

# TRAIL 受体家族基因多态性及 sTRAIL 水平与 溃疡性结肠炎的关系

王建璋 林李森 徐昌隆 吴小丽 金捷 丁然 薛战雄

**摘要** **目的** 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 的受体家族包括死亡受体 (DR4、DR5), 诱骗受体 (DcR1、DcR2) 及护骨素 (OPG)。研究显示 TRAIL 3'非翻译区基因多态性与溃疡性结肠炎 (UC) 的易感性相关, 由于 TRAIL 各受体间的平衡及相互作用是调节靶细胞对 TRAIL 诱导凋亡敏感度的关键因素, 因此本研究将进一步探讨 TRAIL 受体家族基因多态性与 UC 的关系。**方法** 收集 146 例 UC 患者和 247 例正常对照者, 采用微测序技术检测 DR4 (rs20575、rs13278062)、DR5 (rs1047266)、DcR1 (rs12549481)、DcR2 (rs1133782) 及 OPG (rs3102735) 6 种单核苷酸多态性。**结果** 在显性模型中, 与对照组相比, UC 组中 DR4 (rs20575) 的突变等位基因 (G) 和基因型 (CG + GG) 频率均增高 (4.79% vs 1.62%,  $P=0.009$ ; 8.22% vs 3.24%,  $P=0.030$ ), 而 DcR2 (rs1133782) 的突变基因型 (GA + AA) 频率降低 (10.27% vs 18.22%,  $P=0.034$ )。采用隐性模型分析, UC 组中 OPG (rs3102735) 的突变等位基因 (T) 和基因型 (TT) 频率均显著高于对照组 (86.99% vs 80.9%,  $P=0.029$ ; 76.03% vs 66.40%,  $P=0.044$ )。经非条件 Logistic 回归分析, 与轻中度患者相比, 重度 UC 患者中 DR4 (rs20575) 的突变等位基因 (G) 和基因型 (CG + GG) 频率均显著增高 (15.00% vs 3.17%,  $P=0.001$ ; 25.00% vs 5.56%,  $P=0.003$ ), 而 DR4 (rs13278062) 的突变基因型 (T) 和基因型 (GT + TT) 及 OPG (rs3102735) 突变等位基因 (T) 频率均显著降低 (17.50% vs 33.73%,  $P=0.040$ ; 30.00% vs 59.22%,  $P=0.014$ ; 75.00% vs 88.89%,  $P=0.015$ )。此外, 本研究还发现, UC 组中 sTRAIL 水平显著高于对照组。**结论** DR4 (rs20575)、DcR2 (rs1133782) 及 OPG (rs3102735) 基因多态性与 UC 相关, DR4 (rs20575、rs13278062) 及 OPG (rs3102735) 基因突变可能影响 UC 疾病严重程度。此外, 本研究还发现血浆 sTRAIL 水平与 UC 相关, 提示 TRAIL 及其受体所构成的凋亡途径可能与 UC 相关。

**关键词** 溃疡性结肠炎 TNF 相关凋亡诱导配体 受体 基因多态性

**中图分类号** R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.01.026

**Associations of Genetic Polymorphisms of TRAIL Receptors Family and the Plasma Levels of sTRAIL with Ulcerative Colitis.** Wang Jianzhang, Lin Limiao, Xu Changlong, et al. Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

**Abstract Objective** The receptor family of tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand (TRAIL) comprises death receptors (DR4, DR5), decoy receptors (DcR1, DcR2) and osteoprotegerin (OPG). It had been reported that the polymorphisms of 3' untranslated region in TRAIL gene were correlated with ulcerative colitis (UC). The balance and interaction between each member of the TRAIL receptor family were demonstrated to have a crucial impact on the sensitivity of target cells to apoptosis. Thus the present study aimed to further analyze the association of UC with the genetic polymorphisms of TRAIL receptors. **Methods** A total of 146 UC patients and 247 controls were recruited in this study. The six single nucleotide polymorphisms of DR4 (rs20575, rs13278062), DR5 (rs1047266), DcR1 (rs12549481), DcR2 (rs1133782) and OPG (rs3102735) were detected by SNaPshot. **Results** Under an autosomal dominant model, the frequencies of mutant allele (G) and genotype (CG + GG) of DR4 (rs20575) were higher in UC patients than in the controls (4.79% vs 1.62%,  $P=0.009$ ; 8.22% vs 3.24%,  $P=0.030$ , respectively). However, the mutant genotype (GA + AA) of DcR2 (rs1133782) was decreased in UC patients compared to the controls (10.27% vs 18.22%,  $P=0.034$ ). Under a recessive model, the frequencies of mutant allele (T) and homozygote (TT) of OPG (rs3102735) were significantly higher in UC patients than in the controls (86.99% vs 80.90%,  $P=0.029$ ; 76.03% vs 66.40%,  $P=0.044$ , respectively). By unconditional Logistic regression analysis, compared to patients with mild and moderate UC, the frequencies of mutant allele (G) and genotype (CG + GG) in DR4 (rs20575) were significantly higher in patients with severe UC (15.00% vs 3.17%,  $P=0.001$ ; 25.00% vs 5.56%,  $P=0.003$ ,

基金项目:温州市科技局基金资助项目(Y20130052)

作者单位:325000 温州医科大学附属第二医院消化内科(王建璋、林李森、徐昌隆、薛战雄);温州医科大学附属第一医院消化内科(吴小丽);温州市中心医院消化内科(金捷);温州市人民医院消化内科(丁然)

通讯作者:薛战雄,电子邮箱:xuezhaxiong@126.com

respectively). Nevertheless, the mutant allele (T) and genotype (GT + TT) of DR4 (rs13278062) were significantly decreased in patients with severe UC (17.50% vs 33.73%,  $P = 0.040$ ; 30.00% vs 59.22%,  $P = 0.014$ , respectively). The same result was obtained for the mutant allele (T) of OPG (rs3102735) (75.00% vs 88.89%,  $P = 0.015$ ). **Conclusion** The genetic polymorphisms of DR4 (rs20575), DcR2 (rs1133782) and OPG (rs3102735) were associated with UC. The mutations of DR4(rs20575) and (rs13278062) as well as OPG(rs3102735) might influence the severity of UC in the patients. In addition, the plasma levels of sTRAIL were significantly higher in the UC patients than those in the controls. Our findings strongly implicated that the apoptotic pathway formed by TRAIL and its receptors might play a pivotal role in UC.

**Key words** Ulcerative colitis; TNF - related apoptosis - inducing ligand; Receptor; Genetic polymorphism

炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)是遗传、免疫、环境等复杂因素共同作用下,在遗传易感者体内发生针对自身肠道的异常免疫应答,导致肠组织中出現失控的炎性反应。研究表明,肠组织中大量活性异常增高的T淋巴细胞、中性粒细胞及血浆细胞浸润不仅是IBD显著的临床病理特征之一,也是IBD中慢性炎性反应持续存在的重要原因<sup>[1]</sup>。至今关于克罗恩病(Crohn's disease, CD)的研究证实其肠黏膜上皮细胞及T细胞中普遍存在凋亡抵抗现象,但来自溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的报道并非完全一致,因此凋亡异常与UC的相关性有待于进一步阐明<sup>[2]</sup>。

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand, TRAIL),不仅是重要的促细胞凋亡因子,也是免疫应答过程中关键的效应分子<sup>[3]</sup>。TRAIL只有与其受体家族相结合才能发挥生物学效应。研究发现TRAIL受体家族系统非常复杂,包括死亡受体(death receptor, DR)4、DR5,诱骗受体(decoy receptor, DcR)1、DcR2以及护骨素(osteoprotegerin, OPG)<sup>[4]</sup>。无论是膜结合型TRAIL(mTRAIL)还是血中可溶性TRAIL(sTRAIL),与含有死亡结构域的DR4和(或)DR5结合后均能迅速诱导靶细胞凋亡。由于DcR1和OPG不具有功能性死亡结构域,DcR2仅含有1个截断的死亡结构域,这3种受体与TRAIL结合后非但不产生促细胞凋亡信号,还与死亡受体DR4、DR5竞争性结合TRAIL,从而抑制靶细胞凋亡。

有研究显示TRAIL基因3'非翻译区rs1131568、rs1131579和rs1131580单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与UC的易感性相关<sup>[5]</sup>。由于TRAIL只有与其受体家族结合才能发挥凋亡诱导作用,因此本研究拟检测TRAIL受体家族DR4(rs20575, rs13278062)、DR5(rs1047266)、DcR1(rs12549481)、DcR2(rs1133782)及OPG(rs3102735)6个SNP位点的基因多态性在UC患者和对照组之

间的分布差异,从而为阐明IBD的遗传免疫学机制提供新的思路。

## 对象与方法

1. 对象:收集自2006年1月~2014年12月在温州医科大学附属第二医院、温州医科大学附属第一医院、温州市中心医院消化内科门诊或住院确诊的UC患者146例,其中男性83例,女性63例,患者平均年龄 $41.39 \pm 14.56$ 岁。UC诊断标准采用中华医学会消化病学分会2012年广州会议制定的“炎症性肠病诊断与治疗的共识意见”<sup>[6]</sup>。所有UC患者均经临床、实验室、影像学、结肠镜、病理等检查综合确立诊断并评估疾病严重程度及病变部位,并排除系统性红斑狼疮、自身免疫性甲状腺炎等自身免疫性疾病以及肿瘤。UC患者按病情严重程度分为轻度(57例)、中度(69例)、重度(20例),病变部位根据结肠镜表现分为远端结肠炎(E1 + E2, 86例)和广泛结肠炎(E3, 60例)。按性别、年龄匹配原则同期收集温州医科大学附属第二医院体检中心的247例健康体检者作为对照组,其中男性132例,女性115例,健康检查平均年龄 $40.87 \pm 14.34$ 岁。UC组和对照组间性别、年龄差异均无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ )。UC组及对照组的一般资料见表1,所有研究对象均来自无血缘关系的浙江汉族人群。本研究获得上述各医院伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

2. 方法:(1)外周血基因组DNA提取及PCR反应:所有研究对象均提取2ml空腹外周静脉血,乙二胺四乙酸二钠(EDTA - Na<sub>2</sub>)抗凝。按照(北京)天根生化科技有限公司提供的血液基因组DNA提取试剂盒说明操作。提取的全基因组DNA置于-20℃冰箱保存。根据Primer 6.0软件设计引物(表2),引物由(北京)天根生化科技有限公司合成。PCR总反应体系10μl,包括全基因组DNA1μl(约10ng),10×PCR缓冲液1.5μl(Roche公司),dNTP1.5μl(2mmol/L, Roche公司),0.6U Fast Taq酶0.6U(Promega公司),各引物对的终浓度为0.1μmol/L,用灭菌去

表 1 溃疡性结肠炎 (UC) 患者及健康对照组一般资料

临床特征	UC 组 (n = 146)	健康对照组 (n = 247)	P
性别 (男性/女性)	83/63	132/115	0.512
年龄 (岁)	41.39 ± 14.56	40.87 ± 14.34	0.369
吸烟史 [n (%)]			
有	20 (13.70)	37 (15.00)	0.727
无	126 (86.30)	210 (85.00)	
UC 病变部位 [n (%)]			
远端结肠炎 (E1 + E2)	86 (58.90)		
广泛结肠炎 (E3)	60 (41.10)		
UC 严重程度 [n (%)]			
轻度	57 (39.04)		
中度	69 (47.26)		
重度	20 (13.70)		
肠外表现 [n (%)]			
口腔溃疡	4 (2.74)		
关节炎	9 (6.16)		
结节性红斑	1 (0.69)		
治疗 [n (%)]			
SASP/5 - ASA	116 (79.45)		
强的松	51 (38.35)		
抗生素	38 (26.03)		
免疫抑制剂	5 (3.45)		
英夫利昔	0 (0.00)		
结肠切除术	1 (0.68)		

SASP. 柳氮磺吡啶; 5 - ASA. 5 - 氨基水杨酸

离子水补足至 10μl。PCR 反应程序如下: 95℃ 预变性 5min; 94℃ 30s, 65℃ 1min, 72℃ 1min, 共进行 35 个循环, 然后 72℃ 延伸 10min, 4℃ 保存。PCR 扩增后, 产物经 3% 的琼脂糖电泳检测有片段的表明扩增成功。(2) 纯化 PCR 产物: 纯化反应总体系为 7.5μl, 包括 PCR 产物 2μl, 虾碱性磷酸酶 1.5U (shrimp alkaline phosphatase, SAP) (美国 ABI 公司), 外切酶 Exon I 2 U (美国 ABI 公司), 用灭菌去离子水补足至 7.5μl。反应程序如下: 37℃ 孵育保温 80min, 然后 80℃ 保温 15min。纯化模板可以在 4℃ 保存 24h 或 -20℃ 长期保存。(3) SNaPshot PCR 反应: 反应体系 7μl, 包括纯化的 PCR 产物 2μl, SNaPshot Multiplex Mix 1μl (美国 ABI 公司), 5 × Seq 缓冲液 1μl, 各延伸引物终浓度为 0.2μmol/L, 去离子水补足至 7μl。反应程序如下: 96℃ 1min, 96℃ 10s, 52℃ 5s, 60℃ 30s, 共 28 个循环, 然后 4℃ 保存。(4) 二次纯化反应: 在 SNaPshot PCR 反应产物中加入 1USAP, 震荡混匀, 37℃ 保温 1h, 纯化处理去除多余的引物和 ddNTP, 75℃ 保温 15min 以灭活 SAP, 4℃ 可保存 24h 或 -20℃ 长期保存。(5) 毛细管电泳检测基因型: 取二次纯化产物 1.5μl, 高度去离子甲酰胺 (highly deionized - formamide, HiDi) (美国 ABI 公司) 8μl, 内标

表 2 TRAIL 受体家族各位点 PCR 扩增引物序列

基因	等位基因	引物 (5'→3') (Tm℃)	长度 (bp)
DR4 rs20575	C/G	F: GGGCTGATAGATACGGGTACAAGGA (59.9)	190
		R: ACCACGACCAGGAACACAGCAT (60.5)	
DR4 rs13278062	G/T	F: GCGGAATGAAGGACACAGAGG (59.3)	142
		R: GCGGACAGAGCTTGACTCCATC (59.4)	
DR5 rs1047266	C/T	F: CAGACTGGAAGCTCATGGAGACAAG (59.8)	258
		R: GTGCCTGGGCTCAAGAGAATGTG (60.1)	
DcR1 rs12549481	T/C	F: GCTGGAGACATCAGTGGCATCAG (59.7)	282
		R: TGCGTTTGATTCCGGGTCT (60.2)	
DcR2 rs1133782	G/A	F: AGCAAGGACAGGACAGGGAGTAAG (60.1)	300
		R: GGTCTCTGAGCAGGAAATCCAAGG (59.4)	
OPG rs3102735	C/T	F: GAGCACTGTCCCTTCCACCAACC (60)	386
		R: CTCTCTGATTCTTACCTTCTTCC (59.3)	

Tm. 退火温度; T. 胸腺嘧啶; C. 胞嘧啶; G. 鸟嘌呤; A. 腺嘌呤

LIZ - 120 (美国 ABI 公司) 0.3μl, 混匀离心后备用。然后 95℃ 变性 5min 后迅速置于冰上 5min。将 9.5μl 混匀的电泳样品在 3730DNA 测序仪上进行毛细管电泳。(6) 数据分析及基因验证: 采用 GeneMapper3.0 软件进行。随机抽取部分样本进行直接测序进一步核实基因型。SNaPshot 复测和测序样本核实的基因型与最初 SNaPshot 判定的结果符合率均为 100%。

另采用 Haploview 4.2 软件进行连锁不平衡和单倍型分析。(7) 血浆 sTRAIL 水平检测: 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血浆中 sTRAIL 水平 (Bender Medsystems 公司试剂盒), 用芬兰雷勃 (Labsystems) 酶标仪 (MK - 3) 读取吸光度 (A) 值, 计算血浆 sTRAIL 浓度。

3. 统计学方法: 采用两独立样本的 t 检验比较

UC 组及对照组间的年龄差异;对照组中用  $\chi^2$  检验分析 TRAIL 各受体多态性位点基因型频率分布是否符合 Hardy - Weinberg 平衡定律,  $P > 0.05$  表明符合该遗传平衡定律。采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确概率法比较 UC 组及对照组间 TRAIL 各受体等位基因及基因型频率差异;采用非条件 Logistic 回归分析 TRAIL 各受体基因多态性与 UC 患者临床病理特征的关系。线性回归分析血浆 sTRAIL 水平与 TRAIL 基因多态性及 UC 临床病理特征之间的关系。以上数据均输入 SPSS 20.0 统计软件包处理,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. TRAIL 受体家族基因多态性与 UC 的关系: Hardy - Weinberg 平衡定律是指在理想状态下,群体中某一基因位点的基因型和等位基因频率将代代保持不变,处于遗传平衡状态。本研究对照组中 DR4 (rs20575、rs13278062)、DR5 (rs1047266)、DcR2 (rs1133782) 及 OPG (rs3102735) 5 个位点的基因型分布均符合 Hardy - Weinberg 平衡定律 ( $P = 0.796$ 、 $0.327$ 、 $0.229$ 、 $0.862$ 、 $0.396$ ), 而 DcR1 (rs12549481) 位点的基因型分布不符合 Hardy - Weinberg 平衡规律 ( $P < 0.05$ ), 故不做进一步统计学处理。本研究采用显性模型分析发现, UC 组中 DR4 (rs20575) 的突变等位基因 (G) 和基因型 (CG + GG) 频率均高于对照组 [4.79% vs 1.62%, OR = 2.961, 95% CI: 1.257 ~ 6.972,  $P = 0.009$ ; 8.22% vs 3.24%, OR = 2.538, 95% CI: 1.062 ~ 6.063,  $P = 0.030$ ], DcR2 (rs1133782) 的突变基因型 (GA + AA) 频率低于对照组 [10.27% vs 18.22%, OR = 0.514, 95% CI: 0.275 ~ 0.960,  $P = 0.034$ ]。在隐性模型中 OPG (rs3102735) 的突变等位基因 (T) 和纯合子突变基因型 (TT) 频率较对照组均

显著增高 [86.99% vs 80.90%, OR = 1.570, 95% CI: 1.053 ~ 2.364,  $P = 0.029$ ; 23.97% vs 33.60%, OR = 0.623, 95% CI: 0.392 ~ 0.990,  $P = 0.044$ ]。而 DR4 (rs13278062) 和 DR5 (rs1047266) 的突变基因型和等位基因频率在 UC 组和对照组之间比较, 差异均无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ )。此外, 采用 Haploview 4.2 软件对 DR4 (rs20575, rs13278062)、DR5 (rs1047266)、DcR2 (rs1133782) 和 OPG (rs3102735) 进行连锁不平衡检验, 结果发现这 5 个 SNP 位点之间不存在连锁不平衡, 故不进一步做单倍型分析。

2. TRAIL 受体基因多态性与 UC 患者临床病理特征的关系: 采用非条件 Logistic 回归分析 TRAIL 受体基因多态性与 UC 临床病理特征的关系, 纳入的变量包括年龄、性别、疾病部位和严重程度。结果发现与轻中度患者相比, 重度 UC 中 DR4 (rs20575) 的突变等位基因 (G) 和基因型 (CG + GG) 频率均显著增高 (15.00% vs 3.17%, OR = 5.382, 95% CI: 1.760 ~ 16.457,  $P = 0.001$ ; 25.00% vs 5.56%, OR = 5.667, 95% CI: 1.596 ~ 20.119,  $P = 0.003$ ); DR4 (rs13278062) 的突变等位基因 (T) 和基因型 (GT + TT) 频率以及 OPG (rs3102735) 的突变等位基因 (T) 频率均显著降低 (17.50% vs 33.73%, OR = 0.417, 95% CI: 0.177 ~ 0.981,  $P = 0.040$ ; 30.00% vs 59.22%, OR = 0.291, 95% CI: 0.105 ~ 0.808,  $P = 0.291$ ; 75.00% vs 88.89%, OR = 0.844, 95% CI: 0.702 ~ 1.014,  $P = 0.015$ )。但上述各 SNP 与 UC 患者的疾病部位均无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ )。此外, DR5 (rs1047266) 和 DcR2 (rs1133782) 基因多态性与 UC 患者的疾病严重程度及部位均无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ , 表 3、表 4)。

表 3 TRAIL 受体家族各位点基因型及等位基因在 UC 组和对照组 (HC) 中的分布 [n(%)]

基因	UC 组 (n = 146)	HC 组 (n = 247)	OR	95% CI	P
DR4 rs20575					
CC	134 (91.78)	239 (96.76)			
CG	10 (6.85)	8 (3.24)			0.030
GG	2 (1.37)	0 (0.00)			
CG + GG	12 (8.22)	8 (3.24)	2.538	1.062 ~ 6.063	0.030
等位基因 C	278 (95.21)	486 (98.38)			
等位基因 G	14 (4.79)	8 (1.62)	2.961	1.257 ~ 6.972	0.009
DR4 rs13278062					
GG	65 (44.52)	113 (45.75)			
GT	70 (47.95)	113 (45.75)			
TT	11 (7.53)	21 (8.50)			
GT + TT	81 (55.48)	134 (54.25)	1.023	0.850 ~ 1.230	0.813

续表 3

基因	UC 组 (n = 146)	HC 组 (n = 247)	OR	95% CI	P
等位基因 G	200 (68.49)	339 (68.62)			
等位基因 T	92 (31.51)	155 (31.38)	1.004	0.811 ~ 1.243	0.970
DR5 rs1047266					
CC	74 (50.68)	123 (49.80)			
CT	60 (41.10)	108 (43.72)			
TT	12 (8.22)	16 (6.48)			
CT + TT	72 (49.32)	124 (50.2)	0.982	0.799 ~ 1.207	0.865
等位基因 C	208 (71.23)	354 (71.66)			
等位基因 T	84 (28.77)	140 (28.34)	1.015	0.808 ~ 1.276	0.898
DeR2 rs1133782					
GG	131 (89.73)	202 (81.78)			
GA	13 (8.90)	43 (17.41)			
AA	2 (1.37)	2 (0.81)			
GA + AA	15 (10.27)	45 (18.22)	0.514	0.275 ~ 0.960	0.034
等位基因 G	275 (94.18)	447 (90.49)			
等位基因 A	17 (5.82)	47 (9.51)	0.588	0.331 ~ 1.045	0.067
OPG rs3102735					
CC	3 (2.05)	11 (4.45)			
CT	32 (21.92)	72 (29.15)			
TT	111 (76.03)	164 (66.40)			
CC + CT	35 (23.97)	83 (33.6)	0.623	0.392 ~ 0.990	0.044
等位基因 C	38 (13.01)	94 (19.03)			
等位基因 T	254 (86.99)	400 (80.97)	0.637	0.423 ~ 0.958	0.029

本表格中 OPG (rs3102735) 采用隐性模型统计, 其余位点采用显性模型统计

表 4 TRAIL 受体家族多态性与 UC 患者临床病理特征的关系 [n(%)]

TRAIL 受体家族	严重程度		OR	95% CI	P
	轻中度	重度			
DR4 (rs20575)					
CC	119 (94.44)	15 (75.00)			
CG + GG	7 (5.56)	5 (25.00)	5.667	1.596 ~ 20.119	0.003
C	244 (96.83)	34 (85.00)			
G	8 (3.17)	6 (15.00)	5.382	1.760 ~ 16.457	0.001
DR4 (rs13278062)					
GG	51 (40.78)	14 (70.00)			
GT + TT	75 (59.22)	6 (30.00)	0.291	0.105 ~ 0.808	0.014
G	167 (66.27)	33 (82.50)			
T	85 (33.73)	7 (17.5)	0.417	0.177 ~ 0.981	0.04
DR5 (rs1047266)					
CC	62 (49.21)	12 (60.00)			
CT + TT	64 (50.79)	8 (40.00)	0.646	0.247 ~ 1.687	0.370
C	176 (69.84)	32 (80.00)			
T	76 (30.16)	8 (20.00)	0.579	0.255 ~ 1.315	0.187
DeR2 (rs1133782)					
GG	113 (89.68)	18 (90.00)			
GA + AA	13 (10.32)	2 (10.00)	0.965	0.851 ~ 1.167	0.996
G	237 (94.05)	38 (95.00)			
A	15 (5.95)	2 (5.00)	0.990	0.916 ~ 1.070	0.811
OPG (rs3102735)					
TT	99 (78.57)	12 (60.00)			
CC + CT	27 (21.43)	8 (40.00)	1.310	0.905 ~ 1.894	0.071
T	224 (88.89)	30 (75.00)			
C	28 (11.11)	10 (25.00)	1.185	0.986 ~ 1.425	0.015

以轻中度 UC 为参考, 纳入的变量包括性别、发病年龄及吸烟情况, TRAIL 受体家族基因多态性与疾病部位差异均无统计学意义, 故未在表格中列出

3. 血浆 sTRAIL 平均水平在 UC 组和对照组中的比较:UC 患者中血浆 sTRAIL 水平显著高于对照组 ( $1.2 \pm 0.6$  vs  $1.1 \pm 0.7$  ng/L,  $P < 0.05$ )。

### 讨 论

研究表明,除 OPG 基因定位于 8q23 - 24, DR4、DR5、DcR1 和 DcR2 基因均位于人染色体 8p21 ~ 22<sup>[7]</sup>。Teng 等<sup>[8]</sup>报道在高加索人群中 DR4 (rs20575) 突变等位(G)的携带者罹患头颈部鳞状细胞癌的风险增加,而发生膀胱癌和套细胞淋巴瘤的风险可能会降低<sup>[9,10]</sup>。而一项 Meta 分析结果表明, DR4 (rs20575) 基因多态性与卵巢癌、乳腺癌、胃癌的易感性无显著关联<sup>[11]</sup>。目前证实 (rs13278062) 是影响 DR4 受体生物学活性最重要的功能性位点之一。在中国汉族人群中 Wang 等<sup>[12]</sup>发现 DR4 (rs13278062) 基因突变可能增加膀胱癌的发病风险。国外 Satoshi Arakawa 等<sup>[13]</sup>和 Nakata 等<sup>[14]</sup>的研究都提示 DR4 (rs13278062) 位点突变后将提高年龄相关性黄斑变性的疾病风险。Lee 等<sup>[15]</sup>采用多因素相关分析发现 DR5 (rs1047266) 基因突变与早期非小细胞肺癌患者的生存时间及预后密切相关,可能成为评估该疾病预后的重要指标。

另有报道 DR5 (rs1047266) 基因多态性可能与哮喘相关。至今关于诱骗受体及 OPG 基因多态性与疾病易感性的研究相对较少。Zhai 等<sup>[16]</sup>研究显示 DcR1 (rs12549481) 和 DcR2 (rs1133782) 2 个 SNP 位点的突变不影响 T 细胞淋巴瘤的易感性。一项来自德国人群的研究显示 OPG (rs3102735) 基因多态性与 RA 无关。而 Ney 等<sup>[17]</sup>在高加索人群的研究中发现,与 OPG (rs3102735) 突变等位基因(T)的携带者相比,野生型等位基因(C)的携带者患乳腺癌的风险将增加 1.5 倍。Assmann 等报道,若个人携带 OPG (rs3102735) 等位基因(C)或含有(C)的基因型,其发生银屑病的风可能会增高。上述研究结果表明 TRAIL 受体基因多态性对疾病的影响可能与种族遗传背景的差异密切相关,并且在不同疾病中,TRAIL 受体基因发挥的生物学功能也可能有所不同。

本研究采用显性和隐性两种遗传学模型统计分析,再从两种模型的检验结果中优先选取统计学差异最显著者作为推断依据。本研究在显性模型中发现 DR4 (rs20575) 基因突变可能增加 UC 的患病风险,并且该基因突变与 UC 疾病严重程度呈正相关,提示 DR4 (rs20575) 可能是影响 UC 易感性的潜在功能性位点。目前证实 DR4 (rs20575) 位于外显子 4,是

TRAIL 与 DR4 特异性结合区域,当该位点野生等位基因(C)被(G)取代后,原来编码的苏氨酸转变为精氨酸,DR4 与 TRAIL 结合部位的空间结构将随之改变,导致 TRAIL 与 DR4 结合后不能产生正常的促细胞凋亡信号。笔者还发现携带 DcR2 (rs1133782) 突变等位基因(A)的个体发生 UC 的风险可能降低。(rs1133782)位于 DcR2 基因第 7 外显子,发生(G)→(A)突变后所编码的亮氨酸转变为丝氨酸,使 DcR2 的功能发生异常。

本研究采用隐性模型分析,结果表明 UC 组中 OPG (rs3102735) 突变等位基因(T)及纯合子突变基因型(TT)的频率均显著高于对照组,提示该位点基因突变能提高 UC 的患病风险。理论上,OPG 是 TRAIL 的可溶性受体,在体内主要发挥抑制破骨细胞和增加骨密度的作用。rs3102735 位于 OPG 基因启动子上游的第 759 个碱基,发生(C)→(T)突变后可能在转录水平影响 OPG 的表达水平,使 OPG 与 TRAIL 的结合出现异常。尽管 OPG 缺乏功能性死亡结构域,与 TRAIL 结合的亲合力也较低,但研究表明 OPG 与 TRAIL 之间可以相互调节,OPG 能抑制 TRAIL 诱导的 Jurkat 细胞凋亡,而 TRAIL 也能阻断 OPG 对破骨细胞的抑制作用。

本研究进一步分析 TRAIL 各受体基因多态性与 UC 临床病理特征的相关性,结果发现与轻中度 UC 相比,DR4 (rs13278062) 的突变等位基因(T)和基因型(GT + TT)以及 OPG (rs3102735) 的突变等位基因(T)在重度 UC 患者中均显著降低,提示这两个 SNP 位点突变后可能减轻 UC 疾病严重程度。理论上,rs13278062 位于 DR4 基因启动子上游第 397 个碱基位点,发生(G)→(T)突变后,影响 DR4 mRNA 的转录水平及功能活性,降低 TRAIL 诱导的促细胞凋亡效应<sup>[13,14]</sup>。而 OPG (rs3102735) 位点突变可能影响 OPG 与 TRAIL 的结合,削弱 OPG 对 TRAIL 促细胞凋亡的抑制效应。笔者的研究发现似乎与这些现存理论观点相悖,推测其原因是 UC 复杂紊乱的体内环境可能在一定程度上限制或改变了 OPG (rs3102735) 和 DR4 (rs13278062) 原本具有的生物学功能。此外,本研究中 UC 患者的样本量大小及其临床病理特征的构成比也可能对上述分析结果产生重要影响。

综上所述,本研究提示 DR4 (rs20575)、DcR2 (rs1133782) 和 OPG (rs3102735) 3 个 SNP 可能与 UC 的易感性相关,尤其是 DR4 (rs20575) 和 OPG (rs3102735) 基因突变还能影响 UC 疾病严重程度。

DcR2(rs1133782)位点的(GG)基因型是UC的独立危险因素,并且DR4可能分别与DcR2和OPG联合,对UC产生协同影响。因此结合前期研究成果,笔者推测TRAIL及其受体所构成的凋亡途径可能与UC密切相关。但由于影响TRAIL凋亡途径的因素纷繁复杂,本研究尚无法完全阐明TRAIL受体家族影响UC易感性的潜在机制,笔者将在今后的研究中继续论证。

参考文献

- 1 Geboes K, De Hertogh G. Indeterminate colitis[J]. *Inflam Bowel Dis*, 2003, 9(5): 324-331
- 2 Sturm A, Leite AZA, Danese S, et al. Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis[J]. *Gut*, 2004, 53(11): 1624-1631
- 3 Anel A, Bosque A, Naval J, et al. Apo2L/TRAIL and immune regulation[J]. *Front Biosci*, 2007, 12(1): 2074-2084
- 4 Kim Y, Seol DW. TRAIL, a mighty apoptosis inducer[J]. *Mol Cells*, 2003, 15(3): 283-293
- 5 蒋益,裴继华,林李森,等. 溃疡性结肠炎患者中肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体基因多态性及单倍型分析[J]. *中华消化杂志*, 2011, 31:812-816
- 6 中华医学会消化病分会炎症性肠病协作组. 中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见(2007,济南)[J]. *中华内科杂志*, 2008, 47(1):73-79
- 7 López-Gómez C, Fernández O, García-León JA, et al. TRAIL/TRAIL receptor system and susceptibility to multiple sclerosis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7):e21766
- 8 Teng MS, Brandwein-Gensler MS, Teixeira MS, et al. A study of TRAIL receptors in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005, 131(5): 407-412

- 9 Hazra A, Chamberlain RM, Grossman HB, et al. Death receptor 4 and bladder cancer risk[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(6): 1157-1159
- 10 Fernandez V, Jares P, Bea S, et al. Frequent polymorphic changes but not mutations of TRAIL receptors DR4 and DR5 in mantle cell lymphoma and other B-cell lymphoid neoplasms[J]. *Haematologica*, 2004, 89(11): 1322-1331
- 11 Chen B, Liu S, Wang XL, et al. TRAIL-R1 polymorphisms and cancer susceptibility: an evidence-based meta-analysis[J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45(14): 2598-2605
- 12 Wang M, Wang M, Cheng G, et al. Genetic variants in the death receptor 4 gene contribute to susceptibility to bladder cancer[J]. *Mutat Res*, 2009, 661(1-2): 85-92
- 13 Arakawa S, Takahashi A, Ashikawa K, et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for exudative age-related macular degeneration in the Japanese population[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(10): 1001-1004
- 14 Nakata I, Yamashiro K, Akagi-Kurashige Y, et al. Association of genetic variants on 8p21 and 4q12 with age-related macular degeneration in Asian populations[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(10): 6576-6581
- 15 Lee EB, Jeon HS, Yoo SS, et al. Polymorphisms in apoptosis-related genes and survival of patients with early-stage non-small-cell lung cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(10): 2608-2618
- 16 Zhai K, Chang J, Wu C, et al. Association between genetic variations in tumor necrosis factor receptor genes and survival of patients with T-cell lymphoma[J]. *Chinese J Cancer*, 2012, 31(7): 335
- 17 Ney JT, Juhasz-Boess I, Gruenlage F, et al. Genetic polymorphism of the OPG gene associated with breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13(1): 40

(收稿日期:2016-04-28)

(修回日期:2016-05-24)

# 牙龈间充质干细胞在大鼠体内分布情况及其分离鉴定

竺王玉 朱 蓓 陈冬冬

**摘要** 目的 了解一种新的牙龈来源的间充质干细胞(gingival tissue-derived mesenchymal stem cells, GMSCs)在大鼠体内的分布情况及其分离鉴定。**方法** 取成人健康牙龈组织,经 dispase II 和胶原酶IV消化分离单细胞,培养并鉴定为 MSCs。将 36 只 SD 大鼠(雌雄各半)分成两组:GMSCs 移植组(n=24)和对照组(n=12)。GMSCs 经尾静脉输入,并分别于移植后 1、5、10、20 和 30 天各时间点随机处死 4 只大鼠,快速取出心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、脑、胸骨、肌肉、睾丸或卵巢等组织,冷冻切片后荧光显微镜观察 GMSCs 生物分布。**结果** GMSCs 贴壁生长,呈长梭形,具有向脂肪细胞及成骨细胞分化的能力,CD29、CD39、CD73、CD90、CD105 阳性率 >95%,CD34、CD45、HLA-DR 阳性率 <5%。荧光显微镜观察结果显示,移植后 1 天肺 CM-Dil 阳性细胞

基金项目:浙江省科技厅公益类项目(2014C33244)

作者单位:316021 舟山医院细胞分子生物学实验室(竺王玉、陈冬冬),小儿科(朱蓓)

通讯作者:竺王玉,电子邮箱:zhuwangyu24@sina.cn