

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.04.021

TLR4 基因 rs10983755 位点单核苷酸多态性与非小细胞肺癌易感性的相关性研究 *

张先娇¹ 苗 毅¹ 曲书毅² 杨 城² 谢祥军² 刘寒强^{2Δ} 王水利^{1Δ}

(1 陕西省人民医院, 西安医学院附属医院 陕西 西安 710068; 2 第四军医大学军事预防医学院 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨 TLR4 基因 rs10983755 A/G 单核苷酸多态性(SNP)与非小细胞肺癌(NSCLC)易感性的相关性。**方法:**采用病例-对照研究方法纳入 160 例非小细胞肺癌患者(NSCLC 组)和 160 例健康对照(NC 组),利用 MassARRAY 飞行时间质谱生物芯片系统对 TLR4 基因 rs10983755 位点的单核苷酸多态性进行分型检测,并进行统计学分析。**结果:**rs10983755 等位基因频率在中国汉族 NSCLC 患者和健康人群中的分布差异具有统计学意义($P<0.05$),A 等位基因携带者 NSCLC 发生风险是 G 等位基因携带者的 1.821 倍(95% CI=1.124~2.906);rs10983755 基因型频率在 NSCLC 患者和健康人群中分布差异具有统计学意义($P<0.05$),AA+AG 基因型 NSCLC 发生风险是 GG 基因型的 2.103 倍 (95% CI=1.118~3.898)。**结论:**TLR4 基因 rs10983755 A/G 单核苷酸多态性与 NSCLC 的易感性显著相关,A 是风险等位基因。

关键词:Toll 样受体 4;单核苷酸多态性;非小细胞肺癌

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)04-701-04

Correlative Analysis between SNP rs10983755 in TLR4 Gene and NSCLC Susceptibility*

ZHANG Xian-jiao¹, MIAO Yi¹, QU Shu-yi², YANG Cheng², XIE Xiang-jun², LIU Han-qiang^{2Δ}, WANG Shui-li^{1Δ}

(1 Shaanxi provincial People's Hospital, Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;

2 School of Public Health, The Fourth, Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the correlation of rs10983755 A/G SNP of TLR4 with non-small cell lung cancer (NSCLC) susceptibility in a population in Shaanxi province. **Methods:** Based on case-control study, MassARRAY platform which based on MALDI-TOF mass spectrometry technology was used to identify the genotypes of rs10983755 of TLR4 gene in 160 cases of NSCLC patients and 160 cases of healthy control in a population in Shaanxi province. Then, we did statistics analysis with epidemiological data and clinical data to find the association of SNP with NSCLC susceptibility. **Results:** There was a significant difference in the genotypes of the TLR4 SNP rs10983755 between the NSCLC patients and controls ($P<0.05$). NSCLC patients with the A allele showed a significantly higher risk of NSCLC ($P<0.05$) compared with the G allele, indicating that the A allele SNP rs10983755 was associated with NSCLC risk (OR=1.821, 95% CI=1.124~2.906). Compared with GG genotype, AA+AG genotype was significantly associated with increased risk of NSCLC (OR=2.103, 95% CI=1.118~3.898). **Conclusion:** The single nucleotide polymorphism of the rs10983755 of TLR4 gene was correlated with NSCLC susceptibility in a population in Shaanxi province, and the allele A was a risk allele.

Key words: Toll-like receptors 4; Single nucleotide polymorphism; Non-small cell lung cancer

Chinese Library Classification (CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)04-701-04

前言

肺癌是当今世界上严重危害人类健康的最常见恶性肿瘤之一,亦是我国亟待解决的重大公共卫生问题^[1]。非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC) 是肺癌最常见的组织学类型,约占肺癌总数的 80-85%,对该组织学类型肺癌进行研究具有及其重要的临床应用价值^[2]。Toll 样受体 4(Toll like receptor 4, TLR4)是发现最早的 Toll 样受体家族的重要成员之一,在天

然免疫中发挥着重要作用^[3],参与了多种肿瘤包括肺癌的发生发展^[4,5]。

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)是一种常见的人类可遗传的变异,与个体对疾病(包括肿瘤)的易感性有着密切联系^[6]。近年来,TLR4 单核苷酸多态性在包括肺癌在内的多种肿瘤发生发展的作用及机制引起了众多研究者的关注^[7]。目前研究表明 TLR4 的 1 个 SNP 位点(rs1927914)与肺癌的发病风险显著相关^[8]。然而,TLR4 基因 SNPs 是否与中

* 基金项目:陕西省自然科学基金项目(2014JQ4130)

作者简介:张先娇,女,博士,主要研究方向:复杂性疾病的分子流行病学研究,E-mail: zhangxianjiaovip@163.com

Δ 通讯作者:刘寒强,男,副教授,主要研究方向:代谢性疾病的流行病学及分子机制研究,E-mail: liuhanqiangvip@163.com;

王水利,男,主任医师,主要研究方向:呼吸系统疾病,E-mail: shuiliwang3384@163.com

(收稿日期:2017-10-12 接受日期:2017-10-30)

国汉族人口的 NSCLC 发病风险相关尚不清楚。

本研究基于病例-对照研究,利用 MassARRAY 基因质谱检测平台检测 TLR4 基因 rs10983755 位点 A/G 单核苷酸多态性,并结合生物信息学及统计学方法,分析其与 NSCLC 的相关性,以期对 NSCLC 的高危人群筛查及早期诊断提供重要的实验依据及理论支持。

1 资料和方法

1.1 研究对象

根据病例-对照研究所遵循的年龄、性别配对原则,收集陕西省人民医院在 2015 年 9 月~2016 年 9 月期确诊为 NSCLC 的中国汉族患者(病例组)和健康人群(对照组)各 160 例。医护人员通过面对面询问的方式收集患者以下流行病学资料:一般情况(年龄、性别、身高、体重和民族等),个人史情况(肿瘤家族史、传染病史、吸烟史、长期服药史和饮酒史等)。进一步收集以下资料,具体包括:检查情况(肿瘤大小数目位置、病理分级、TNM 分期及肿瘤标志物检查结果等),医疗情况(手术时间及方式,化疗药物的种类剂量等)等。患者知情同意并签署《知情同意书》,研究方案经陕西省人民医院伦理委员会批准。

1.2 血液样本收集及处理

采集所有研究对象空腹至少 12 小时后的外周静脉血液,枸橼酸钠管加抗凝血 5 mL,在 3 小时内用冰盒将血液运抵实验室进行血浆分离(两步离心法),血细胞用于基因组 DNA 提取(天根 DP319 全血 DNA 提取试剂盒,严格按照说明书进行操作),同时进行浓度测定(NanoDrop 2000C 微量分光光度计,Thermo)及完整性鉴定(DNA 琼脂糖凝胶电泳仪,BIO-RAD)。 -80°C 保存,用于后续的 SNP 检测。

1.3 SNP 分型

基于 MassARRAY 飞行时间质谱生物芯片系统(美国 Sequenom 公司)进行 SNP 分型,主要流程包括引物设计、样品制备、PCR 扩增、单碱基延伸及质谱检测等环节。严格按照说明书进行操作,大致流程如下:① 利用 MassARRAY Assay Design 4.0 Software 软件,分别设计合成 TLR4 基因 SNP 位点 rs10983755 的两套引物(普通引物及 UEP 引物),其中普通引物用于普通 PCR 反应扩增含特定 SNP 的目的片段,而 UEP 引物用于单碱基延伸反应(引物由上海生工合成);② 在 PCR 板中加入 10 ng DNA/每孔,并加入 dNTP、Taq 酶等,混合均匀,然后进行 PCR 反应,常规扩增待测片段,45 个循环;③ 在 PCR 产物中加入 2 μL SAP 酶,以除去未用尽的 dNTP,然后加入 ddNTP 进行单碱基延伸反应,200 个循环;④ 用纳升点样仪将纯化后的扩增产物点在质谱微阵列芯片(SpectroCHIP)上,将芯片放入飞行时间质谱仪(MALDI-TOFMS)中进行检测;⑤ 利用该平台自带的 MassARRAY TYPER 软件,根据引物延伸反应产物质谱峰的位置确定其分子质量,系统自动判读出 SNP 分型结果。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。分别统计病例组和对照组等位基因和基因型频率,经 Hardy-Weinberg 平衡原理检验该样本群体代表性后,进行组间等位基因和基因型频率的 χ^2 检验。利用 logistic 回归分析单个 SNP 不同基因型与 NSCLC 发病风险的相关性,以优势比(odds ratio, OR)和 95%可信区间

(Confidence Interval, CI)来计算特定 SNP 与 NSCLC 发病风险之间的相对危险度。所有 P 值均为双尾,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的一般特征

本研究纳入 NSCLC 患者(病例组)及健康人群(对照组)各 160 例,研究对象的年龄、性别、家族史和吸烟状态的分布见表 1。NSCLC 病例组男、女性分别为 124 例(77.58%),36 例(22.42%),对照组男、女性分别为 123 例(76.89%),女性 37 例(23.11%);两组比较差异无统计学意义($P=0.894$)。NSCLC 病例组年龄为 61.07 ± 12.37 岁,对照组年龄为 59.16 ± 10.59 岁;两组比较差异无统计学意义($P=0.726$)。因此,对照组和 NSCLC 病例组在年龄和性别上完全匹配。

对两组的吸烟情况进行分析,结果显示 NSCLC 病例组吸烟个体比例(64.55%)与对照组(53.32%)相比较差异具有统计学意义($P=0.031$),表明吸烟是肺癌的危险因素。对两组的肿瘤家族史进行分析,结果显示病例组有肿瘤家族史的为 11(6.63%)例,高于对照组 4(2.87%)例,但二者之间无显著性差异($P=0.059$)。组织病理分型显示鳞癌是最主要的病理学类型占 54.78%;其次为腺癌占 32.39%,其他类型占 12.93%。

2.2 rs10983755 多态性与 NSCLC 发病风险性的关系

对 160 名受试对象的 TLR4 基因 SNP 位点 rs10983755 等位基因和基因型频率进行统计学分析,结果显示 rs10983755 等位基因频率在 NSCLC 患者和健康对照人群中的分布差异具有统计学意义($P<0.05$),A 等位基因携带者 NSCLC 发生风险是 G 等位基因携带者的 1.821 倍(95% CI=1.124~2.906);rs10983755 基因型频率 NSCLC 患者和健康人群中分布差异也具有统计学意义($P<0.05$)。进一步对 3 种基因型(AA、AG、GG),根据显性模型和隐性模型进行统计分析,结果表明显性模型基因型组间差异具有统计学意义($P<0.05$),AA+AG 基因型 NSCLC 发生风险是 GG 基因型的 2.103 倍(95% CI=1.118~3.898),而隐性模型基因型组间差异不具有统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

3 讨论

NSCLC 发生的早期症状少而轻,也无明显特征性,甚至无症状,很难在初发时即获确诊,在临床实践中发现大部分患者在确诊时通常已属晚期并伴有严重的并发症^[9]。目前,NSCLC 已成为个人、家庭和社会的沉重经济负担,也是全球尤其是我国亟待解决的重大社会公共卫生问题^[2]。因此,准确有效的评估普通人群的肺癌发病风险,能够从中发现高危人群,从而做好 NSCLC 的预警工作^[10]。尽管传统的肺癌风险评估的方法有了较大的改良和进步,但在临床实践中仍存在一定的局限性,因此有必要寻找高效准确的可用于评估 NSCLC 发病风险的标志物^[11]。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是人类可遗传的变异中最常见的一种,主要指在基因组水平上由单个核苷酸的变异而引起的 DNA 序列多态性,其在人群中的发生频率大于 1%^[12]。SNP 决定着绝大多数生物学性状的个体

表 1 NSCLC 组与对照组一般特征的比较

Table 1 Comparison of the distribution of demographic characteristics between NSCLC cases and control participants

Variables	NSCLC cases	Control participants	P values
	n=160	n=160	
Age (%)			
Mean age	61.07± 12.37	59.16± 10.59	0.726
<60 years	81(50.54%)	83(51.69%)	
≥ 60 years	79(49.46%)	77(48.31%)	
Gender (%)			0.894
Male	124(77.58%)	123(76.89%)	
Female	36(22.42%)	37(23.11%)	
Smoking (%)			0.031
Non-smokers	56(35.45%)	75(46.68%)	
Former smokers	15(9.08%)	48(29.80%)	
Current smokers	89(55.47%)	37(23.52%)	
Family history of cancer			0.059
No	149(93.37%)	156(97.13%)	
Yes	11(6.63%)	4(2.87%)	
Histologic type (%)			
Squamous cell carcinoma	88(54.78%)		
Adenocarcinoma	52(32.39%)		
Other carcinoma	40(12.93%)		

表 2 TLR4 基因 SNP 位点 rs10983755 等位基因和基因型频率比较

Table 2 Comparison of the genotype and allele frequencies of the rs10983755 A/G locus in TLR4 gene

Variables		Group (n)		P	OR(95% CI)
		Case	Control		
Allele	A	70	48	0.011a	1.821(1.124~2.906)
	G	90	112		
	AA	15	7	0.039b	
Genotype	AG	40	34	0.023c	2.103(1.118~3.898)
	GG	25	39	0.064d	2.415(0.932~6.326)

注:校正因素包括年龄、性别、吸烟情况及肿瘤家族史。

Note: Adjusted for age, sex, smoking status, and family history of cancer.

间差异,并与个体对疾病(包括肿瘤)的易感性有着密切联系^[12]。研究表明除了吸烟是肺癌的影响因素之外,遗传易感性所起的作用也逐渐为人们所重视^[10,13]。近几十年来,人们一直在探索 SNP 在内的遗传基因变异与 NSCLC 风险之间的关联。随着全基因组扫描技术的发展与成熟,尤其是大量全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)的开展,国内外多个研究组已先后发现并证实了与 NSCLC 的发病风险显著相关的多个基因的多个 SNP 位点,如 nm23 基因的 rs16949649C/T, DNA 修复基因 XRCC1 的 3 个 SNPs (rs25487、rs1799782 及 rs3213334)^[14], XPA 基因的 2 个 SNPs(rs3176720、及 rs2808668) XPC 基因的 4 个 SNPs (rs2229090、rs2228001、rs2733533 及

rs3729584)、XPD 基因的 3 个 SNPs (rs13181、rs1799793 及 rs238406)^[15], survivin 基因的 rs9904341^[16], Sipal(Signal-induced proliferation associated gene 1) 基因的 3 个 SNPs(rs931127、rs2448490 及 rs3741379)^[17]、叶酸代谢通路的 8 个 SNPs^[18]、染色体 15q15.2 区域的 3 个 SNPs (rs504417、rs11853991 及 rs748404)^[19]、染色体 15q25 区域的 4 个 SNPs(rs2036534、rs667282C、rs12910984 及 rs6495309)^[20]、染色体 15q25.1 区域的 2 个 SNPs(rs1051730 及 rs8034191)^[21]。总之,SNP 与肺癌的发生发展有着密切联系^[22]。

值得注意的是,最近的研究报道了 TLR4 的 6 个 SNP 位点(rs1927914、rs4986790、rs4986791、rs11536889、rs1927911 及

rs2149356)与多种肿瘤(胃癌^[23]、肝癌^[24]、前列腺癌^[25]等)的发病风险显著相关,其中 rs1927914 与肺癌显著相关^[26];然而基于 TLR4 信号通路分子群的 SNP 与肺癌的相关性尚无报道。本研究采用病例-对照研究方法探讨了 TLR4 基因 rs10983755 A/G 单核苷酸多态性(SNP)与非小细胞肺癌(NSCLC)易感性之间的相关性。研究结果表明 rs10983755 等位基因频率在中国汉族 NSCLC 患者和健康人群中的分布差异具有统计学意义,A 等位基因携带者 NSCLC 发生风险是 G 等位基因携带者的 1.821 倍(95% CI=1.124~2.906) AA+AG 基因型 NSCLC 发生风险是 GG 基因型的 2.103 倍(95% CI=1.118~3.898)。这为 TLR4 基因 SNP 位点 rs10983755 应用于中国汉族人群 NSCLC 发生风险的预测奠定了非常重要的理论基础,亦为 NSCLC 的临床早期预警和临床诊治提供了新的思路,具有非常广阔的应用前景。

本研究由于样本量较小,使得本研究结果的可靠性及稳定性存在一定的局限;对此,我们将进一步扩大样本量对该研究结果进行验证,然后在细胞模型和动物模型水平上研究该 TLR4 基因 SNP 位点参与 T2DM 发生的具体分子作用机制。此外,rs10983755 位点及 TLR4 基因的表达水平是否与 NSCLC 患者的临床治疗反应(手术、化疗等)相关,亦是我们拟解决的问题;最终为实现肺癌的风险评估及个体化治疗提供可靠的依据。

参考文献(References)

- [1] She J, Yang P, Hong Q, et al. Lung cancer in China: challenges and interventions[J]. Chest, 2013, 143(4): 1117-1126
- [2] Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments [J]. Lancet, 2017, 389(10066): 299-311
- [3] Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, et al. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes [J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(8): 546-558
- [4] Tsan MF. Toll-like receptors, inflammation and cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2006, 16(1): 32-37
- [5] Wang X, Yu X, Wang Q, et al. Expression and clinical significance of SATB1 and TLR4 in breast cancer[J]. Oncol Lett, 2017, 14(3): 3611-3615
- [6] Brown AA, Buil A, Vinuela A, et al. Genetic interactions affecting human gene expression identified by variance association mapping[J]. Elife, 2014, 3: e01381
- [7] Kutikhin AG. Association of polymorphisms in TLR genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway with cancer risk [J]. Hum Immunol, 2011, 72(11): 1095-1116
- [8] Hart K, Landvik NE, Lind H, et al. A combination of functional polymorphisms in the CASP8, MMP1, IL10 and SEPS1 genes affects risk of non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2011, 71(2): 123-129
- [9] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108
- [10] Nomizo T, Ozasa H, Tsuji T, et al. Clinical Impact of Single Nucleotide Polymorphism in PD-L1 on Response to Nivolumab for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients [J]. Sci Rep, 2017, 7: 45124
- [11] Reck M, Heigener DF, Mok T, et al. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments[J]. Lancet, 2013, 382(9893): 709-719
- [12] Shaw V, Bullock K, Greenhalf W. Single-Nucleotide Polymorphism to Associate Cancer Risk[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1381: 93-110
- [13] Quan X, Yin Z, Fang X, et al. Single nucleotide polymorphism rs3124599 in Notch1 is associated with the risk of lung cancer in northeast Chinese non-smoking females [J]. Oncotarget, 2017, 8(19): 31180-31186
- [14] Qian B, Zhang H, Zhang L, et al. Association of genetic polymorphisms in DNA repair pathway genes with non-small cell lung cancer risk[J]. Lung Cancer, 2011, 73(2): 138-146
- [15] Mei C, Hou M, Guo S, et al. Polymorphisms in DNA repair genes of XRCC1, XPA, XPC, XPD and associations with lung cancer risk in Chinese people[J]. Thorac Cancer, 2014, 5(3): 232-242
- [16] Jang JS, Kim KM, Kang KH, et al. Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer[J]. Lung Cancer, 2008, 60(1): 31-39
- [17] Xie C, Yang L, Yang X, et al. Sip1 promoter polymorphism predicts risk and metastasis of lung cancer in Chinese[J]. Mol Carcinog, 2013, 52 (Suppl 1): E110-117
- [18] Swartz MD, Peterson CB, Lupo PJ, et al. Investigating multiple candidate genes and nutrients in the folate metabolism pathway to detect genetic and nutritional risk factors for lung cancer [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53475
- [19] Rafnar T, Sulem P, Besenbacher S, et al. Genome-wide significant association between a sequence variant at 15q15.2 and lung cancer risk[J]. Cancer Res, 2011, 71(4): 1356-1361
- [20] Cheng Y, Wang C, Zhu M, et al. Targeted sequencing of chromosome 15q25 identified novel variants associated with risk of lung cancer and smoking behavior in Chinese [J]. Carcinogenesis, 2017, 38(5): 552-558
- [21] Amos CI, Wu X, Broderick P, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1 [J]. Nat Genet, 2008, 40(5):616-622
- [22] Mah TL, Yap XN, Limviphuvadh V, et al. Novel SNP improves differential survivability and mortality in non-small cell lung cancer patients[J]. BMC Genomics, 2014, 15(Suppl 9): S20
- [23] Huang L, Yuan K, Liu J, et al. Polymorphisms of the TLR4 gene and risk of gastric cancer[J]. Gene, 2014, 537(1): 46-50
- [24] Minmin S, Xiaoqian X, Hao C, et al. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 4 decrease the risk of development of hepatocellular carcinoma [J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19466
- [25] Shui IM, Stark JR, Penney KL, et al. Genetic variation in the toll-like receptor 4 and prostate cancer incidence and mortality [J]. Prostate, 2012, 72(2): 209-216
- [26] Yang H, Pan T, Duan G, et al. A cumulative meta-analysis on the association of toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with cancer risk[J]. Eur J Cancer, 2016, 58: 130-137