

TLR4 基因单核苷酸多态性与缺血性脑卒中再灌注损伤关系的 Meta 分析*

刘远兴¹, 王士中¹, 刘险辉², 谢运泉¹

(广东省梅州市人民医院:1. 检验科;2. 中心实验室, 广东梅州 514031)

摘要:目的 通过 Meta 分析评估 Toll 样受体 4(TLR4) 基因单核苷酸多态性(SNP)位点 rs10759932, rs11536891, rs11536879 与缺血性脑卒中再灌注损伤发生的关系, 旨在为预防缺血性脑卒中再灌注损伤发病提供循证医学依据。**方法** 检索 Medline、PubMed、EMBASE、Cochrane、CBM、中国期刊网、学术会议资料和学位论文等数据库, 全面收集关于缺血性脑卒中再灌注损伤与 TLR4 基因 SNP(rs10759932, rs11536891, rs11536879) 相关的队列研究和病例对照文献, 通过基因型之间的对比, 确定基因 SNP(rs10759932, rs11536891, rs11536879) 是否与缺血性脑卒中再灌注损伤发生相关。应用软件 Stata11.0 进行 Meta 分析, 异质性检验采用随机效应模型, 并计算其 OR 值, 为定量分析不同研究间的异质性, 采用固定效应模型, 并计算其变异性的百分比 I^2 。**结果** Meta 分析结果显示, 分析 1 943 例缺血性脑卒中再灌注损伤患者和 5 043 例对照组, TLR4 基因 SNP(rs10759932, rs11536891, rs11536879) 和缺血性脑卒中再灌注损伤的患病风险具有重要关联性, 其中显性固定效应模型分别为 $OR=1.653, 95\%CI:1.416\sim1.930$; $OR=1.653, 95\%CI:1.416\sim1.930$; $OR=1.653, 95\%CI:1.416\sim1.930$ 。共显性的固定效应模型分别为 $OR=1.525, 95\%CI:1.350\sim1.723$; $OR=1.653, 95\%CI:1.416\sim1.930$; $OR=1.653, 95\%CI:1.416\sim1.930$ 。**结论** 通过 Meta 分析得出 TLR4 基因 SNP(rs10759932, rs11536891, rs11536879) 与缺血性脑卒中再灌注损伤的发生相关。

关键词: 缺血性脑卒中; 再灌注损伤; Toll 样受体 4; 单核苷酸多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.11.008 **中图法分类号:**R394

文章编号:1673-4130(2018)11-1307-04

文献标识码:A

Meta-analysis on the relationship between single nucleotide polymorphisms of ILR4 gene and ischemic stroke reperfusion injury*

LIU Yuanxing¹, WANG Shizhong¹, LIU Xianhui², XIE Yunquan¹

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Core Laboratory, Meizhou People's Hospital, Meizhou, Guangdong 514031, China)

Abstract: Objective The relationship between toll like receptor 4 (TLR4) the single nucleotide polymorphisms of gene (SNP) and ischemic stroke reperfusion injury was evaluated by meta-analysis, which was designed to provide evidence-based medicine for the prevention of ischemic stroke reperfusion injury.

Methods In Medline, PubMed, EMBASE, Cochrane, CBM, Chinese Journal Net, academic conference materials and dissertations, we searched for comprehensive information on the relationship between TLR4 gene SNP (rs10759932, rs11536891, rs11536879) in ischemic stroke Cohort study and case-control literature to determine whether the gene SNP (rs10759932, rs11536891, rs11536879) was associated with ischemic stroke reperfusion injury by genotype comparison. The heterogeneity test was performed by Stata11.0. The heterogeneity test was used to calculate the OR value. The heterogeneity between different studies was analyzed quantitatively. The fixed effect model was used and the percentage I^2 was calculated. **Results** Meta analysis showed that 1 943 cases of ischemia-reperfusion injury and 5 043 cases of control group were analyzed, TLR4 gene SNP (rs10759932, rs11536891, rs11536879) was associated with the risk of ischemic stroke reperfusion injury, the dominant fixed effect models were ($OR=1.653, 95\%CI:1.416-1.930$; $OR=1.653, 95\%CI:1.416-1.930$; $OR=1.653, 95\%CI:1.416-1.930$); a co-dominant fixed effect model ($OR=1.525, 95\%CI:1.350-1.723$;

* 基金项目: 广东省医学科学技术研究基金(B2017102)。

作者简介: 刘远兴, 男, 副主任技师, 主要从事临床检验诊断学研究。

本文引用格式: 刘远兴, 王士中, 刘险辉, 等. TLR4 基因单核苷酸多态性与缺血性脑卒中再灌注损伤关系的 Meta 分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(11): 1307-1310.

OR=1.653, 95% CI: 1.416-1.930; OR=1.653, 95% CI: 1.416-1.930). **Conclusion** TLR4 gene SNP (rs10759932, rs11536891, rs11536879) was associated with the occurrence of ischemic stroke reperfusion injury by Meta-analysis.

Key words: ischemic stroke; reperfusion injury; toll like receptor 4; single nucleotide polymorphism

脑卒中是严重危害人类生命和健康的疾病,缺血性脑卒中仍然是导致死亡和残疾的主要原因,全球每年发患者数为 200 万,占有住院脑卒中患者的 10%~30%。急性脑梗死是因为脑动脉被血栓堵塞,在脑卒中急性期,患者能否尽早再次打通已经闭塞的血管^[1],在时间窗内恢复血管的血供与其预后密切相关,若得不到及时救治,则会诱发再灌注损伤^[2]。目前用于临床试验的溶栓剂有重组组织型纤溶酶原激活剂、链激酶、尿激酶,给药的途径包括局部动脉内灌注、静脉滴注及动静脉联合溶栓^[3]。目前由于脑出血的研究主要集中在脑出血急性期的治疗和预防出血再发,忽略了对缺血性卒中再灌注损伤的预防。有研究者对脑出血后缺血性卒中高危人群的药物治疗安全性研究发现,早期使用溶栓药物并未增加脑出血再发风险^[4]。缺血性卒中再灌注损伤与自身和外界共同作用,近年来研究发现 Toll 样受体 4(TLR4)基因单核苷酸多态性(SNP)的表达与缺血性卒中有着密切联系^[5]。为确定 TLR4 基因多态性在缺血性卒中再灌注损伤中的作用,本文通过 Meta 分析评估 TLR4 基因的基因多态性与缺血性卒中再灌注损伤的发生,旨在挖掘缺血性卒中再灌注损伤发生因素,同时也为脑出血后缺血性卒中再灌注损伤高危人群早期使用溶栓治疗的安全性和有效性提供循证医学证据。

1 资料与方法

1.1 资料来源 检索 Medline、PubMed、EMBASE、Cochrane、CBM、中国期刊网、学术会议资料和学位论文等数据库,全面收集 2001 年 1 月至 2017 年 5 月发表的有关 TLR4 基因多态性与缺血性脑卒中再灌注损伤发生的病例对照和队列研究文献,检索词包括 toll-like receptor 4, TLR4 genepolymorphism, TLR4, rs10759932, rs11536891, rs11536879, reperfusion injury, ischemic stroke, clots。

1.2 文献纳入标准与排除标准 纳入标准:(1)缺血

性脑卒中再灌注损伤的疾病诊断均符合世界卫生组织的诊断标准;(2)纳入的队列研究和病例对照研究均为原始数据,而不是引用文献;(3)所有的数据都是相关基因型的完整数据,可以提供进一步统计计算;(4)单一数据来自同一个种族、同一个时期;(5)患者进行随机选择,对一般资料没有严格的限制;(6)必须是研究年限内的文献;(7)每篇文献均有可提供的完整数据,可算出 OR 值和 95% CI,信息量充足。排除标准:(1)有合并其他系统疾病的研究数据;(2)队列研究没有提供详细信息的病例研究;(3)同一数据来源于不同种族人群以及时期;(4)病例数据样本量过少的队列研究和病例对照研究。

1.3 统计学处理 所有数据均由两个样本收集员进行收集评估,如果两个人不能达成共识,需要第三数据收集员进行确认,Stata11.0 软件作为本研究统计分析的主要软件,分别对缺血性脑卒中再灌注损伤的基因型和等位基因进行比较,统计标准以 OR 值表示,异质性分析以 OR 值来进行确定,异质性的比较显著性以 $P < 0.1$ 表示,随机效应模型运用 D-L 进行合并统计;异质性不显著以 $P > 0.1$ 表示,使用 M-H 固定效应模型对数据合并,为定量分析不同研究间的异质性,通过变异性的百分比 I^2 计算, $> 75\%$ 为异质性大, $> 56\% \sim 75\%$ 为异质性显著, $25\% \sim 56\%$ 为异质性适中, $< 25\%$ 为异质性低。

2 结果

2.1 研究特点识别和选择研究进展的综述 共有 3 项与缺血性脑卒中再灌注损伤 TLR4 基因 rs10759932、rs11536891、rs11536879 位点多态性研究符合纳入该项研究的条件^[6-15]。所有 3 项研究均为病例对照研究,包括 1 943 例缺血性脑卒中再灌注损伤患者和 5 043 例对照组,见表 1。rs10759932、rs11536891、rs11536879 分析显示见表 1。

表 1 TLR4 SNP(rs10759932,rs11536891,rs11536879)表达情况(n)

作者	发表年份	样本量		rs10759932 表达		rs11536891 表达		rs11536879 表达	
		缺血性脑卒中再灌注损伤	对照组	缺血性脑卒中再灌注损伤	对照组	缺血性脑卒中再灌注损伤	对照组	缺血性脑卒中再灌注损伤	对照组
ENQUOBAHRIE 等 ^[6]	2008 年	368	2 682	256	536	236	202	295	162
WEINSTEIN 等 ^[7]	2014 年	886	1 236	651	269	696	139	712	128
BECKER 等 ^[8]	2015 年	689	1 125	496	365	496	96	523	102
P				0.024		0.016		0.026	
OR				1.867		2.598		1.762	

2.2 Meta 分析结果 荟萃分析结果显示,TLR4 SNP (rs10759932、rs11536891、rs11536879) AA 和 AG 型与缺血性脑卒中再灌注损伤的患病风险具有重要关联性,其中显性固定效应模型分别为 $OR = 1.653, 95\% CI = 1.416 \sim 1.930$; $OR = 1.759, 95\% CI = 1.425 \sim 1.987$; $OR = 1.689, 95\% CI = 1.854 \sim 1.854$ 。共显性的固定效应模型分别为 $OR = 1.541, 95\% CI = 1.484 \sim 1.755$; $OR = 1.684, 95\% CI = 1.474 \sim 1.944$; $OR = 1.845, 95\% CI = 1.674 \sim 1.985$, 研究结果提示缺血性脑卒中再灌注

损伤的易感基因为 TLR4 SNP (rs10759932、rs11536891、rs11536879), 结论差异有统计学意义 ($P = 0.000$), 研究来源的异质性和敏感分析显示, 单变量的多元回归分析, 校正出版年、年龄和种族, 协变量无显著的统计学差异。经过进一步排除研究的关键因素非均质性、异质性低 ($I^2 < 50\%$) 中发现的上述遗传模型基于初步分类 I^2 值, TLR4 SNP (rs10759932、rs11536891、rs11536879) 和缺血性脑卒中再灌注损伤具有敏感性, 见表 2。

表 2 荟萃分析 TLR4 SNP(rs10759932、rs11536891、rs11536879) AA 和 AG 型与缺血性脑卒中再灌注损伤的患病风险

TLR4 SNP	基因型	缺血性脑卒中再灌注损伤	对照组	FEM [OR(95% CI)]	REM [OR(95% CI)]	P	I ²
rs10759932	AA	563	486	1.477(1.336~1.633)	1.384(1.062~1.804)	0.016	79.60
	AG	840	684	1.360(1.149~1.610)	1.246(0.912~1.703)	0.168	61.40
rs11536891	AA	623	206	1.497(1.161~1.930)	1.465(0.992~2.165)	0.055	42.10
	AG	805	231	1.525(1.350~1.723)	1.525(1.350~1.723)	0.000	0.000
rs11536879	AA	785	156	1.497(1.161~1.930)	1.465(0.992~2.165)	0.055	42.10
	AG	745	236	1.525(1.350~1.723)	1.525(1.350~1.723)	0.000	0.000

注: FEM 为固定效应模型; REM 为随机效应模型

2.3 TLR4 SNP(rs10759932、rs11536891、rs11536879) 与缺血性脑卒中再灌注损伤发生的关系 采用 D-L 随机效应模型进行数据合并, 敏感性分析需排除不符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律的文献, 进一步关键因素之间的异质性代表 OR 值, 采用固定效应模型, 结果显示, $95\% CI = -1.33 \sim -11.24, P = 0.01$ 。

3 讨论

目前, 大量研究提示缺血性脑卒中是脑部缺血缺氧导致的脑组织缺血性坏死和脑软化, 包括腔隙性梗死、脑栓塞及脑血栓形成^[9]。再灌注损伤主要的病理表现为缺血半暗带组成了急性脑梗死的病灶, 缺血半暗带相对耐受时间较长, 梗死区很快发生坏死, 尽快恢复部分的血流, 挽救这些尚未坏死的组织是治疗关键^[10]。研究已证实, 国内外认可的治疗急性脑梗死的一个有效的治疗方案, 迅速恢复缺血半暗带的血液供应, 在有效时间窗内使闭塞的血管再通, 挽救脑组织, 使其存活下来并恢复正常的生理功能^[11]。因此, 近年来研究者把目光集中到了研究缺血性脑卒中再灌注损伤的易感基因上。自从分子生物学技术的不断提高和广泛应用, 很多学者都希望从分子学角度上阐明该疾病的发病机制, 进一步丰富该病的诊疗手段, 达到预防和控制这一世界性难题的目的, 若该病的研究能取得突破性进展, 将是人类未来的福音^[12]。

随着研究的深入发现, 从基因多态性的研究上着手才能充分地阐明其作用机理, 每一个基因的变异对该病的风险都有一定的作用, 累积作用效应导致疾病的发生^[13]。近年来随着基因芯片技术的不断深入, 测

序研究已经趋向成熟, 给基因多态性与疾病的关系研究带来了很大帮助, 为找到影响缺血性脑卒中再灌注损伤的基因靶标提供了技术支持, 越来越多的基因分型被发现, 为基因治疗提供了依据^[14]。令人鼓舞的是, 在所有已发现的基因中, TLR4 是迄今为止发现的对缺血性脑卒中再灌注损伤影响最大的基因^[15]。

TLR4 是与炎症密切相关的细胞因子, 基因全长为 216.86 kb, 位于 9q11.7, 参与脑卒中后的炎症性脑损伤发病过程, 如蛛网膜下腔出血、脑梗死, 有研究证实, 通过抑制 TLR4 信号通路可减轻炎症性脑损伤^[16]。近 10 年, 研究者把对于该基因的研究放在了缺血性脑卒中再灌注损伤的基因分子学研究上面, 研究发现 TLR4 基因可以通过 TRIF 信号通路调节机体内炎症因子的释放。越来越多的研究发现, 该信号通路与脑卒中后炎症表达及脑细胞损伤方面关系密切, 再灌注脑损伤之后细胞释放热休克蛋白等能激发 TLR4 介导的炎性反应, 进一步损伤神经元发生热休克蛋白 60, 从而激活更多的神经毒性受体形成恶性循环, 脑卒中所致的脑损伤机制研究发现 TLR4 在其中发挥着重要的作用^[17]。

在 TLR4 基因多态性与缺血性脑卒中再灌注损伤发病风险相关的研究方面, 有学者进行了一项连锁不平衡分析, 对缺血性脑卒中再灌注损伤患者与健康人群的基因多态性对比研究发现, TLR4 SNP (rs10759932、rs11536891、rs11536879) 与缺血性脑卒中再灌注损伤的发病之间具有密切的关联; 研究通过进一步的基因芯片定位技术, 对具有该基因型特异性

片段进行标记,发现 AA 和 AG 型位点与缺血性脑卒中再灌注损伤的关联程度具有相关性^[18]。

随着基因检测技术的不断完善以及缺血性脑卒中再灌注损伤关注的不断提高,积累了很多临床研究数据,世界范围内对缺血性脑卒中再灌注损伤的基因型分析进了大量的研究,对其数据进行整理有助于更好地为该病寻找易感基因提供循证医学依据。笔者通过资料的全面收集发现,TLR4 基因的多态性是一直认为与缺血性脑卒中再灌注损伤关联性最大的基因。虽然说种族差异在疾病的基因型上有一定的差异,但是纵观几项大规模的多中心临床研究,临床检验结果一致认为 TLR4SNP(rs10759932、rs11536891、rs11536879)与缺血性脑卒中再灌注损伤密切相关。本文通过 Meta 分析,全面收集 TLR4SNP(rs10759932、rs11536891、rs11536879)与缺血性脑卒中再灌注损伤的关联性相关文献,采用合并同类研究增加统计效率的方法,各位点的 AA 和 AG 型与缺血性脑卒中再灌注损伤的关联性。研究分析的结果显示,缺血性脑卒中再灌注损伤基因与 AA 和 AG 型缺血性脑卒中再灌注损伤发生相关,但是入选文献的地区病例数之间以及对照组之间的种族不同,对照匹配之间存在一定的同质性差异,所以在分析中还需要把握此方面系统误差,本研究分析从一定程度上给缺血性脑卒中再灌注损伤基因学研究提供了有价值的参考依据。

参考文献

- [1] 王拥军. 2014 卒中领域热点研究年中盘点[J]. 实用心脑血管病杂志, 2014, 3(9): 17.
- [2] 杨伟业, 陈康宁, 史树贵, 等. 急性缺血性脑卒中短期强化内科治疗的早期再灌注特点[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(9): 921-924.
- [3] 严晓波, 张圣, 严慎强, 等. 不同严重程度急性缺血性卒中患者静脉溶栓预后的影响因素分析[J]. 浙江大学学报(医学版), 2015, 44(1): 54-60.
- [4] 林佳才, 伍思婷, 孙婷婷. 急性缺血性脑卒中溶栓后强化灌注治疗的临床疗效分析[J]. 医学临床研究, 2015, 11(3): 521-524.
- [5] 黄镗, 宋海庆, 吉训明, 等. 院前预通知对急性缺血性卒中患者静脉溶栓治疗院内延误的影响[J]. 中国脑血管病杂志, 2016, 13(4): 182-186.
- [6] ENQUOBAHRIE D A, SMITH N L, BIS J C, et al. Cholesterol ester transfer protein, interleukin-8, peroxisome proliferator activator receptor alpha, and Toll-like receptor 4 genetic variations and risk of incident nonfatal myocardial infarction and ischemic stroke[J]. Am J Cardiol, 2008, 101(12): 1683-1688.
- [7] WEINSTEIN J R, SCHULZE J, LEE R V, et al. Functional polymorphisms in toll-like receptor 4 are associated with worse outcome in acute ischemic stroke patients[J]. Neuroreport, 2014, 25(8): 580-584.
- [8] BECKER K, KOHEN R, LEE R, et al. Poststroke fatigue: hints to a biological mechanism[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2015, 24(3): 618-621.
- [9] VERMEER S E, ALGRA A, FRANKE C L, et al. Long-term prognosis after recovery from primary intracerebral hemorrhage[J]. Neurology, 2002, 59(2): 205-209.
- [10] ECKMAN M H, ROSAND J, KNUDSEN K A, et al. Can patients be anticoagulated after intracerebral hemorrhage? A decision analysis[J]. Stroke, 2003, 34(7): 1710-1716.
- [11] DIENER H C, SAVI P. Clopidogrel for the secondary prevention of stroke [J]. Expert Opin Pharmacother, 2005, 6(5): 755-764.
- [12] WU J, YANG X, ZHANG Y F, et al. Angiotensin II up-regulates Toll-like receptor 4 and enhances lipopolysaccharide-induced CD40 expression in rat peritoneal mesothelial cells[J]. Inflamm Res, 2009, 58(8): 473-482.
- [13] NIEDZIELSKA E, WECLAWEK-TOMPOL J, MATKOWSKA-KOCJAN A, et al. The influence of genetic RFC1, MS and MTHFR polymorphisms on the risk of acute lymphoblastic leukemia relapse in children and the adverse effects of methotrexate[J]. Adv Clin Exp Med, 2013, 22(4): 579-584.
- [14] ZHAO J, TANG H D, SUN J L, et al. Analysis of cognitive dysfunction with silent cerebral infarction: a prospective study in Chinese patients[J]. Metab Brain Dis, 2012, 27(1): 17-22.
- [15] KUSTER G W, BUENO ALVES M, CENDOROGLO NETO M, et al. Determinants of emergency medical services use in a Brazilian population with acute ischemic stroke[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2013, 22(3): 244-249.
- [16] CAPRIE STEERING COMMITTEE. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee[J]. Lancet, 1996, 348(938): 1329-1339.
- [17] 邵自强, 赵雪梅, 焦劲松, 等. 脑出血后遗症患者应用阿司匹林预防脑缺血事件的初步研究[J]. 中国全科医学, 2011, 14(14): 1543-1544.
- [18] KIM Y S, PARK S S, BAE H J, et al. Stroke awareness decreases prehospital delay after acute ischemic stroke in Korea[J]. BMC Neurol, 2011, 11(1): 2.

(收稿日期: 2017-12-16 修回日期: 2018-02-26)