

TNF- α 基因 308 位点单核苷酸多态性与原发性肺癌相关性研究*

孙永林^① 李颖^② 李永文^② 吴志浩^② 范亚光^② 刘红雨^② 陈军^①

摘要 目的:肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)基因启动子单核苷酸多态性与某些炎症疾病、肿瘤的发生有关。本研究就 TNF- α -308G/A 位点基因多态性与中国人群原发性肺癌易感性进行探讨。方法:应用高通量 TaqMan-MGB 探针技术对 TNF- α -308G/A 位点,即 rs1800629 位点进行基因分型,分析比较 447 例健康对照者和 250 例原发性肺癌患者的基因类型。采用 SPSS 18.0 软件对数据资料进行统计分析。结果:TNF- α -308G/A 位点 GG 基因型在病例组和对照组中的频率分别为 73.2% 和 90.8%。A/G 基因型在病例组和对照组中频率分别为 26.8% 和 8.7%。基因型 A/G+AA 频率分别为 26.8% 和 9.2%,该位点多态性在病例组和对照组中的分布频率差异具有统计学意义($P<0.05$)。此外,A/G 基因型在男性、吸烟、小细胞肺癌或非小细胞肺癌患者相对于 GG 型均为危险因素,但在女性中无统计学意义($P>0.05$)。结论:TNF- α -308G/A 位点基因多态性与中国原发性肺癌发病易感性显著相关。

关键词 肿瘤坏死因子- α 基因 单核苷酸多态性 原发性肺癌 小细胞肺癌 非小细胞肺癌

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20150554

Association between TNF- α -308 genetic polymorphisms and increased risk of primary lung cancer in Chinese population: a case-control study

Yonglin SUN¹, Ying LI², Yongwen LI², Zhihao WU¹, Yaguang FAN¹, Hongyu LIU¹, Jun CHEN²

Correspondence to: Hongyu LIU; E-mail: liuhongyu123@hotmail.com

¹Department of Lung Cancer Surgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China; ²Tianjin Key Laboratory of Lung Cancer Metastasis and Tumor Microenvironment, Tianjin Lung Cancer Institute, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China.

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81172233 and No.81372306), the Key Project of Tianjin Municipal Natural Science Foundation (No.12JCZDJC24400), Tianjin Municipal Natural Science Foundation (No.13JCYBJC22600), Tianjin Science and Technology Support Program (No.12ZCDZSY16100), and the Funds of Special Studies for China Ministry of Education Doctorship Conferring Unit (No. 20131202110004).

Abstract Objective: Previous studies suggested that the -308G/A allele in the tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene promoter (-308G/A) may be a potential risk factor for inflammatory diseases and tumor progression. However, only a few studies have focused on the -308 polymorphism of TNF- α gene with primary lung cancer in Chinese population. This study aims to evaluate the role of TNF- α -308G/A single nucleotide polymorphism (SNP) and the risk of primary lung cancer in Chinese population. **Methods:** A total of 250 patients and 447 healthy individuals (control group) were involved in this study. Genotyping was performed using TaqMan technology. **Results:** The frequencies of (GG), (A/G), and (A/G+AA) genotypes of -308G/A SNP in TNF- α gene were 183 (73.2%), 67 (26.8%), and 67 (26.8%) in the patients, and 406 (90.8%), 39 (8.7%), and 41 (9.2%) in the control group, respectively. The distribution of polymorphism frequencies in the case group and the control group showed a statistically significant difference for the Chinese population ($P<0.05$). **Conclusion:** Results indicated that TNF- α gene polymorphism at position -308G/A is associated with susceptibility to lung cancer in Chinese Han population.

Keywords: tumor necrosis factor- α gene, single nucleotide polymorphism, primary lung cancer, small cell lung cancer, non-small-cell lung cancer

作者单位:①天津医科大学总医院肺部肿瘤外科(天津市300052);②天津市肺癌研究所,天津市肺癌转移与肿瘤微环境实验室

*本文课题受国家自然科学基金项目(编号:81172233,81372306)、天津市自然科学基金重点项目(编号:12JCZDJC24400)、天津市自然科学基金项目(编号:13JCYBJC22600)、天津市科委抗癌重大专项攻关计划(编号:12ZCDZSY16100)和教育部博士点基金(编号:20131202110004)资助

通信作者:陈军 huntercj2004@yahoo.com

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)是由单个核苷酸变异所引起的DNA序列多态性,是人类可遗传变异中最常见的一种。本研究主要分析中国人群中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)基因启动子上游-308位点,即rs1800629位点多态性与原发性肺癌易感性的关系。TNF- α 基因位于染色体6P21.4,全长为3.6 kbp,由4个外显子和3个内含子组成,与主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)基因紧密连锁位于MHC3类基因区内,为TNF超家族重要成员之一,能产生炎症细胞因子,从而起始和调控炎症细胞因子的产生。人类疾病细胞因子基因多态性数据库中,其启动子区238、308、857、863、1 031等8个位点存在单核苷酸多态性,而TNF- α 启动子区多态性被认为可调节TNF- α 的转录水平,有研究报道TNF- α 基因-308位点单核苷酸多态性可能与慢性阻塞性肺病^[1]、淋巴瘤^[2-4]、类风湿性关节炎^[5]、肉状瘤病^[6]以及II型糖尿病^[7]的发病易感性有关系。本研究采用Taqman基因分型技术,检测中国人群中447例健康者与250例原发性肺癌患者的TNF- α -308位点,即rs1800629位点的基因型,并分析比较健康者与原发性肺癌基因型的差异,探讨TNF- α -308位点G/A多态性与中国人群原发性肺癌易感性的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

447例健康对照者均来自2007年1月至2010年1月天津医科大学总医院肺部肿瘤外科健康查体门诊,其中男性275例,女性172例,年龄范围22~84岁,中位年龄54岁。全部研究对象均为随机选取,无血缘关系。250例肺癌患者均来自天津医科大学总医院肺部肿瘤外科原发性肺癌手术患者,其中男178例,女72例,年龄范围32~84岁,中位年龄61岁。全部研究对象均为随机选取,无血缘关系。本研究经院伦理委员会审批同意。研究对象的基本情况见表1。

1.2 方法

1.2.1 人外周血白细胞基因组DNA抽提 取对照者或患者清晨空腹静脉血5 mL, EDTA抗凝,以DNA抽提试剂盒(德国Qiagen公司)抽提血DNA。紫外分光光度计检验其浓度后标准化至50 ng/ μ L, -80°C冰箱中备用。

1.2.2 基因多态性分析 基因多态性分析采用Taqman基因分型技术,使用的Pre-designed Taqman SNP基因分型探针rs1800629、PCR体系中所使用的PCR引物和Master Mix均购于美国应用生物系统公

司,取2.5 μ L的DNA模板与2 \times TaqMan Genotyping Master Mix 2.5 μ L, 40 \times TaqMan SNP Genotyping Assay 0.125 μ L混合充分。质控:每次实验均设NTC(no-template controls)以及阳性对照。RT-PCR的循环条件为:50°C 2 min, 95°C 10 min, 95°C 15s, 60°C 1 min; 循环50次。RT-PCR反应完成后进行后读板,结果采用SDS 2.2 software分析。基因分型在Applied Biosystems(美国应用生物系统公司)7900HT Fast RT-PCR System 384孔板完成。

1.3 统计学方法

采用SPSS 18.0软件进行数据分析,用 χ^2 检验比较病例组与对照组中年龄、性别、吸烟的分布情况,组间均数比较运用 t 检验。采用多因素Logistic回归分析基因多态性与肺癌易感性的关联。所有检验为双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 病例组和对照组基本情况比较

病例组和对照组的年龄差异和性别构成及吸烟状况具有统计学意义($P<0.05$),病例组中年龄 >57 岁的患者人数频率显著高于对照组(61.6% vs. 40.7%);男性患者人数频率同样高于对照组(71.2% vs. 61.5%);病例组吸烟人数频率显著高于对照组(63.6% vs. 34.2%,表1)。

表1 对照组与病例组的基本情况 例(%)

Table 1 General characteristics of the case group and the control group n (%)

Characteristics	Controls ($n=447$)	Cases ($n=250$)	P
Age (years)			
≤57	265 (59.3)	96 (38.4)	0.001
>57	182 (40.7)	154 (61.6)	
Gender			
Male	275 (61.5)	178 (71.2)	0.010
Female	172 (38.5)	72 (28.8)	
Smoking status			
Non-smoking	291 (65.1)	83 (33.2)	0.001
Smoking	153 (34.2)	159 (63.6)	
Histologic type			
Ac		93 (37.2)	
ScC		113 (45.2)	
LcC		13 (5.2)	
ScC		22 (8.8)	
Ade and squa		5 (2)	
Others		3 (1.2)	

Ac, adenocarcinoma; ScC, squamous cell carcinoma; LcC, large cell lung cancer

2.2 TNF-α-308G/A 位点各基因型的频率分布以及与肺癌发病危险关系分析

基因型 GG 在病例组和对照组中的频率分别为 73.2% 和 90.8%，基因型 A/G 在两组中的频率分别为 26.8% 和 8.7%，基因型 A/G+AA 在病例组及对照组中的比例分别为 26.8% 和 9.2%。以基因型 G/G 作为对照，该位点基因型 A/G 的调整危险度为 3.707 (95%CI: 2.414~5.692, P<0.05)，基因型 A/G+AA 的调整危险度为 3.530 (95%CI: 2.312~5.392, P<0.05)。表明 TNF-α-308G/A 基因型在肺癌患者和健康者中的分布频率差异具有统计学意义 (P<0.05)，基因型 A/G 与 AA 在病例组和健康组中相对于 GG 为原发性肺癌的危险因素 (表 2)。

2.3 TNF-α 基因-308G/A 位点各基因型不同分层后与肺癌发病危险关系分析

为消除年龄、性别、吸烟的混杂影响，进一步对 TNF-α-308G/A 基因位点各基因型按性别、吸烟进行分层分析，并对 308G/A 位点多态性与不同病理类型肺癌的关联进行了分析 (表 3~5)。根据性别将研究人群分为男性和女性两组，分析发现，此位点在男性中基因型 A/G 的 OR 值为 4.15 (95%CI: 2.43~7.08, P<0.05)，A/G+AA OR 值为 4.90 (95%CI: 2.74~8.77, P<0.05)，为原发肺癌的危险因素，但在女性中无统计学意义 (P>0.05, 表 3)；此外，根据吸烟史将研究人群分为不吸烟和吸烟组，在吸烟中基因型 A/G

的 OR 值为 5.93 (95%CI: 2.88~12.28, P<0.05)，A/G+AA 型 OR 值为 5.93 (95%CI: 2.88~12.28, P<0.05)，有统计学意义，在非吸烟中基因型 A/G 的 OR 值为 2.39 (95%CI: 1.20~4.75, P<0.05)，A/G+AA 型 OR 值为 2.26 (95%CI: 1.15~4.46, P<0.05)，差异有统计学意义 (表 4)，基因型 A/G 和 A/G+AA 在吸烟人群中相对于 GG 是肺癌发病的危险因素，基因型 A/G 和 A/G+AA 在非吸烟人群中相对于 GG 也属于肺癌发病的危险因素。根据病理类型将研究对象分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌两组人群，基因型 A/G 与 A/G+AA 在小细胞肺癌中 OR 值分别为 5.62 (95%CI: 2.06~15.34, P<0.05)，差异有统计学意义，在非小细胞肺癌中 A/G 与 A/G+AA 基因型 OR 值为 3.67 (95%CI: 2.25~5.97, P<0.05, 表 5)，A/G 和 A/G+AA 基因型在小细胞肺癌和非小细胞肺癌中相对于 GG 型均为肺癌发病的危险因素。

表 2 TNF-α-308G/A 基因多态性与肺癌发病危险关系分析例 (%)

Table 2 Association between the SNP of the TNF-α gene and the risk for lung cancer n (%)

Genotype	Control	Case	Adjusted OR (95%CI)
GG	406 (90.8)	183 (73.2)	1.00 (Reference)
A/G	39 (8.7)	67 (26.8)	3.70 (2.414-5.692)
AA	2 (0.45)	0	—
A/G or AA	41 (9.2)	67 (26.8)	3.53 (2.312-5.392)

OR: odds ratio; 95%CI: 95% confidence interval

表 3 不同性别患者 TNF-α-308G/A 位点与肺癌发病风险的关联

Table 3 TNF-α-308G/A SNP in the lung-cancer group and the control group for different genders

Genotype	Male			Female		
	Control	Case	Adjusted OR (95%CI)	Control	Case	Adjusted OR (95%CI)
GG	251	127	1 (Reference)	155	56	1 (Reference)
A/G	24	51	4.15 (2.43-7.08)	15	16	1.93 (0.78-4.80)
AA	1	0	—	1	0	—
A/G or AA	25	51	4.90 (2.74-8.77)	16	16	1.84 (0.75-4.53)

表 4 不同吸烟状态下 TNF-α-308G/A 位点与肺癌发病风险的关联

Table 4 TNF-α-308G/A SNP in the lung-cancer group and the control group for different smoking status

Genotype	Smoker			Non-smoker		
	Control	Case	Adjusted OR (95%CI)	Control	Case	Adjusted OR (95%CI)
GG	140	111	1 (Reference)	264	66	1 (Reference)
A/G	12	49	5.93 (2.88-12.28)	27	16	2.39 (1.20-4.75)
AA	0	0	—	2	0	—
A/G or AA	12	49	5.93 (2.88-12.28)	29	16	2.26 (1.15-4.46)

表 5 308G/A 与不同组织类型肺癌发病风险的相关性

Table 5 308G/A SNP in the lung-cancer group and the control group for different pathologic types

Genotype	Control	SCLC	OR (95%CI)	NSCLC	OR (95%CI)
GG	406	14	1	169	1
A/G	39	8	5.62 (2.06-15.34)	58	3.67 (2.25-5.97)
AA	2	0	—	0	—
A/G or AA	41	8	5.62 (2.06-15.34)	58	3.67 (2.25-5.97)

3 讨论

肺癌是目前全球范围内对人类生命威胁最大的恶性肿瘤之一,关于肺癌的病因学、预防、诊断、治疗已经成为全世界的重要课题,流行病学研究表明肺癌的发生是环境因素和遗传因素共同作用的结果,尽管 80% 以上的肺癌可归咎于烟草暴露^[8],但在相同的烟草暴露下,仅不到 20% 的吸烟者发展为肺癌^[9],提示不同个体对肺癌存在遗传易感性。SNP 是目前为止分布最为广泛、存在数量最多的一种遗传多态性,其在基因序列中的高密度、代表性、遗传稳定性以及易检测等特点体现了新一代遗传标记的优越性,使其被迅速接受从而成为遗传研究领域极为活跃的内容。目前已经发现多个基因的多态位点与肺癌的发生、发展、治疗及预后具有相关性^[10-11],为探讨肺癌发生的分子基础提供了很好的依据。本研究分析了 TNF- α 基因位点多态性与原发性肺癌发病的关系,采用 Taqman 技术,分析了大样本的 TNF- α -308G/A 基因型多态性位点与肺癌易感性的关系。TNF- α 基因启动子区多态性可调节 TNF- α 的转录水平。同时 TNF- α 基因与 MHC 基因紧密连锁位于 MHC3 类基因区内,处于连锁不平衡状态,MHC 对某些疾病有重要影响,这可能是 TNF- α 基因多态性与肿瘤发生的分子基础。

本研究表明 TNF- α -308G/A 基因型在肺癌患者和健康者中的分布频率差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),这一点与相关研究结果相似,基因型 A/G 与 A/G+AA 相对于 GG 为原发性肺癌的危险因素^[12]。进一步的分层分析发现此位点在男性中基因型 A/G 和 A/G+AA 相对于 GG 为原发性肺癌的危险因素,而在女性中无统计学意义 ($P > 0.05$);此外,A/G 和 AA 在吸烟和非吸烟人群中相对于 GG 是肺癌发病的危险因素。基因型 A/G 与 A/G+AA 在小细胞肺癌和非小细胞肺癌中相对于 GG 均为肺癌发病的危险因素。因此,在男性、吸烟与非吸烟的各种组织类型的原发性肺癌中,TNF- α -308G/A 位点 A/G 和 AA 型相对于 GG 型,依然是肺癌发病的危险因素。而在女性患者中基因型 A/G 和 AA 型相对于 GG 型并没有统计学差异 ($P > 0.05$),

可能与样本量、研究对象的选择有关。

综上所述,在肺癌的发生过程中 TNF- α -308G/A 多态性位点可能对肺癌的易感性产生一定的影响。充分考虑肿瘤多影响因素的复杂过程,可为全面了解肺癌病因提供科学依据。

参考文献

- [1] Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25[J]. *Nature*, 2008, 452(7187):633-637.
- [2] Bel HJB, Chatti A, Laatiri A, et al. Tumor necrosis factor promoter gene polymorphism associated with increased susceptibility to non-Hodgkin's lymphomas[J]. *Eur J Haematol*, 2007, 78(2):117-122.
- [3] Cerhan JR, Liu-Mares W, Fredericksen ZS, et al. Genetic variation in tumor necrosis factor and the nuclear factor-kappaB canonical pathway and risk of non-Hodgkin's lymphoma[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17(11):3161-3169.
- [4] Wang SS, Cerhan JR, Hartge P, et al. Common genetic variants in proinflammatory and other immunoregulatory genes and risk for non-Hodgkin lymphoma[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(19):9771-9780.
- [5] O'Rielly DD, Roslin NM, Beyene J, et al. TNF-alpha-308 G/A polymorphism and responsiveness to TNF-alpha blockade therapy in moderate to severe rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Pharmacogenomics J*, 2009, 9(3):161-167.
- [6] Medica I, Kastrin A, Maver A, et al. Role of genetic polymorphisms in ACE and TNF-alpha gene in sarcoidosis: a meta-analysis[J]. *J Hum Genet*, 2007, 52(10):836-847.
- [7] Boraska V, Rayner NW, Groves CJ, et al. Large-scale association analysis of TNF/LTA gene region polymorphisms in type 2 diabetes[J]. *BMC Med Genet*, 2010, 11:69.
- [8] Peto R, Lopez AD, Boreham J, et al. Mortality from smoking worldwide[J]. *Br Med Bull*, 1996, 52(1):12-21.
- [9] Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer[J]. *Chest*, 2003, 123(1 Suppl):21S-49S.
- [10] Gao H, Ge RC, Liu HY, et al. Effect of ERCC1 polymorphism on the response to chemotherapy and clinical outcome of non-small cell lung cancer[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(4):8997-9004.
- [11] Brzoska K, Bartłomiejczyk T, Sochanowicz B, et al. Matrix metalloproteinase 3 polymorphisms as a potential marker of enhanced susceptibility to lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease subjects[J]. *Ann Agric Environ Med*, 2014, 21(3):546-551.
- [12] Shih CM, Lee YL, Chiou HL, et al. Association of TNF-alpha polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2006, 52(1):15-20.

(2015-05-15 收稿)

(2015-06-29 修回)

(编辑:杨红欣)

作者简介

孙永林 专业方向为肺部肿瘤外科学研究。

E-mail: 15620198787@163.com

