

- 14 Metzger R, Schneider PM, Warnecke-Eberz U, Brabender J, Holscher AH. Molecular biology of esophageal cancer. *Onkologie* 2004;27:200-206

- 15 Sutter AP, Zeitz M, Scherubl H. Recent results in understanding molecular pathways in the medical treatment of esophageal and gastric cancer. *Onkologie* 2004;27:17-21

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 肿瘤坏死因子 $\beta$ 1069位点基因多态性与胃癌易感性的相关性研究

李立人, 鞠少卿

李立人, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001  
鞠少卿, 南通大学附属医院检验医学中心 江苏省南通市 226001  
项目负责人: 李立人, 226001, 江苏省南通市西寺路 20 号, 南通大学附属医院消化内科. larry017@163.com  
电话: 0513-5052206 传真: 0513-5519820  
收稿日期: 2004-10-21 接受日期: 2004-11-04

### 摘要

**目的:** 探讨江苏汉族人群肿瘤坏死因子 $\beta$ (tumor necrosis factor  $\beta$ , TNF $\beta$ ) 1069 位点等位基因多态性与胃癌的关系。

**方法:** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法对 168 名健康人和 45 例胃癌患者 TNF $\beta$  基因的单碱基突变多态性进行了分析。

**结果:** 胃癌患者的 TNF $\beta$ \*1/2 等位基因频率(66.7%) 较正常人(47.0%) 明显升高( $P=0.019<0.05$ )。

**结论:** TNF $\beta$ \*1/2 等位基因频率与胃癌易感性相关。

李立人, 鞠少卿. 肿瘤坏死因子 $\beta$ 1069 位点基因多态性与胃癌易感性的相关性研究. 世界华人消化杂志 2005;13(1):115-117  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/115.asp>

### 0 引言

胃癌是我国发病率最高的恶性肿瘤, 其发生与外界各种不良因素持续作用以及个体遗传易感性有关. 最近, 人们逐渐意识到不同个体易感性的不同在胃癌发病机制中的重要性. 人群中存在易感个体是由于一些与肿瘤发生相关的基因存在多态性. 随着限制性内切酶、Southern 杂交技术以及克隆测序技术的完善, 目前研究较深入的基因多态性主要为单核苷酸多态、微卫星 DNA 多态、AluI 序列多态. 自从 1985 年 Kroutiris *et al* 报道了检测 *ras* 癌基因多态性可用于估计肿瘤发生的危险性后, 国内外学者在多个层面研究了基因多态性与胃癌发生的相关性, 阐明了基因型与表型之间的联系。

虽然胃癌的发病机制至今还在争论, 但大量的证据认为细胞因子如白介素在胃癌的过程中发挥着重要的作用<sup>[1]</sup>. 肿瘤坏死因子 $\beta$  (tumor necrosis factor-beta,

TNF $\beta$ ) 是体内具有多种生物活性的细胞因子, 具有抗肿瘤、抗病毒感染的作用及诱发炎症反应以及刺激某些正常细胞的生长. 编码 TNF $\beta$  的基因位于 HLA-B 以及 HLA-C<sub>2</sub> 位点之间的 HLA-III 抗原基因族内, 包含若干个多态性位点. 近年来研究显示 TNF $\beta$  基因多态性主要有 5 种, Shimura *et al*<sup>[2]</sup> 报道第 1 内含子内, 转录起始位点下游第 252 位点(+252 位点, 也就是 TNF $\beta$  基因第 1069 位点) 处鸟嘌呤(G)→腺嘌呤(A) 碱基变化与胃癌预后有关, 发现携带 TNF $\beta$ 10.5 kb 纯合子基因型的胃腺癌患者预后较好, TNF $\beta$  基因 1069 处位点为 G 称为 TNF $\beta$ \*1, 具有 *Nco*I 限制性内切酶的识别位点, 1069 位为 A 的基因称为 TNF $\beta$ \*2, 无 *Nco*I 限制性内切酶的识别位点, TNF $\beta$  基因 G-A 突变可调节 TNF $\beta$  转录水平<sup>[3]</sup>, 与 TNF 水平特征性增高有密切关系<sup>[4]</sup>. TNF $\beta$  基因多态性是否与人类自身免疫性疾病、感染、肿瘤等许多疾病相关联, 国外学者进行了探讨<sup>[5-6]</sup>, 但结论不完全相同. 我们采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 方法探讨江苏地区汉族人群肿瘤坏死因子 $\beta$  (TNF $\beta$ ) 等位基因多态性与胃癌的相关性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 对象 (1) 患者组: 45 例胃癌患者(高中分化型 14 例, 低分化型 31 例), 其中女性 30 例, 男性 15 例, 年龄 38-72 岁, 平均年龄(56.6 $\pm$ 9.2) 岁, 均经病理证实胃癌, 临床排除自身免疫病、感染性疾病、其他恶性肿瘤; (2) 正常对照组: 168 名年龄、性别与胃癌患者组大致匹配的健康体检者及献血员, 其中男性 102 名, 女性 66 名, 年龄 36-70 岁, 平均年龄(54.2 $\pm$ 9.7) 岁. 以上患者及正常对照人群均系江苏地区、无血缘关系、三代亲属均为汉族。

1.1.2 仪器和试剂 Gene Amp 9600 型 PCR 扩增仪(美国 PE 公司), 2360K 离心机(德国 Hermle 公司), SX-100 型凝胶自动成像系统(上海生物技术公司); Taq DNA 聚合酶

(上海华美公司), 限制性内切酶 *NcoI* (Promega 公司), dNTP (Pharmacia 公司), DNA 分子量标准 (pUC19 DNA/ *Msp I*) (MBI 公司产品).

## 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 抽提** 从 3 mL 10% EDTA- $\text{Na}_2$  抗凝外周血中提取有核细胞, 用蛋白酶 K 隔夜消化, 然后用酚-氯仿法抽取基因组 DNA, 调 DNA 浓度至 50 mg/L,  $-20^\circ\text{C}$  保存备用.

**1.2.2 引物及合成** 自行设计引物序列, 由上海生工生物工程有限公司合成及纯化. 上、下游引物分别为: TNF $\beta$ A 5' -CCGTGCTTCGTGCTTTGGACTA-3'; TNF $\beta$ B 5' -AGACGTTCA GGTGGTGCA T-3', 对应产物为 TNF $\beta$  基因第 1、2 外显子间 427 bp 的基因片段. 每个 PCR 扩增体系为 50  $\mu\text{L}$ . 其中包括基因组 DNA 250 ng,  $1\times$  PCR 缓冲液 (50 mmol/L KCl, 10 mmol/L 的 Tris-Cl, pH 9.0, 1.0% Triton X-100, 1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{mol/L}$  dNTPs, 引物各 0.2  $\mu\text{mol/L}$ , 2U Taq DNA 聚合酶. 扩增条件:  $95^\circ\text{C}$  预变性 10 min,  $94^\circ\text{C}$  1 min,  $64^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  1 min, 共 35 个循环, 继后  $72^\circ\text{C}$  延伸 5 min.

**1.2.3 产物鉴定及分析** 任意抽取 10 份产物 (各 12.0  $\mu\text{L}$ ) 加 0.85  $\mu\text{L}$  双蒸水、1.5  $\mu\text{L}$   $10\times$  缓冲液、0.15  $\mu\text{L}$   $100\times$  乙酰化牛血清白蛋白 (BSA) 以及 0.5  $\mu\text{L}$  *NcoI* 内切酶 (10 U/ $\mu\text{L}$ ),  $37^\circ\text{C}$  水浴 4 h, 30 g/L 溴化乙锭琼脂糖电泳, 通过观察条带的情况 (有可能酶切不够或过酶切) 确定一份 TNF G/G 纯合子的模板 DNA, 取 4 管 PCR 反应管, 各加入 5.0  $\mu\text{L}$  纯合子的模板 DNA, 扩增结束后合并 4 管产物, 吸取 50.0  $\mu\text{L}$  产物加 29.2  $\mu\text{L}$  双蒸水、8  $\mu\text{L}$   $10\times$  缓冲液、0.8  $\mu\text{L}$   $100\times$  BSA 以及 0.5  $\mu\text{L}$  *NcoI* 内切酶, 混匀后再将其重新分成 5 管,  $37^\circ\text{C}$  分别水浴 1, 2, 4, 6, 8, 12 h,  $65^\circ\text{C}$  20 min 灭活, 30 g/L 溴化乙锭琼脂糖电泳, 通过观察条带的情况确定最佳的酶切时间 (结果 4 h 为最佳). 取消消化后的产物经 30 g/L 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭 0.5 mg/L) 电泳, 约 1 h 后, 在紫外线灯下观察、记录结果, 并在凝胶自动成像系统进行成像.

**统计学处理** TNF $\beta$  基因频率及基因型频率用直接计数法, 采用  $\chi^2$  检验进行 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验, 组间比较  $\chi^2$  检验. 不同人种 TNF  $\beta$  基因频率的构成比用  $\chi^2$  检验进行比较, 所有数据统计由 STATA 6.0 统计软件包完成.

## 2 结果

**2.1 TNF $\beta$  基因型及等位基因频率** 用 3', 5' TNF $\beta$  引物行 PCR 扩增反应可获得第 1 外显子到第 2 外显子长度为 427 bp 的一段基因片段扩增产物, 经限制性内切酶 *NcoI* 作用后 (酶切位点位于 1064 与 1065 之间), 根据基因不同, 产生 3 种酶切结果: (1) TNF $\beta$ \*1/1 纯合子, 扩增的基因片段, 含有 *NcoI* 酶切位点, 可被完全酶切为 231 bp、196 bp<sup>2</sup> 条带; (2) TNF $\beta$ \*1/2 杂合子, 产生不完全

酶切, 出现 427 bp、231 bp、196 bp 3 条带; (3) TNF $\beta$ \*2/2 纯合子, 其 PCR 产物经 *NcoI* 消化, 则电泳后只出现 427 bp 1 条带, 其酶切结果 (图 1).

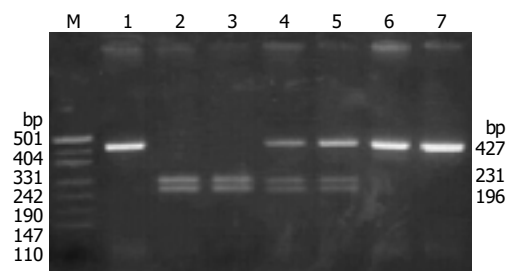


图1 TNF $\beta$  酶切产物 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳结果. M: DNA 分子量标准: Marker (pUC19 DNA/*Msp I*); 1: 未被酶切的原产物; 2, 3: TNF $\beta$ \*1/1 纯合子; 4, 5: TNF $\beta$ \*1/2 杂合子; 6, 7: TNF $\beta$ \*2/2 纯合子.

**2.2 胃癌 患者组与正常对照组 TNF $\beta$  等位基因频率及基因表型的分布 (表 1), 应用 Hardy-Weinberg 定律进行检验, 两个群体都达到了遗传平衡 ( $P > 0.05$ ). 胃癌患者 TNF $\beta$ \*1/2 等位基因频率显著高于正常人群 ( $P = 0.019$ ), 提示 TNF $\beta$ \*1/2 等位基因与胃癌的发病有关.**

表1 TNF $\beta$  基因型及等位基因频率在胃癌及健康对照组中的比较

| 等位基因             | 胃癌患者 n(%)             | 健康对照 n(%) |
|------------------|-----------------------|-----------|
| 基因型频率            |                       |           |
| TNF $\beta$ *1/1 | 4(8.9)                | 36(21.4)  |
| TNF $\beta$ *1/2 | 30(66.7) <sup>a</sup> | 79(47.0)  |
| TNF $\beta$ *2/2 | 11(24.4)              | 53(31.5)  |
| 基因频率             |                       |           |
| TNF $\beta$ *1   | 38(42.2)              | 151(44.9) |
| TNF $\beta$ *2   | 52(57.8)              | 185(55.1) |

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 健康对照组.

## 3 讨论

Kim *et al*<sup>[7]</sup> 曾报道 TNF $\beta$  两个等位基因之间不仅存在着结构上、还存在着功能上的差异. 体外用植物血凝素刺激韩国人外周血单核细胞, 得出 TNF $\beta$ \*1 纯合子产生 TNF $\beta$  的水平高于 TNF $\beta$ \*2 纯合子的结论. 我们研究结果显示胃癌患者中 TNF $\beta$ \*1/2 基因型频率显著高于正常人群, 提示 TNF $\beta$ \*1/2 基因型与胃癌的发病相关, 据 Lee *et al* 的实验结果推测, 胃癌的发病可能通过调节 TNF 的分泌而参与. 至于 TNF $\beta$ \*1/2 基因型有无可能增加胃癌患者幽门螺杆菌的感染率, TNF $\beta$ \*1/2 等位基因是否可以作为江苏地区汉族人群胃癌的发病易感基因的一个标记, 还需进一步深入研究.

应当指出, TNF $\beta$  位于 MHC III 抗原基因簇内, 与 MHC I 类及 II 类抗原基因相邻, TNF $\beta$  基因与 HLA 的某些单倍体有连锁不平衡, 而 MHC 复合体具有高度多态性. 虽然 TNF $\beta$ \*1/2 基因频率在胃癌中升高, 但不能将其作为是疾病的一个遗传标记. HLA 其他基因的基因多态性可影响

TNF $\beta$  活性, 因此 TNF $\beta$  基因多态性在 HLA 相关疾病中的地位还不明确, TNF $\beta$  基因多态性在这些疾病的发生、发展中是起主要作用, 还是辅助作用, 或是其他因素协同作用, 或者只是其他主要因素的标志, 这些都还不明确. 此外到目前为止, 人们只研究了 TNF $\beta$  基因多态性对 TNF 产量的影响, TNF $\beta$  基因多态性对 TNF $\beta$  的活性的影响还没有研究, TNF $\beta$  基因多态性是否导致机体产生异常活性的 TNF $\beta$ , 进而影响了疾病的病程, 都有待于进一步讨论和研究.

#### 4 参考文献

- 1 Akira S. Signal pathways in immune systems: IL-1 R/ Toll-like receptor family. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2000; 23:505-510
- 2 Shimura T, Inaguma Y, Nakamura T, Itoh M, Morii Y. 10. 5-kb homozygote of tumor necrosis factor-beta gene is associated with a better prognosis in gastric cancer patients. *Cancer* 1995; 75:1450-1453
- 3 Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997;34:391-399
- 4 Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Molvig J, Worsaae H, Abbal M, Thomsen M, Nerup J, Cambon-Thomsen A. Association of tumor necrosis factor(TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993;23:224-231
- 5 Yamaguchi E, Itoh A, Hizawa N, Kawakami Y. The gene polymorphism of tumor necrosis factor- $\beta$ , but not that of tumor necrosis factor- $\beta$ , is associated with the prognosis of sarcoidosis. *Chest* 2001;119:753-761
- 6 Matthias M, Sascha F, Udo O. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann Surg* 1999; 230:207-214
- 7 Kim TG, Kim HY, Lee SH, Cho CS, Park SH, Choi HB, Han H, Kim DJ. Systemic lupus erythematosus with nephritis is strongly associated with the TNF $\beta$ \*2 homozygote in the Korean population. *Hum Immunol* 1996;46:10-17

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

### *World Journal of Gastroenterology* 出版周期

《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》将从 2004 年起由月刊改为半月刊, 以期在不增加出版篇幅的前提下进一步缩短出版周期, 力争论文的投稿时滞控制在 1-4 个月内出版, 并进入 Science Citation Index-Expanded 及 *Index Medicus* /MEDLINE 等国际著名检索系统, 以展示我国消化病学者在该领域的国际领先地位. 例如, 2003 年第 10 期刊出的浙江大学医学院附属第二医院普外科彭淑牖教授等撰写的“采用 PMOD 和刮吸术通过不同途径进行肝尾叶切除术: 76 例”, 是一篇具有国际领先水平的论文, 该文从收稿至出版仅用 45 天.

### *World Journal of Gastroenterology* 排版印刷

《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》全文模板设计从书眉、栏目、题名、作者、作者单位、基金资助、通讯作者、E-mail、电话、传真、收稿日期、接受日期、摘要、文献著录格式、一级标题字体、二级标题字体、图、表、参考文献, 均制订了统一的字体及格式要求, 每篇文章结束后不再续接其他文章, 适用于摘要数据库、ASP、XML、PDF 格式的要求. WJG 使用的排版软件为国际流行的 PageMaker 软件, 可自动生成 ASP、XML、PDF, 为 WJG 进入电子版格式起到了重要的作用. WJG 出片为进口片, 黑白和彩色印刷用海德堡彩色印刷, 采用三面刀剪切. 北京科信印刷厂承担 WJG 印刷业务, 一条龙服务, 包括出片、打样、装订前书样, 全部送杂志社审核, 达到标准后才能印刷和装订. WJG 出版后, 赠送给国内外专家, 他们认为 WJG 封面、内文印刷和装订可与国际著名期刊相媲美.