLR2 Arg753Gln 位点基因型频率比较

应用 PCR-SSP 方法检测了浙江地区汉族人群的 TLR2 Arg753Gln 位点分布情况, 在 170 例肺结核病患者中, G/G 和 G/A 的基因型频率分别为 58.23% 和 41.77%, 未发现存在 A/A 基因型, 而在 199 例正常对照组中, G/G 和 G/A 的基因型频率分别为 84.20% 和 15.80%, 也未发现存在 A/A 基因型。两组的基因型频率比较, 卡方值为 31.43, $P < 0.001$ 。表 1 比较了浙江地区汉族人群(正常健康人群)、德国人、土耳其人群及法国人群中 TLR2 Arg753Gln 位点基因型分布情况。

3 讨论

人 TLR2 基因位于染色体 4q32, TLR2 基因全

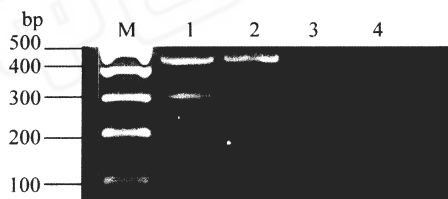


Fig.1 TLR2 Arg753Gln polymorphism by PCR-SSP

M: DNA marker; 1, 2: sample of G/G genotype (328 bp); 3, 4: sample of G/A genotype (328 bp). The upper bands represent the 432 bp internal control PCR fragment.

Table 1 Distribution of the TLR2 Arg753Gln genotypes in Zhejiang Han population and other ethnical groups

Groups	Genotype frequency (%)		
	G/G	G/A	A/A
Zhejiang Han (n=199)	168(84.20)	31(15.80)	0(0)
Indigenous German (n=319)	289(90.60)	30(9.40)	0(0)*
Indigenous French (n=110)	107(97.27)	3(2.73)	0(0)**
Indigenous Turkish (n=116)	107(92.30)	7(6.00)	2(1.70)*

Compared with Zhejiang Han population, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, Fisher's exact test.

长 17.46 kb, 编码序列包括 2 355 个碱基, 编码的整个蛋白质结构由 784 个氨基酸组成。TLR2 为 1 型跨膜蛋白, 可分为: 胞外区、胞浆区和跨膜区 3 部分, 从 N 端到 C 端依次包括信号肽、多个富含亮氨酸的重复序列(leucine-rich repeat, LRR)、一个富含半胱氨酸的结构域、一段跨膜区以及 TIR 结构域。TLR2 能识别许多种病原相关的分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMPs), 包括细菌脂多糖、肽聚糖和胞壁酸, 在分支杆菌、螺旋体、支原体和酵母菌感染中发挥重要作用, 可通过识别 LAM、脂蛋白/脂肽、细菌 DNA 等菌体成分来激活细胞内信号转导, 诱导促炎细胞因子和直接参与适应性免疫应答的效应细胞因子的分泌, 引发机体的急性或者慢性炎症反应等^[2,4,8]。TLR2 基因剔除的小鼠^[9]对葡萄球菌和链球菌引起的感染性疾病具有高度易感性, 并且在感染后具有比野生型大得多的携菌量。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP), 主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性。大多数的 SNP 对细胞的功能没有影响, 而一些可以影响基因功能的 SNP 则会增强人们对疾病的易感性及对药物的反应^[10]。Arbour 等^[11]首先通过对白种人中的 TLR4 (Asp299Gly) 多态性进行分析, 发现这一位于细胞内的多态性位点与吸入性的脂多糖具有高反应性, 增加了由 G- 菌引起的脓毒血症的易感性。自此后, TLRs 家族的 SNP 与人类疾病的发生、发展的相关性研究日益得到各国研究者的重视。Lorenz 等^[3]通过 PCR-SSCP 方法发现了 TLR2 一个新的 SNP 位点, 在 753 位上导致精氨酸和谷氨酰胺的替换, 并且这一多态性与葡萄球菌引起的脓毒血症的发生相关。对 HEK293 细胞转染 TLR2 753Gln 基因后, 发现对细菌的脂肽反应性下降^[6]。这些研究都提示 TLR2 基因的 SNP 会增加机体对感染性疾病的易感性。

世界上有三分之一的人口曾感染结核杆菌, 而只有 5%~15% 的人会发展成为有临床症状的结核病患者, 其中的原因仍然未知。但有研究表明, 遗传因素是增加肺结核病发展的重要易感因素之一^[12]。在结核分枝杆菌感染时, 机体的免疫系统中, 巨噬细胞、T 淋巴细胞、干扰素- γ 、肿瘤坏死因子- α 等起着重要的防御机制作用。最近研究报道, 巨噬细胞通过 TLR2 的活化(第一道防线)感知分枝杆菌的侵入, 从而引发一系列的免疫反应, 如, 肿瘤坏死因子- α 和白介素-1 的产生, 抗原提呈, T 淋巴细胞活化, 干扰素- γ 产生等。Reiling 等^[13]对 TLR2、TLR4、CD14 基因剔除的小鼠及正常对照小鼠进行实验, 发现

TLR2基因剔除的小鼠对大剂量的肺结核杆菌防御力下降,但对自然空气中低浓度的肺结核杆菌没有组间差别,这提示TLR2基因缺陷增加了对肺结核病的易感性。我们通过对肺结核组和正常对照组检测TLR2 Arg753Gln位点基因型频率和等位基因频率比较后得出,浙江地区汉族人群中的肺结核病患者的G/A基因型及A等位基因分布频率显著高于正常人,肺结核患者中G/A基因型分布频率高达41.77%,表明在浙江地区汉族人群中,肺结核病的发生与TLR2 Arg753Gln的多态性有一定关联。这个位于TIR区域的多态性位点可能(和TLR2的/或和TLRS其他多态性位点共同)降低了巨噬细胞等对细菌多种多肽反应能力,并与某些环境因素相互作用,从而导致肺结核病的发生、发展^[6]。

Lorenz等^[3]报道,在法国人群中,TLR2 Arg753Gln位点G/A基因型分布频率仅为2.73%;Ogus等^[6]报道,在土耳其人群中,TLR2 Arg753Gln位点G/A基因型在结核病患者中的分布频率为17.9%,在正常对照组中的分布频率为7.7%,并且存在AA基因型;Schroder等^[14]报道,在德国人群中,这一位点G/A基因型频率为9.4%,未见纯合突变。与这些研究结果比较,TLR2 Arg753Gln位点基因型和等位基因分布频率随

国家地域分布和种族的不同而有所差异,G/A基因型频率以浙江地区汉族人群中最高,土耳其人群中次之,德国、法国人群中最低。在浙江地区汉族人群中没有检测到A/A基因型,表明这一基因型在浙江地区汉族人群中分布的频率非常低。

本研究表明,TLR2 Arg753Gln位点多态性是肺结核病易感性的危险因素之一。这一SNP可能是直接影响基因功能,也可能与其他功能性的SNP位点连锁不平衡共同影响基因功能,还需进行进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Takeda K *et al.* *Int Immunol*, 2005, **17**: 1
- [2] Lien E *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 33419
- [3] Lorenz E *et al.* *Infect Immun*, 2000, **68**: 6398
- [4] Schroder NW *et al.* *Lancet Infect Dis*, 2005, **5**: 156
- [5] Schumann RR. *Vaccine*, 2004, **22** (suppl 1): S21
- [6] Ogus AC *et al.* *Eur Respir J*, 2004, **23**: 219
- [7] Olerup O *et al.* *Tissue Antigen*, 1992, **39**: 225
- [8] Kirschning CJ *et al.* *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002, **270**: 121
- [9] Hoebe K *et al.* *Nat Immunol*, 2004, **5**: 971
- [10] Sachidanandam R *et al.* *Nature*, 2001, **409**: 928
- [11] Arbour NC *et al.* *Nat Genet*, 2000, **25**: 187
- [12] Dupuis S *et al.* *Science*, 2001, **293**: 300
- [13] Reiling N *et al.* *J Immunol*, 2002, **169**: 3480
- [14] Schroder NW *et al.* *J Mol Med*, 2003, **81**: 368

The Arg753Gln Polymorphism of the Human Toll-like Receptor 2 Gene and Its Association with Tuberculosis Disease in Zhejiang Han Population

Lei Jin, Shi-Ping Ding, Xiu-Fang Zhu¹, Jian-Ping Zhong², Ji-Cheng Li*

(Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; ¹Yiwu Central Hospital, Yiwu 322000, China;

²Shaoxing Fourth Hospital, Shaoxing, 312007, China)

Abstract Toll-like receptor 2 (TLR2) plays a critical role in immune response to mycobacteria. In order to know the TLR2 Arg753Gln single nucleotide polymorphism (SNP) and the relationship with the developing of tuberculosis in Zhejiang Han population, we collected the blood samples from 170 TB patients compared with 199 ethnically and age-matched healthy blood donors. Polymerase chain reaction with sequence specific primer method (PCR-SSP) was applied to detect the TLR2 Arg753Gln polymorphism. The G/G genotype of Arg753Gln polymorphism was observed in 58.23% and 84.2% in TB patients and the controls, respectively. And the G/A genotype in the cases was much greater, 41.77%, compared with 15.8% in the controls. Statistically significant difference was found between the two groups, $P < 0.001$. Moreover, no one in either group was homozygous for the mutation (A/A). The present data suggests that the polymorphism of the TLR2 gene in Zhejiang Han population has its specific distribution trait. And it influences the risk of developing tuberculosis.

Key words Toll-like receptor 2; single nucleotide polymorphism; tuberculosis

Received: July 25, 2006 Accepted: November 16, 2006

This work was supported by the Education Bureau of Zhejiang Province (No.20020820)

*Corresponding author: Tel: 86-571-88208088, E-mail: lijichen@zju.edu.cn