

TNF- α 基因启动子单核苷酸多态性的功能意义

张佃良, 于宝军

张佃良, 青岛大学医学院附属医院普通外科 山东省青岛市 266003
于宝军, 南京军区南京总医院普通外科研究所 江苏省南京市 210002
项目负责人: 张佃良, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院
附属医院普通外科. phdzdl@yahoo.com
电话: 0532-2911324 传真: 0532-2911111
收稿日期: 2004-06-24 接受日期: 2004-07-27

摘要

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是主要的致炎细胞因子, 在许多炎症性疾病中起了非常重要的作用. 其基因启动子单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 在炎症性疾病中的作用一直是近几年来研究的热点, 有研究证实 TNF- α 基因启动子单核苷酸多态性 (SNP) 影响 TNF- α 的表达, 并且与某些炎症性疾病的发生或疾病的严重程度有关, 而有些报道却没有发现甚至得出相反的结论. 目前对于 TNF- α 基因启动子多态性的研究, 大多数集中于-308位点. 一般认为, -308G/A 多态性可能对转录产生影响, A 等位基因能够增强 TNF- α 的转录, 并且与疾病的严重程度或患者的预后相关联, 而G等位基因可能与低水平的TNF- α 表达有关. 其他位点的启动子SNPs研究的较少, 对TNF- α 转录水平的影响及与其疾病发生和严重程度的关系还需要进一步探讨.

张佃良, 于宝军. TNF- α 基因启动子单核苷酸多态性的功能意义. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2454-2456
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2454.asp>

0 引言

在当今医学研究领域, 一个新的课题是探讨与疾病易感性有关的基因定位. 目前, 有不少基因多态性已经被证明与人类某些疾病的易感性或疾病的危重状态相关联^[1-6]. TNF- α 是主要由单核巨噬细胞和T淋巴细胞分泌的细胞因子, 在许多炎症性疾病中起了重要的作用^[7-9]. 已经有研究证实 TNF- α 基因启动子单核苷酸多态性 (SNP) 影响 TNF- α 的表达, 并且与某些炎症性疾病或疾病的严重程度有关, 而有些报道却没有发现甚至得出相反的结论.

1 TNF- α 基因启动子 SNP 影响 TNF- α 产生

TNF- α 基因长约 2 676 bp, 包含 4 个外显子和 3 个内含子, 位于 6 号染色体 p21 区域内, 包含于 HLA III 基因中. 由于 TNF- α 不是预先储存在细胞内而是在受到刺激时合成的, 因此, 基因启动子区域中的 SNP 具有重要的意义. 研究 TNF- α 基因启动子多态性对转录影响的

方法有 2 种: 一是利用细胞系作为靶细胞, 通过报告基因来评估多态性对转录功能的影响; 二是用人体内的单个细胞作为对象, 研究 TNF- α 基因启动子上的不同核型对 TNF- α 表达的影响.

目前对于 TNF- α 基因启动子多态性的研究, 大多数集中于 -308 位点. 用人体内的单个细胞作为对象, 通过比较 -308G 和 -308A 在 TNF- α 水平上的产生差异, 来研究 TNF-308 多态性的功能意义, 但其结论往往是相左的. 一般认为 TNF- α 基因启动子多态性影响 TNF- α 的产生, 但也有否定的结论. 仔细分析上述论文不难发现, 6 篇文章中的 5 篇观察到 -308G/A 杂合子产生的 TNF- α 比 -308G/G 纯合子产生的 TNF- α 量大, 其程度在 20-40% 之间^[10]. 根据统计学推论, 如果样本量足够大的话, 20-40% 的量的增高就可能带来统计学差异^[10]. 2 篇有否定结论的报道中, 有 6 个是 TNF-308G/A 杂合子^[11-12], 而在 2 篇有肯定结论的报道中有 12 个 G/A 杂合子^[13-14]. 值得注意的是, 上述研究所用的 LPS 刺激浓度有很大的差异: 在 1 ng 到 10 μ g 之间. 惟一的一篇没有报道 TNF- α 高表达的文章, 研究者是用高浓度的 LPS 来刺激外周血单核细胞的 (所用量是另外 5 篇文章所用量的 10 倍)^[15]. 如此高浓度的 LPS 刺激所引起的 TNF- α 高表达, 可能超过了 TNF-308 多态性本身所导致的 TNF- α 表达变化. 另外, 这 6 个研究的样本量都比较小, 在 6-16 个之间, 如此小的样本量在很大程度上可能影响结果的稳定性.

在 TNF- α 表达水平上 308G/A 和 -308G/G 的差异, 似乎不可能是 MHC 连锁不平衡造成的. 有研究报道, -308A 纯合子和 HLA-DR3 处于连锁不平衡状态时, 造成了 TNF- α 分泌的差异^[10]. 但也有人报道, 无论 HLA-DR3(+) 组还是 HLA-DR3(-) 组, -308G/A 杂合子个体 TNF- α 的分泌都是升高的^[16], 结果提示 HLA-DR3 本身不可能引起 -308G/A 杂合子 TNF- α 的高表达, 而与 HLA-DR3 有关的 TNF- α 高表达, 可能是由于和 -308A 纯合子连锁的原因.

用报告基因来研究 TNF- α 基因启动子多态性对转录的影响, 结论也是相互矛盾的. 1999 年 Allen 报道, 有 3 项独立的研究发现 -308G/A 影响 TNF- α 的转录, 而相继进行的另外 3 项研究却得出否定的结论. 在得出否定结论的研究中, 有 2 篇是用小鼠细胞系做研究对象, 而得出肯定结论的 3 项研究中, 无一项是用小鼠细胞系做研究对象的. 然而, Higuchi *et al* 在研究对象、研究方法等方面, 和得出肯定结论的研究完全相

同, 但是他们的研究却得出否定的结论^[17], 这提示细胞系不是造成结论不一致的惟一因素. 造成结论不一致的因素也许还出自扩增的基因启动子片段长度上.

对于 TNF- α 基因启动子上其他的 SNPs, 目前报道的很少, 得出的结论也极不一致^[17-18]. -237G/A 能够降低 TNF- α 的转录^[12], 而另外一个试验却没有观察到相同的结果. 然而这 2 个实验的检测条件不一致, 用的 LPS 浓度也不相同, 所以对他们进行比较缺乏说服力. 另一个较为常见的基因启动子区域中多态性是 -376, 如 -376G 变为 A, 则 TNF- α 表达显著升高, 但目前关于这个位点的研究报道很少. 关于启动子 SNP 对循环中 TNF- α 浓度的影响, 也有报道: -863A 可导致低水平的外周血浆 TNF- α 浓度^[10]. 用基因报告来研究 TNF- α 基因启动子其他部位的 SNPs, 得出结论也不尽相同. 1998 年, 有 2 个不同的研究均发现 -375G/A、-237SNP、-575SNP 均对 TNF- α 的转录没有影响, 但在 -875 和 -863SNP 对 TNF- α 的转录的影响上, 得出结论是相矛盾的^[17]. 可能的原因之一是, 如果这些 SNP 是通过修饰 DNA 结构来发挥作用的话, 那么基因报告在检测中的作用就大打折扣.

由此可见, -308G/A 多态性可能对转录产生影响, A 等位基因能够增强 TNF- α 的转录, 而别的 SNPs 对转录的影响还需要进一步探讨. 但是, 目前尚未解决的问题是: -308G/A 多态性对转录的影响达到什么程度才能产生相关的生物学活性改变呢? 也许局部 TNF- α 的浓度有 5% 的差异就足够了, 这种差异就能在关键时刻改变机体的免疫反应. 有证据表明, TNF- α 通过正反馈来增加他的分泌^[11]. 因此, 在不同个体内较小 TNF- α 浓度的差异, 就可能通过自身放大效应来影响各自最终炎性反应的结果. 基于这个现象, 有理由认为, 启动子多态性必须对转录产生大的影响才能导致机体免疫反应改变的观点是不正确的.

2 TNF- α 基因启动子多态性影响疾病的发生

评价 TNF- α 基因启动子多态性是否有功能意义的另一个指标是观察他是否影响疾病的发生率或严重程度. 这很难分析, 因为启动子部分的 SNPs 靠近 MHC, 他们处于连锁不平衡状态, 而后者对某些疾病有重要的影响. 同样困难的是, 疾病的易感性或严重性仅仅用一个 SNP 来判断似乎是不够的. 实际上, 在极其复杂的生物体内, 一个基因多态性对细胞因子的影响很有可能被其他的因素所掩盖^[19-20]. 因此, 如果一个基因多态性不能对某疾病的易感性产生影响, 我们也不能得出这个多态性与这个疾病易感性无关的结论.

目前研究最多的是 TNF-308 多态性, 不少研究发现 TNF-308 多态性与大多数自身免疫性疾病的易感性无关, 但与某些感染性疾病的严重程度有关. 1994/1997 年之间, 人们相继发现 TNF-308 多态性可影响脑性疟疾的易感性, 影响脑膜炎的严重程度, 并与结节

性麻风病的进展程度有关. 也有研究报道, 利什曼原虫或衣原体感染性疾病也与 TNF-308G/A 有关. 并且, 研究发现 TNF-308 多态性与感染性疾病的关系不是由于 TNF- α 和 MHC 的连锁不平衡性造成的^[21]. 对非洲人群研究表明, -308 和 -376 基因多态性均可作为预测脑性疟疾患者危重状态的独立因素; 在严重的中枢性后遗症或死亡率方面进行比较发现, -308A 纯合子患者的发生率是 -308G 纯合子的 7 倍^[22]. Mira *et al* 对一组严重感染患者研究发现, -308A 在严重脓毒症组出现的频率为 39%, 在正常对照组只有 18% ($P < 0.01$). -308A 和脓毒症休克的易感性密切相关, 并且 -308A 患者的死亡率是 -308G 患者的 3.7 倍 (95% CI, 1.37-10.24)^[23]. 在对外科手术后出现感染的患者研究中发现, -308A 患者和 -308G 患者在严重脓毒症发生率上无明显差异, 前者也并不比后者有更高的死亡率; 但在脓毒症出现后, -308G/A 患者的死亡率比 -308A 纯合子患者明显增高 (92% vs 62%, $P < 0.05$)^[24]. 但另一个报道也令人关注: Stuber *et al* 的报道 -308G/A SNP 与外科手术后严重脓毒症患者的预后没有任何关系^[25]. 为什么出现这样矛盾的现象呢? 研究人群不同, 核型的检测准确程度不同可能是其中的原因. 通过对我国汉族人的研究, 我们发现: -308G/A 重症胰腺炎患者的重度脓毒症或脓毒性休克的发生率远比 -308G/G 患者高, 死亡率也有显著的差别^[26-30]. 因此一般认为, TNF-308 多态性可能与大多数自身免疫性疾病的易感性无关, 但可影响感染性疾病的严重程度.

对于 -806SNP, 有人研究发现他和血浆中低水平的 TNF 浓度有关, 但与疾病的易感性等方面的报道较少. -237G/A 多态性可能与自身免疫性疾病有关, 也有人发现他和某些感染性疾病有联系. 而 -376A, Mira *et al*^[23] 在研究中发现, 他仅在死亡患者中才能被检测到. TNF 启动子区域中其他的 SNPs 与疾病易感性及严重程度之间的关系, 目前研究的还较少.

3 讨论

总之, 对功能性基因多态性的寻找是当今医学的崭新的课题, 近几年来得到了迅猛发展. TNF 基因启动子区域上的多态性可能有更重要的生物学功能, 能够在转录水平上对细胞因子的产生发挥作用, 并影响到疾病的易感性、疾病的严重程度甚至患者的预后. 对人类基因组多态性的研究, 将使我们达到完整意义上的个体化治疗. 他使我们明白为什么有些患者会出现脓毒症, 为什么另一些患者不会出现脓毒症, 甚至使我们了解, 为什么有些脓毒症患者死亡而另一些患者能够治愈. 通过对基因多态性与细胞因子浓度的关系的深入了解, 将有可能改变我们治疗脓毒症的策略. 对基因决定的高浓度 TNF- α 进行检测, 我们来筛选哪些患者可能对给予抗 TNF- α 治疗有益. 另一方面, 对于那些低浓度的 TNF- α 脓毒症患者, 给予免疫抑制剂如糖皮质激素治疗可能是无益甚至有害的.

4 参考文献

- 1 Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: Role in prognosis and potential for therapy. *Chest* 2003;124:1103-1115
- 2 Keen LJ. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. *Transpl Immunol* 2002;10:143-146
- 3 Stuber F. Effects of genomic polymorphisms on the course of sepsis: Is there a concept for gene therapy? *J Am Soc Nephrol* 2001;12(Suppl 17):S60-64
- 4 Andreotti F, Porto I, Crea F, Maseri A. Inflammatory gene polymorphisms and ischaemic heart disease: review of population association studies. *Heart* 2002;87:107-112
- 5 Csaszar A, Abel T. Receptor polymorphisms and diseases. *Eur J Pharmacol* 2001;414:9-22
- 6 Kwok PY, Gu Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Mol Med Today* 1999;5: 538-543
- 7 陈剑群, 许统俭, 安侠, 王营, 陈玉林. 胃癌患者血清 TNF- α 的水平及意义. 世界华人消化杂志 2003;11:668-669
- 8 宋红丽, 吕斌, 马力, 李颖, 刘沛. TNF- α 影响肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2004;12:1303-1306
- 9 杨生, 岳桂英. 2 型糖尿病合并脂肪肝患者血清肿瘤坏死因子- α 水平增高与胰岛素抵抗指数相关分析. 世界华人消化杂志 2004; 12:1485-1487
- 10 Allen RD. Polymorphism of the human TNF- α promoter-random variation or functional diversity? *Mol Immunol* 1999; 36: 1017-1027
- 11 Danis VA, Millington M, Hyland V, Lawford R, Huang Q, Grennan D. Increased frequency of the uncommon allele of a tumour necrosis factor alpha gene polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Dis Markers* 1994;12:127-133
- 12 Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de Gaer L, Dams L, Crusius JB, Garcia-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman CH, Pena AS. TNF- α promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol* 1997;72:149-153
- 13 Braun N, Michel U, Ernst BP, Metzner R, Bitsch A, Weber F, Rieckmann P. Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor- α (TNF- α) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF- α production. *Neurosci Lett* 1996;215:75-78
- 14 Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences aTNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998;113:401-406
- 15 Mycko M, Kowalski W, Kwinkowski M, Buenafe AC, Szymanska B, Tronczynska E, Plucienniczak A, Selmaj K. Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha. *J Neuroimmunol* 1998; 84:198-206
- 16 Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kostense PJ, Giphart MJ, Schreuder GM, Meuwissen SG, Pena AS. Secretion of tumour necrosis factor α and lymphotoxin- α in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996;43:456-463
- 17 Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, Itoh K. Polymorphism of the 5'-fanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)- α gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998;51:605-612
- 18 Kaijzel EL, van Krugten MV, Brinkman BM, Huizinga TW, van der Straaten T, Hazes JM, Ziegler-Heitbrock HW, Nedospasov SA, Breedveld FC, Verweij CL. Functional analysis of a human tumor necrosis factor α (TNF- α) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis. *Mol Med* 1998;4:724-733
- 19 Zhang DL, Li JS, Jiang ZW, Yu BJ, Tang XM, Zheng HM. Association of two polymorphisms of tumor necrosis factor genewith acute biliary pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9:824-828
- 20 Powell JJ, Fearon KC, Siriwardena AK, Ross JA. Evidence against a role for polymorphisms at tumor necrosis factor interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist gene loci in the regulation of disease severity in acute pancreatitis. *Surgery* 2001;129:633-640
- 21 Conway DJ, Holland MJ, Bailey RL, Campbell AE, Mahdi OS, Jennings R, Mbena E, Mabey DC. Scarring trachoma is associated with polymorphism in the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene promoter and with elevated TNF- α levels in tear fluid. *Infect Immun* 1997;65:1003-1006
- 22 Knight JC, Udalova I, Hill AV, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, Kwiatkowski D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* 1999;22:145-150
- 23 Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riche F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999; 282:561-568
- 24 Tang GJ, Huang SL, Yien HW, Chen WS, Chi CW, Wu CW, Lui WY, Chiu JH, Lee TY. Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection. *Crit Care Med* 2002;28:2733-2736
- 25 Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor- α concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996;24:381-384
- 26 Zhang D, Li J, Jiang ZW, Yu B, Tang X. Association of two polymorphisms of tumor necrosis factor gene with acute severe pancreatitis. *J Surg Res* 2003;112:138-143
- 27 Dianliang Z, Jieshou L, Zhiwei J, Baojun Y. Association of plasma levels of tumor necrosis factor (tnf)-alpha and its soluble receptors, two polymorphisms of the TNF gene, with acute severe pancreatitis and early septic shock due to it. *Pancreas* 2003;26:339-343
- 28 张佃良, 黎介寿, 江志伟, 于宝军, 唐星明. TNF- α 基因多态性在重症急性胰腺炎中的意义. 中华医学杂志 2002;82:1529-1531
- 29 张佃良, 江志伟, 于宝军, 黎介寿. 肿瘤坏死因子基因启动子多态性与重症急性胆源性胰腺炎及其脓毒症休克的关系. 中国急救医学 2003;23:694-696
- 30 Zhang D, Li J, Jiang Z, Yu B, Tang X, Li W. The relationship between tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms and acute severe pancreatitis. *Chin Med J (Engl)* 2003;116: 1779-1781