

肿瘤坏死因子- α 基因多态性与肝细胞癌遗传易感性的关联研究

申鹏 翁美玲 汪正飞

[摘要] 目的 探究肿瘤坏死因子- α (TNF- α)基因单核苷酸多态性(SNP)位点的多态性与肝细胞癌(HCC)遗传易感性的相关性。方法 选取HCC患者112例作为实验组,并选取同期住院无血缘关系的非肿瘤患者100例作为对照组。采用Taqman探针荧光定量PCR法对TNF- α 基因多态性位点-238G/A和-308A/G进行基因分型,观察两多态性位点的基因型及等位基因频率在两组间的分布特征,并采用logistic回归分析多态位点与HCC的相关性。结果 实验组患者血清TNF- α 水平明显高于对照组,差异有统计学意义($t=13.36, P<0.05$);在TNF- α 基因-238G/A位点中,两组间基因型及等位基因频率分布比较,差异均无统计学意义(χ^2 分别=1.61、0.02, P 均 >0.05);在TNF- α 基因-308A/G位点中,实验组AA基因型频率明显低于对照组,G等位基因频率明显高于对照组,差异均有统计学意义(χ^2 分别=6.46、7.23, P 均 <0.05);-308A/G位点中,AG+GG基因型的患者血清TNF- α 水平明显高于AA基因型,差异有统计学意义($t=6.10, P<0.05$)。结论 TNF- α 基因多态性与HCC之间可能存在一定的相关性,其中-308A/G位点中的G等位基因可能是HCC遗传易感性的风险等位基因,监测TNF- α 基因中-308A/G位点的多态性对及时准确地预测HCC的发生、改善HCC患者预后具有重要的临床意义。

[关键词] 肿瘤坏死因子- α ; 肝细胞癌; 多态性; 基因; 遗传易感性; 相关性

Association between gene polymorphism of TNF- α and genetic susceptibility to hepatocellular carcinoma SHEN Peng, WENG Meiling, WANG Zhengfei. Department of Hepatobiliary Surgery, Quzhou People's Hospital, Quzhou 324000, China.

[Abstract] **Objective** To explore the correlation between TNF- α gene polymorphism and genetic susceptibility to hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Totally 112 patients with HCC were selected as the experimental group, and 100 patients without blood relationship and tumor were selected as the control group. The Taqman probe quantitative PCR method was used to genotype TNF- α gene polymorphism loci -238G/A and -308A/G, and the distribution characteristics of the genotypes and allele frequencies of the two polymorphism loci between the two groups were observed. And the correlation between the polymorphism loci and hepatocellular carcinoma was analyzed by logistic regression. **Results** The serum TNF- α level in the experimental group was significantly higher than that in the control group ($t=13.36, P<0.05$). In the TNF- α gene-238G/A locus, there was no significant difference in genotype and allele frequency distribution between the two groups ($\chi^2=1.61, 0.02, P>0.05$). In the TNF- α gene-308A/G locus, the AA genotype frequency in the experimental group was significantly lower than that in the control group, while the G allele frequency was significantly higher than the control group ($\chi^2=6.46, 7.23, P<0.05$). In the -308A/G locus, the serum TNF- α level in the patients with AG + GG genotype was significantly higher than that in the patients with AA genotype, the difference was statistically significant ($t=6.10, P<0.05$). **Conclusion** TNF- α gene polymorphism may be has a certain correlation with HCC, and G allele of -308A/G locus may be a risk allele for genetic susceptibility to HCC. Monitoring the 308A/G loci polymorphism of TNF- α is important to the accurate prediction of the occurrence of HCC and the prognosis of patients with HCC.

[Key words] tumor necrosis factor- α ; hepatocellular carcinoma; polymorphism; gene; genetic susceptibility; correlation

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.002.007

作者单位: 324000 浙江衢州, 衢州市人民医院肝胆外科
(申鹏、汪正飞), 肿瘤内科(翁美玲)

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是临床常见的恶性肿瘤疾病,是原发性肝癌中最常见的一种肿瘤类型,约占全部肝癌病例的85%~90%^[1]。HCC肿瘤恶性程度高,死亡率极高,潜伏期较长,预后极差,对人们的生命健康造成极大的威胁,同时也给HCC患者的家庭带来了沉重的经济负担和精神负担^[2]。因此,研究其遗传易感性,于发病前预测或在发病早期给予干预治疗具有重要意义。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)被认为是炎症相关性肿瘤发生发展过程中发挥重要作用的细胞因子^[3]。目前国内外对TNF- α 基因多态性与HCC遗传易感性的相关性报道较少。因此,本次研究通过观察TNF- α 基因-238G/A和-308A/G两位点在HCC患者和非肿瘤患者间的基因型和等位基因分布特征,来分析TNF- α 基因与HCC的相关性,以期能及时、准确地预测HCC的发生提供理论依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2016年9月至2019年9月于衢州市人民医院就诊的HCC患者112例作为实验组,其中男性50例、女性62例;年龄24~76岁,平均年龄为(41.39±10.97)岁。纳入标准包括:①HCC诊断均符合《原发性肝癌诊疗规范(2017年版)》中关于HCC的诊断标准^[4],且经病理证实;②患者均为未经过放射和抗癌药物治疗的新发现病例;③临床资料完整;④患者依从性好。并剔除:①伴有严重心、脑功能障碍者;②伴有其他恶性肿瘤或严重的全身性疾病者;③近期使用过抗感染和免疫制剂治疗者;④不配合试验以及临床资料不全者。选取同期住院无血缘关系的非肿瘤(临床和实验室检测均正常,无家族肿瘤史)患者100例为对照组,其中男性52例、女性48例;年龄23~74岁,平均年龄为(43.33±10.89)岁。全部研究对象或其家属签署知情同意书,本试验通过本院伦理委员会审查。两组一般资料比较,差异均无统计学意义(P 均>0.05)。

1.2 方法 所有患者均在22:00后禁食禁水,于次日清晨空腹采集外周静脉血5 ml置于抗凝管内,室温下静置1 h后,在4℃下3 500 r/min离心10 min后取上层清液,置于-80℃冷冻保存待检。采用酶联免疫吸附法检测血清TNF- α 水平,试剂盒由上海希美生物科技生物有限公司生产,检测过程全部操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 基因的提取与SNP位点基因分型 采集空腹静脉血5 ml(用乙二胺四乙酸二钠或肝素抗凝)置于离心管中,加入800 μ l的Tris-EDTA(TE)后混匀,在室温下以12 000 r/min离心10 min,重复5~6次,直至完全溶解。再加入400 μ l TE,25 μ l 10%十二烷基硫酸钠溶液,5 μ l 20 mg/ml PK,37℃消化过夜。吸上层清液,加入等体积的酚,摇荡15 min,以12 000 r/min离心10 min,再次吸上层清液;加入等体积的酚:氯仿(1:1)混合液,摇荡15 min,以12 000 r/min离心10 min,吸上层清液;再加入等体积的氯仿,摇荡15 min,以12 000 r/min离心10 min,吸上层清液;加入两倍体积的无水乙醇和1/10体积的3M乙酸钠,于-20℃下沉淀1 h,以12 000 r/min离心10 min,弃上层清液,向沉淀中加入75%乙醇,以12 000 r/min离心5 min后弃上层清液,干燥后用100 μ l TE溶解,最后置于-20℃冷藏备用。

SNP位点-238G/A和-308A/G的基因分型采用TaqMan探针荧光定量PCR方法进行检测,所使用的仪器为罗氏LightCycler480实时荧光定量PCR仪,基因分型试剂、TaqMan探针以及引物均购自美国ABI公司。PCR反应在罗氏LightCycler480实时荧光定量PCR仪进行,反应体积为10 μ l,反应条件为95℃预变性10 min,92℃变性15 s,60℃退火1 min,共40个循环,40℃延伸5 min。以水代替模板DNA作为阴性对照。用罗氏LightCycler 480荧光定量分析软件LCS480 1.5.1.62对实验数据进行基因分型,随机对SNP位点的不同基因型样本进行测序,验证Taqman基因分型的结果。SNP位点扩增引物设计参照文献,所用引物见表1。

表1 TNF- α 基因引物序列

多态位点	引物	序列(5'-3')
-238G/A	上游	AGAAGACCCCTCGGAACC
	下游	ATCTGGAGGAAGCGGTAGTG
-308A/G	上游	AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT
	下游	TCCTCCCTGCTCCGATTCCG

1.4 统计学方法 采用SPSS 21.0软件对统计数据整理分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。计量资料比较采用 t 检验;计数资料比较采用 χ^2 检验。采用Hardy-Weinberg平衡检验分析TNF- α 基因型在两组研究对象中的分布是否具有代表性。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清TNF- α 水平比较 实验组患者血清TNF- α 水平(488.15 \pm 126.20)pg/ml,明显高于对照组(284.69 \pm 94.77)pg/ml,差异有统计学意义($t=13.36, P<0.05$)。

2.2 两组间TNF- α 基因-238G/A和-308A/G多态性位点基因型及等位基因频率分布见表2

表2 两组间TNF- α 基因-238G/A和-308A/G多态性位点基因型及等位基因频率分布

SNP	基因型及等位基因	实验组 (n=112)	对照组 (n=100)
-238G/A	GG	81(72.31)	68(68.00)
	GA	28(25.01)	31(31.00)
	AA	3(2.68)	1(1.00)
	A	86(76.79)	67(67.00)
	G	26(23.21)	33(33.00)
-308A/G	AA	71(62.43)*	78(78.00)
	AG	33(30.54)*	20(20.00)
	GG	8(7.03)*	2(2.00)
	A	75(66.96)*	76(76.00)
	G	37(33.04)*	24(24.00)

注:*,与对照组比较, $P<0.05$ 。

由表2可见,TNF- α 基因-238G/A位点存在GG、GA、AA三种基因型,且两组间基因型频率分布比较,差异无统计学意义($\chi^2=1.61, P>0.05$);两组间的A、G等位基因分布频率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.02, P>0.05$)。

TNF- α 基因-308A/G位点存在AA、AG、GG三种基因型,且两组间基因型频率分布比较,差异有统计学意义($\chi^2=6.46, P<0.05$),实验组患者显性等位基因纯合子AA基因型频率明显低于对照组,杂合子AG以及隐性等位基因纯合子GG的基因型频率明显高于对照组,差异均有统计学意义(χ^2 分别为5.24、6.39、5.76, P 均 <0.05)。实验组中A等位基因频率明显低于对照组,实验组中G等位基因频率明显高于对照组,差异均有统计学意义(χ^2 分别为6.46、7.23, P 均 <0.05)。

2.3 不同基因分型的实验组患者血清TNF- α 水平比较见表3

由表3可见,TNF- α 基因-238G/A位点GG基因型患者血清TNF- α 水平与GA+AA基因型比较,差异无统计学意义($t=1.35, P>0.05$);TNF- α 基因

-308A/G位点AG+GG基因型的患者血清TNF- α 水平明显高于AA基因型,差异有统计学意义($t=6.10, P<0.05$)。

表3 不同基因分型的实验组患者血清TNF- α 水平比较

SNP	基因型	n	TNF- α /pg/ml
-238G/A	GG	81	514.56 \pm 128.94
	GA+AA	31	478.06 \pm 126.02
-308A/G	AA	71	492.59 \pm 125.81
	AG+GG	41	687.17 \pm 180.50*

注:*,与AA基因型比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

我国是肝癌的高发地区,HCC是肝癌最常见的一种病理类型^[5,6]。HCC的高发病率、高病死率以及高恶性程度给患者的生命健康带来了极大的威胁,对于目前不能进行病理学检查的HCC患者来说,单靠影像学技术进行诊断很难鉴别出病变的良恶性,而各类炎症因子则可在血清表达水平上发生变化,于恶性肿瘤发生的早期就起到一定的预警作用^[7]。炎症因子的基因多态性可能与HCC存在一定的病理相关。

TNF- α 是肿瘤疾病发生发展过程中发挥重要作用、极具代表性的炎性细胞因子,主要由活化的巨噬细胞产生和释放,具有免疫调节等多种生物学功能,也是炎症反应的启动因子,可促进机体组织产生炎症损伤以及其他炎性因子的生成^[8]。TNF- α 基因位于人类第6号染色体短臂p21.3区域^[9]。杨艳等^[10]的研究证实了TNF- α 在肝损伤、肝纤维化以及肝癌的病理发生发展过程中发挥重要作用。本次研究结果显示,HCC患者其血清TNF- α 水平明显高于对照组患者($P<0.05$),证实了TNF- α 与HCC之间存在相关性,TNF- α 基因多态性可能与HCC遗传易感性相关。

Satoh等^[11]以及王崇科等^[12]的研究均发现了TNF- α 基因-308A/G位点的单核苷酸多态性影响患者血清TNF- α 水平,当A等位基因被G等位基因替代,机体的TNF转录水平会上升,导致AG和GG基因型的患者血清TNF- α 水平会明显上升。本次研究结果显示,在TNF- α 基因中,-308A/G位点AG+GG基因型的患者血清TNF- α 水平明显高于AA基因型($P<0.05$),提示TNF- α 基因-308A/G位点的多态性可以影响机体TNF- α 的转录效率,导致不同基因型的个体之间血清TNF- α 水平存在差异,最终影

响HCC的遗传易感性及其发生发展。在本次研究关于-308A/G位点的基因型及等位基因频率分布研究结果显示,HCC患者中AA基因型频率明显低于非肿瘤患者,且HCC患者中G等位基因频率明显高于非肿瘤患者(P 均 <0.05),提示在-308A/G位点多态性中,A等位基因是个体发生HCC的保护等位基因,而G等位基因是个体发生HCC的风险等位基因。

王崇科等^[12]在研究中并未发现TNF- α 基因-238G/A位点的多态性与肝癌之间存在一定关联,这在Yang等^[13]关于细胞因子基因多态性与肝癌遗传易感性的Meta分析研究中亦得到了证实。考虑到HCC在肝癌疾病中的高额度占比以及两者病理过程的高度重合性,提示TNF- α 基因-238G/A位点可能与HCC之间不存在明显相关性。本次研究结果亦显示,在TNF- α 基因-238G/A位点的多态性中,两组间基因型频率分布及等位基因频率分布差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。而黄海玲等^[14]研究发现,TNF- α 基因-238位点GG、GA频率及其等位基因G、A频率在肝癌组和对照组间均存在明显差异,携带GA基因型个体患肝癌的风险约是GG基因型的2.786倍,这可能是由于地域、环境等因素的差异以及样本量选择和研究方法的不同造成的。但本次研究还存在一定的局限性,如样本量过小,且未对其他医院HCC患者进行研究,代表性不足。

综上所述,TNF- α 基因多态性与HCC遗传易感性以及发生发展过程可能存在一定的相关性,其中-308A/G位点中的G等位基因可能是个体发生HCC的风险等位基因,监测患者TNF- α 基因中-308A/G位点多态性对及时准确地预测HCC的发生、改善HCC患者预后具有重要的临床意义。

参考文献

- 1 Ringelhan M, Pfister D, O'Connor T, et al. The immunology of hepatocellular carcinoma[J]. *Nature Immunol*, 2018, 19(Suppl):23-26.
- 2 许秀华,向晓星.肝细胞癌的病因及发病机制研究进展[J].

医学综述, 2013, 19(5):70-72.

- 3 Gulluoglu S, Tuysuz EC, Sahin M, et al. The role of TNF- α in chordoma progression and inflammatory pathways[J]. *Cellular Oncol*, 2019, 56(8):1-15.
- 4 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局.原发性肝癌诊疗规范(2017年版)[S]. *中华消化外科杂志*, 2017, 16(7):635-647.
- 5 Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- 6 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and monal worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- 7 朱慧婧,顾益凤.血清中AFP、CA199、CA50和Ferr联合检测在原发性肝癌诊断中的意义[J]. *临床检验杂志(电子版)*, 2019, 23(4):77-79.
- 8 孙振亚,麦彩铃,刘昌伟,等.肿瘤坏死因子 α 对人肝癌细胞株MHCC-97L侵袭能力的影响[J]. *医学分子生物学杂志*, 2013, 45(2):105-108.
- 9 Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease[J]. *Human Immunol*, 2001, 62(11):1191.
- 10 杨艳,仇小强,曾小云,等.广西地区人群TNF- α 基因启动子区多态性与肝癌的易感性研究[J]. *中国癌症杂志*, 2012, 22(1):41-47.
- 11 Satoh J, Fujiwara F, Ishii M. TNF-alpha gene polymorphism, insulin resistance and type 2 diabetes in humans [J]. *Nihon Rinsho Japanese Journal Clin Med*, 2005, 63 (Suppl 2):189.
- 12 王崇科,张春燕,黄天壬,等. TNF- α 基因多态性与广西肝癌家族聚集性的相关性研究[J]. *中国癌症防治杂志*, 2012, 4(2):149-153.
- 13 Yang Y, Luo C, Feng R, et al. The TNF- α , IL-1B and IL-10 polymorphisms and risk for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(6):947-952.
- 14 黄海玲,解继胜,黄赞松,等. TNF- α -238G/A基因多态性与原发性肝癌的关系[J]. *解剖科学进展*, 2007, 13(1):11-13.

(收稿日期 2019-12-06)

(本文编辑 蔡华波)