

文章编号:1005-6947(2006)09-0659-05

· 胃癌专题研究 ·

细胞因子基因多态性与胃腺癌发生及其临床病理特点的关系

邢培祥¹, 肖东杰³, 曾庆东², 高卫⁴, 汪运山³, 王洪春¹

(山东大学齐鲁医院 1. 检验科 2. 普通外科, 山东 济南 250012; 山东大学临床医学院济南市中心医院 3. 中心实验室 4. 肿瘤科, 山东 济南 250013)

摘要:目的 探讨肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素6 (IL-6)基因单核苷酸多态性 (SNP)与胃腺癌合并或未合并幽门螺杆菌 (Hp)感染的关系。方法 采用基因芯片技术检测130例胃腺癌患者 (胃癌组)和142例健康对照人群 (对照组)中TNF- α -238G/A, -308G/A和IL-6-597G/A, -174G/C, -572G/C位点多态性。同时应用酶联免疫吸附试验 (ELISA)测定两组血清中Hp-IgG/IgM/IgA型抗体浓度。结果 胃癌组Hp的感染阳性率明显高于对照组 ($P < 0.01$, 相对危险度 [OR] = 2.59)。TNF- α -238GA基因型和A等位基因频率,胃癌组明显高于对照组 ($P < 0.01$, OR = 2.44; $P < 0.01$, OR = 2.13); Hp阳性胃癌组明显高于Hp阴性胃癌 ($P < 0.05$, OR = 4.53; $P < 0.01$, OR = 3.52);低分化胃癌组显著高于高分化胃癌组 ($P < 0.05$, OR = 4.16)。胃癌组IL-6-572CC基因型频率明显低于对照组 ($P < 0.01$, OR = 0.17)。未见TNF- α 和IL-6其他位点的SNP与胃癌组或Hp阳性胃癌组有任何相关性。结论 TNF-238GA基因型及其等位基因A与胃腺癌或感染Hp的胃腺癌易感性相关,而IL-6-572CC基因型则能降低胃腺癌易感性。

关键词:胃肿瘤/病理学; 腺癌/病理学; 肿瘤坏死因子; 白细胞介素-6; 多态性, 单核苷酸

中图分类号: R735.2; R730.261

文献标识码: A

Relationship between cytokine gene polymorphisms on development and clinical characteristics of gastric adenocarcinoma

XING Pei-xiang¹, XIAO Dong-jie³, ZENG Qing-dong², GAO Wei⁴, WANG Yun-shan³, WANG Hong-chun¹

(1. Department of Clinical Laboratory 2. Department of General Surgery, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China; 3. Central Laboratory 4. Department of Oncology, Jinan Central Hospital, Clinical Medical College of Shandong University, Jinan 250013, China)

Abstract: Objective To investigate relationships between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of tumor necrosis factor- α (TNF α) or interleukin-6 (IL-6) promoter genes and gastric adenocarcinoma with or without helicobacter pylori (HP) infection. **Methods** The SNPs of TNF- α (-238G/A and -308G/A) and IL-6 (-597G/A, -174G/C and -572G/C) were determined by gene chip in 130 patients with gastric adenocarcinoma and 142 healthy controls. The sera concentrations of IgG, IgM and IgA of HP antibodies were measured by ELISA in all cases and controls. **Results** Pylori infection was detected in 69.2% of 130 patients and 46.5% of 142 controls ($P < 0.01$, odds ratio [OR] = 2.59, 95% confidence interval [95% CI] = 1.58 ~ 3.93). Frequencies of TNF- α -238GA genotype and A allele in patients with gastric adenocarcinoma were significantly higher than those in healthy controls ($P < 0.01$, OR = 2.44, 95% CI = 1.41 ~ 4.22 and $P < 0.01$, OR = 2.13, 95% CI = 1.22 ~ 3.73, respectively). Frequencies of TNF- α -238GA genotype and A allele in patients with gastric adenocarcinoma with HP infection were significantly higher than those in HP-negative patients with gastric adenocarcinoma ($P < 0.05$, OR = 4.53,

收稿日期:2006-01-25; 修订日期:2006-07-07。

作者简介:邢培祥,男,山东安丘人,山东大学齐鲁医院主管检验师,主要从事肿瘤免疫与遗传方面的研究。

通讯作者:汪运山 E-mail:sdjnwys@163.com。

95% CI = 1.16-17.68 and $P < 0.01$, OR = 3.52, 95% CI = 1.64-7.54, respectively). Frequencies of TNF- α -238GA genotype and A allele in patients with poorly-differentiated gastric adenocarcinoma were significantly higher than those in well-differentiated group ($P < 0.05$, OR = 4.16, 95% CI = 1.21 ~ 14.32). The proportion of individuals carrying the IL-6-572CC genotype was significantly lower in the patients with gastric adenocarcinoma than in the controls ($P < 0.01$, OR = 0.17, 95% CI = 0.064 ~ 0.465). No association was found between any of the other polymorphisms and patients with gastric adenocarcinoma or patients with gastric adenocarcinoma and HP infection. **Conclusions** TNF- α -238GA genotype and A allele were significantly related to patients with gastric adenocarcinoma or patients with gastric adenocarcinoma and HP infection. IL-6-572CC genotype can have a protective function against susceptibility to gastric cancer.

Key words: Stomach Neoplasms/pathol; Adenocarcinoma/pathol; Tumor Necrosis Factor; Interteukin-6; Polymorphism, Single Nucleotide

CLC number: R735.2; R730.261

Document code: A

胃癌的发生发展是一个多因素多阶段多基因参与的过程,其中,幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染和遗传因素在胃癌发生发展中的作用备受关注^[1-2]。肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素6(IL-6)分别是Th1型和Th2型免疫反应的关键分子,如果这些分子出现基因变异则导致不同的免疫反应,进而增加发生胃癌的危险性^[1-4]。基于此,笔者对TNF- α 和IL-6启动子区单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与胃癌易感性的关系进行探讨,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源及其一般资料 130例胃腺癌患者(胃癌组)分别来自山东大学齐鲁医院、济南市中心医院肿瘤科及普通外科。其中男70例,女60例;平均年龄(58.6 ± 13.3)岁。均经病理切片证实为胃腺癌;包括低分化腺癌78例,中分化腺癌32例,高分化腺癌20例;有淋巴结转移48例,无淋巴结转移82例。142例健康对照(对照组)来自山东大学临床医学院济南市中心医院健康体检中心,其中男70例,女72例;平均年龄(53.5 ± 11.2)岁。所有对照均无消化系统疾病、内分泌疾病、心血管疾病、自身免疫病和慢性炎症,均无近期输血史。

1.1.2 试剂与仪器 TNF- α /IL-6基因多态性检测芯片试剂盒由济南市中心医院中心实验室提供。芯片检测试剂盒由提取液1,提取液2,预杂交液,杂交缓冲液,洗液1,洗液2,洗液3,抗体液,显色液,Taq酶,扩增液14,扩增液15,扩增液16,阴性扩增液,阴性对照液,阳性扩增液及阳性对照液等组成。Hp抗体(IgG, IgM, IgA)检测试剂盒由美国Biochech, Inc提供。聚合酶链式反应(PCR)采用ABI公司生产的5700型PCR扩增仪。芯片检测采

用Baio BE系列基因芯片检测仪,购自上海百傲科技有限公司。PCR引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。TNF- α 上游引物为Biotin-5'-tcctccaaccccggtttct-3',下游引物为5'-catctggaggaagcggtagtgg-3'; IL-6上游引物为5'-cacactccacctggagacgcc-3',下游引物为5'-Biotin-agcgggtgggctgattgga-3'。

1.2 实验方法

1.2.1 标本采集 所有样本均采集4mL EDTA抗凝血,分离部分血浆备测Hp抗体,剩余部分颠倒混匀备抽提基因组DNA。标本-80℃保存备用。

1.2.2 基因芯片检测 操作严格按说明进行。简要步骤如下:(1)DNA抽提。(2)PCR扩增。扩增条件为94℃ 5min, 94℃ 25s, 56℃ 25s, 72℃ 25s, 35个循环, 72℃延伸5min。扩增产物98℃变性5min,迅速放入冰盒,-20℃放置备用。(3)杂交。将基因芯片置于杂交舱中并加入200 μ L预杂交液, 41℃ 5min;然后加入已变性的PCR扩增产物和200 μ L杂交液, 41℃ 30min;再加入200 μ L已预热的1号洗涤液, 41℃ 5min,重复2次。(4)显色。向杂交舱中加入2号洗涤液200 μ L,室温2min,加入抗体液200 μ L,室温20min,然后用2号洗涤液洗2次,3号洗涤液洗1次,向杂交舱中加入200 μ L显色液, 41℃ 40min。(5)检测。在Baio基因芯片识读仪上检测。检测图像经Array Doctor软件分析自动输出检测结果。

1.2.3 Hp抗体检测 应用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定Hp。操作方法、结果计算均按试剂盒说明进行。Hp感染的认定标准:血清IgG, IgA, IgM 3项指标中有1项以上阳性者为Hp阳性(Hp⁺),否则为Hp阴性(Hp⁻)。

1.3 统计学处理

基因频率的计算采用直接算法。数据处理使用SAS 9.0统计学软件。两组间基因型和等位基因

分布比较用四格表法进行 χ^2 或 Fisher's 准确概率法。以比值比 (OR) 及其 95% 可信区间 (95% CI) 估计相对风险度。用单体型频率进行连锁不平衡分析。

2 结果

2.1 Hp 感染实验结果

胃癌组的 Hp 感染率显著高于对照组 ($\chi^2 = 14.36, P < 0.01$; OR = 2.591, 95% CI = 1.583 ~ 3.931) (表 1)。

2.2 连锁不平衡分析

TNF- α -238 和 -308 位点连锁不平衡系数 D, 在

胃癌组和对照组分别为 0.633 和 0.562 ($P = 0.067$)。表明两组的单体型频率差异无显著性。IL-6-174, -572 和 -597 连锁不平衡系数 D, 在胃癌组和对照组比较差异亦无显著性 ($P = 0.664$)。

2.3 TNF- α 基因多态性与胃癌风险性的关系

胃癌组 TNF- α -238 GA 基因型频率显著高于对照组 ($\chi^2 = 10.17, P < 0.01, OR = 2.44, 95\% CI = 1.41 \sim 4.22$), 等位基因 A 频率也明显高于对照组 ($\chi^2 = 7.03, P < 0.01, OR = 2.13, 95\% CI = 1.22 \sim 3.73$)。TNF α -308 基因型及等位基因频率两组间差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 2)。芯片部分检测结果见附图。

表 1 两组感染 Hp 的分布状态

组别	例数	IgG 阳性	IgM 阳性	IgG + IgM 阳性	IgG + IgA 阳性	合计阳性例数 (%)
胃癌	130	62	8	12	8	90(69.23)
对照	142	44	8	8	6	66(46.48)
P 值						<0.01

表 2 TNF- α 基因多态性与胃癌风险性的关系 (n, %)

组别	n	-238 (%)					-308 (%)				
		GG	GA	AA	G	A	GG	GA	AA	G	A
胃癌组	130	84(64.6)	46(35.4) [†]	0	214(82.3)	46(17.7) [†]	72(55.4)	54(41.5)	4(3.1)	198(76.2)	62(23.8)
对照组	142	116(81.7)	26(18.3)	0	258(90.9)	26(9.1)	100(70.4)	40(28.2)	2(1.4)	240(84.5)	44(15.5)

注: † 与对照组比, $P < 0.01$

a:GA/GA/GG/GC/GA 基因型

b:GG/GG/GG/GC/GG 基因型

c:GG/GA/GG/GC/GA 基因型

d:GG/GA/GG/CC/GG 基因型

附图 TNF- α -238/-308 和 IL-6-174/-572/-597 多态性基因芯片分型结果

2.4 IL-6 基因多态性与胃癌风险性的关系

胃癌组 IL-6-572CC 基因型频率明显低于对照组 ($\chi^2 = 12.102, P < 0.01, OR = 0.173, 95\% CI = 0.0644 \sim 0.4649$); IL-6-572C 等位基因频率虽低于对照组但差异无显著性 ($\chi^2 = 2.274, P > 0.05$) (表 3)。芯片部分检测结果见附图。

2.5 TNF- α 和 IL-6 基因多态性与胃腺癌临床特征的关系

2.5.1 TNF- α 和 IL-6 基因多态性与性别的关系

TNF- α 和 IL-6 基因多态性频率在对照组男性人群和女性人群及胃癌组男性患者和女性患者之间未见统计学差异 ($P > 0.05$)。对照组和胃癌组之间的 TNF- α 和 IL-6 基因多态性频率差异也无显著性 ($P > 0.05$)。

2.5.2 TNF- α -238 GA 基因型及 A 等位基因与胃腺癌不同分化程度的关系

低分化胃癌组 TNF- α -

238GA 基因型及 A 等位基因频率明显高于高分化胃癌组 ($P < 0.05$, OR = 4.16, 95% CI = 1.21 ~ 14.32) (表4)。

表3 IL-6 基因多态性与胃癌风险性的关系

等位基因和基因型	胃腺癌组 ($n = 130$)		对照组 ($n = 142$)	
	例数	(%)	例数	(%)
IL-6-174				
G	254	(97.69)	276	(97.18)
C	6	(2.31)	8	(2.82)
GG	124	(95.38)	134	(94.36)
GC	6	(4.62)	8	(5.64)
CC	0		0	
IL-6-572				
G	134	(51.54)	128	(45.07)
C	126	(48.46)	156	(54.93)
GG	8	(6.15)	8	(5.63)
GC	118	(90.77)	112	(78.87)
CC	4	(3.08) [†]	22	(15.50)
IL-6-597				
G	160	(61.54)	180	(63.38)
A	100	(38.46)	104	(36.62)
GG	30	(23.08)	38	(26.76)
GA	100	(76.92)	104	(73.24)
AA	0		0	

注: † 与对照组比 $P < 0.05$

表5 胃腺癌 TNF- α -238/-308 基因型和等位基因与 Hp 感染相关性

组别	例数	-238 (%)					-308 (%)				
		GG	GA	AA	G	A	GG	GA	AA	G	A
Hp ⁺	90	50(56.0)	40(44.0) [†]	0	140(78.0)	40(22.0) [†]	50(55.6)	38(42.2)	2(2.2)	138(76.6)	42(23.3)
Hp ⁻	40	34(85.0)	6(15.0)	0	74(92.5)	6(7.0)	22(55.0)	16(40.0)	2(5.0)	60(75.0)	20(25.0)

注: † 与 HP⁻ 组比, $P < 0.05$

3 讨论

TNF- α 是参与免疫调节作用的前炎性细胞因子,具有抑制胃酸分泌^[5]及损伤胃黏膜^[6]的作用。TNF- α 启动子区存在许多 SNP (如-238 G/A, -308 G/A, -857 C/T, -863 C/A, -1031 T/C); 这些 SNP 对转录因子结合的影响可调节 TNF- α 的产物^[4]。研究^[7]表明,与 Hp 阴性胃癌患者相比, Hp 阳性胃癌患者胃液和血清中的 TNF 是升高的。但 TNF- α -308 基因多态性并未影响胃黏膜 TNF- α 表

表4 TNF- α -238GA 基因型及 A 等位基因与胃腺癌不同分化程度的关系

组别	总例数	-238GA		-238A	
		例数	(%)	例数	(%)
高分化	20	3	(15.0)	3	(15.0)
中分化	32	10	(31.3)	10	(31.3)
低分化	78	33	(42.3) [†]	33	(42.3) [†]

注: † 与高分化组比, $P < 0.05$

2.5.3 TNF- α 和 IL-6 基因多态性与淋巴结转移的关系 在有淋巴结转移的胃腺癌组 ($n = 48$) 和无淋巴结转移的胃腺癌组 ($n = 82$) 之间,未观察到 TNF- α 和 IL-6 基因多态性频率差异有显著性 ($P > 0.05$)。

2.6 TNF- α 和 IL-6 基因多态性与 Hp 感染的关系

Hp 阳性组 TNF- α -238GA 基因型频率明显高于 Hp 阴性组 ($P < 0.05$, OR = 4.53, 95% CI = 1.16 ~ 17.68); TNF- α -238A 等位基因频率也明显高于 Hp 阴性组 ($\chi^2 = 10.50$, $P < 0.01$, OR = 3.52, 95% CI = 1.64 ~ 7.54)。TNF- α -308 各基因型及等位基因频率差异均无显著性 ($P > 0.05$)。胃癌 Hp 阳性组和胃癌 Hp 阴性组之间 IL-6 基因多态性各位点基因型及等位基因频率差异均无显著性 ($P > 0.05$)。

达或对 Hp 的炎性反应^[3]。Jang 等^[8]对 169 例肿瘤研究表明, TNF- α -238A 等位基因频率明显低于对照组,具有降低肿瘤风险的作用,但未获其他资料的支持^[4-5,9]。本研究结果表明,胃癌组中 TNF-238GA 基因型及 A 等位基因频率均显著高于健康对照组,携带 A 等位基因或 GA 基因型的个体比不携带者发生胃腺癌的危险性高 2 倍以上。提示 TNF-238A 可能与胃腺癌易感性有关。胃腺癌进一步按分化程度分组的结果显示,低分化组 TNF-238GA 基因型及 A 等位基因频率显著高于高分化

组。提示携带 TNF-238GA 基因型或 A 等位基因易致恶性程度高胃腺癌,其危险性比致高分化胃腺癌高 4 倍以上。此项结果对预测胃腺癌预后的意义值得深入研究,但文献未见报道。Hp⁺ 胃腺癌 TNF-238GA 基因型及 A 等位基因频率显著高于 Hp⁻ 胃腺癌,携带 A 等位基因的 Hp⁺ 患者比 Hp⁻ 患者发生胃腺癌的危险性高 4.5 倍以上。提示 TNF-238GA 基因型与 Hp 感染可能协同致癌,突变型等位基因 A 可能是 Hp 感染胃腺癌的遗传易感因素。

Yea 等^[4]对 TNF- α -308 与 Hp 感染关系的研究表明,TNF-308A 等位基因与 Hp 感染无关,但与细胞毒相关基因 A (cytotoxin associated gene A, cagA) 阳性亚群显著相关。Machado 等^[2]证实了 Yea 等的研究结果,即 TNF- α -308 与胃癌及是否有 Hp 感染无关^[5,10-14]。然而,Zambon 等^[9]研究则表明 TNF- α -308A 等位基因与 Hp 感染有关,并增加胃腺癌的易感性^[5]。本研究结果与 Machado 等^[2]的结论基本一致,即 TNF-308 基因多态性与胃腺癌易感性无关。

IL-6 是介导 Th2 型反应的一个关键因子。研究^[15]表明,IL-6 启动子区-174G/C SNP 可增加 IL-6 基因的转录和表达;升高的血清 IL-6 水平与进展期胃癌的不良预后有关^[16],但 IL-6 基因多态性并不增加胃癌危险性^[1,17]。Hwang 等^[18]应用 Hp 感染 6 种胃癌细胞系,结果发现 IL-6 水平与 IL-6 启动子区-174,-572 和-597 多态性位点无相关性;在 Hp 感染阳性和阴性胃癌患者中也未发现与这 3 个位点的任何相关性。本研究表明,IL-6-572CC 基因型频率显著低于健康人群,提示 IL-6-572CC 基因型具有降低胃癌危险性的作用。其作用机制是否与 IL-6-572CC 基因型具有减少 IL-6 产物的作用有关,尚待深入研究。

参考文献:

[1] Savage SA, Abnet CC, Haque K, *et al.* Polymorphisms in interleukin -2, -6, and -10 are not associated with gastric cardia or esophageal cancer in a high-risk chinese population [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13 (9): 1547 - 1549.

[2] Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, *et al.* A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125 (2): 364 - 371.

[3] Rad R, Dossumbekova A, Neu B Ne, *et al.* Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection [J]. *Gut*, 2004, 53 (6): 1082 - 1089.

[4] Yea SS, Yang YI, Jang WH, *et al.* Association between TNF- α promoter polymorphism and *Helicobacter pylori* cagA subtype infection [J]. *Clin Pathol*, 2001, 54 (9): 703 - 706.

[5] Lee SG, Kim B, Yook JH, *et al.* TNF/LTA polymorphisms and risk for gastric cancer/duodenal ulcer in the Korean population [J]. *Cytokine*, 2004, 28 (2): 75 - 82.

[6] 褚延奎, 马庆久, 刘维, 等. 肝缺血再灌注对血及胃黏膜中 TNF 和 IL-8 及其 mRNA 表达的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12 (6): 425 - 426.

[7] Mehmet N, Refik M, Harputluoglu M, *et al.* Serum and gastric fluid levels of cytokines and nitrates in gastric diseases infected with *Helicobacter pylori* [J]. *New Microbiol*, 2004, 27 (2): 139 - 148.

[8] Jang WH, Yang YI, Yea SS, *et al.* The-238 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers [J]. *Cancer Lett*, 2001, 166 (1): 41 - 46.

[9] Zambon CF, Basso D, Navaglia F, *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome [J]. *Cytokine*, 2005, 29 (4): 141 - 152.

[10] Wu MS, Chen LT, Shun CT, *et al.* Promoter polymorphisms of tumor necrosis factor- α are associated with risk of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma [J]. *Cancer*, 2004, 110 (5): 695 - 700.

[11] Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, El-Omar E, *et al.* Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico [J]. *Cancer*, 2005, 114 (2): 237 - 241.

[12] Li C, Xia B, Yang Y, *et al.* TNF gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis in Chinese population [J]. *Am J Gastroenterol*, 2005, 100 (2): 290 - 294.

[13] Perri F, Piepoli A, Bonvicini C, *et al.* Cytokine gene polymorphisms in gastric cancer patients from two Italian areas at high and low cancer prevalence [J]. *Cytokine*, 2005, 30 (5): 293 - 302.

[14] Lee JY, Kim HY, Kim KH, *et al.* Association of polymorphism of IL-10 and TNF-A genes with gastric cancer in Korea [J]. *Cancer Lett*. 2005, 225 (2): 207 - 214.

[15] Lobo Gatti L, Zambaldi Tunes M, de Labio RW. Interleukin-6 polymorphism and *Helicobacter pylori* infection in Brazilian adult patients with chronic gastritis [J]. *Clin Exp Med*, 2005, 5 (3): 112 - 116.

[16] Ashizawa T, Okada R, Suzuki Y, *et al.* Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) in the spread of gastric cancer; role of IL-6 as a prognostic factor [J]. *Gastric Cancer*, 2005, 8 (2): 124 - 131.

[17] El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, *et al.* Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms [J]. *Gastroenterology*, 2003, 124 (5): 1193 - 1201.

[18] Hwang IR, Hsu PI, Peterson LE, *et al.* Interleukin-6 genetic polymorphisms are not related to *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases [J]. *Helicobacter*, 2003 8 (2): 142 - 148.