

· 论著 ·

胃幽门螺杆菌感染与 TLR4 基因 G11367C、NADPH 氧化酶基因 His72Tyr 多态性的交互作用和特发性成年骨质疏松症的关系

张超贤^{1*} 郭李柯² 侯文根³ 秦咏梅¹

1. 新乡医学院第一附属医院消化内科, 河南 卫辉 453100

2. 新乡医学院第一附属医院口腔科, 河南 卫辉 453100

3. 新乡医学院第一附属医院骨科, 河南 卫辉 453100

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 05-0515-09

摘要: 目的 探讨胃幽门螺杆菌(*H. Pylori*)感染与 TLR4 基因 G11367C、NADPH 氧化酶基因 His72Tyr 多态性的交互作用和特发性成年骨质疏松症(IOIA)的关系。方法 选择我院2011年5月至2015年7月收治的IOIA患者160例,以160例健康体检者作为对照组,两组在年龄、性别、民族、籍贯和生活习惯方面无显著性差异,以上述各组患者的外周血白细胞为样本,利用PCR-RFLP技术检测了TLR4基因G11367C和NADPH氧化酶基因His72Tyr多态性。采用¹⁴C-尿素呼气试验法(¹⁴C-UBT)检测受检者,*H. Pylori*与¹⁴C结合的每分钟衰变数(DPM)以判断*H. Pylori*感染情况。每位研究对象进行问卷调查,采用非条件 Logistic 分析,估算G11367C、His72Tyr多态性和*H. Pylori*感染与LSCC发病风险的调整比值比(OR)及95%可信区间(95% CI),并分析G11367C、His72Tyr多态性与*H. Pylori*感染的交互作用。结果 G11367C(GC)、His72Tyr(HT)和His72Tyr(TT)基因型频率分布在IOIA组分别为70.62%、35.00%和36.25%,在对照组分别为28.12%、13.12%和13.75%,两组之间有显著差异(P 均 <0.01)。G11367C(GC)基因型者患IOIA的风险均显著增加($OR=6.1442$),His72Tyr(HT)和His72Tyr(TT)基因型者患IOIA的风险也显著增加($OR=6.7773$, $OR=6.4737$)。基因突变的协同分析发现G11367C(GC)/His72Tyr(TT)基因型者频率在IOIA组和对照组的分布频率分别为25.63%和3.75%,经 χ^2 检验在两组之间有显著性差异($P<0.01$)。G11367C(GC)/His72Tyr(TT)基因型者患IOIA的风险显著增加($OR=39.5731$),G11367C(GC)和His72Tyr(TT)基因型在IOIA发生、发展存在正向的交互作用($\gamma_2=2.0887$, $\gamma_3=1.9856$),另外G11367C(GC)和His72Tyr(HT)之间也存在正向交互作用($\gamma>1$)。100 $\leq$ DPM <500 和DPM ≥ 500 的*H. Pylori*感染者频率分布在IOIA组分别为28.75%和40.63%,在对照组分别为15.63%和11.87%,上述*H. Pylori*感染状况频率在IOIA组与对照组之间均有显著差异(P 均 <0.01)。100 $\leq$ DPM <500 和DPM ≥ 500 的*H. Pylori*感染者患IOIA的风险性均明显增高($OR=4.4463$; $OR=8.0238$),而DPM ≥ 500 的*H. Pylori*感染者患LSCC的风险性则又明显高于100 $\leq$ DPM <500 的*H. Pylori*感染者($P<0.01$)。*H. Pylori*感染与G11367C(GC)、His72Tyr(HT)和His72Tyr(TT)基因型与均有正向交互作用(γ 均大于1)。结论 携带G11367C(GC)、His72Tyr(HT)和His72Tyr(TT)基因型的个体属IOIA高危人群,这些基因型和*H. Pylori*感染的交互作用促进了IOIA的发生、发展,应当采取根除*H. Pylori*或调控基因表达的措施以达到有效预防IOIA的目的。

关键词: 特发性成年骨质疏松症(IOIA);TLR4基因G11367C;NADPH氧化酶基因His72Tyr;胃幽门螺杆菌(*H. Pylori*)感染;多态现象

Relationship between the interaction of gastric helicobacter pylori infection and polymorphism of TLR4 gene G11367C and NADPH oxidase gene His72Tyr and the idiopathic osteoporosis in adults

ZHANG Chaoxian¹, GUO Like², HOU Wengen³, QIN Yongmei¹

1. Department of Gastroenterology

2. Department of Stomatology

3. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan, China

Corresponding author: ZHANG Chaoxian, Email: g75zh@aliyun.com

基金项目: 河南省教育厅科研基金资助项目(2011A320015)

* 通讯作者: 张超贤, Email: g75zh@aliyun.com

Abstract: Objective To investigate the interaction of gastric helicobacter pylori (H. Pylori) infection and polymorphism of toll-like receptor4 (TLR4) gene G11367C and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase gene His72Tyr in idiopathic osteoporosis in adults (IOIA). **Methods** A total of 160 IOIA cases and 160 healthy controls in our hospital from May 2011 to July 2015 were selected. No significant difference between the two groups in age, gender, ethnicity, and place of birth was observed. The genetic polymorphisms of TLR4 gene G11367C and NADPH oxidase gene His72Tyr were analyzed using PCR-RFLP in peripheral blood leukocytes from the cases. ^{14}C -urea breath test (^{14}C -UBT) was used to test ^{14}C disintegration per minute (DPM) for evaluating the infection H. Pylori. Eligible participants were personally interviewed using a questionnaire. Unconditional logistic regression model and single factor analysis were performed to calculate the adjusted odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) of G11367C and His72Tyr polymorphisms and H. Pylori infection, respectively, and to analyze the interaction between nucleotide polymorphisms and H. Pylori infection. **Results** The frequencies of G11367C (GC), His72Tyr (HT), and His72Tyr (TT) were 70.62%, 35.00%, and 36.25% in IOIA group, and 28.12%, 13.12%, and 13.75% in control group, respectively. The difference between the two groups was significant ($P < 0.01$). The risk of IOIA significantly increased in subjects with G11367C (GC) genotype (OR = 6.1442), His72Tyr (HT) genotype (OR = 6.7773), and His72Tyr (TT) genotype (OR = 6.4737). Combined analysis of the polymorphisms showed that the percentage of G11367C (GC)/His72Tyr (TT) in IOIA and control groups was 25.63% and 3.75%, respectively, with significant difference between the two groups ($P < 0.01$). The people who carried with G11367C (GC)/His72Tyr (TT) had a high risk of IOIA (OR = 39.5731), and statistical analysis suggested a positive interaction between G11367C (GC) and His72Tyr (TT) in increasing the risk of IOIA ($\gamma_2 = 2.0887$, $\gamma_3 = 1.9856$). Likewise, there was also positive interaction in the pathogenesis of IOIA between G11367C (GC) and His72Tyr (HT) ($\gamma > 1$). The frequencies of $100 \leq \text{DPM} < 500$ and $\text{DPM} \geq 500$ were 28.75% and 40.63% in IOIA group, and 15.63% and 11.87% in control group, respectively. The difference between the two groups was significant ($P < 0.01$). The risk of IOIA significantly increased in subjects with $100 \leq \text{DPM} < 500$ (OR = 4.4463) and in those with $\text{DPM} \geq 500$ (OR = 8.0238). The IOIA incidence of $\text{DPM} \geq 500$ was significantly higher than that of $100 \leq \text{DPM} < 500$ ($P < 0.01$). Statistical analysis suggested a positive interaction between H. Pylori infection and G11367C (GC), His72Tyr (HT), and His72Tyr (TT) in increasing the risk of IOIA ($\gamma > 1$). **Conclusion** These carriers of G11367C (GC), His72Tyr (HT), and His72Tyr (TT) genotypes may have a high risk of developing IOIA. These gene genotypes can interact with H. pylori infection in the pathogenesis of IOIA. Therefore, effective prevention measures for IOIA should consider eradicating H. Pylori or regulating gene expression.

Key words: Idiopathic osteoporosis in adults; Toll-like receptor4 gene G11367C; Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase gene His72Tyr; Gastric helicobacter pylori infection; Polymorphism

特发性成年骨质疏松症 (idiopathic osteoporosis in adult, IOIA) 是一种发生在成年女性闭经前, 男性在 60 岁前而没有明显诱因的全身骨代谢疾病, 表现为成年人骨量低下和骨的微细结构破坏、导致骨的脆性增加易发生骨折为特征的系统的全身性骨病, 严重危害公众的健康^[1]。IOIA 病因和发病机制尚未完全明确, 目前认为炎症反应、胰岛素抵抗和活性氧自由基损伤在 IOIA 发病中起重要作用, 并与环境因素、遗传因素密切相关^[2,3]。幽门螺杆菌 (Helicobacter pylori, H. pylori) 作为消化系统最常见的感染细菌之一, 其在慢性活动性胃炎消化性溃疡胃黏膜相关淋巴组织 (MALT) 淋巴瘤和胃癌等中的致病作用已得到证实 近年研究还发现, H. pylori 感染不仅与胃肠疾病相关, 而且与一些胃肠以外的疾病也存在密切的相关性, 可通过影响血脂代谢、胰岛素抵抗、炎症反应和氧化应激来参与 IOIA 的发生、发展^[4]。Toll 样受体 4 (toll-like receptor4,

TLR4) TLR4 是第一个被发现的 Toll 样受体, 几乎存在于所有细胞表面, 包括肝脏、脂肪组织、骨骼肌等, 主要通过 TLR4/核转录因子- κB (NF- κB) 通路调控炎症因子的表达, 继而调节胰岛素敏感性, 影响胰岛素抵抗的发生。在基因突变或其他因素作用下, TLR4/NF- κB 通路异常激活, 导致炎症因子大量释放和胰岛素敏感性下降, 促进 IOIA 的发生、进展^[5]。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶是机体产生活性氧自由基的关键酶, 其活性变化将直接影响机体活性氧自由基水平, 在 IOIA 的发生、发展中发挥重大作用^[6]。TLR4、NADPH 氧化酶基因具有多态性, 即具有多个等位基因, 不同的等位基因编码的 TLR4 或 NADPH 氧化酶活性有差异。TLR4 或 NADPH 氧化酶基因的多态性可使机体对外界环境 (如 H. pylori 感染) 的反应能力有所不同, 这是决定机体 IOIA 易感性的一个重要因素。TLR4、NADPH

氧化酶基因多态性与 IOIA 易感性的研究日渐增多,但尚未见 *H. pylori* 感染与上述基因多态性的联合作用对 IOIA 易感性影响的报道。为了研究 TLR4、NADPH 氧化酶在当地人群中的分布状态,进而探索其和 *H. pylori* 感染相互作用与 IOIA 高发的关系,我们在国内首次开展了 TLR4 和 NADPH 氧化酶联合基因多态性与 IOIA 易感性关系的研究。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集 2011 年 5 月~2015 年 7 月在我院门诊和病房收治的 IOIA 确诊患者 160 例,无甲状腺、甲状旁腺、肾上腺病变者,不合并严重肝、胆、肾等疾病和类风湿性关节炎、营养缺乏性疾病及其它引发骨质疏松疾病和因素,不合并免疫系统疾病,纳入研究时均为第一次就诊,未经任何药物和手术治疗,IOIA 的诊断参照中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会 2011 年制定的原发性骨质疏松症诊治指南(2011 年)^[7]。对照组为 160 例同期健康体检者,两组按照年龄(± 3)、性别、居住地进行 1:1 配对,均为豫北居民或在豫北 10 年及以上,各组性别比(男:女)均为 97:63 例;IOIA 组年龄 19~50 岁,平均(38.27 ± 7.46)岁;对照组年龄 18~49 岁,平均(38.32 ± 10.64)岁。两组在年龄、性别、民族和籍贯统计学处理差异无显著性,无血缘关系。采用统一的流行病学调查表,由经过专门培训的调查员对病例和对照组进行询问调查,收集研究对象的一般情况、健康相关行为、吸烟、饮酒、饮食习惯、运动情况、疾病史。饮食因素主要包括:饮食习惯、碳水化合物、蔬菜水果、肉类、蛋类、油脂、家禽内脏、家畜内脏、煎炸食品等。饮食调查采用询问法,对主要膳食因素详细记录并折算成各种食物成分摄入量和产热量。饮食状况分为低脂饮食、高脂饮食(饮食中脂肪的产热量占总热量百分比超过 25% 持续 1 年以上定义为高脂饮食),吸烟状况本文分为不吸烟者、吸烟者(将每天至少吸 1 支烟,持续半年以上定义为吸烟者)。饮酒定义为饮酒折合乙醇量男性大于 140g/周(女性 > 70g/周),持续半年以上。

1.2 *H. pylori* 检测

¹⁴C-UBT 试剂盒由深圳市中核海得威生物科技有限公司提供,所有待用试剂的配制均按试剂盒说明书进行。检测仪器为 HUBT-01 卡式幽门螺杆菌检测仪(深圳市中核海得威生物科技有限公司)。患者在清晨空腹时或至少禁食 6 h 以后受试,受试

前漱口,口服¹⁴C-尿素胶囊一粒,嘱受试者整粒服下,20 ml 温水送服,不得咬碎胶囊,3 min 后再饮水 20 ml,然后静坐 15~20 min,等待采样。开启 CO₂ 吸收剂一瓶,倾入一洁净的液闪瓶内,嘱受试者通过吹气导管向 CO₂ 吸收剂徐徐吹气,不能倒吸入嘴内,力度适中,避免液体溅出,当 CO₂ 吸收剂的紫红色褪尽变为无色透明时,停止吹气。此时 CO₂ 吸收剂刚好吸收到所需的 CO₂ 采样量。向已采集呼气样品的液闪瓶内加入稀闪烁液 4.5 ml,摇匀,测量样品每分钟衰变数(disintegration per minute, DPM),以试剂盒提供的 DPM ≥ 100 为阳性标准,本研究将 *H. Pylori* 感染状况分为未感染者(DPM < 100)、100 $\leq$ DPM < 500 感染者和 DPM ≥ 500 感染者。

1.3 标本采集

每人各抽取静脉血 2~3 ml,置乙二胺四乙酸钠抗凝管,分离白细胞层。用 QIAampDNA 提取试剂盒提取白细胞 DNA,DNA 置 -30℃ 低温冰箱保存备用。

1.4 基因测定

1.4.1 TLR4 基因 G11367C 基因型检测^[8]:采用单管双向等位基因特异性扩增技术对 TLR4 基因 G11367C 进行基因分型,引物序列为:外引物上游引物 5'-: GTCATTCCAAAGTTATTGC CTACTAAG 3',下游引物 5'-GTGATATCTCATTGTGGTTTTATTTC-3';内引物上游引物 5'-: TAAACCCGGGGTGACCTCATGAAATCAG 3',下游引物 5'-TCTGAAAAAATAAACTTCTGCTGCTAG-3'。PCR 反应体系包括:基因组 DNA 1 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,Taq DNA 聚合酶 Mix 液 12.5 μ L。反应条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 40 s,68℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 40 s,20 个循环,每个循环下降 0.5℃,直到最适退火温度 58℃,再进行 95℃ 变性 40 s,58℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s,共 10 个循环。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,goldenview 核酸染料染色,紫外透射凝胶成像系统确定可见 3 种带型:TLR4 基因 G11367C(GG)纯合子基因型个体显示为 398 和 599bp 两条 DNA 带,TLR4 基因 G11367C(GC)杂合子基因型个体显示 257、398 和 599bp 三条 DNA 带,在各组中均未发现突变纯合子 CC 基因型(图 1)。每组随机抽取 15 个初步确定了基因型的样本,用 PCR 扩增后,送上海生工生物工程技术服务公司进行 DNA 序列测定进行验证,获得了 100% 的一致。

1.4.2 NADPH 氧化酶基因 His72Tyr 多态性分析^[9]:引物序列为:上游引物 5'TGCTTGTGGTA

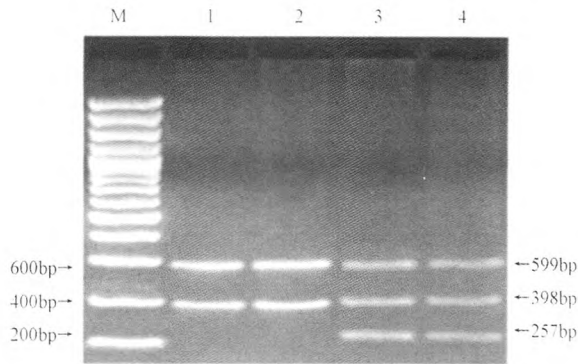


图 1 TLR4 基因 G11367C PCR 产物检测

Fig. 1 The electrophoretogram of PCR products of TLR4 gene G11367C.

M: Marker; 1, 2: GG; 3, 4: GC

AACCAAGGCCGGTG3', 下游引物: 5' AACACTGAG GTAAGTGGGGGTGGCTCCTGT', 由上海生工生物技术有限公司合成。应用 TaKaRa PCR Amplification Kit(大连宝生物工程有限公司) PCR 试剂盒在 25 μ L PCR 反应体系中进行基因组 DNA 扩增, 0.5 μ g DNA 基因组 DNA, 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, 含 MgCl₂ 1.5 μ L (25 mol/L), 2dNTP Mixture 2 μ L, TaKaRa Taq DNA 聚合酶 0.125 μ L (5 U/ μ L), 引物各 1 μ L (10 pmol/L), 灭菌去离子水 17.375 μ L。PCR 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65 $^{\circ}$ C 3 min, 70 $^{\circ}$ C 1 min, 33 个循环, 最后 70 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增后的基因片段为 348bp。取 12 μ L 的 PCR 反应产物与限制性内切酶 Rsa I (NEB 公司) 于 37 $^{\circ}$ C 温浴过夜。酶切产物经 3.5% 琼脂糖凝胶电泳 (含 0.5 μ g/ml 溴乙锭) 进行分析, His72Tyr(HH) 纯合子基因型个体显示 1 条 348bp 长的 DNA 片段, His72Tyr(TT) 纯合子基因型个体显示 188bp 和 160bp 两条区带, His72Tyr(HT) 杂合子基因型个体则显示 348bp、188bp 和 160bp 的 3 条区带 (图 1)。

对于上述 PCR 酶切法的结果, 每组随机抽取了 20 个样本用 PCR-单链构象多态性 (PCR-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 方法进行了验证, 扩增片段 614bp, 上游引物 5'-TGGGGAA GTCGACTGCCT-3', 下游引物 5'-CAGTGGTAGCAGTGAATGAAC-3', 应用从 65 $^{\circ}$ C 开始, 每循环下降退火温度 0.5 $^{\circ}$ C, 30 个循环后在 50 $^{\circ}$ C 退火温度上再进行 15 个循环。PCR 产物用 12% 聚丙烯酰胺凝胶循环水冷 35 W 恒功率电泳

5 h (Bio-Rad 伯乐公司 Mini-PROTEAN Tetra Cell 电泳槽), 银染后与 PCR 酶切法的分型结果进行比对, 获得了 100% 的一致。

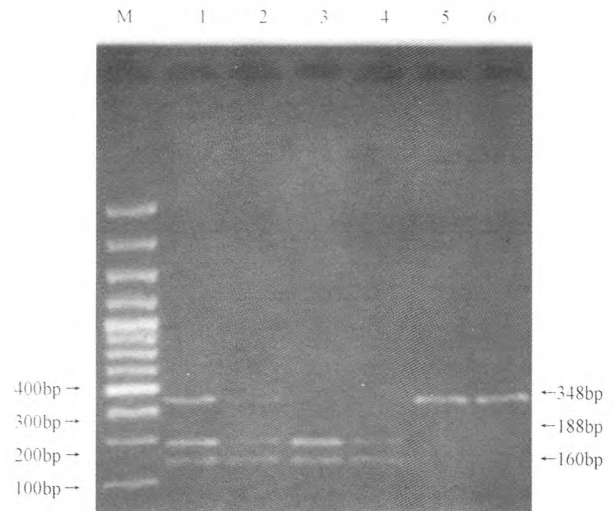


图 2 NADPH 氧化酶基因 His72TyrPCR 产物检测

Fig. 2 The electrophoretogram of PCR products of NADPH oxidase gene His72Tyr.

M: Marker; 1, 2: HT; 3, 4: TT; 5, 6: HH

1.5 统计方法

Hardy-Weinberg 平衡检验研究样本的群体代表性, 以 $P > 0.05$ 为符合 Hardy-Weinberg 规律。用比值比 (OR) 值和 95% 可信区间 (95% CI) 评价相对风险, 病例组和对照组之间的基因型频率和等位基因频率采用 χ^2 检验检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。非条件 logistic 回归模型分析交互作用。根据 Khoury 和 Wagener 提出的交互作用模型和交互系数 ($\gamma = \beta_{eg}/\beta_e$) 判断基因-环境交互作用模型以及交互作用类型^[10]。判定依据 1: $\gamma > 1$, 表示基因对环境暴露的效应有放大作用, 正向交互作用; $\gamma < 1$, 表示基因对环境暴露的效应有减弱作用, 负向交互作用; $\gamma = 1$, 表示基因对环境暴露没有交互作用。在病例对照研究中, γ 为两变量 lgOR 的比值。判定依据 2: $OR_{eg} = OR_e \times OR_g$ 为相乘模型; $OR_{eg} > OR_e \times OR_g$ 为超相乘模型; $OR_{eg} < OR_e \times OR_g$ 为次相乘模型; $OR_{eg} = OR_e + OR_g - 1$ 为相加。

2 结果

2.1 IOIA 组和对照组的一般资料分析

IOIA 组和对照组性别、年龄分布差异无显著性意义 ($P > 0.05$); IOIA 组高脂饮食率、吸烟率和饮酒率均显著高于对照组 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 IOIA 组和对照组的一般资料
Table 1 General information of IOIA and control group

指标	对照组 Control group	IOIA 组 IOIA group	P
性别 (Gender) [n(%)]			0.2143
男 (Male)	97 (60.63%)	97 (60.63%)	
女 (Female)	63 (39.37%)	63 (39.37%)	
年龄 (岁) [Age (year)]	38.27 ± 7.46	38.32 ± 10.64	0.2835
饮食习惯 (Diet status)			0.0068
低脂饮食 (Low-fat diet)	129 (80.63%)	84 (52.50%)	
高脂饮食 (High-fat diet)	31 (18.37%)	76 (47.50%)	
饮酒状况 (Drinking status)			0.0075
不饮酒 (No)	125 (78.13%)	86 (53.75%)	
饮酒 (Yes)	35 (21.87%)	74 (46.25%)	
吸烟状况 (Smoking status)			0.0212
不吸烟 (No)	105 (65.63%)	83 (51.88%)	
吸烟 (Yes)	55 (34.37%)	77 (48.12%)	

2.2 IOIA 易感性与 H. pylori 感染的相关性分析

100 ≤ DPM < 500 和 DPM ≥ 500H. pylori 感染者频率分布在 IOIA 组分别为 28.75% 和 40.63%，在对照组分别为 15.63% 和 11.87%，上述 H. pylori 感染状况频率在 IOIA 组与对照组之间均有显著差

异 (P 均 < 0.01)。100 ≤ DPM < 500 和 DPM ≥ 500H. pylori 感染者患 IOIA 的风险性均明显增高 (OR = 4.4463, OR = 8.0238)，而 DPM ≥ 500H. pylori 感染者患 LSCC 的风险性则又明显高于 100 ≤ DPM < 500H. pylori 感染者 (P < 0.01) (表 2)。

表 2 IOIA 易感性与 H. pylori 感染的相关性分析
Table 2 Correlation analysis between IOIA susceptibility and H. pylori infection

H. pylori 感染状况 H. pylori infection status	IOIA 组 IOIA group	对照组 Control group	OR*	95% CI	P
无感染 (Non-infection)	49 (30.62%)	116 (72.50%)	1.00		
100 ≤ DPM < 500	46 (28.75%)	25 (15.63%)	4.4463	2.5080 - 7.2174	0.0082
DPM ≥ 500	65 (40.63%)	19 (11.87%)	8.0238*	4.4775 - 11.219	0.0067

*: 按照性别、年龄、饮食习惯、饮酒和吸烟状况调整; 与 100 ≤ DPM < 500 相比, *P < 0.01

*: adjusted according to gender, age, diet status, drinking status and smoking status *P < 0.01 vs 100 ≤ DPM < 500

2.3 TLR4 基因 G11367C 和 NADPH 氧化酶基因-C242T 基因型和等位基因频率关联分析

经 Hardy-Weinberg 平衡检验, TLR4 基因 G11367C 各基因型在对照组中的分布均符合 Hardy-Weinberg 规律 (P > 0.05), 说明研究群体具有代表性 (见表 3)。GG 和 GC 基因型频率在病例组和对照组差异有显著性 (P < 0.01); 等位基因 C 在 IOIA 组和对照组之间的分布差异具有统计学意义 (P <

0.01), 且 OR 值大于 1, 说明含等位基因 C 的个体发生 IOIA 的风险相对较高; 两位点的不同基因型在病例、对照组之间的分布差异均具有统计学意义 (P < 0.01)。结果表明: TLR4 基因 G11367C (G → C 突变) 可能增加 IOIA 的患病风险 (表 2)。NADPH 氧化酶基因 His72Tyr 3 种基因型、等位基因频率亦符合上述规律 (表 4)。

表 3 TLR4 基因 G11367C 基因型与等位基因分布
Table 3 Distribution of polymorphisms of TLR4 gene G11367C genotypes and alleles

指标	IOIA 组 IOIA group	对照组 Control group	OR*	95% CI	P
基因型 (Genotype)					
GG	47 (29.38%)	115 (71.88%)	1.00		
GC	113 (70.62%)	45 (28.12%)	6.1442	3.4725 - 9.8036	0.0073
等位基因 (Allele)					
G	207 (64.69%)	275 (85.94%)	1.00		
C	113 (35.31%)	45 (14.06%)	3.3360	1.8790 - 7.9787	0.0086

*: 按照性别、年龄、饮食习惯、饮酒、吸烟状况和 H. Pylori 感染状况调整

*: adjusted according to gender, age, diet status, drinking status, smoking status and H. pylori infection status

表 4 NADPH 氧化酶基因 His72Tyr 与等位基因分布

Table 4 Distribution of NADPH oxidase gene His72Tyr polymorphism genotypes and alleles

指标	IOIA 组 IOIA group	对照组 Control group	OR ^a	95% CI	P
基因型 (Genotype)					
HH	46 (28.75%)	117 (73.13%)	1.00		
HT	56 (35.00%)	21 (13.12%)	6.7773	3.4192 – 10.2130	0.0071
TT	58 (36.25%)	22 (13.75%)	6.4737	3.1795 – 10.2159	0.0076
等位基因 (Allele)					
H	148 (46.25%)	255 (79.69%)	1.00		
T	172 (53.75%)	65 (20.31%)	4.4705	2.3784 – 8.1557	0.0081

^a: 按照性别、年龄、饮食习惯、饮酒、吸烟状况和 H. Pylori 感染状况调整

^a:adjusted according to gender, age, diet status, drinking status, smoking status and H. pylori infection status

2.4 IOIA 危险因素的多因素非条件 Logistic 回归

为进一步分析 IOIA 的危险因素,将 H. pylori 感染状况、G11367C 和 His72Tyr 基因型作为自变量,以是否发生 IOIA 作为因变量 Y(0:未患 IOIA; 1:患 IOIA),采用逐步后退法进行非条件 Logistic 回归,主要变量赋值见表 5。结果显示,H. pylori 感染、G11367C 和 His72Tyr 与 IOIA 发生有统计学关联,见表 6。

表 5 非条件 Logistic 回归分析变量赋值表

Table 6 The variables in non-conditional logistic regression analysis

研究因素 Factors	变量命名 The name of variables	变量赋值 The value of variables
H. pylori 感染 (H. pylori infection)	X1	无感染 = 0, 100 ≤ DPM < 500 = 1, DPM ≥ 500 = 2, 无感染作为参照因素
G11367C	X2	GG = 0, GC = 1, GC 作为参照因素
His72Tyr	X3	HH = 0, HT = 1, TT = 1, CC 作为参照因素

表 6 IOIA 危险因素的非条件 Logistic 回归分析

Table 6 The results of the non-conditional logistic regression analysis on the risk factors of IOIA

危险因素 Influencing factors	参照因素 Reference factors	β	Waldx ²	P	OR (95% CI)
100 ≤ DPM < 500	无感染 (Non-infection)	0.8224	14.6882	<0.01	4.1674 (2.5372 – 7.2073)
DPM ≥ 500	无感染 (Non-infection)	1.4601	31.3270	<0.01	7.6520 (3.8387 – 10.7593)
G11367C	G11367C (GC)	0.8540	16.8048	<0.01	6.5313 (2.82980 – 9.2079)
His72Tyr (HT)	His72Tyr (HH)	0.9413	25.9162	<0.01	6.4679 (3.9852 – 10.8106)
His72Tyr (TT)	His72Tyr (HH)	0.9328	24.4857	<0.01	6.1648 (4.0325 – 9.6457)

2.5 TLR4 基因 G11367C 和 NADPH 氧化酶基因 His72Tyr 多态性在 IOIA 发病中的交互作用

基因突变的协同分析发现 G11367C (GC)/His72Tyr (TT) 基因型者频率在 IOIA 组和对照组的分布频率分别为 25.63% 和 3.75%, 此基因型频率经 χ^2 检验在两组之间有显著性差异 ($P < 0.01$)。G11367C (GC)/His72Tyr (TT) 基因型者患 IOIA 的风险显著增加 ($OR = 39.5731$), G11367C (GC) 和 His72Tyr (TT) 基因型在 IOIA 发生、发展存在正向的交互作用 ($\gamma_2 = \beta_{2 \cdot 3} / \beta_3, \gamma_3 = \beta_{2 \cdot 3} / \beta_2; \gamma_2 = 2.0887, \gamma_3 = 1.9856$), 另外 G11367C (GC) 和 His72Tyr (HT) 之间也存在正向交互作用 ($\gamma > 1$) (表 7)。

2.6 H. pylori 感染和 TLR4 基因 G11367C 和 NADPH 氧化酶基因 His72Tyr 多态性在 IOIA 发病中的交互作用

单纯 $100 \leq DPM < 500$ 的 H. pylori 感染的 OR_{e1} 为 4.4111, 单独携带 G11367C (GC) 型的 OR_g 为 6.2879, 两者同时存在时, 交互作用 OR_{e1g} 为 27.1020, 交互系数 $\gamma = \beta_{e1g} / \beta_e = > 1, OR_{e1g} > OR_{e1} \times OR_g$ 为超相乘模型; 另外数据分析显示在 $DPM \geq 500$ 和 -C34G (CG) 之间也存在正向交互作用 ($\gamma = \beta_{e1g} / \beta_e = > 1$) (表 8)。同样在 $100 \leq DPM < 500$ 和 His72Tyr (HT) 之间、 $100 \leq DPM < 500$ 和 His72Tyr (TT) 之间、 $DPM \geq 500$ 和 His72Tyr (HT) 之间及 $DPM \geq 500$ 和 His72Tyr (TT) 在 IOIA 发生、发展中也存在正向交互作用 (γ 均大于 1) (表 9)。

表 7 TLR4 基因 G11367C 和 NADPH 氧化酶基因 His72Tyr 多态性在 IOIA 发病中的交互作用

Table 7 Interaction of polymorphisms between TLR4 gene G11367C and NADPH oxidase gene His72Tyr in IOIA.

联合基因型 Combined genotype		IOIA 组 IOIA group	对照组 Control group	OR ^a	95% CI	β
G11367C	His72Tyr					
GG	HH	14 (8.75%)	84 (52.50%)	1.0000		
GG	HT	16 (10.00%)	15 (9.38%)	6.4000 ^b (OR ₁)	2.3328 - 10.8757	0.8062 (β ₁)
GG	TT	17 (10.63%)	16 (10.00%)	6.3750 ^c (OR ₂)	2.3740 - 9.2471	0.8045 (β ₂)
GC	HH	32 (20.00%)	33 (20.63%)	5.8182 ^d (OR ₃)	2.2610 - 9.5473	0.7648 (β ₃)
GC	HT	40 (25.00%)	6 (3.75%)	39.0347 ^e (OR ₁₊₃)	16.3035 - 64.1824	1.5915 (β ₁₊₃)
GC	TT	41 (25.63%)	6 (3.75%)	39.5731 ^f (OR ₂₊₃)	15.5184 - 63.2169	1.5974 (β ₂₊₃)

^a: 按照性别、年龄、饮食习惯、饮酒、吸烟状况和 H. Pylori 感染状况调整; ^b: 单纯 His72Tyr 杂合突变型暴露的 OR 值 (OR₁); ^c: 单纯 His72Tyr 纯合突变型暴露的 OR 值 (OR₂); ^d: 单纯 G11367C 杂合突变型暴露的 OR 值 (OR₃); ^e: G11367C 杂合突变型和 His72Tyr 杂合突变型交互后的 OR 值 (OR₁₊₃); ^f: G11367C 杂合突变型和 His72Tyr 纯合突变型交互后的 OR 值 (OR₂₊₃)

^a: adjusted according to gender, age, diet status, drinking status and smoking status; ^b: OR value by simple His72Tyr heterozygote exposure (OR₁); ^c: OR value by simple His72Tyr homozygous mutant exposure (OR₂); ^d: OR value by simple G11367C heterozygote exposure (OR₃); ^e: OR value by the interaction of G11367C heterozygote and His72Tyr heterozygote (OR₁₊₃); ^f: OR value by the interaction of His72Tyr homozygous mutant and G11367C heterozygote (OR₂₊₃)

表 8 H. pylori 感染和 TLR4 基因 G11367C 多态性在 IOIA 发病中的交互作用

Table 8 Interaction between H. pylori infection and TLR4 gene G11367C polymorphism in IOIA

G11367C 基因型 G11367C genotype	H. pylori 感染状况 H. pylori infection status	IOIA 组 IOIA group	对照组 Control group	OR ^a	95% CI	β
GG	无感染 (Non-infection)	14 (8.75%)	83 (51.88%)	1.0000		
GG	100 ≤ DPM < 500	14 (8.75%)	18 (11.25%)	4.4111 ^b (OR _{e1})	2.1987 - 5.304	0.6445 (β _{e1})
GG	DPM ≥ 500	19 (11.88%)	14 (8.75%)	7.8459 ^c (OR _{e2})	4.8465 - 11.6031	0.8946 (β _{e2})
GC	无感染 (Non-infection)	35 (21.88%)	33 (22.63%)	6.2879 ^d (OR _g)	4.2083 - 9.0576	0.7985 (β _g)
GC	100 ≤ DPM < 500	32 (20.00%)	7 (4.38%)	27.1020 ^e (OR _{e1+g})	16.3971 - 43.789	1.4330 (OR _{e1+g})
GC	DPM ≥ 500	46 (28.88%)	5 (3.13%)	54.5429 ^f (OR _{e2+g})	39.8364 - 75.8020	1.7367 (β _{e2+g})

^a: 按照性别、年龄、饮食习惯、饮酒和吸烟状况调整; ^b: 单纯 100 ≤ DPM < 500 H. pylori 感染暴露的 OR 值 (OR_{e1}); ^c: 单纯 DPM ≥ 500 H. pylori 感染暴露的 OR 值 (OR_{e2}); ^d: 单纯杂合突变型暴露的 OR 值 (OR_g); ^e: 100 ≤ DPM < 500 H. pylori 感染与杂合突变型交互后的 OR 值 (OR_{e1+g}); ^f: DPM ≥ 500 H. pylori 感染与杂合突变型交互后的 OR 值 (OR_{e2+g})

^a: adjusted according to gender, age, diet status, drinking status and smoking status; ^b: OR value by simple 100 ≤ DPM < 500 exposure (OR_{e1}); ^c: OR value by simple DPM ≥ 500 exposure (OR_{e2}); ^d: OR value by simple heterozygote type exposure (OR_g); ^e: OR value by the interaction of 100 ≤ DPM < 500 and heterozygote (OR_{e1+g}); ^f: OR value by the interaction of DPM ≥ 500 and heterozygote (OR_{e2+g})

表 9 两组 H. pylori 感染和 NADPH 氧化酶基因 His72Tyr 多态性在 IOIA 发病中的交互作用

Table 9 Interaction between H. pylori infection and NADPH oxidase gene His72Tyr polymorphism in IOIA

- C242T 基因型和 H. pylori 感染状况 [n (%)]									
项目	HH/无感染	HH/100 ≤ DPM < 500	HH/DPM ≥ 500	HT/无感染	HT/100 ≤ DPM < 500	HT/DPM ≥ 500	TT/无感染	TT/100 ≤ DPM < 500	TT/DPM ≥ 500
对照组 (n = 160)	85 (53.13)	18 (11.25)	14 (8.75)	15 (9.38)	3 (1.88)	3 (1.88)	16 (10.00)	4 (2.50)	2 (1.25)
IOIA 组 (n = 160)	14 (8.75)	13 (8.13)	19 (11.88)	17 (10.63)	16 (10.00)	23 (14.38)	18 (11.25)	17 (10.63)	23 (14.38)
OR ^a	1.00	4.3849 ^b (OR _{e1})	7.2398 ^c (OR _{e2})	4.9810 ^d (OR _{g1})	32.3810 ^e (OR _{e1+g1})	46.5476 ^f (OR _{e2+g1})	5.3104 ^g (OR _{e2})	25.8038 ^h (OR _{e1+g2})	69.8214 ⁱ (OR _{e2+g2})
95% CI		2.5725 - 7.1792	4.7594 - 11.9704	3.2921 - 10.4235	17.5702 - 41.9974	41.6419 - 75.5306	3.2364 - 9.2024	18.6781 - 45.2871	29.6521 - 55.2040
β		0.6420 (β _{e1})	0.8597 (β _{e2})	0.6973 (β _{g1})	1.5103 (OR _{e1+g1})	1.6679 (β _{e2+g1})	0.7251 (β _{e2})	1.4117 (β _{e1+g2})	1.8440 (β _{e2+g2})

^a: 按照性别、年龄、饮食习惯、饮酒和吸烟状况调整; ^b: 单纯 100 ≤ DPM < 500 H. pylori 感染暴露的 OR 值 (OR_{e1}); ^c: 单纯 DPM ≥ 500 H. pylori 感染暴露的 OR 值 (OR_{e2}); ^d: 单纯杂合突变型暴露的 OR 值 (OR_{g1}); ^e: 100 ≤ DPM < 500 H. pylori 感染与杂合突变型交互后的 OR 值 (OR_{e1+g1}); ^f: DPM ≥ 500 H. pylori 感染与杂合突变型交互后的 OR 值 (OR_{e2+g1}); ^g: 单纯纯合突变型暴露的 OR 值 (OR_{e2}); ^h: 100 ≤ DPM < 500 H. pylori 感染与纯合突变型交互后的 OR 值 (OR_{e1+g2}); ⁱ: DPM ≥ 500 H. pylori 感染与纯合突变型交互后的 OR 值 (OR_{e2+g2})

^a: adjusted according to gender, age, diet status, drinking status and smoking status; ^b: OR value by simple 100 ≤ DPM < 500 exposure (OR_{e1}); ^c: OR value by simple DPM ≥ 500 exposure (OR_{e2}); ^d: OR value by simple heterozygote type exposure (OR_{g1}); ^e: OR value by the interaction of 100 ≤ DPM < 500 and heterozygote (OR_{e1+g1}); ^f: OR value by the interaction of DPM ≥ 500 and heterozygote (OR_{e2+g1}); ^g: OR value by simple homozygous mutant type exposure (OR_{e2}); ^h: OR value by the interaction of 100 ≤ DPM < 500 and homozygous mutant (OR_{e1+g2}); ⁱ: OR value by the interaction of DPM ≥ 500 and homozygous mutant (OR_{e2+g2})

3 讨论

TLR4在自然配体LPS作用下导致NF- κ B激活从而释放肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)等大量炎症因子,这些细胞因子可调控骨的吸收或转化,在破骨细胞生成的早期,能诱导骨组织中破骨细胞活化因子的表达,刺激较原始的破骨细胞前体分裂和增殖,促进破骨细胞形成及骨吸收,从而导致局部或全身的骨质疏松。另外上述的TNF- α 、IL-1 β 等各种炎症因子大量分泌入血,进而发生全身性低度慢性炎症反应,最终使机体发生了胰岛素抵抗,胰岛素抵抗通过影响肾1 α -羟化酶的活性,影响肾对钙磷的调节,以及继发甲状旁腺激素等激素分泌异常从而干扰骨代谢,胰岛素敏感性降低还引起蛋白质代谢障碍,蛋白质分解增加,合成受抑制,而蛋白质是构成骨架的基本物质,其减少可导致骨质减少,使钙、磷不能在骨骼中沉积,造成骨质疏松^[11]。人类TLR4基因定位于9q32.9q33,目前研究较多的是Asp299Gly和Thr399Ile变异,但这两个多态位点在人群中非常罕见。研究发现在中国正常人群中发现TLR4基因3'未翻译区(3'UTR)11367位点的多态性,此突变属于功能性变异,可改变血液和组织中TLR4的表达,影响其生物学效应。TLR4基因3'未翻译区11367多态性具有三种基因型:野生型纯合子G11367C(GG)、杂合子G11367C(GC)和突变纯合子G11367C(CC),国内外已有报道认为G11367C位点的多种炎性疾病有关^[12-13]。本研究各组未发现突变纯合子G11367C(CC)基因型,发现杂合子G11367C(GC)基因型与IOIA发生、发展有关,与对照组比较差异有统计学显著性,携带G11367C(GC)基因型者患IOIA的风险高于携带G11367C(GG)的个体(OR = 6.1442, 95% CI 3.4725 - 9.8036, $P < 0.01$),与G11367C位点变异增加炎症相关性疾病发病风险的结论一致。G11367C(GC)基因型者易患IOIA的机理还不清楚,相关研究显示C等位基因可能通过活化TLR4基因转录过程,增加TLR4表达,促进炎症因子的释放,降低胰岛素敏感性^[14],从而增加IOIA发生的危险性。

人体过多的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)能抑制成骨家谱系细胞的增殖分化,导致成骨家谱系细胞的死亡,促进破骨细胞形成和分化,在骨质疏松的发生过程中起重要作用^[15,16]。氧化应激机制中,NADPH氧化酶是生成活性氧簇的主要

来源,其主要亚基中质膜结合成分p22phox为跨膜亚基,是NADPH氧化酶酶促的核心作用部分,p22phox亚基的多态性影响NADPH氧化酶的功能。位于16号染色体4号外显子上的第242密码子存在C $\rightarrow$ T基因突变,使得编码的72号氨基酸由组氨酸变为酪氨酸。72号组氨酸残基是p22phox结合血红素的部位,由于基因的改变使p22phox结合血红素的能力下降,从而影响了NADPH氧化酶的活性^[17]。研究证明NADPH氧化酶p22phox亚基基因His72Tyr多态性可增加氧化应激相关疾病如冠心病、脑血管疾病等的发病率^[18,19]。本研究发现His72Tyr(HT)和His72Tyr(TT)基因型与IOIA的发生有关,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),携带His72Tyr(HT)和His72Tyr(TT)基因型者患IOIA的风险高于携带His72Tyr(HH)的个体(OR = 6.7773, 95% CI 3.4192 - 10.2130, $P < 0.01$; OR = 6.4737, 95% CI 3.1795 - 10.2159, $P < 0.01$),与相关研究结果一致。

本研究发现G11367C杂合突变型与NADPH氧化酶基因His72Tyr纯合突变型的交互作用增加了IOIA的发病风险,G11367C(GC)和His72Tyr(TT)基因型对IOIA的发生风险有相互显著放大效应($\gamma_2 = 2.0887$, $\gamma_3 = 1.9856$);另外本研究显示,两基因的杂合子与杂合子之间也存在明显的正向交互作用(γ 均大于1)。通过对H. pylori感染状况的分析发现,100 $\leq$ DPM < 500和DPM $\geq$ 500 H. pylori感染者患IOIA的风险明显高于未感染者(OR = 4.4463, OR = 8.0238),而DPM $\geq$ 500 H. pylori感染者患IOIA的风险性则又明显高于100 $\leq$ DPM < 500 H. pylori感染者($P < 0.01$);数据分析显示H. Pylori感染与G11367C(GC)、His72Tyr(HT)和His72Tyr(TT)基因型均存在正向交互作用(γ 均大于1),携带G11367C(GC)、His72Tyr(HT)和His72Tyr(TT)基因型者H. Pylori感染的危害效应更大;G11367C(GC)、His72Tyr(HT)和His72Tyr(TT)与H. pylori感染交互作用OR_g均大于相应相应的OR_e $\times$ OR_g,显示G11367C(GC)、His72Tyr(HT)和His72Tyr(TT)与H. pylori感染交互作用机制在IOIA发生中均为超相乘模型。H. pylori感染可能通过炎症、纤维蛋白原自身免疫反应来引起胰岛细胞损伤,胰岛功能下降,胰岛素分泌减少;H. pylori慢性感染可诱导炎症反应,刺激炎症因子如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、及IL-8等释放。而低水平的炎症状态正是胰岛素抵抗的病因之一,TNF

- α 和 IL-6 作为炎症递质,参与了胰岛素抵抗的发生和发展,它们可以干扰胰岛素信号转导,降低胰岛素的敏感性,它们还能影响脂代谢及脂肪因子,降低胰岛素作用。另外 H. pylori 感染者的胃肠激素水平有明显改变,H. pylori 感染升高血清胃泌素浓度和降低生长抑素的浓度,胃泌素增加食物和糖刺激的胰岛素释放,生长抑素调节胰腺胰岛素的分泌,抑制胰岛素的释放,通过负反馈调节导致胰岛素抵抗,提示 H. pylori 感染可能通过主要慢性炎症和影响胃肠激素对胰岛素的调节,而导致胰岛素抵抗,为 IOIA 的发生创造了条件^[20]。H. pylori 感染致不同程度的急、慢性炎症,多形核嗜中性粒细胞等在吞噬 H₂O₂ 时产生大量的超氧自由基(O₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)和羟基自由基(·OH)等活性氧,释放至细胞介质及体液内,导致体内氧化和抗氧化平衡失调及一系列自由基反应加剧^[21]。过量氧自由基通过血液进骨组织细胞,增加骨质疏松发生的风险性。这可能是 H. pylori 感染可单独增加及与 TLR4 基因 G11367C 与 NADPH 氧化酶基因 His72Tyr 突变基因型协同增加 IOIA 发生风险性的重要原因。

IOIA 是涉及环境因子和多种基因相互作用的复杂过程,本研究提示 TLR4 基因 G11367C 杂合突变型与 NADPH 氧化酶基因 His72Tyr 突变基因型的个体属 IOIA 高危人群,IOIA 诊治方案中应加以重视。虽然尚不能通过改变其 IOIA 易感的基因型来防治 IOIA,但可以通过 TLR4 基因 G11367C 与 NADPH 氧化酶基因 His72Tyr 基因检测,预测个体发生 IOIA 的风险性,采取相应的控制环境病因的措施如根除 H. Pylori 或调控基因表达以达到有效预防 IOIA 的目的。另外通过基因预测个体成年后发生 IOIA 的风险性,为预测运动员的发展前途、早期选拔运动员提供参考。

【参 考 文 献】

- [1] Gennari L, Bilezikian JP. Idiopathic osteoporosis in men[J]. Curr Osteoporos Rep, 2013, 11(4):286-298.
- [2] Sardone LD, Renlund R, Willett TL, et al. Effect of rosiglitazone on bone quality in a rat model of insulin resistance and osteoporosis[J]. Diabetes, 2011, 60(12):3271-3278.
- [3] Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis[J]. Endocr Rev, 2010, 31(3):266-300.
- [4] 徐中海,张骏,杨迪,等.幽门螺旋杆菌感染与骨质疏松症的研究进展[J].中国骨伤,2011,24(11):966-968.
Xu ZH, Zhang J, Yang D, et al. Progress of research between helicobacter pylori infection and osteoporosis[J]. China J Orthop Trauma, 2011, 24(11): 966-968.
- [5] Vijayan V, Khandelwal M, Mangani K, et al. Methionine down-regulates TLR4/MyD88/NF- κ B signalling in osteoclast precursors to reduce bone loss during osteoporosis[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(1):107-121.
- [6] Schröder KL. NADPH oxidases in bone homeostasis and osteoporosis[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(1):25-38.
- [7] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会.原发性骨质疏松症诊治指南(2011年)[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2011,4(1):2-17.
Osteoporosis and bone mineral branch of Chinese medical association. Guidelines for the diagnosis and treatment of primary osteoporosis(2011)[J]. Chin J Osteoporosis & Bone Miner Res, 2011, 4(1):2-17.
- [8] 赵静,刘恩梅,邓昱,等. TLR4 基因 3' 非翻译区 11367 位点多态性与婴幼儿喘息性疾病的研究[J].免疫学杂志,2009,(6):689-692.
Zhao J, Liu EM, Deng Y, et al. Association between TLR4/11367 gene polymorphism in 3' untranslated region and wheezing diseases in infants[J]. Immunological Journal, 2009, 25(6): 689-692.
- [9] de Oliveira Alvim R, Santos PC, Dias RG, et al. Association between the C242T polymorphism in the p22phox gene with arterial stiffness in the Brazilian population[J]. Physiol Genomics, 2012, 44(10): 587-592.
- [10] Wallace HM. A model of gene-gene and gene-environment interactions and its implications for targeting environmental interventions by genotype[J]. Theor Biol Med Model, 2006, 3:35.
- [11] Uzar I, Mrozikiewicz PM, Bogacz A, et al. The importance of 8993C > T (Thr399Ile) TLR4 polymorphism in etiology of osteoporosis in postmenopausal women[J]. Ginekol Pol, 2014, 85(3):180-184.
- [12] Wang LZ, Yu JT, Miao D, et al. Genetic association of TLR4/11367 polymorphism with late-onset Alzheimer's disease in a Han Chinese population[J]. Brain Res, 2011, 1381:202-207.
- [13] Duan ZX, Gu W, Zhang LY, et al. Clinical relevance of the TLR4 11367 polymorphism in patients with major trauma[J]. Arch Surg, 2009, 144(12):1144-1148.
- [14] Duan ZX, Zhu PF, Dong H, et al. Functional significance of the TLR4/11367 polymorphism identified in Chinese Han population[J]. Shock, 2007, 28(2):160-164.
- [15] Callaway DA, Jiang JX. Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases[J]. J Bone Miner Metab. 2015, 33(4):359-370.
- [16] Huang Q, Gao B, Wang L, et al. Protective effects of myricitrin against osteoporosis via reducing reactive oxygen species and bone-resorbing cytokines[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2014, 280(3):550-560.
- [17] Ge J, Ding Z, Song Y, et al. Smoking dose modifies the association between C242T polymorphism and prevalence of metabolic syndrome in a Chinese population[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e31926.
- [18] Hashad IM, Abdel Rahman MF, Abdel-Maksoud SM, et al. C242T polymorphism of NADPH oxidase p22phox gene reduces the risk of coronary artery disease in a random sample of Egyptian population[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(4):2281-2286.
- [19] Genius J, Grau AJ, Lichy C. The C242T polymorphism of the NAD(P)H oxidase p22phox subunit is associated with an enhanced risk for cerebrovascular disease at a young age[J]. Cerebrovasc Dis, 2008, 26(4):430-403.
- [20] Asaoka D, Nagahara A, Hojo M, et al. The Relationship between H. pylori Infection and Osteoporosis in Japan[J]. Gastroenterol Res Pract, 2014, 2014:340765.
- [21] Na HK, Woo JH. Helicobacter pylori Induces Hypermethylation of CpG Islands Through Upregulation of DNA Methyltransferase: Possible Involvement of Reactive Oxygen/Nitrogen Species[J]. 2014, 19(4):259-264.

(收稿日期:2015-10-12)