

· 临床研究 ·

TNF- α 水平及其基因多态性和乳腺癌临床特征的相关性

卢文添¹, 陈德波², 陈紫莹², 蒋燕成², 林毅胜³

1. 福建省石狮市华侨医院检验科, 福建 石狮 350007; 2. 福建省泉州市第一医院普外科, 福建 泉州 362000;
3. 福建省泉州市中心血站, 福建 泉州 362000

摘要: **目的** 探讨乳腺癌患者肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 基因突变率及其与乳腺癌临床特征的相关性。**方法** 纳入 2014 年 1 月至 12 月住院的病理确诊的乳腺癌患者 128 例为乳腺癌组,同时纳入健康人群 50 例为对照组。通过 DNA 测序法检测两组对象 TNF- α 基因 rs1800629、rs361525 位点的基因型分布及突变率;采用免疫组化法检测乳腺癌组织 TNF- α 表达水平,采用酶联免疫吸附法测定乳腺癌患者血清 TNF- α 水平,分析乳腺癌患者 TNF- α 基因突变情况及其和乳腺癌患者临床分期、肿瘤大小、脏器淋巴结转移及复发的关系。**结果** 乳腺癌患者 rs1800629 位点突变率为 18.7%,对照组为 20.0%;乳腺癌患者 rs361525 位点突变率为 2.3%,对照组为 4.0%;乳腺癌组 rs1800629 位点、rs361525 位点基因型分布和对照组差异无统计学意义(P 均 >0.05)。突变基因型(杂合突变型 G/A、纯合突变型 A/A)患者癌组织 TNF- α 表达水平及血清 TNF- α 水平与野生型(G/G)患者相比,差异无统计学意义(P 均 >0.05)。乳腺癌患者 TNF- α 基因 rs1800629 位点、rs361525 位点突变和乳腺癌腋窝淋巴结转移、脏器转移、肿瘤复发、肿瘤大小、临床分期均无相关性(P 均 >0.05)。**结论** TNF- α 基因 rs1800629、rs361525 位点突变和乳腺癌的发病无相关性,不推荐作为筛选乳腺癌基因的候选指标。

关键词: 乳腺癌; 肿瘤坏死因子- α ; 基因; 基因多态性; 病理分型; 临床分期; 转移复发

中图分类号: R 737.9 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)12-1663-03

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。近年来,其发病率不断升高,成为妇女发病率最高的恶性肿瘤之一,严重威胁着女性的身体健康^[1]。乳腺癌的发生发展是一个复杂的过程,不仅涉及外界环境因素的改变,同时与个体的遗传环境密切相关,研究发现,在相同的外界致癌因素作用下,只有部分人发生肿瘤,而部分人群可不发生明显变化^[2-3]。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)是目前研究的和肿瘤发生密切相关的因子之一,其基因突变参与了肿瘤的发生发展^[4],本研究主要探讨乳腺癌患者 TNF- α 基因多态性及其表达水平与乳腺癌的病理、临床特点及预后的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2014 年 1 月至 12 月石狮市华侨医院住院的乳腺癌患者 128 例,均为女性;年龄 34~76(55.3 \pm 12.5)岁;临床分期:Ⅰ期 10 例,Ⅱ期 62 例,Ⅲ期 46 例,Ⅳ期 10 例。同时纳入我院健康女性职工 50 例为对照组。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和仪器 全血基因组 DNA 快速提取试剂盒(QIAamp DNA Blood Mini Kit) LOT NO145025475,PCR 引物(上海生物工程技术公司合成),罗氏 Z480 型 PCR 仪器,血清 TNF- α 水平检测试剂盒采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA,上海信然实业有限公司),TNF- α 免疫组织化学试剂盒(武汉博士德生物公司)。

1.2.2 TNF- α 基因多态性检测 提取患者的外周血 DNA,采用 PCR 方法和 DNA 测序分析确定。根据 GeneBank 中 TNF- α 基因序列(序列号 NG_007462.1)设计 TNF- α 基因启动子 308 位点(rs1800629)、238 位点(rs361525)的引物:上游引物,5'-CAAACACAGGCCTCAGGACTCAACA-3';下游引物,5'-CAAACACAGGCCTCAGGACTCAACA-3'。根据文献报道,TNF- α 基因 rs1800629 位点:G/G(野生纯合子)、G/A(突变杂合子)、A/A(突变纯合子);rs361525 位点:G/G(野生纯合子)、G/A(突变杂合子)、A/A(突变纯合子)。

1.2.3 血清 TNF- α 水平及乳腺癌组织 TNF- α 表达水平检测 血清 TNF- α 检测采用双抗体一步夹心法 ELISA 测定。乳腺癌组织 TNF- α 表达水平采用免疫组织化学法(S-P 法)。结果判定根据肿瘤细胞染色阳性细胞占视野细胞百分比:0%为 0 分(阴性),1%

~49% 为 1 分(弱阳性), 50% ~ 79% 为 2 分(阳性), 80% ~ 100% 为 3 分(强阳性)。

1.3 统计学方法 所有数据采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验; 二分类变量的关联性采用四格表 χ^2 检验; 有序多分类资料, 采用秩 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌和对照组人群 TNF- α rs1800629、rs361525 位点基因型分布及基因突变率 乳腺癌组 rs1800629 位点、rs361525 位点基因型分布和对照组差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。见表 1。乳腺癌患者 rs1800629 位点突变率为 18.7% (24/128), 对照组为 20.0% (10/50); 乳腺癌患者 rs361525 位点突变率为 2.3% (3/128), 对照组为 4.0% (2/50)。

2.2 乳腺癌患者血清 TNF- α 及癌组织 TNF- α 表达水平 突变基因型(杂合突变型 G/A、纯合突变型

A/A)患者癌组织 TNF- α 表达水平及血清 TNF- α 水平与野生型(G/G)患者相比, 差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。见表 2。说明乳腺癌患者 TNF- α 基因 rs1800629 位点、rs361525 位点突变和癌组织 TNF- α 表达及血清 TNF- α 水平无相关性。

2.3 TNF- α 基因突变和肿瘤大小、临床分期、转移、复发的相关性 乳腺癌患者 TNF- α 基因 rs1800629 位点、rs361525 位点突变和乳腺癌腋窝淋巴结、脏器转移、肿瘤复发、肿瘤大小、临床分期均无相关性 (P 均 > 0.05)。见表 3。

表 1 乳腺癌组和对照组 TNF- α 基因 rs1800629、rs361525 位点基因型分布对比 (例)

组别	例数	rs1800629 位点			rs361525 位点		
		G/G	G/A	A/A	G/G	G/A	A/A
乳腺癌组	128	104	23	1	125	3	0
对照组	50	40	8	2	48	2	0
Z 值		2.297			1.410		
P 值		0.317			0.235		

表 2 128 例乳腺癌患者血清 TNF- α 水平及癌组织 TNF- α 表达水平

位点	基因型	例数	癌组织 TNF- α 表达(例)				Z 值	P 值	血清 TNF- α (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)	t 值	P 值
			阴性	弱阳性	阳性	强阳性					
rs1800629 位点	G/G	104	15	61	20	8	4.926	0.177	13.32 \pm 18.26	1.277	0.204
	G/A + A/A	24	1	13	9	1					
rs361525 位点	G/G	125	25	56	29	15	1.398	0.706	10.53 \pm 8.92	0.241	0.810
	G/A + A/A	3	0	2	1	0					

表 3 128 例乳腺癌患者 TNF- α 基因突变和肿瘤大小、临床分期、转移、复发的相关性 (例)

临床特征	rs1800629 位点		χ^2 值	P 值	rs361525 位点		χ^2 值	P 值
	野生型	突变型			野生型	突变型		
肿瘤大小								
T1 + T2	86	20	0.006	0.940	105	2	0.642	0.423
T3 + T4	18	4			20	1		
临床分期								
I + II	61	11	1.302	0.254	71	1	0.656	0.418
III + IV	43	13			54	2		
脏器转移								
是	15	2	0.628	0.428	27	1	0.236	0.627
否	89	22			98	2		
腋窝淋巴结转移								
有	54	12	0.029	0.865	65	2	0.253	0.615
无	50	12			60	1		
复发								
是	22	7	0.715	0.398	44	0	1.609	0.205
否	82	17			81	3		

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 占各种恶性肿瘤的 10.4% 左右, 全球每年新增乳腺癌病例达 120 万例^[5], 对乳腺癌的研究已逐渐由环境影响因素发展到分子、基因水平。乳腺癌的早期快速诊断是提高

治愈率和改善预后的关键, 目前肿瘤相关的基因诊断成为乳腺癌诊断和预测一个研究热点^[6]。肿瘤的发生、侵袭和转移是一个极其复杂的多基因、多步骤调控的网络, 与一系列相关基因的突变、激活或基因抑制有关, 最终导致肿瘤发生^[7]。

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是体内重要致炎细胞因子, 主要由体内的巨噬细胞和 T 淋巴细胞分泌^[8], 包含 TNF- α 和 TNF- β 两种, 具有抗肿瘤、抗病毒、增强免疫的作用^[9]。TNF- α 基因启动子区域 rs1800629、rs361525 位点, 位于转录起始位点上游, 和 TNF- α 蛋白的表达密切相关^[10-11]。研究发现, rs1800629 位点单一碱基突变, G 突变为 A 就可以直接影响 TNF- α 的表达, 导致血清中 TNF- α 明显升高^[12]。Zhou 等^[13]研究证实细胞周期调控的核心蛋白分子是细胞周期蛋白, TNF- α 具有诱导细胞高表达细胞周期蛋白, 从而缩短细胞的 G1 期时相, 加速细胞的增殖, 导致肿瘤发生、发展。

Kim 等^[14]研究发现, 乳腺癌癌旁组织及正常组织中 TNF- α 表达水平均高于正常人群的乳腺组织, 说明肿瘤患者不但在肿瘤组织内因刺激了淋巴细胞或巨噬细胞而高分泌 TNF- α , 同时整个机体也处于高

TNF- α 内环境,这可能与整个机体内 TNF- α 高表达有关。Tripsianis 等^[15]研究证实,肿瘤患者 TNF- α 启动区域内 308、238 位点基因突变发生率明显高于健康人群。不少研究证实,TNF- α 基因多态性对各种类型恶性肿瘤的易感性已成为一个潜在的决定因素,如在宫颈癌中 308、238 位点的突变^[16]、在口腔鳞状细胞癌中 238 位点的突变均与肿瘤的发生相关^[17]。

本研究发现,乳腺癌患者 rs1800629 位点、rs361525 位点基因型分布和对照组无显著差异,G/A(突变杂合子)、A/A(突变纯合子)两种基因型频率与对照组相比亦无显著差异。乳腺癌患者 rs1800629 位点突变率为 18.7%,对照组为 20.0%;乳腺癌患者 rs361525 位点突变率为 2.3%,对照组为 4.0%,表明,乳腺癌组织中 TNF- α 表达水平和 TNF- α 基因型无相关性。另一方面表明,乳腺癌患者 TNF- α 基因 rs1800629 位点、rs361525 位点突变与乳腺癌病理分型、肿瘤大小、临床分期、转移复发无明显相关性^[18-19]。这与国内外的文献结果不同,导致研究结果的差异可能与种族、地域、环境、遗传背景有关,有待进一步扩大样本进行更深入的研究。

总的来说,本研究结果显示,TNF- α 基因 rs1800629、rs361525 位点突变和乳腺癌的发病无相关性,不推荐作为筛选乳腺癌基因的候选指标。

参考文献

[1] Hongisto V, Aure MR, Mäkelä R, et al. The HER2 amplicon includes several genes required for the growth and survival of HER2 positive breast cancer cells: A data description [J]. *Genom Data*, 2014, 2: 249 - 253.

[2] Liu HC, Ma F, Shen Y, et al. Overexpression of SMAR1 enhances radiosensitivity in human breast cancer cell line MCF7 via activation of p53 signaling pathway [J]. *Oncol Res*, 2014, 22(5/6): 293 - 300.

[3] Dowling P, Palmerini V, Henry M, et al. Transferrin-bound proteins as potential biomarkers for advanced breast cancer patients [J]. *BBA Clin*, 2014, 2: 24 - 30.

[4] Gaudineau B, Fougère M, Guaddachi F, et al. Lipocalin 2, the TNF-like receptor TWEAKR and its ligand TWEAK act downstream of NFAT1 to regulate breast cancer cell invasion [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 19): 4475 - 4486.

[5] Tao MH, Dai Q, Millen AE, et al. Associations of intakes of magnesium and calcium and survival among women with breast cancer: results from Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) Study [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(1): 105 - 113.

[6] Rieder V, Salama M, Glockner L, et al. Effect of lifestyle and reproductive factors on the onset of breast cancer in female BRCA 1 and 2

mutation carriers [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2016, 4(2): 172 - 177.

[7] Ghandadi M, Behravan J, Abnous K, et al. Reactive Oxygen Species Mediate TNF- α 237A; Cytotoxic Effects in the Multidrug-Resistant Breast Cancer Cell Line MCF-7/MX [J]. *Oncol Res Treat*, 2016, 39(1/2): 54 - 59.

[8] Xie L, Jiang F, Zhang X, et al. Honokiol sensitizes breast cancer cells to TNF- α induction of apoptosis by inhibiting Nur77 expression [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(2): 344 - 356.

[9] Chaturvedi M, Vaitheeswaran K, Satishkumar K, et al. Time trends in breast cancer among indian women population: an analysis of population based cancer registry data [J]. *Indian J Surg Oncol*, 2015, 6(4): 427 - 434.

[10] Naik R, Veldore VH, Gopinath KS. Genetics and breast cancer-oncologists perspectives [J]. *Indian J Surg Oncol*, 2015, 6(4): 415 - 419.

[11] Ben MR, Usha L, Hibbeln J, et al. TNF inhibitors to treat ulcerative colitis in a metastatic breast cancer patient: a case report and literature review [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(19): 5912 - 5917.

[12] Liu Y, Fan W, Chen H, et al. Risk of breast cancer and total malignancies in rheumatoid arthritis patients undergoing TNF- α antagonist therapy: a meta-analysis of randomized control trials [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(8): 3403 - 3410.

[13] Zhou XL, Fan W, Yang G, et al. The clinical significance of PR, ER, NF- κ B and TNF- α in breast cancer [J]. *Dis Markers*, 2014, 2014: 494581.

[14] Kim MJ, Jung JH, Lee WS, et al. Arsenic hexoxide enhances TNF- α -induced anticancer effects by inhibiting NF- κ B activity at a safe dose in MCF-7 human breast cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(5): 2305 - 2311.

[15] Tripsianis G, Papadopoulou E, Anagnostopoulos K, et al. Coexpression of IL-6 and TNF- α : prognostic significance on breast cancer outcome [J]. *Neoplasma*, 2014, 61(2): 205 - 212.

[16] Zidi S, Stayoussef M, Zouidi F, et al. Tumor necrosis factor alpha (-238/-308) and TNFR2-VNTR (-322) polymorphisms as genetic biomarkers of susceptibility to develop cervical cancer among tunisians [J]. *Pathol Oncol Res*, 2015, 21(2): 339 - 345.

[17] Singh PK, Bogra J, Chandra G, et al. Association of TNF- α (-238 and -308) promoter polymorphisms with susceptibility of oral squamous cell carcinoma in North Indian population [J]. *Cancer Biomark*, 2015, 15(2): 125 - 131.

[18] Mahdi NK, Al-Jowher MH, Ali HQ. Can IgA, C3, IL-6 and TNF- α act as predictors for reoccurrence of breast cancer among Iraqi women? [J]. *Qatar Med J*, 2013, 2013(1): 30 - 31.

[19] Allensworth JL, Sauer SJ, Lyerly HK, et al. Smac mimetic Birinapant induces apoptosis and enhances TRAIL potency in inflammatory breast cancer cells in an IAP-dependent and TNF- α -independent mechanism [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 137(2): 359 - 371.