

· 医学综合研究 ·

TLR4 基因 Asp299Gly 多态性与强直性脊柱炎关系的 Meta 分析

李朝顶^{1,2}, 许杰¹, 王喜安¹, 时超¹

1. 徐州市中医院(南京中医药大学附属徐州医院)骨科, 江苏 徐州 221000;
2. 皖南医学院第一附属医院骨科, 安徽 芜湖 241001

摘要:目的 采用 Meta 分析方法对 TLR4 基因 Asp299Gly 多态性与强直性脊柱炎(AS)的关系进行系统评价, 探寻 AS 发病遗传背景的循证医学证据。方法 以“强直性脊柱炎”和“toll 样受体 4 或 TLR4”和“多态性”为关键词, 全面检索 PubMed 医学网站、中国学术期刊全文数据库、中国生物医学文献、万方等全文数据库, 筛选 TLR4 基因多态性与 AS 关系的文献, 截止 2015 年 7 月, 筛选有详细信息的相关全文文献, 根据是否为病例对照研究等纳入标准, 对筛选文献中提供准确数据的文献进行 Meta 分析, 根据资料有同质性, 采用固定效应模型, 合并 OR 值, 采用 Egger's 检验漏斗图对称性评价发表偏倚, 系统评价 TLR4 基因 Asp299Gly 多态性与强直性脊柱炎的相关性。结果 最终纳入 6 篇 TLR4 基因 Asp299Gly 多态性与强直性脊柱炎病例对照研究文献进行 Meta 分析, 共计病例组 851 例, 对照组 842 例。对照组人群均符合 Hardy-Weinberg 平衡。合并 TLR4 基因 Asp299Gly 位点的基因型(AG + GG)/AA, 异质性检验 Q 检验统计量为 5.82, $I^2 = 48.5\%$, $P > 0.05$, 采用固定效应模型进行统计分析, 合并值 $OR = 1.04$ (95% $CI = 0.70 \sim 1.54$), 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), Egger's 检验漏斗图对称性, $P > 0.05$, 无发表偏倚。合并 TLR4 基因 Asp299Gly 位点的等位基因 G/A, 异质性检验 Q 检验统计量为 6.80, $I^2 = 55.9\%$, $P > 0.05$, 采用固定效应模型进行统计分析, 合并值 $OR = 1.02$ (95% $CI = 0.70 \sim 1.50$), 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Egger's 检验漏斗图对称性, $P > 0.05$, 无发表偏倚。结论 尚不能认为 TLR4 基因 Asp299Gly 与 AS 易感性有关联。

关键词: TLR4; 多态性; 强直性脊柱炎; Meta 分析

中图分类号: R593.23 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-4152(2017)11-1967-04

DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.2017.11.043

Meta-analysis on the association TLR4 Asp299Gly polymorphism with ankylosing spondylitis Li Chao-ding, XU Jie, WANG Xi-an, et al. Department of Orthopedics, Xuzhou Municipal Hospital of TCM, Xuzhou, Jiangsu 221000, China

Abstract: Objective To investigate the association of Asp299Gly polymorphism in toll-like receptor 4 (TLR4) gene with ankylosing spondylitis (AS) through meta-analysis for supplying evidences with evidence-based medicine in research of the genetic background of AS. **Methods** Literatures were initially retrieved from CBM disc, CNKI, WANGFANG DATA and PubMed by key words of “ankylosing spondylitis”, “toll-like receptor 4/TLR4 and polymorphism”, and articles related to TLR4 Asp299Gly polymorphism and AS were available by July 2015. Eligible studies were defined as case-control study on full data included in the paper basis, and subjected to meta-analysis. Fixed effects model was used to pool the odd ratio (OR) by homogeneity in the data. Publication bias among the enrolled studies was evaluated using Egger's test to measure the funnel plot asymmetry. Systematic review was performed to estimate the relation of TLR4 Asp299Gly polymorphism with AS. **Results** Six studies related to TLR4 Asp299Gly polymorphism and AS were finally enrolled for current meta-analysis, involving 851 AS cases and 842 controls. The healthy controls in the 6 studies were agreed on Hardy-Weinberg equilibrium. Genotype distribution (AG + GG vs. AA) for TLR4 Asp299Gly allele was 5.82 by Q -test and I^2 statistic to estimate the degree of heterogeneity ($I^2 = 48.5\%$, $P > 0.05$). Fixed effects model estimation indicated pooled $OR = 1.04$ (95% $CI = 0.70 - 1.54$, $P > 0.05$). The difference was not significant. No publication bias was found by examining the funnel plot asymmetry using Egger's test ($P > 0.05$). As for the allele G/A in TLR4 Asp299Gly, Q -test and I^2 statistics showed 6.80 ($I^2 = 55.9\%$, $P > 0.05$). Fixed effects model revealed no significant difference ($OR = 1.02$, 95% $CI = 0.70 - 1.50$, $P > 0.05$). No publication bias occurred on allele G/A as the funnel plot asymmetry measured by Egger's test. **Conclusion** Current findings appear hard to determine the association of TLR4 Asp299Gly polymorphism with AS.

Key words: TLR4; Polymorphism; ankylosing spondylitis; Meta-analysis

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)主要表现为骶髂关节及中轴关节病变,可累及外周关节和其他组织,是一种慢性进展性炎性疾病,晚期可能发展为

脊柱畸形^[1]。不同的种族 AS 的发病率存在差异,中国汉族人群的发病率为 0.06% ~ 0.54%。目前研究显示该病发病机制尚不明确。一些研究发现天然免疫应答在 AS 发病和病情进展中可能发挥作用,而 TLR4 是天然免疫分子家族的重要成员,TLR4 以革兰阴性细菌 LPS、热休克蛋白、透明质酸等内外源性物质为配体,经信号通路活化,可产生肿瘤坏死因子(TNF)- α 、

基金项目:安徽省自然科学基金(08020303078);安徽高校省级自然科学基金重点项目(KJ2008A09ZC);江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(ZY320816)

通信作者:李朝顶, E-mail: cdlee007@163.com

白介素 (IL)-12、干扰素 (IFN)- γ 等多种促炎症因子, 引发机体全身性的自身免疫性炎症损伤或者局部的损伤^[2-3]。

目前在探讨 TLR4 基因多态性与 AS 关系的研究中, Asp299Gly 位点比较受关注, Asp299Gly 位于 TLR4 基因的外显子区域, 有多个关于 TLR4 基因 Asp299Gly 多态性与 AS 关系的分子流行病学研究, 但研究结果并不完全一致。本研究搜集了较为全面的文献, 针对采用病例对照研究方法开展的研究进行 Meta 分析, 为强直性脊柱炎发病的病因学提供循证医学证据。

1 资料与方法

1.1 文献检索方法 检索的数据库为 PubMed、中国生物医学文献数据库、万方科技期刊和中国学术期刊全文数据库等。中文检索策略: “强直性脊柱炎” and “toll 样受体 4 or TLR4” and “多态性”; 英文检索策略: “ankylosing spondylitis” and “TLR4 or toll-like receptor” and “polymorphism or variant”。检索文献发表时间截止到 2015 年 7 月, 并对发表文献追溯。

1.2 筛选文献方法 对获得的全部文献, 先阅读文献标题和摘要, 对有全文文献的资料采用全文阅读, 进行初次筛选, 再根据纳入标准进行二次筛选, 对确定的文献进行全文阅读审核, 按照排除标准剔除不符合文献, 最终筛选出要分析的文献。纳入标准: ①采用病例对照研究方法开展的 AS 与 TLR4 基因位点的相关性文献; ②文献中可直接查到或可以间接推算确切的基因型频数; ③AS 病例组诊断标准采用 1984 年纽约修订标准^[4], 对照组为健康人群; ④对照组人群基因位点符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。排除标准: ①采用描述、

队列等其他流行病学研究方法开展研究的文献; ②在参考文献中不能获得对照组信息的文献; ③同一实验室或同一作者发表的相似文献, 选取样本例数最大的研究文献或发表时间最新的文献。

1.3 数据的提取 由 2 位研究者按照排除和纳入标准进行独立提取信息双遍录入并进行数据比对, 对有异议的文献数据再与第三位研究者讨论, 达成一致意见后决定是否纳入。提取的信息包括发表文献的第一作者、发表时间、研究人群、语言、样本含量、基因分型及频数分布、检测方法等。

1.4 统计学方法 先采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验各基因型分布是否符合平衡定律, 剔除对照组不符合 HWE 遗传平衡定律的文献。再采用 Review 4.2 统计软件对 TLR4 基因 Asp299Gly 位点的基因型和等位基因进行分析, 首先对研究结果进行异质性检验, 若 $P > 0.05$, 各研究具有同质性, 选用固定效应模型 (fixed effect model, FEM) 进行合并统计分析, 若 $P < 0.05$, 则采用随机效应模型 (random effect model, REM) 进行合并统计分析, 并绘制森林图。本研究选用比值比 OR 值为评价指标, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, 计算 OR 值及 95% 可信区间 (CI)。

2 结果

2.1 文献基本情况 按照上述检索策略, 最终有 6 篇^[5-10] 研究文献符合纳入标准进行 Meta 分析。病例组共计 851 例, 对照组共计 842 例。各文献的基本情况见表 1。被纳入 Meta 分析的文献基本信息和基因型分布详见表 1 和表 2。

表 1 纳入文献信息

作者	年份	国籍	语言	基因	病例组	对照组	检测方法
Adam R ^[5]	2006	美国	英文	Asp299Gly Thr399Ile	193	125	PCR
Gergely P Jr ^[6]	2006	匈牙利	英文	Asp299Gly Thr399Ile	138	140	PCR-RFLP
Na KS ^[7]	2008	韩国	英文	Asp299Gly Thr399Ile	200	197	PCR
van der Paardt M ^[8]	2005	荷兰	英文	Asp299Gly	113	170	PCR-RFLP
秦姣 ^[9]	2009	中国	中文	Asp299Gly Thr399Ile	107	112	PCR-RFLP
Snelgrove T ^[10]	2007	加拿大	英文	Asp299Gly Thr399Ile	100	98	PCR

表 2 纳入文献基因型分布

作者	年份	基因型 (病例组/对照组)			等位基因 (病例组/对照组)		HEW
		AA	AG	GG	A	G	
Adam R	2006	164/107	27/17	2/1	355/231	31/19	0.72
Gergely P Jr	2006	128/127	10/12	0/1	266/266	10/14	0.24
Na NS	2008	200/197	0/0	0/0	400/394	0/0	
van der Paardt M	2005	106/153	7/16	0/1	219/322	7/18	0.42
秦姣	2009	107/112	0/0	0/0	214/224	0/0	
Snelgrove T	2007	86/93	13/5	1/0	185/191	15/5	1.00

2.2 TLR4 基因 Asp299Gly 多态性与 AS 相关性分析 在基因型分析中, (AG + GG)/AA 基因型频数的 OR 值 Q 检验统计量为 5.82, $P = 0.12$, $I^2 = 48.5\%$,

各研究资料具有同质性, 选用固定效应模型, 合并 OR 值为 1.04, 95% CI 为 (0.70 ~ 1.54), $P = 0.86$, 见图 1。在等位基因分析中, G/A 等位基因频数的 OR 值 Q 检验统计量为 6.80, $P = 0.08$, $I^2 = 55.9\%$, 各研究资料亦具有同质性, 选用固定效应模型, 合并 OR 值为 1.02, 95% CI 为 (0.70 ~ 1.50), $P = 0.90$, 见图 2。

2.3 发表偏倚 TLR4 基因 Asp299Gly 位点基因型 (AG + GG)/AA 与 AS 关联研究的漏斗图基本对称, 且经 Egger's 检验为 $P = 0.696$, 差异无统计学意义, 表明对称 (见图 3)。TLR4 基因 Asp299Gly 位点等位基因 G/A 与 AS 关联研究的漏斗图基本对称, 且经 Egger's

检验为,差异无统计学意义($P = 0.757$),表明亦对称偏倚。(见图4)。因此认为所纳入的研究文献不存在发表

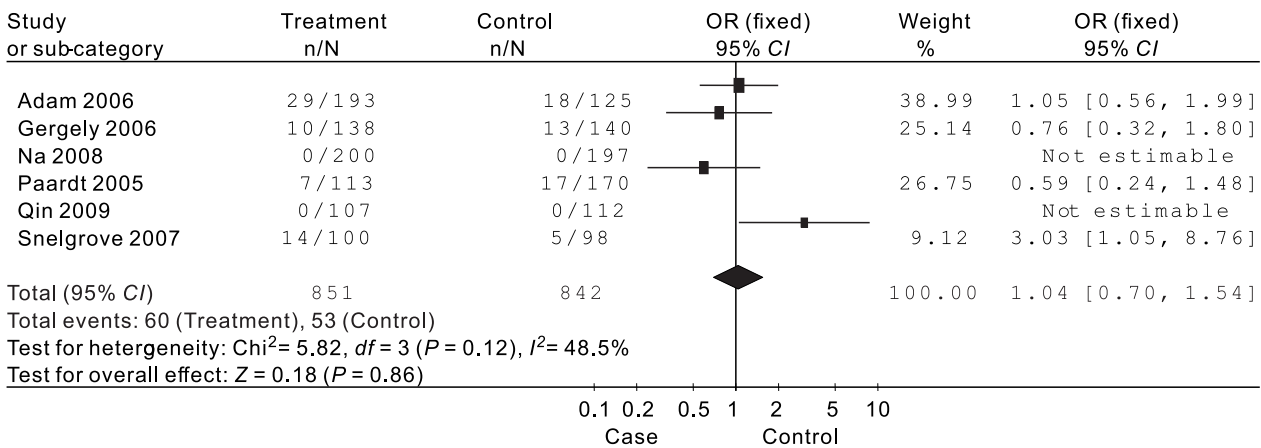


图1 TLR4 基因 Asp299Gly 位点基因型 (AG + GG)/AA 与 AS 关联研究的森林图

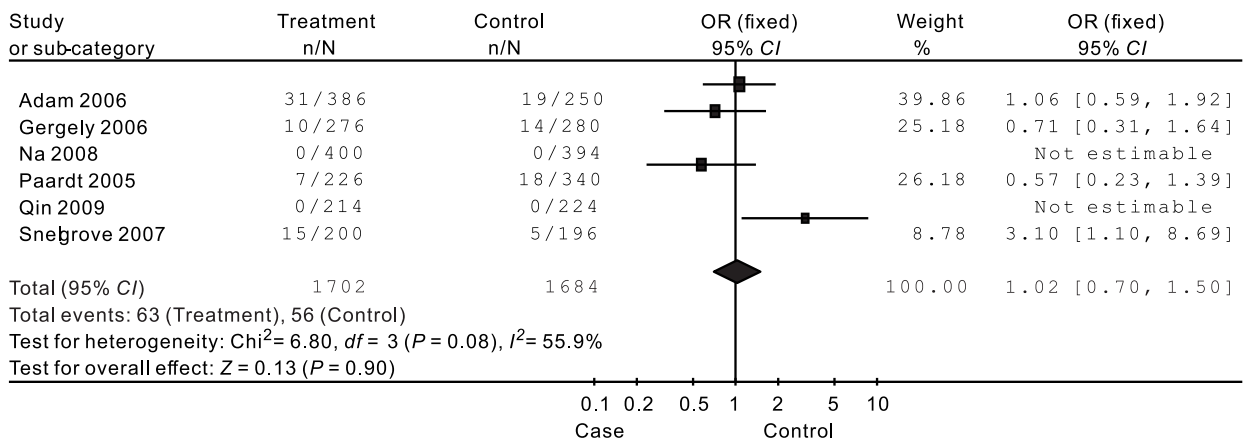


图2 TLR4 基因 Asp299Gly 位点等位基因 G/A 与 AS 关联研究的森林图

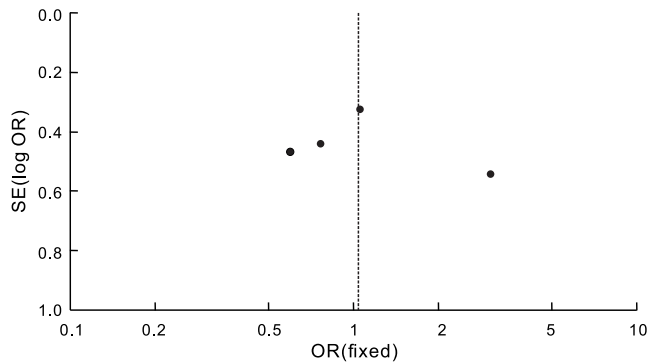


图3 TLR4 基因 Asp299Gly 位点基因型 (AG + GG)/AA 与 AS 关联研究的漏斗图

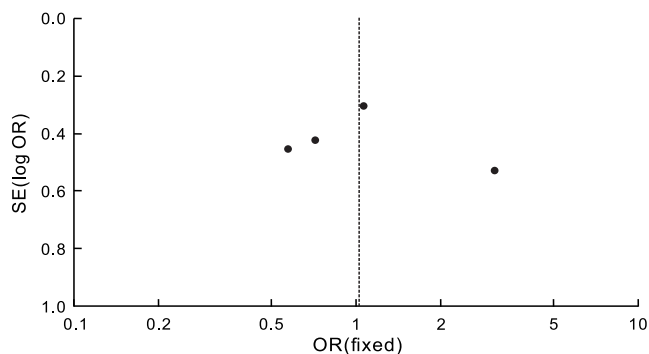


图4 TLR4 基因 Asp299Gly 位点等位基因 G/A 与 AS 关联研究的漏斗图

3 讨论

强直性脊柱炎发病比较缓慢,是一种炎症性关节系统的病变。该病发病原因及发病机制目前尚未完全阐明。近年来开展了一些相关研究,主要围绕该病的诊断、治疗、合并症和并发症及其临床护理等方面研究^[11-18]。病因学研究方面主要围绕病原学特征、免疫学机制及其遗传基因多态性等方面的研究。有研究显示强直性脊柱炎的发病可能与患者感染肺炎衣原体有关。有研究^[19]发现大多数强直性脊柱炎患者都存在感染肺炎衣原体的情况。林桂英等^[20]研究发现在强直性脊柱炎患者的滑膜中通过抗衣原体脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 单克隆抗体检测到衣原体抗原。龚韶华等^[21]研究认为强直性脊柱炎的发病与白细胞介素 33 有相关性。人类第一个被发现的 Toll 样受体就是 TLR4,在人类染色体 9q32-q33 上,由 24 个亮氨酸重复序列组成其胞外区,胞内区包含 200 个氨基酸。TLR4 可以通过特异性结合 LPS 释放 IL-1、TNF- α 等炎症因子进而介导免疫应答^[22]。TLR4 基因 Asp299Gly 多态性能导致苏氨酸被异亮氨酸替代,进而影响 TLR4 对 LPS 的应答,这种 TLR 信号失调会导致促炎与抗炎细胞因子比例失衡,可能将诱导强直性脊柱炎的发生。

近年来一些研究者开展了关于强直性脊柱炎易感性与 Asp299Gly 多态性的关系的研究,文献报道两者相关性不完全一致。目前,多项研究发现,TLR4 基因 Asp299Gly 位点的分布具有人群特异性,非洲人群的 Asp299Gly 突变率最高,平均约为 16%;排在第二位的是高加索白人;在亚洲人群中,中国汉族人群中的 Asp299Gly 突变发生率较低^[23-24]。本研究通过综合已发表文献研究结果,将样本含量扩大并对其进行定量分析,使检验效能得到提高期望获得两者之间较为准确的关联性。由于纳入的文献经检验均具有同质性,本研究采用的均为固定效应模型分析,对于基因型 (AG + GG)/AA 合并后的 OR 值为 1.04, 95% CI 为 (0.70 ~ 1.54), $P > 0.05$, 提示 TLR4 基因 Asp299Gly 位点中基因型 (AG + GG)/AA 与强直性脊柱炎无关联。在等位基因分析中,对于 G/A 合并后的 OR 值为 1.02, 95% CI 为 (0.70 ~ 1.50), $P > 0.05$, 提示 Asp299Gly 等位基因 G/A 可能与 AS 无关联。本研究结果显示强直性脊柱炎发病可能与 TLR4 基因 Asp299Gly 多态性无关。

本研究对纳入的文献的漏斗图进行 Egger's 检验提示不存在发表偏倚,结果较为可靠,但由于受到语种、地域等的限制,结果的解释可能还不够全面,由于已开展的此类病例对照研究较少,仅 6 篇文献,其中 2 篇研究亚洲人群,2 篇是欧洲人群,另外 2 篇是美洲地区人群,缺少其他各大洲的人群,本研究未对人种进行分层分析,若研究资料充分,进一步按种族分层进行 Meta 分析可能得出更有价值的结果。强直性脊柱炎是一种受多基因、多因素共同作用的复杂疾病,虽然本研究显示尚不能认为 Asp299Gly 多态性与强直性脊柱炎存在关联性,但并不能完全排除该位点变异在强直性脊柱炎的炎性机制中可能发挥一定的作用,尚有待于大样本研究进一步验证。

参考文献

- Mercan R, Bitik B, Tufan A, et al. The association between neutrophil/lymphocyte ratio and disease activity in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis [J]. *J Clin Lab Anal*, 2016, 30(5):597-601.
- Qavi A, Garg RK, Malhotra HS, et al. Disseminated cysticercosis: clinical spectrum, Toll-like receptor-4 gene polymorphisms and role of albendazole: A prospective follow-up of 60 cases with a review of 56 published cases [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(39):e4882.
- Vaure C, Liu Y. A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species [J]. *Front Immunol*, 2014, 5:316-331.
- van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis; a proposal for modification of the New York criteria [J]. *Arthritis Rheum*, 1984, 27(4):361-368.
- Adam R, Sturrock RD, Gracie JA. TLR4 mutations (Asp299Gly and Thr399Ile) are not associated with ankylosing spondylitis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65(8):1099-1101.
- Gergely P Jr, Blazsek A, Weisz Z, et al. Lack of genetic association of the Toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with spondylarthropathies in a Hungarian population [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2006, 45(10):1194-1196.
- Na KS, Kim TH, Rahman P, et al. Analysis of single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 4 shows no association with ankylosing spondylitis in a Korean population [J]. *Rheumatol Int*, 2008, 28(7):627-630.
- van der Paardt M, Crusius JB, de Koning MH, et al. No evidence for involvement of the Toll-like receptor 4 (TLR4) A896G and CD14-C260T polymorphisms in susceptibility to ankylosing spondylitis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(2):235-238.
- 秦姣, 邵静茹, 周若宇, 等. TLR4 基因 Asp299Gly、Thr399Ile 错义突变与强直性脊柱炎的相关性研究 [J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2009, 31(S2):499-503, 540.
- Snelgrove T, Lim S, Greenwood C, et al. Association of toll-like receptor 4 variants and ankylosing spondylitis: a case-control study [J]. *J Rheumatol*, 2007, 34(2):368-370.
- 马超, 魏金栋, 张洪相. 强直性脊柱炎早期诊治进展 [J]. *中国基层医药*, 2015, 22(18):2859-2863.
- 孙冬梅. MRI 诊断强直性脊柱炎骶髂关节病变价值 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2016, 30(6):609-610.
- 肖利华. 长蛇灸配合康复体操治疗强直性脊柱炎的疗效观察 [J]. *河北医学*, 2015, 21(12):2072-2074.
- 罗成城. 来氟米特与雷公藤多苷治疗强直性脊柱炎的临床对照试验研究 [J]. *中国基层医药*, 2013, 20(11):1716-1718.
- 韩贵俊, 李连泰, 李海然, 等. 中西医结合治疗强直性脊柱炎临床护理体会 [J]. *河北医学*, 2015, 21(1):166-169.
- 宋国祥, 黄进贤, 邓亚玲, 等. 强直性脊柱炎伴发葡萄膜炎 82 例临床分析 [J]. *海南医学*, 2014, 25(20):3059-3061.
- 刘婧, 贾园, 李茹, 等. 类风湿关节炎合并强直性脊柱炎 3 例 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2014, 46(1):149-154.
- 高兰, 樊勇, 张卓莉. 强直性脊柱炎合并恶性肿瘤 31 例 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2015, 47(6):962-965.
- 曾华, 林桂英, 冯修高, 等. 部队官兵肺炎衣原体感染与强直性脊柱炎关系的调查研究 [J]. *东南国防医药*, 2013, 15(2):110-112.
- 林桂英, 曾华, 冯修高, 等. 阿奇霉素治疗活动期强直性脊柱炎的疗效 [J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(8):1323-1326.
- 龚韶华, 石晓兵, 包朝鲁. 强直性脊柱炎患者血浆白细胞介素 33 及白细胞介素 33 mRNA 的表达及意义 [J]. *中国基层医药*, 2017, 24(1):45-48.
- Wu TT, Tai YT, Cherng YG, et al. GATA-2 transduces LPS-induced il-1 β gene expression in macrophages via a toll-like receptor 4/MD88/MAPK-dependent mechanism [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e72404.
- Senhaji N, Diakité B, Serbati N, et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms; New data and a meta-analysis [J]. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14:206.
- Manolakis CA, Kapsoritakis NA, Kapsoritaki A, et al. Readressing the role of toll-like receptor-4 alleles in inflammatory bowel disease: colitis, smoking, and seroreactivity [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(2):371-380.