

汉族人群 Toll 样受体 3 基因启动子区 rs128912 单核苷酸多态性与白内障的关系

郭晶晶¹, 马玲玲², 江黎³, 周妍妍¹, 陈伟芳¹, 贺玲¹

引用: 郭晶晶, 马玲玲, 江黎, 等. 汉族人群 Toll 样受体 3 基因启动子区 rs128912 单核苷酸多态性与白内障的关系. 国际眼科杂志 2023;23(12):2031-2034

作者单位:¹(453000) 中国河南省新乡市, 中国人民解放军陆军第八十三集团军医院眼耳鼻喉科;²(453100) 中国河南省卫辉市人民医院眼科;³(430000) 中国湖北省武汉市, 中国人民解放军中部战区总医院眼科

作者简介: 郭晶晶, 毕业于新乡医学院, 主治医师, 研究方向: 白内障、青光眼、屈光不正及斜弱视。

通讯作者: 贺玲, 毕业于新乡医学院, 硕士, 副主任医师, 主任, 研究方向: 白内障、眼底病、屈光. 13839054899@163.com

收稿日期: 2023-05-29 修回日期: 2023-11-06

摘要

目的: 分析汉族人群 Toll 样受体 3 (TLR3) 基因启动子区 rs128912 单核苷酸多态性 (SNP) 与白内障的关系。

方法: 选取 2019-06/2021-06 我院收治的白内障患者 263 例作为研究组, 晶状体脱位患者 150 例作为对照组。采用免疫印迹法 (Western blotting) 检测两组患者晶状体前囊膜组织中 TLR3 蛋白表达情况, 采用直接测序法分析 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点多态性, 采用实时荧光定量-聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 法检测不同基因型患者外周血 TLR3 mRNA 表达情况。

结果: 研究组患者前囊膜组织中 TLR3 蛋白相对表达水平高于对照组 ($P < 0.05$)。研究组和对照组患者 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点基因型 (AA、AT、TT) 频率均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律, 且两组患者间 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点基因型 (AA、AT、TT) 频率和等位基因 (A、T) 频率均有差异 ($P < 0.05$)。研究组中 TT 基因型患者外周血 TLR3 mRNA 相对表达水平均高于 AA 和 AT 基因型患者 ($P < 0.05$)。

结论: 白内障患者晶状体前囊膜组织中 TLR3 蛋白表达明显上调, 且 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点多态性与汉族人群白内障易感性有关, 携带 TT 基因型者更易发生白内障。

关键词: Toll 样受体 3; 单核苷酸多态性; 启动子; 白内障; 易感性

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.12.18

Relationship between rs128912 single nucleotide polymorphism in promoter region of Toll-like receptor 3 gene and cataract in Chinese Han population

Jing-Jing Guo¹, Ling-Ling Ma², Li Jiang³, Yan-Yan Zhou¹, Wei-Fang Chen¹, Ling He¹

¹Department of Eye & ENT, the 83rd Group Army Hospital of PLA, Xinxiang 453000, Henan Province, China; ²Department of Ophthalmology, Weihui People's Hospital, Weihui 453100, Henan Province, China; ³Department of Ophthalmology, Central Theater Command General Hospital of PLA, Wuhan 430000, Hubei Province, China

Correspondence to: Ling He. Department of Eye & ENT, the 83rd Group Army Hospital of PLA, Xinxiang 453000, Henan Province, China. 13839054899@163.com

Received: 2023-05-29 Accepted: 2023-11-06

Abstract

• **AIM:** To analyze the relationship between rs128912 single nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region of Toll-like receptor 3 (TLR3) gene and cataract in Chinese Han population.

• **METHODS:** A total of 263 patients with cataract admitted to our hospital from June 2019 to June 2021 were selected as study group, and 150 patients with lens dislocation were included in control group. Western blotting was used to detect the expression of TLR3 protein in the anterior capsular tissues of lens in the two groups, and direct sequencing method was applied to analyze the polymorphism of rs128912 locus in the promoter region of TLR3 gene. The expression of peripheral blood TLR3 mRNA of patients with different genotypes was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

• **RESULTS:** The expression level of TLR3 protein in the anterior capsular tissues in the study group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). The frequencies of genotypes (AA, AT, TT) at rs128912 locus in the TLR3 gene promoter region in the study group and the control group were in accordance with Hardy-Weinberg genetic equilibrium, and there were differences in the frequencies of genotypes (AA, AT, TT) and frequencies of alleles (A, T) at rs128912 locus in the TLR3 gene promoter

region between both groups ($P < 0.05$). The relative expression level of peripheral blood TLR3 mRNA in patients with TT genotype in the study group was higher than that in patients with AA or AT genotypes ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The expression of TLR3 protein in anterior capsular tissues of lens of patients with cataract is significantly up-regulated, and rs128912 locus polymorphism in the TLR3 gene promoter region is related to the susceptibility of cataract in Chinese Han population, and people with TT genotype are more prone to cataract.

• **KEYWORDS:** Toll-like receptor 3; single nucleotide polymorphism; promoter; cataract; susceptibility

Citation: Guo JJ, Ma LL, Jiang L, et al. Relationship between rs128912 single nucleotide polymorphism in promoter region of Toll-like receptor 3 gene and cataract in Chinese Han population. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2023;23(12):2031-2034

0 引言

白内障是世界范围内的第一致盲原因,也是造成视力损害的主要原因^[1]。由于我国人口呈不断老龄化趋势,预防年龄相关性白内障的增加以及延缓早中期白内障的进展成为现阶段的重难点问题^[2]。超声乳化手术是目前临床上治疗白内障的主要方法,但术后仍可出现并发症,同时白内障手术的需求也在增加,给患者家庭及社会造成了沉重的经济负担^[3]。白内障的发生与外伤、辐射、衰老等多种因素密切相关^[4]。此外,遗传因素在白内障的发生发展中亦起着至关重要的作用^[5]。Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)是人类早期病原体识别和宿主防御系统的重要组成部分,在保护细胞免受损伤和介导组织稳态方面起着重要作用^[6]。TLR3是TLRs家族的重要成员,在炎症反应急性期作为损伤相关分子模式和组织坏死的内源性受体^[7]。此外,TLR3也是识别病毒病原体相关分子模式的关键受体^[8]。研究表明,TLR3基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与黄斑变性有关^[9],但TLR3基因启动子区SNP与白内障的关系尚未阐明。本研究选择TLR3基因启动子区SNP进行研究,对汉族人群TLR3基因启动子区rs128912位点多态性与白内障的关系进行分析,报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取2019-06/2021-06我院收治的白内障患者263例作为研究组,其中男148例,女115例;年龄51~76(平均64.19±5.86)岁。纳入标准:(1)符合2016年美国眼科学会制定的白内障诊断标准^[10],术后病理组织活检确诊为白内障;(2)均为汉族人群,四代内不存在血缘关系。排除标准:(1)合并青光眼、葡萄膜炎及外伤等其他原因引起的并发性白内障者;(2)合并糖尿病、肾病等全身性疾病者。另选取同期我院收治的晶状体脱位患者150例作为对照组,其中男86例,女64例;年龄51~78(平均63.57±5.42)岁。纳入标准:均为汉族人群,四代内不存在血缘关系。排除标准:合并其他眼部疾病。两组患者性别构成、年龄比较,差异均无统计学意义($\chi^2 = 0.044, P =$

0.834; $t = 1.062, P = 0.289$)。本研究严格遵守《赫尔辛基宣言》,并经医院伦理委员会批准。在患者知情同意的前提下,采集其空腹外周静脉血,并在手术时收集晶状体前囊膜组织,用于后续试验。

1.2 方法

1.2.1 免疫印迹法(Western blotting)检测TLR3蛋白表达水平 取两组患者新鲜冷冻的前囊膜组织,加入RIPA裂解液(上海康朗生物科技有限公司),并于冰上彻底匀浆,振荡混匀,冰浴30min,12000r/min离心5min,收集上清液,得到总蛋白溶液,采用BCA法测定蛋白浓度。采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法分离总蛋白,并转移至PVDF膜上,使用TLR3一抗[稀释比例1:1000,艾博抗(上海)贸易有限公司]4℃孵育过夜,使用二抗[稀释比例1:5000,艾博抗(上海)贸易有限公司]室温孵育1h,采用Bio-Rad凝胶成像系统对蛋白条带进行检测,使用Image Lab软件计算蛋白条带灰度值,并分析目的蛋白的相对表达水平。

1.2.2 TLR3基因启动子区rs128912位点多态性分析

采用直接测序法分析TLR3基因启动子区rs128912位点多态性。抽取两组患者空腹外周静脉血5mL,立刻置于EDTA抗凝管中,离心15min,分离中间层外周血白细胞。采用血液基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA,采用紫外分光光度计测定样品DNA浓度和纯度(A_{260}/A_{280} 为1.7~2.0),将合格的样品保存于-20℃冰箱中。使用Primer Premier 5软件设计TLR3基因启动子区rs128912位点引物,上游引物:5'-TCGATCCGATGTAGATGCT-3',下游引物:5'-ACGTGTAGTCGATGTCGTA-3',产物大小188bp,通过琼脂糖凝胶电泳进行引物验证,若凝胶电泳图中上面的条带与目的条带大小一致,提示引物特异性高。采用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)进行扩增,PCR体系(20 μ L):2.0 μ L DNA模板、10.0 μ L 2 \times MIX、0.4 μ L上游引物、0.4 μ L下游引物和7.2 μ L ddH₂O。PCR程序:95℃ 120s;94℃ 30s,57℃ 90s,72℃ 60s,35个循环;72℃ 10min。采用琼脂糖凝胶电泳检测基因片段的扩增情况。取纯化产物直接进行测序。

1.2.3 实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测TLR3 mRNA表达水平 采用Trizol试剂(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)提取外周血白细胞总RNA,并采用逆转录试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)逆转录得到cDNA。以GAPDH为内参,检测目的基因TLR3的表达情况,加入2 \times SYBR qPCR Master Mix,检测各样品荧光信号,计算TLR3和GAPDH的Ct值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因表达情况,实验重复3次,取平均值。TLR3基因上游引物:5'-ACGATCGATCGTAGTGTAGC-3',下游引物:5'-ACGTAGCTGACTACGATCGT-3',产物大小156bp;GAPDH基因上游引物:5'-ATTGCTAGGATCGTTACCA-3',下游引物:5'-TGTAGTCGTAGTCGTGTAGT-3',产物大小129bp。

统计学分析:采用SPSS 23.0统计学软件分析数据。计量资料均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析。计数资料采用百分比(%)或频数(n)表示,组间比较采用 χ^2

检验;采用 χ^2 检验分析两组各基因型的 Hardy-Weinberg 遗传平衡。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者前囊膜组织中 TLR3 蛋白相对表达水平

Western blotting 检测结果显示,研究组患者前囊膜组织中 TLR3 蛋白相对表达水平 (4.91 ± 0.56) 显著高于对照组 (1.75 ± 0.38), 差异有统计学意义 ($t = 61.263, P < 0.05$), 见图 1。

2.2 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点多态性分析 采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律对基因型频率进行检验, 结果表明, 研究组和对照组患者 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点基因型 (AA、AT、TT) 频率均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律 ($\chi^2_{\text{研究组}} = 2.122, P_{\text{研究组}} = 0.346; \chi^2_{\text{对照组}} = 1.302, P_{\text{对照组}} = 0.521$)。研究组和对照组患者 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点 AA、AT、TT 基因型频率和 A、T 等位基因频率差异均有统计学意义 ($P < 0.001$), 见表 1。

2.3 两组患者 TLR3 mRNA 相对表达水平 RT-qPCR 检测结果显示, 研究组中 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点 TT 基因型患者外周血 TLR3 mRNA 相对表达水平显著高于 AA 和 AT 基因型患者, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

3 讨论

白内障是全世界导致失明的常见原因之一, 随着人口老龄化加剧, 白内障的发病率不断增加^[11]。我国中南部

是白内障发病率最高的地区, 可能与该地区人群长期暴露在较高的紫外线辐射中有关, 预计到 2050 年, 我国白内障患病人数将达到 2.41 亿^[12]。因此, 白内障患者的管理是一项重大的公共卫生问题。流行病学研究表明, 紫外线辐射、电离辐射、吸烟、衰老等是白内障发生的危险因素^[13]。近年研究证实, 异常基因表达与白内障的发生密切相关, 可导致晶状体中各种蛋白的转录和翻译出现改变, 从而破坏晶状体的结构和功能, 最终导致白内障的发生^[14]。据报道, 基因多态性与白内障的发病风险有关^[15]。深入研究基因 SNP 与白内障的关系, 有助于从分子水平阐明白内障的发生机制。

TLRs 是一种重要的天然免疫受体, 可识别外部病原微生物表面的病原体相关分子模式^[16]。TLRs 可通过与特定的配体结合介导信号转导, 从而激活 TLRs 信号通路, 最终促进宿主细胞释放促炎细胞因子, 参与炎症反应过程^[17]。目前, 在哺乳动物基因组已发现 13 种 TLR 基因 (TLR1~13), 其中 TLR3 基因位于 4 号染色体 q35 区, 长度为 3 029bp, 包含 5 个外显子, 共编码 504 个氨基酸^[18]。TLR3 属于 I 型跨膜蛋白, 由细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域组成^[19]。年龄相关性黄斑变性是一种由多种因素所致的复杂疾病, 也是老年人群常见的退行性疾病, 由遗传和环境因素共同引起, 天然免疫在年龄相关性黄斑变性发病机制中发挥着关键作用^[20]。既往研究表明, 湿性年龄相关性黄斑变性患者外周血 TLR3 mRNA 和

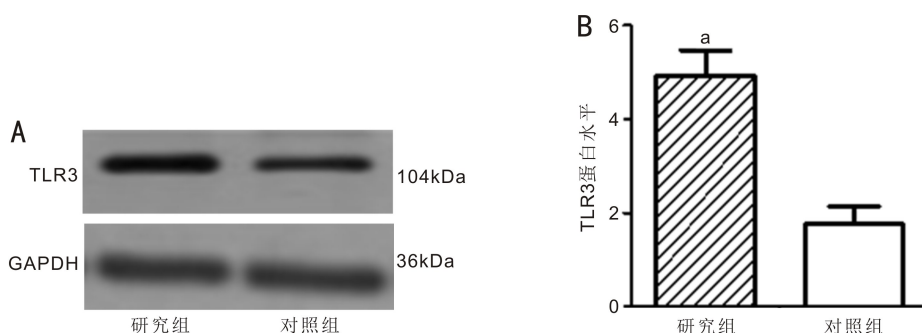


图 1 两组患者前囊膜组织中 TLR3 蛋白表达水平比较 A: Western blotting 检测结果; B: 量化分析结果, $^a P < 0.05$ vs 对照组。

表 1 两组患者 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点基因型和等位基因频率比较

组别	例数	基因型			等位基因		n (%)
		AA	AT	TT	A	T	
研究组	263	25 (9.51)	96 (36.50)	142 (53.99)	146 (27.76)	380 (72.24)	
对照组	150	40 (26.67)	68 (45.33)	42 (28.00)	148 (49.33)	152 (50.67)	
χ^2			34.235			38.797	
P			<0.001			<0.001	

注: 研究组: 白内障患者; 对照组: 晶状体脱位患者。

表 2 两组中不同基因型患者 TLR3 mRNA 相对表达水平比较

组别	例数	AA 基因型	AT 基因型	TT 基因型	F	P	$\bar{x} \pm s$
研究组	263	4.73 \pm 0.54	4.75 \pm 0.36	7.93 \pm 0.41 ^{a,c}	2023.651	<0.001	
对照组	150	2.19 \pm 0.31	2.24 \pm 0.38	2.25 \pm 0.30	0.325	0.723	
t		24.172	42.707	83.914			
P		<0.001	<0.001	<0.001			

注: 研究组: 白内障患者; 对照组: 晶状体脱位患者。^a $P < 0.05$ vs AA 基因型; ^c $P < 0.05$ vs AT 基因型。

蛋白表达水平明显高于正常对照组,TLR3 表达上调可能与湿性年龄相关性黄斑变性发病有关^[21]。TLR3 基因 rs3775291 多态性能够通过抑制双链 RNA 诱导视网膜色素上皮细胞死亡,具有潜在的临床意义^[22]。此外,TLR3 在人脉络膜新生血管形成过程中表达上调^[23]。上述研究结果均提示 TLR3 可能在眼科疾病中发挥重要作用。本研究结果显示,研究组患者前囊膜组织中 TLR3 蛋白表达水平显著高于对照组,表明 TLR3 可能在汉族人群白内障发生发展中发挥一定作用。Xie 等^[24]通过细胞实验发现,TLR3 可能是通过靶向 Jagged-1/Notch 信号通路在白内障发病中发挥作用。本研究分析 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点多态性与白内障的关系,结果显示,研究组和对照组患者 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点 AA、AT、TT 基因型频率和 A、T 等位基因频率比较,差异均具有统计学意义,且研究组 TT 基因型频率及 T 等位基因频率显著高于对照组,提示携带 TT 基因型和 T 等位基因可能增加汉族人群白内障的患病风险。此外,本研究通过检测不同基因型患者外周血 TLR3 mRNA 表达情况发现,研究组中 TT 基因型患者 TLR3 mRNA 相对表达水平显著高于 AA 和 AT 基因型患者,表明 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点多态性可能与 TLR3 mRNA 表达有关。分析 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点 A 突变为 T,可能影响 TLR3 mRNA 表达,进而影响其编码蛋白的功能。但国内尚无学者发现 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点多态性与白内障的关联,目前缺乏同类研究。本研究创新之处在于发现了 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点多态性与白内障发生的关系,通过检测 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点多态性有助于早期筛查白内障患者,从而为临床防控提供参考依据。但以上结论缺乏较大样本的流行病学研究,且基因与基因以及基因与环境之间存在相互作用,而本研究仅选择了 TLR3 基因单个 SNP 位点进行分析,TLR3 基因启动子区 rs128912 位点多态性与白内障的关系有待进一步探究。

综上所述,本研究表明,白内障患者晶状体前囊膜组织中 TLR3 蛋白表达明显上调,且 TLR3 基因启动子区 rs128912 位点多态性与汉族人群白内障易感性有关,携带 TT 基因型者更易发生白内障,有助于指导临床筛查白内障高风险人群。

参考文献

- 1 Xie JG, Zhu YJ, Fan YM, et al. Association between extreme heat and hospital admissions for cataract patients in Hefei, China. *Environ Sci Pollut Res Int* 2020;27(36):45381-45389
- 2 王延东. 重视白内障防治药物研发,降低白内障患者致盲率. *中华实验眼科杂志* 2020;38(12):1001-1003
- 3 Benítez Martínez M, Baeza Moyano D, González - Lezcano RA. Phacoemulsification; proposals for improvement in its application. *Healthcare* 2021;9(11):1603
- 4 陈文静,刘平. miRNA 在白内障形成中的作用. *眼科新进展* 2020;40(5):497-500
- 5 Sun W, Xu JW, Gu YS, et al. The relationship between major intrinsic protein genes and cataract. *Int Ophthalmol* 2021;41(1):375-387
- 6 Singh AK, Prakash S, Garg RK, et al. Study of single nucleotide polymorphisms in endosomal toll-like receptors-3, 7, and 9 genes in patients with dengue: a case-control study. *Cureus* 2021;13(5):e14883

- 7 Gosu V, Son S, Shin D, et al. Insights into the dynamic nature of the dsRNA-bound TLR3 complex. *Sci Rep* 2019;9(1):3652
- 8 Chen GP, Xiang K, Sun L, et al. TLR3 polymorphisms are associated with the severity of hand, foot, and mouth disease caused by enterovirus A71 in a Chinese children population. *J Med Virol* 2021;93(11):6172-6179
- 9 Zhou P, Fan L, Yu KD, et al. Toll-like receptor 3 C1234T may protect against geographic atrophy through decreased dsRNA binding capacity. *FASEB J* 2011;25(10):3489-3495
- 10 Golozar A, Chen YJ, Lindsley K, et al. Identification and description of reliable evidence for 2016 American academy of ophthalmology preferred practice pattern guidelines for cataract in the adult eye. *JAMA Ophthalmol* 2018;136(5):514-523
- 11 王婷,汪瑞昕,林浩添. 基于人工智能的白内障新诊疗模式. *中华实验眼科杂志* 2021;39(9):832-836
- 12 Song PG, Wang H, Theodoratou E, et al. The national and subnational prevalence of cataract and cataract blindness in China: a systematic review and meta-analysis. *J Glob Health* 2018;8(1):010804
- 13 Cui YL, Yu XN, Zhang X, et al. Association of IGF1R polymorphisms (rs1546713) with susceptibility to age-related cataract in a Han Chinese population. *Int J Ophthalmol* 2020;13(3):374-381
- 14 Li Y, Zhang WJ, Ke HQ, et al. Rs1894720 polymorphism is associated with the risk of age-related cataract by regulating the proliferation of epithelial cells in the lens via the signalling pathway of MIAT/miR-26b/BCL2L2. *Arch Med Sci* 2022;18(1):223-236
- 15 Jiang HY, Gao Y, Chen Z, et al. Association between MMP-2 gene polymorphism and cataract susceptibility: a protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine* 2021;100(14):e25392
- 16 Baioumy SA, Taha SI, Sallam DE, et al. Toll-like receptor-4 gene (Asp299Gly) polymorphism in allergic conjunctivitis. *Egypt J Immunol* 2022;29(1):1-12
- 17 王娟,程龙,李文静,等. 4种临床抗结核药物对 A549 细胞 TLRs 信号通路和炎症因子表达的影响. *中国免疫学杂志* 2021;37(6):718-724
- 18 Mosaad YM, Metwally SS, Farag RE, et al. Association between toll-like receptor 3 (TLR3) rs3775290, TLR7 rs179008, TLR9 rs352140 and chronic HCV. *Immunol Invest* 2019;48(3):321-332
- 19 El-Sharawy S, Negm OE, Abd-Elsalam S, et al. Study of toll-like receptor 3 gene polymorphism as a novel risk factor for HCV-related hepatocellular carcinoma in Egypt. *Curr Cancer Drug Targets* 2020;20(5):382-389
- 20 Güven M, Batar B, Mutlu T, et al. Toll-like receptors 2 and 4 polymorphisms in age-related macular degeneration. *Curr Eye Res* 2016;41(6):856-861
- 21 Zhu Y, Liang L, Qian D, et al. Increase in peripheral blood mononuclear cell Toll-like receptor 2/3 expression and reactivity to their ligands in a cohort of patients with wet age-related macular degeneration. *Mol Vis* 2013;19:1826-1833
- 22 Yang ZL, Stratton C, Francis PJ, et al. Toll-like receptor 3 and geographic atrophy in age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2008;359(14):1456-1463
- 23 Maloney SC, Anteck A, Orellana ME, et al. Choroidal neovascular membranes express toll-like receptor 3. *Ophthalmic Res* 2010;44(4):237-241
- 24 Xie WW, Yu QH, Wang LY, et al. Toll-like receptor 3 gene regulates cataract-related mechanisms via the Jagged-1/Notch signaling pathway. *Bioengineered* 2022;13(6):14357-14367