

• 实验研究 •

TNFR II 基因 -196M/R 多态性与乳腺癌易感性的相关性

柳晓义 胡建霞 王宇 曹明智

【摘要】 目的 探讨 TNF- α 受体 II(TNFR II)基因第 6 外显子 -196M/R 多态性与中国北方女性乳腺癌发病的相关性。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测 TNFR II 基因 -196M/R 多态性,分析 212 例乳腺癌患者(实验组),218 例乳腺良性病变患者(良性组)和 220 例健康对照者(对照组)的 TNF- α 受体 II(TNFR II)基因多态性与乳腺癌易感性的关系。**结果** (1)650 例研究对象中存在 TNFR II 基因 -196M/R 多态性。(2) -196M/R 位点的 TG + GG 基因型及 G 等位基因频率在良性病变组与对照组间差异无统计学意义,而在乳腺癌组则显著高于良性病变组和对照组(均 $P < 0.05$)。**结论** TNFR II 基因 -196M/R 在乳腺癌组和对照组存在多态性,第 6 外显子 -196M/R 位点 T/G 多态性可能为乳腺癌发病的易感基因位点,G 等位基因可能为中国北方女性乳腺癌发病的易感基因。

【关键词】 乳腺癌;肿瘤坏死因子 α ;肿瘤坏死因子 α 受体 II;多态现象

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Association between TNFR II gene polymorphisms and breast cancer LIU Xiao-yi, HU Jian-xia, WANG Yu, CAO Ming-zhi. Department of Galactophore, Qingdao Medical School Hospital, Qingdao 266003, China

【Abstract】 Objective To explore the relationship between TNF- α receptor II(TNFR II) gene -196M/R polymorphisms and breast cancer. **Methods** TNFR II gene polymorphisms at position -196 were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method in 212 female patients with breast cancer, 218 female patients with breast benign diseases and 220 female healthy controls. **Results** (1) There were

作者单位:266003 青岛,青岛大学医学院附属医院乳腺外科

通讯作者:曹明智, E-mail: qdxyhjh@126.com

TNFR II gene -196 M/R polymorphisms in the 640 cases. (2) There was no statistic difference in the frequencies of TG + GG genotype and allele G between benign and control groups. The frequencies of TG + GG genotype in the study group were significantly higher than those in the benign and control groups ($P < 0.05$). **Conclusion** There were TNFR II gene -196 M/R polymorphisms in breast cancer and control groups. TNFR II gene -196 G allele may be the predisposing gene and the relative risk of breast cancer.

【Key words】 Breast carcinoma; TNF- α ; TNF- α receptor II (TNFR II); Polymorphisms

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,严重危害妇女的健康和生命。其发病率在世界各地之间存在显著的差异,原为乳腺癌低发区的亚洲国家发病率逐年升高,已发现数种基因与乳腺癌的发病相关。近年来已有研究显示肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及其受体基因多态性与自身免疫病,恶性肿瘤的进程及严重程度相关。本研究以中国北方女性为研究对象,旨在探讨肿瘤坏死因子受体 II 基因多态性的分布及其是否为乳腺癌发病的易感基因。

1 材料与方法

1.1 研究对象

均为 2005 年 7 月至 2007 年 3 月本院乳腺外科门诊及住院患者。乳腺癌组(实验组)212 例,均为女性,年龄(50.7 ± 5.64)岁,其中浸润性导管癌 172 例,单纯癌 26 例,髓样癌 8 例,黏液腺癌 6 例。乳腺良性病变组(良性组)218 例,均为女性,年龄(44.9 ± 3.52)岁,其中纤维腺瘤 178 例,乳腺囊性增生症 40 例。患者均经病理证实。健康对照组 220 例(女性),年龄(49.5 ± 4.65)岁,为本院健康查体中心筛选的健康人群,无乳腺疾病家族史,年龄、性别与病例组相匹配。

1.2 实验方法

1.2.1 基因提取:赛百盛基因组 DNA 提取试剂盒提取外周血 DNA,溶解于 pH 8.0 的 TE 缓冲液中。

1.2.2 引物设计与合成:根据 GenBank 中的基因序列用 DNASTAR 软件设计上下游引物。-196 位点上游引物:5'-TTC TGG AGT TGG CTG CGT GT-3',下游引物:5'-ACT CTC CTA TCC TGC CTG CT-3',PCR 产物长度为 242 bp。引物由上海生工生物公司合成。

1.2.3 PCR 扩增反应:反应体系 25 μ l。去离子水 13 μ l, DNA 模板 2 μ l, 10 \times Buffer 2.5 μ l, 10 \times dNTP 2 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1.5 μ l,

Taq 酶 1 U。循环参数:95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 60 s, 57 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 35 个循环, 之后 72 °C 终延伸 5 min。

1.2.4 限制性酶切反应体系:去离子水 9 μ l, 10 \times Buffer 2 μ l, PCR 产物 7 μ l, *Nla* III 2 μ l。37 °C 水浴中酶切 14 h。

1.2.5 酶切结果分析:限制性酶切产物经 4% 琼脂糖凝胶电泳分离后观察结果。结果显示, 在 242 bp 的 PCR 扩增片段中, 当此位点为野生型(TT)时, 可被 *Nla* III 酶切后产生 133 bp 和 109 bp 两个片段; 当此位点为纯合变异型(GG)时, 此处序列不能被 *Nla* III 酶切; 当此位点为杂合变异型(TG)时, 由于同时存在上述两种情况, 酶切后得到 242、133、109 bp 3 个片段。

1.3 统计学处理

运用 Hardy-Weinberg 平衡法则检测样本的群体代表性, 采用 SPSS11.0 统计处理软件将实验数据进行 χ^2 检验, 并计算相对危险度。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNFR II 基因第 6 外显子 - 196M/R 位点 3 种基因型(TT、TG、GG) 的频率分布

实验组 TG + GG 基因型频率显著高于良性组和对照组 ($\chi^2 = 4.021, P = 0.045, OR = 1.482, 95\%$ 可信区间为 1.008 ~ 2.178; $\chi^2 = 6.616, P = 0.010, OR = 1.66, 95\%$ 可信区间为 1.127 ~ 2.445), 绝经前及绝经后患者与对照组相比差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 4.532, P = 0.033, OR = 1.632, 95\%$ 可信区间为 1.038 ~ 2.657; $\chi^2 = 4.400, P = 0.036, OR = 1.679, 95\%$ 可信区间为 1.033 ~ 2.789)。良性组 TG + GG 基因型频率与对照相比差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.324, P = 0.569$, 表 1)。

表 1 TNFR II 基因第 6 外显子 - 196M/R 位点基因型和等位基因的分布频率

组别	例数	基因型[例数(%)]		等位基因[例数(%)]	
		TT	TG + GG	T	G
对照组	220	144(0.655)	76(0.345)	358(0.814)	82(0.186)
良性组	218	137(0.628)	81(0.372)	352(0.807)	84(0.193)
实验组	212	113(0.533)	99(0.467) ^{ab}	316(0.745)	108(0.255) ^{ab}
绝经前	121	65(0.537)	56(0.463) ^b	180(0.744)	62(0.256) ^a
绝经后	91	48(0.527)	43(0.473) ^b	136(0.747)	46(0.253)

a: $P < 0.05$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, 与良性组比较

2.2 TNFR II 基因第 6 外显子 - 196M/R 位点两种等位基因(T、G)的频率分布

实验组 G 等位基因频率显著高于良性组和对照组($\chi^2 = 4.774, P = 0.029, OR = 1.432, 95\%$ 可信区间为 $1.037 \sim 1.978$; $\chi^2 = 5.881, P = 0.015, OR = 1.492, 95\%$ 可信区间为 $1.079 \sim 2.046$), 绝经前及绝经后患者与对照组相比差异均有统计学意义($\chi^2 = 32.114, P < 0.001, OR = 2.62, 95\%$ 可信区间为 $1.868 \sim 3.674$; $\chi^2 = 12.556, P < 0.001, OR = 1.990, 95\%$ 可信区间为 $1.355 \sim 2.923$)。良性组 G 等位基因频率与对照组相比差异无统计学意义($\chi^2 = 0.057, P = 0.812$, 表 1)。

3 讨论

有研究报道炎症因子能促进恶性细胞的生长、侵袭及远处转移。TNF- α 是炎症过程早期产生的细胞因子之一,并能引起 TNF 自身及 IL-1、IL-6 等其他细胞因子的快速产生^[1]。TNF 是一种多功能的细胞因子,最早被认为是由巨噬细胞分泌的血浆蛋白,可调节小鼠实体瘤的坏死。TNF- α 的高水平与恶性肿瘤的预后相关^[2]。有研究报道,过多 TNF- α 产生可影响到宿主的状态,如体重下降、恶病质、免疫功能失调和贫血,阻碍患者抵抗疾病的能力^[3]。这些报道表明 TNF- α 可能是体内肿瘤的促进因子^[4-7]。Wilson 等^[8]首先报道了 TNF- α 基因启动子区域内 -308 位点存在 G/A 多态性,Kroeger 进一步研究发现 TNF- α 基因 -308 位点的基因多态性影响转录,可直接影响 TNF- α 的表达产量^[9]。而 TNFR II 基因外显子 6 的碱基变化(196 T \rightarrow G)也可能导致其生物学活性的改变。

TNF- α 主要通过与其受体结合来发挥其生物学作用。肿瘤坏死因子受体(TNFR)存在于多种正常细胞及肿瘤细胞表面,有 TNFR I 和 TNFR II 两种亚型。TNFR I 几乎分布于所有有核细胞表面,而 TNFR II 主要分布于造血细胞系。

TNFR II 基因定位于 1 号染色体 1p36,由 10 个外显子和 9 个内含子构成。第 6 外显子 T/G 单核苷酸多态性导致 196 密码子蛋氨酸被精氨酸代替^[10]。改变的氨基酸定位于其胞外区,与蛋白切除有关,产生 TNFR II 的可溶形式^[11]。受体脱落导致细胞表面受体下调,并释放有生理作用的可溶性受体,其作用可能是受体的拮抗剂^[12]。进一步的功能研究显示 TNFR II 196R 比 TNFR II 196M 导致更多的 IL-6 产生^[13]。

TNFR II 主要位于循环 T 淋巴细胞上,且在肿瘤浸润淋巴细胞,NK 细胞和血单核细胞的体外增殖中起作用。TNFR II 也能增强 TNFR I 在 TNF 介导的毒性反应中的作用。TNFR II 的这些特性促使学者们探讨其基因多态性在乳腺癌发病中的作用。

本研究显示 TNFR II 196M/R 基因型增加了乳腺癌发病的危险性。乳腺癌组 196R 基因的频率显著高于对照组,两者之间的相关性在绝经后妇女中尤为明显。已有学者在功能研究和基因分析上证实 TNF 和 TNFR II 在肿瘤发生和进展中的作用^[14]。TNFR II 基因定位于 1 号染色体 1p36,某些造血系统恶性肿瘤染色体非随机易位经常发生于这一部位,1p 远端的删除也可见于其他类型肿瘤中,包括乳腺癌^[15]。本研究显示了 TNFR II 第 6 外显子基因多态性与乳腺癌易感性之间的相关性,表明 TNFR II 在肿瘤发生和进展作用中的基因基础可能来源于 196M/R。

参考文献

- [1] Kaur K, Chowdhury S, Greenspan N S, *et al.* Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. *Blood*,2007,110:2948 – 2954.
- [2] 杨文东,安振国,王玉龙. 乳腺癌患者 NO、TNF- α 水平的监测及临床意义. *细胞与分子免疫学杂志*,2002,18:192.
- [3] Byun HS, Park KA, Won M, *et al.* Phorbol 12-myristate 13-acetate protects against tumor necrosis factor (TNF)-induced necrotic cell death by modulating the recruitment of TNF receptor 1-associated death domain and receptor-interacting protein into the TNF receptor 1 signaling complex: Implication for the regulatory role of protein kinase C. *Mol Pharmacol*, 2006,70:1099 – 1108.
- [4] Nick D, Hilde R, Anne K, *et al.* The tumor-promoting effect of TNF- involves the induction of secretory leukocyte protease inhibitor. *J Immunol*,2006,177: 8046 – 8052.
- [5] McKenna S D, Feger G, Kelton C, *et al.* Tumor necrosis factor (TNF)-soluble high-affinity receptor complex as a TNF antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*,2007,322:822 – 828.
- [6] Sainz J, Pérez E, Hassan L, *et al.* Variable number of tandem repeats of TNF receptor type 2 promoter as genetic biomarker of susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Hum Immunol*,2007,68:41 – 50.
- [7] Arnott C H, Scott K A, Moore R J, *et al.* Tumour necrosis factor- α mediates tumour promotion via a PKC α - and AP-1-dependent pathway. *Oncogene*,2002,21: 4728 – 4738.
- [8] Wilson A G, Symons J A, McDowell T L, *et al.* Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA*,1997,94:3195 – 3199.
- [9] Kroeger K M, Carville K S, Abraham L J. The-308 tumor necrosis factor α promoter polymorphism effects transcription. *MolImmunol*, 1997,34:391 – 399.
- [10] Goëb V, Dieudé P, Vittecoq O, *et al.* Association between the TNFR II 196R allele and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2005,7:1056 – 1062.
- [11] Kieszko R, Krawczyk P, Chocholska S, *et al.* Tumor necrosis factor receptors (TNFRs) on T lymphocytes and soluble TNFRs in different clinical courses of sarcoidosis. *Respir Med*,2007,101: 645 – 6054.
- [12] Hooper N M, Karran E H, Turner A J. Membrane protein secretases. *Biochem J*,1997,15:265 – 279.
- [13] Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H, *et al.* Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with

systemic lupus erythematosus in the Japanese; molecular and functional analysis. Arthritis Rheum, 2001, 44: 2819 – 2827.

- [14] Mestiri S, Bouaouina N, Ben Ahmed S, *et al.* Genetic variation in the tumor necrosis factor- α promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. Cancer, 2001, 91: 672 – 678.
- [15] Kuroiwa A, Matsubara K, Nagase T, *et al.* Chromosomal mapping of 18S-28S rRNA genes and 10 cDNA clones of human chromosome 1 in the musk shrew (*Suncus murinus*). J Hered, 2001, 92: 282 – 287.

(收稿日期: 2008-01-10)

(本文编辑: 陈莉)

柳晓义, 胡建霞, 王宇, 等. TNFR II 基因 -196M/R 多态性与乳腺癌易感性的相关性[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2008, 2(2): 165 – 170.