

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.14.012

NLRP3、GSTs、TLR4 基因多态性与 COPD 易感性的关联分析*

石 赞,陈艳蓉,张 净,罗 佳[△]
(首都医科大学附属北京友谊医院老年医学科,北京 100050)

[摘要] **目的** 探讨核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)、谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs)、Toll 样受体 4(TLR4)基因多态性与慢性阻塞性肺疾病(COPD)发病的关系。**方法** 选取该院 2017 年 1 月至 2021 年 1 月收治的 131 例 COPD 患者为观察组,另选取同期健康体检者 120 例为对照组。采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)检测 NLRP3、GSTs、TLR4 基因多态性,Hardy-Weinberg 平衡检验基因型分布遗传平衡,logistic 回归方程分析影响 COPD 发生的危险因素。**结果** 两组性别、年龄、饮酒比例、收缩压、舒张压、空腹血糖、总胆固醇、甘油三酯、尿酸等比较差异均无统计学意义($P>0.05$),观察组吸烟比例明显高于对照组($P<0.05$)。单位点分析结果显示,NLRP3 rs3806265 位点、TLR4 rs2737190、rs10759932 位点与 COPD 发病有关联($P<0.05$);吸烟、NLRP3 rs3806265 位点、TLR4 rs2737190、rs10759932 位点是 COPD 发病的独立影响因素($P<0.05$)。**结论** NLRP3 rs3806265 位点、TLR4 rs2737190、rs10759932 位点基因多态性影响 COPD 易感性。

[关键词] 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3;谷胱甘肽 S-转移酶;Toll 样受体 4;基因多态性;慢性阻塞性肺疾病

[中图法分类号] R563.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)14-2392-05

Analysisi on relationship between NLRP3,GSTs and TLR4 gene polymorphisms with susceptibility of chronic obstructive pulmonary disease *

SHI Yun,CHEN Yanrong,ZHANG Jing,LUO jia[△]
(Department of Geriatrics,Affiliated Beijing Friendship Hospital,Capital Medical University,Beijing 100050,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between nucleotide binding oligomerization domain like receptor protein 3 (NLRP3),glutathione S-transferases (GSTs) and toll-like receptors 4 (TLR4) gene polymorphisms with the onset of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** A total of 131 patients with COPD treated in this hospital from January 2017 to January 2021 were selected as the observation group,and 120 subjects undergoing healthy physical examination during the same period were selected as the control group. The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect NLRP3,GSTs and TLR4 gene polymorphisms. The Hardy-Weinberg equilibrium was used to test the genetic balance of genotype distribution. The logistic regression equation was used to analyze the risk factors affecting the onset of COPD. **Results** No statistically significant differences were found in the gender,age,alcohol drinking,systolic blood pressure,diastolic blood pressure,fasting blood glucose,total cholesterol,triglyceride and uric acid between the two groups ($P>0.05$),while the proportion of the persons with smoking in the observation group was significantly more than that in the control group ($P<0.05$). The unit point analysis results showed that NLRP3 rs3806265,TLR4 rs2737190 and rs10759932 loci had the relation with the COPD onset ($P<0.05$);smoking,NLRP3 rs3806265 locus,TLR4 rs2737190 locus and TLR4 rs10759932 locus were the independent influencing factors of the COPD onset ($P<0.05$). **Conclusion** The gene polymorphisms at NLRP3 (rs3806265) locus,TLR4 rs2737190 locus and TLR4 rs10759932 locus affect COPD susceptibility.

[Key words] nucleotide binding oligomerization domain like receptor protein 3;glutathione S-transferases;toll-like receptors 4;gene polymorphism;chronic obstructive pulmonary disease

* 基金项目:首都医科大学启动项目(医院启动 2017-37)。 作者简介:石赞(1980—),主治医师,硕士,主要从事老年医学研究。
[△] 通信作者,E-mail:ann11121112@sina.com。

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)以持续性气流受限为特征,发病率逐年升高。影响 COPD 发生的因素较多,目前认为与遗传、环境、吸烟、免疫、慢性炎症等关系密切。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(nucleotide binding oligomerization domain like receptor protein 3,NLRP3)是 NLRPs 蛋白家族主要成员之一,已被证实 COPD 的发生、发展中具有重要作用^[1]。NLRP3 基因多态性与多种炎症性疾病有关,但与 COPD 间关系的研究目前较为缺乏。有研究显示^[2],谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferases,GSTs)基因变异是影响 COPD 发生的独立危险因素。但 GSTs 基因多态性与 COPD 的关系仍具有一定争议。文献指出^[3],Toll 样受体(toll-like receptors 4,TLR4)是天然免疫的重要分子,可识别内外源性病原体,介导炎症反应。本研究分析 NLRP3、GSTs、TLR4 基因多态性与 COPD 易感性的关联,为临床工作提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 1 月至 2021 年 1 月本院收治的 131 例 COPD 患者为观察组,另选取同期健康体检者 120 例为对照。纳入标准:(1)COPD 患者符合《慢性阻塞性肺疾病基层诊疗指南(2018 年)》^[4]诊断标准;(2)年龄≥18 岁。排除标准:(1)临床数据不完整,对研究结果造成影响;(2)合并严重肝、肾功能异常;(3)合并免疫、血液系统疾病、全身感染或恶性肿瘤。本研究经本院医学伦理委员会批准(2018-P2-137-01),患者均签署知情同意书。

1.2 方法

限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-

RFLP)检测 NLRP3、GSTs、TLR4 的基因多态性。采集所有研究对象清晨外周静脉血 10 mL,采用酚-氯仿法提取外周血淋巴细胞中基因组 DNA。经 Nano-Drop-2000c(美国 Thermo Scientific 公司)检测 DNA 浓度。采用 0.2 mL 96 孔光学反应板(ABI 7300,美国 Biosystemes 公司)对 NLRP3(rs3582941、rs10754558、rs3806265、rs4612666)、GSTs [GSTP1(rs1695)、GSTM1、GSTT1]、TLR4(rs2737190、rs7873784、rs10759932)进行基因分型。每微孔中总体积 20 μL,通过 10 μL MasterMix(ABI 700,美国 Biosystemes 公司)、0.5 μL AssayMix(美国 ABI 公司)、4.5 μL 去离子水及 5 μL DNA 样品组成。制备成含有 1 000 μL MasterMix、50 μL AssayMix 及 450 μL 去离子水混合物,取 15 μL 混合物与 5 μL DNA 样品加入每个微孔。PCR 反应条件:95 ℃、10 min,95 ℃、15 s,60 ℃、1 min,共 40 个循环。反应完后使用等位基因辨别程序得到检测结果。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;计数资料以例数或率表示,采用 χ^2 检验及 Fisher 确切概率法;基因型分布采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,影响 COPD 发生的危险因素采用 logistic 回归分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组基本资料比较

两组性别、年龄、饮酒比例、收缩压、舒张压、空腹血糖、总胆固醇、甘油三酯、尿酸等比较无明显差异(*P* > 0.05),观察组吸烟比例明显高于对照组(*P* < 0.05),见表 1。

表 1 两组基本资料比较

组别	<i>n</i>	男/女(<i>n</i> / <i>n</i>)	年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	吸烟[<i>n</i> (%)]	饮酒[<i>n</i> (%)]	收缩压($\bar{x} \pm s$,mm Hg)
对照组	120	68/52	63.12±6.78	31(25.83)	18(15.00)	108.26±10.21
观察组	131	76/55	63.40±6.91	73(55.73)	27(20.61)	107.80±10.40
<i>t</i> / χ^2		0.046	0.324	22.969	1.335	0.351
<i>P</i>		0.830	0.747	<0.001	0.248	0.724

组别	<i>n</i>	舒张压($\bar{x} \pm s$,mmHg)	空腹血糖($\bar{x} \pm s$,mmol/L)	总胆固醇($\bar{x} \pm s$,mmol/L)	甘油三酯($\bar{x} \pm s$,mmol/L)	尿酸($\bar{x} \pm s$,μmol/L)
对照组	120	80.20±8.57	5.85±1.03	4.20±0.65	1.36±0.38	386.75±30.69
观察组	131	81.05±8.78	6.01±1.10	4.11±0.68	1.40±0.40	390.65±31.02
<i>t</i> / χ^2		0.775	1.187	1.072	0.811	1.000
<i>P</i>		0.439	0.267	0.284	0.418	0.318

2.2 基因型及等位基因分布

经 Hardy-Weinberg 平衡检验,纳入研究基因型

分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡(*P* > 0.05)。单位点分析结果显示,NLRP3(rs3806265)、TLR4

(rs2737190、rs10759932) 基因多态性与 COPD 发病有关($P<0.05$), 见表 2。

2.3 影响 COPD 发病的危险因素分析

吸烟、NLRP3 rs3806265 位点、TLR4 rs2737190 位点、TLR4 rs10759932 位点是 COPD 发病的独立影响因素($P<0.05$), 见表 3。

表 2 基因型和等位基因分布				
基因	对照组(<i>n</i> = 120)	观察组(<i>n</i> = 131)	OR (95%CI)	<i>P</i>
NLRP3				
rs3582941				
A	11(4.58)	8(3.05)	1	0.925
C	229(95.42)	254(96.95)	0.501(0.059~0.552)	
AA	2(1.67)	3(2.29)	1	
AC	7(5.83)	2(1.53)	0.558(0.210~0.795)	
CC	111(92.50)	126(96.18)	0.650(0.341~0.719)	
rs10754558				
C	85(35.42)	128(48.85)	1	0.932
G	155(64.58)	134(51.15)	0.857(0.431~0.959)	
CC	30(25.00)	31(23.66)	1	
CG	25(20.83)	66(50.38)	0.471(0.287~0.711)	
GG	65(54.17)	34(25.95)	0.243(0.058~0.427)	
rs3806265				
C	76(31.67)	16(6.11)	1	<0.001
T	164(68.33)	246(93.89)	1.556(1.021~1.957)	
CC	2(1.67)	1(0.76)	1	
CT	72(60.00)	14(10.69)	1.321(1.002~1.721)	
TT	46(38.33)	116(88.55)	2.289(1.223~2.541)	
rs4612666				
C	134(55.83)	165(62.98)	1	0.601
T	106(44.17)	97(37.02)	0.301(0.102~0.825)	
CC	31(25.83)	46(35.11)	1	
CT	72(60.00)	73(55.73)	0.247(0.033~0.456)	
TT	17(14.17)	12(9.16)	0.242(0.021~0.429)	
GSTs				
GSTM1				
+	66(55.00)	58(44.27)	1	0.915
—	54(45.00)	73(55.73)	0.840(0.406~0.959)	
GSTT1				
+	94(78.33)	94(71.76)	1	0.969
—	26(21.67)	37(28.24)	0.588(0.218~0.676)	
GSTP1(rs1695)				
A	189(78.75)	205(78.24)	1	0.390
G	51(21.25)	57(21.76)	0.844(0.512~0.954)	
AA	78(65.00)	87(66.41)	1	
AG	33(27.50)	31(23.66)	0.836(0.672~0.887)	
GG	9(7.50)	13(9.92)	0.501(0.312~0.774)	
TLR4				
rs2737190				
A	137(57.08)	199(75.95)	1	<0.001
G	103(42.92)	63(24.05)	1.730(1.205~2.351)	

续表 2 基因型和等位基因分布

基因	对照组(<i>n</i> =120)	观察组(<i>n</i> =131)	OR(95%CI)	<i>P</i>
AA	40(33.33)	79(60.30)	1.601(1.103~2.101)	<0.001
AG	57(47.50)	41(31.30)	1.398(1.027~1.858)	<0.001
GG	23(19.17)	11(8.40)	1	
rs7873784				
C	28(11.67)	31(11.83)	1	
G	212(88.33)	231(88.17)	0.497(0.231~0.689)	0.748
CC	5(4.17)	7(5.34)	1	
CG	18(15.00)	17(12.98)	0.741(0.468~0.831)	0.171
GG	97(80.83)	107(81.68)	0.701(0.562~0.882)	0.285
rs10759932				
C	70(29.17)	29(11.07)	2.258(1.262~3.029)	<0.001
T	170(70.83)	233(88.93)	1	
CC	30(25.00)	3(2.29)	1.823(1.356~2.921)	<0.001
CT	10(8.33)	23(17.56)	1.542(1.154~1.992)	<0.001
TT	80(66.67)	105(80.15)	1	

表 3 影响 COPD 发病的危险因素分析

影响因素	β	SE	Wald χ^2	<i>P</i>	OR(95%CI)
吸烟	0.883	0.277	10.181	0.001	2.418(1.595~4.719)
NLRP3(rs3806265)	1.305	0.411	10.063	0.002	3.687(1.761~8.831)
TLR4(rs2737190)	1.186	0.396	8.963	0.003	3.275(1.685~7.965)
TLR4(rs10759932)	1.391	0.437	10.123	0.001	4.019(2.119~11.761)

3 讨 论

COPD 是全球范围内发病率、死亡率均较高的呼吸系统疾病,发病机制目前尚不明确,普遍认为与吸烟等行为造成有害颗粒及有害气体诱导肺部异常炎症反应有关。本研究显示吸烟是影响 COPD 发病的独立危险因素。但临床数据显示^[5],仅约 20%长期吸烟者最终会发展为 COPD。提示 COPD 的发病风险不仅与吸烟相关,还存在一定个体差异。相关流行病学调查显示^[6],COPD 的发生具有一定家族聚集性。全基因组关联研究表明^[7],COPD 遗传学中发现许多疾病发病机制的相关候选基因,如维生素 D 结合蛋白基因、基质金属蛋白酶基因、细胞外超氧化物歧化酶基因等,提示遗传因素在 COPD 的发生中可能占据重要地位。

已有研究表明^[8],氧化与抗氧化失衡在 COPD 的发生、发展中具有重要意义。GSTs 是机体Ⅱ相代谢酶,具备广泛生物催化特性,通过排除亲电子的外源物质发挥抗氧化作用,另外还可以灭活氧化应激反应形成的次生代谢物,如氢过氧化物、环氧化合物等。GSTs 由至少 8 个基因位点编码,其中 GSTP1、GSTT1、GSTM1 基因在一般人群中具有基因多态性,GSTM1 与 GSTT1 基因多态性表现为缺失,导致酶活性丧失,GSTP1 基因多态性表现为位于 105 密码

子的异亮氨酸转变为缬氨酸,对酶催化活性有一定影响^[9]。本研究结果显示,GSTP1、GSTT1、GSTM1 的基因多态性均与 COPD 发病无明显关系。

NLRP3 基因位于染色体 1q44,基因编码中含有 pyrin 结构域、核苷酸结合位点结构域及富含亮氨酸重复序列的 pyrin 样蛋白,该蛋白是 NLRP3 炎症体复合物成员^[10]。NLRP3 炎症小体已被证实是核因子-κB(NF-κB)信号通路上游激活剂,在炎症、细胞凋亡及免疫应答等反应中发挥调节作用^[11]。另外有研究指出^[12],NLRP3 炎症体的激活会激活半胱天冬蛋白酶-1,后裂解多种白细胞介素因子并将其释放,与集体慢性炎症及癌症的发生、发展关系密切。陈幸等^[13]研究发现 NLRP3 rs4612666 位点基因多态性与慢性牙周炎易感性关系密切。刘璐等^[14]指出,NLRP3 rs10754558、rs3806268 位点基因多态性与新疆地区汉族男性痛风的发生有一定关联。本研究结果显示,NLRP3 rs3582941、rs10754558、rs4612666 位点基因多态性与 COPD 的发生均无明显关联。对照组与观察组 NLRP3 rs3806265 位点 T 基因差异有统计学意义(*P*<0.05),经多因素分析显示,NLRP3 rs3806265 位点基因多态性是 COPD 发生的独立影响因素,与张之海等^[15]研究结论一致。

TLRs 家族在树突细胞、单核细胞及巨噬细胞中

广泛表达,在机体炎性免疫应答反应中起关键作用。相关大鼠实验研究显示^[16],COPD 大鼠模型中 TLR4 被激活,通过级联反应激活 NF- κ B 信号通路中 p65,并使其转移至细胞核内与促炎基因的启动子结合,扩增炎症反应,造成肺部组织炎性损伤。另有研究表明^[17],COPD 患者外周血 TLR4 水平明显升高,异常高水平 TLR4 将激活单核细胞导致气道平滑肌细胞分泌大量炎症因子,推动气道慢性炎症发展。本研究结果显示,两组 TLR4 rs2737190 位点 G、AG、AA 及 rs10759932 位点 C、CC、CT 差异有统计学意义($P < 0.05$),经多因素分析显示 TLR4 rs2737190、rs10759932 位点基因多态性是 COPD 发生的独立影响因素。

综上所述,NLRP3 rs3806265 位点、TLR4 rs2737190、rs10759932 位点基因多态性影响 COPD 易感性,是 COPD 发病的独立影响因素。

参考文献

- [1] 曹秀丽,焦建华,张智慧,等.慢阻肺并发肺动脉高压患者血清 CRP、IL-6 和 TLR4 的差异表达及相关性分析[J].标记免疫分析与临床,2019,26(4):645-649.
- [2] 安海燕,杨潘印,朱茜文,等.谷胱甘肽 S-转移酶 P1 Ile(105)Val 基因多态性与河南回族慢性阻塞性肺疾病易感性的关系[J].现代医药卫生,2019,35(8):1167-1169,1173.
- [3] KABEERDOSS J,GOEL R,MOHAN H,et al. High expression of pro-inflammatory cytokine genes IL-1 β and IL-1R2 upon TLR4 activation in Takayasu arteritis[J]. Rheumatol Int,2022,42(3):535-543.
- [4] 中华医学会,中华医学会杂志社,中华医学会全科医学分会,等.慢性阻塞性肺疾病基层诊疗指南(2018 年)[J].中华全科医师杂志,2018,17(11):856-870.
- [5] 段佳熙,向志,李欣,等.吸烟与非吸烟慢性阻塞性肺疾病患者的临床特征差异[J].中国医师杂志,2020,22(10):1452-1456.
- [6] BRAY M J,CHEN L,FOX L,et al. Dissecting the genetic overlap of smoking behaviors, lung cancer, and chronic obstructive pulmonary disease: a focus on nicotinic receptors and nicotine metabolizing enzyme [J]. Genetic Epidemiol, 2020,44(7):748-758.
- [7] 王小乐,朱洁,童佳兵,等.慢性阻塞性肺疾病肺泡巨噬细胞差异表达基因的生物信息学分析[J].细胞与分子免疫学杂志,2020,36(11):5-10.
- [8] JAKOVLJEVIC T S,JACIMOVIC J,NIKOLIC N,et al. Lack of association between glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms and susceptibility to preeclampsia: an updated systematic review and meta-analysis [J]. Am J Reprod Immunol, 2020, 84 (6): e13303.
- [9] 托娅,杨菁,陈秀娟,等. CYP19A1、GSTM1、GSTT1 和 GSTP1 基因多态性与子宫内异症患者发病的相关研究[J]. 中华医学杂志,2019,99(7):515-519.
- [10] 宋瑶,肖臻. NLRP3 炎症体调控肺部炎症疾病的机制及其中药干预的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2020,38(9):136-139.
- [11] ALMEIDA E D,FRANTZ S R,CESAR P,et al. Frequency of interleukins IL1/IL18 and inflammasome NLRP1/NLRP3 polymorphisms in sickle cell anemia patients and their association with severity score [J]. Curr Mol Med, 2019,19(10):776-783.
- [12] QUEIROZ G,SILVA R,PIRES A,et al. New variants in NLRP3 inflammasome genes increase risk for asthma and Blomia tropicalis-induced allergy in a Brazilian population[J]. Cytokine X,2020,2(3):100032.
- [13] 陈幸,丁成,傅淑蕾,等. NLRP3 炎症小体基因多态性与慢性牙周炎易感性的相关性研究[J]. 浙江临床医学,2020,22(6):778-780.
- [14] 刘璐,苗瑞,姚华,等. NLRP3 基因 rs10754558、rs3806268 位点单核苷酸多态性与新疆地区汉族男性原发性痛风的相关性研究[J]. 检验医学与临床,2019,16(6):11-14,17.
- [15] 张之海,戴垚垚,陈杰,等. IL-17,TLR4,P2X7 基因多态与慢性阻塞性肺疾病的关联研究[J]. 中华疾病控制杂志,2018,22(2):142-146,152.
- [16] 韩旭惠,王昌明,蒋明,等. TLR4 表达水平与 COPD 大鼠肺动脉平滑肌细胞合成分泌功能的关系[J]. 安徽医科大学学报,2017,52(9):1310-1314.
- [17] AHIN F,KOAR A F,ASLAN A F,et al. Serum biomarkers in patients with stable and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a comparative study [J]. J Med Biochem,2019,38(4):503-511.