

贵州地区汉族肺癌患者单核细胞趋化蛋白-1-2518 A/G 基因多态性的研究

金艳坤 井晓婷 罗靖 余红 张雯 张湘燕 叶贤伟

摘要 **目的** 研究贵州地区汉族人群中单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)-2518A/G 位点是否存在基因多态性。探讨 MCP-1-2518A/G 基因多态性与肺癌的相关性。**方法** 收集 2013 年 3~12 月在贵州省人民医院呼吸与危重症医学科住院治疗、无血缘关系的肺癌患者(实验组)90 例及同期健康体检者(对照组)32 例的血样。通过运用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性技术对 MCP-1-2518A/G 的基因型进行检测。**结果** 贵州地区汉族人群中 MCP-1-2518A/G 存在基因多态性,健康人群中,3 种基因型(AA、AG、GG)的分布频率分别为:6.2%、46.9%、46.9%,实验组为 26.7%、46.6%、26.7%。2. 实验组和对照组中 MCP-1-2518A/G 3 种基因型分布差异具有统计学意义($P=0.022$),AA 基因型个体患肺癌的相对风险度高($OR=5.455, P=0.015$),GG 基因型个体患肺癌的相对风险度低($OR=0.412, P=0.035$),A 等位基因在实验组和对照组的分布频率差异具有统计学意义($P=0.005$),携带 A 等位基因的个体患肺癌的相对风险是携带 G 等位基因个体的 2.368 倍。**结论** 贵州地区汉族人群中存在 MCP-1-2518A/G 基因多态性。MCP-1-2518A/G 基因多态性与肺癌的发病有相关性,A 等位基因可能是肺癌发病的易感基因。

关键词 单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1) 基因多态性 肺癌

中图分类号 R734

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.07.018

Study on the Relationship between Genetic MCP-1-2518 Polymorphism and Lung Cancer in Han Population of Guizhou Region. Jin

Yankun, Jing Xiaoting, Luo Jing, et al. Department of Respiratory Medicine, The People's Hospital of Guizhou Province, Guizhou 550002, China

Abstract **Objective** To study the gene polymorphism of monocyte chemotactic protein-1(MCP-1)-2518A/G in Chinese Han population of Guizhou region and the relationship between MCP-1-2518A/G gene polymorphism and lung cancer. **Methods** Totally 90 unrelated patients with lung cancer (22 with SCLC, 68 with NSCLC; 20 in early stage, 70 in late stage) in Department of Respiratory and Critical Care Medicine in the Guizhou Provincial People's Hospital and 32 healthy individuals were recruited from March to December 2013. The gene polymorphism of MCP-1-2518G/A was detected with polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) in both patients with lung cancer and the control groups. **Results** (1)The gene polymorphism of MCP-1-2518 A/G existed in Chinese Han population of Guizhou region. In control group, the genotype frequency of AA, GG, AG were 6.2%, 46.9%, 46.9%. (2) There was a significant difference in genotype distribution between AA, AG, GG of MCP-1-2518A/G in lung cancer patients compared with healthy individuals($P=0.022$). The relative risk of suffering from lung cancer in AA genotype of lung cancer patients was much higher ($\chi^2=5.868, OR=5.455, P=0.015$), and there was a significant decrease in frequency of the GG genotype ($\chi^2=4.433, OR=0.412, P=0.035$). The frequency distribution of A allele in the lung cancer group and the control group of the relative risk was significantly different ($P=0.005$). The relative risk suffered from lung cancer of individuals with A allele was 2.368 folds which was higher than with G allele. **Conclusion** MCP-1-2518A/G gene polymorphism exists in Chinese Han population of Guizhou region. MCP-1-2518A/G gene polymorphism is associated with the incidence of lung cancer. A allele may be one of lung cancer susceptibility genes.

Key words Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1); Gene polymorphism; Lung cancer

基金项目:国家科技部国家临床医学研究中心基金资助项目(2013BAI09B09);贵州省优秀科技教育人才省长专项基金资助项目[黔省专合字(2011)21号];贵州省呼吸疾病防治研究科技创新人才团队[黔科合人才团队(2012)4012号]

作者单位:550002 贵州,贵州省人民医院呼吸与危重症医学科、贵州省呼吸疾病研究所(金艳坤、余红、张湘燕、叶贤伟);贵州医学院(井晓婷、罗靖、张雯)

通讯作者:叶贤伟,电子信箱:yxw1205@163.com

支气管肺癌是严重危害人类健康的疾病,有资料显示,肺癌无论是年发病人数还是年死亡人数,均位居全球癌症首位^[1]。肺癌是一种与环境因素、生活方式及遗传因素有关的恶性疾病,其发生、发展与炎性介质和某些与癌发病相关的基因多态性有关,并存在一定的遗传易感性差异和家族聚集性^[2,3]。单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)是 CC 类趋化因子,是一种重要的炎性细胞因子,参与机体多种炎性反应过程,研究表明 MCP-1-2518 基因多态性可能与恶性肿瘤的易感性相关^[4,5]。目前 MCP-1 基因多态性与肺癌关系的相关研究少见。笔者采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态(PCR-RFLP)技术进行基因多态性的检测,以期发现 MCP-1-2518 基因多态性与肺癌遗传易感性的相关性。

材料与方法

1. 研究对象:选取 2013 年 3~12 月在贵州省人民医院呼吸与危重症医学科住院治疗的肺癌患者 90 例作为实验组,其中男性 58 例,女性 32 例,患者年龄 40~79 岁,平均年龄 57.5 ± 11.3 岁。32 例同期健康体检者作为对照组,其中男性 19 例,女性 13 例,年龄 42~76 岁,平均年龄 55.7 ± 13.1 岁。实验前所有受试者均签署知情同意书。两组受试者均排除严重心血管疾病、肝肾功能不全、自身免疫性疾病、急性或严重慢性感染性疾病等,且相互间无血缘关系。经检验,两组间年龄、性别差异无统计学意义,具有可比性。

2. 实验方法:(1)实验标本收集 所有研究对象均于清晨空腹抽取外周静脉血 2ml(EDTA 抗凝),摇匀后置于 -80°C 冰箱保存,用于基因组 DNA 的提取。(2)MCP-1 基因多态性检测:1)全血基因组 DNA 的提取:使用 TIANamp Genomic DNA Kit 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,提取的 DNA 进行紫外分光光度检测。2)引物合成及 PCR 扩增:根据参考文献^[6],合成引物。上游引物:5'-TTCTCTTC-TACGGGATCTGGG-3',下游引物:5'-GTCTCTCCTGGCTT-TAGTCAT-3'。进行 PCR 扩增:第 1 阶段 94°C 3min;第 2 阶段: 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1min,循环 30 次;第 3 阶段: 72°C 5min。3)PCR 产物的检测、限制性酶切:PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,使用紫外线凝胶成像系统判定目的条带。扩增产物用 Pvu II 限制性内切酶进行酶切。酶切产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,使用紫外线凝胶成像系统观察酶切结果并成像。

3. 统计学方法:对实验对象进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,以了解所收集的标本是否具有良好的群体代表性($P > 0.05$)。使用 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行统计学处理。采用 χ^2 检验对不同两组间基因型或等位基因分布频率的差异进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。对频率差

异有统计学意义的基因型或等位基因进行比值比(odds ratio, OR)及其 95% 可信区间(confidence interval, CI)的计算,OR 表示相对风险度。

结 果

1. MCP-1-2518A/G 基因多态性结果分析:(1)MCP-1-2518A/G 位点 PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳结果:扩增目的 DNA 片段为 466bp。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳证实,在 400~500bp 之间有一条清晰的电泳带,说明目的 DNA 的 PCR 扩增成功(图 1)。(2)MCP-1-2518A/G 位点 PCR 产物 Pvu II 酶切后琼脂糖凝胶电泳结果:DNA 片段经限制性内切酶 Pvu II 酶切后,在 2% 琼脂糖凝胶上电泳观察 3 种基因型:AA 基因型仅见 1 条 466bp 的电泳带,GG 基因型有 327bp 和 139bp 两条电泳带,AG 基因型有 466bp、327bp 和 139bp 3 条电泳带(图 2)。

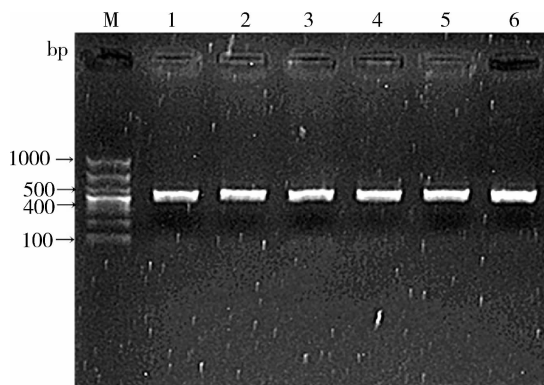


图 1 MCP-1-2518G/A PCR 扩增产物电泳图

M. 100bp DNA marker; 1~6. 扩增的 DNA 片段,长度 466bp

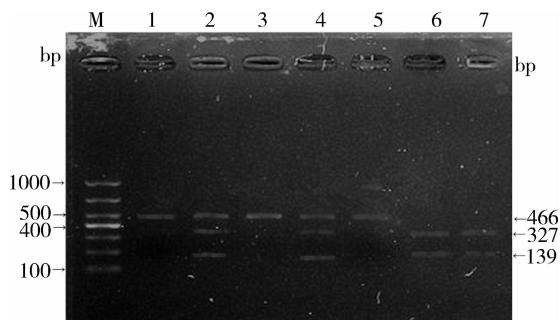


图 2 MCP-1-2518G/A PCR 产物 Pvu II 酶切后电泳图

M. 100bp DNA marker; 1、3、5. AA 基因型; 2、4. AG 基因型; 6、7. GG 基因型

2. MCP-1-2518A/G 多态性基因型分布在实验组与对照组的比较:经验证,基因型在实验组和对照组的分布频率符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,具有群体代表性。对照组中 AA、AG、GG 基因型的分布频

率分别为:6.2%、46.9%、46.9%;实验组中分别为:26.7%、46.6%、26.7%;3种基因型在两组间分布频率差异具有统计学意义($P=0.022$,表1)。经 χ^2 检验及风险性分析得出,AA基因型个体患肺癌的相对风险度高,GG基因型个体患肺癌的相对风险度较低,携带A等位基因的个体患肺癌的相对风险是携带G等位基因个体的2.368倍,A等位基因在病例组

和对照组的分布频率差异具有统计学意义(表2)。

表1 实验组和对照组 MCP-1-2518A/G 基因型频率 Hardy-Weinberg 平衡及组间比较[n(%)]

组别	AA	AG	GG	χ^2	P	H-W 平衡 P
对照组	2(6.2)	15(46.9)	15(46.9)	7.633	0.022	0.280
实验组	24(26.7)	42(46.6)	24(26.7)			0.240

表2 基因型和等位基因分布频率在两组中的比较[n(%)]

组别	AA	AG	GG	A	G
对照组	2(6.2)	15(46.9)	15(46.9)	19(29.7)	45(70.3)
实验组	24(26.7)	42(46.6)	24(26.7)	90(50.0)	90(50.0)
χ^2	5.868	0.000	4.433	7.881	7.881
P	0.015	1.000	0.035	0.005	0.005
OR	5.455		0.412	2.368	0.422
95% CI	1.210 ~ 24.585		0.178 ~ 0.952	1.286 ~ 4.362	0.229 ~ 0.778

讨 论

单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)是CC类趋化因子,位于17号染色体上,包含3个外显子和两个内含子,是一种重要的炎性细胞因子,参与机体多种炎症反应过程。目前研究显示MCP-1可通过向肺癌组织内趋化单核-吞噬细胞、促进肿瘤血管生成、肿瘤免疫逃逸等途径影响肺癌的发生、发展^[7]。Rovin等^[8]研究发现在MCP-1元的调控区-2518A/G位点,存在A-G碱基突变,即AA、AG、GG3种基因型。MCP-1-2518A/G位点突变可能影响MCP-1的表达而影响肿瘤免疫效应,最终影响肿瘤的发病。多个研究表明MCP-1基因-2518位点A/G多态性在一定程度上可以影响到肿瘤的遗传易感性,并在肿瘤的发生、发展过程中起着重要的作用^[4,5]。尽管MCP-1及其多态性与肿瘤关系密切,但由于肿瘤的类型及地域、种族、环境及饮食等方面的差异均可能导致研究结果的不同,且目前MCP-1基因多态性与肺癌关系的相关研究少见。

目前认为肺癌的发生与炎症反应关系密切。炎症部位的细胞、分子或基因的改变对肺癌的发生、进展起着重要作用。慢性或持续性炎症可诱导炎性细胞大量聚集,产生多种炎性细胞和趋化因子并引起级联反应,诱导正常细胞DNA氧化损害,激活癌基因,导致肿瘤发生。近年来研究证实肿瘤微环境的产生对肿瘤发生有关键作用。炎症反应引起肿瘤微环境募集大量巨噬细胞,中性粒细胞清除延迟、活性氧物

质增加,引起肿瘤发生,微环境中的生长因子和血管生成因子使肿瘤部位的血管生成,促进肿瘤细胞增殖和转移。肺内微环境改变可激活肺癌发生的相关信号通路、导致慢性炎症发生。慢性持续性感染可以引起支气管-肺泡干细胞增殖,致肺上皮细胞癌变,还能使基因组不稳定,引起DNA损伤、癌基因激活或抑癌基因失活^[9,10]。

基因多态性可导致人类患各种疾病的易感性不同,人类MCP-1-2518A/G基因多态性存在种族差异性。曾有报道,墨西哥人和亚洲人群携带G等位基因者较高加索人和非洲人群多^[11]。中国台湾地区人群MCP-1-2518的G等位基因频率为52.4%,与已证实的亚洲人群(47%)和墨西哥人群(47%)相似,而高加索人群的G等位基因频率为29%,而非裔美国人的G等位基因更低,只有22%^[12]。土耳其人A和G等位基因的频率分别为71%和29%、高加索人为73%和27%、韩国人分别为39.8%和60.2%^[13-15]。

本研究将90例肺癌患者和32例健康对照的MCP-1-2518A/G基因位点基因型进行检测,结果显示在贵州地区汉族人群中存在MCP-1-2518A/G基因多态性,健康人群的AA、GG、AG基因型的分布频率与上述亚洲人群基因分布频率相似^[10,12];MCP-1-2518A/G3种基因型在实验组和对照组中频率分布差异具有统计学意义;在实验组中AA基因型的频率明显较对照组高,GG基因型频率明显较低,AA基因型个体患肺癌的相对风险度高,GG基因

型个体患肺癌的相对风险度较低;A 等位基因在实验组和对照组的分布频率差异有统计学意义 ($P < 0.05$),即携带 A 等位基因的个体患肺癌的相对风险是携带 G 等位基因个体的 2.368 倍,提示 MCP-1-2518A/G 中 A 等位基因可能是贵州地区汉族人群患肺癌的遗传易感基因。

参考文献

- 葛均波,徐永健,等.内科学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2013:75
- 郝罡,王文静,陆晔,等. TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 启动子区基因多态性与肺发病易感性的关系研究[J]. 环境与职业医学,2009,1(26):24-27
- 周舫,李伟辉,任文杰,等. 肿瘤坏死因子 TNF- β +252 基因多态性与肺癌遗传易感性[J]. 现在预防医学,2011,38(7):1328-1335
- Vázquez-Lavista LG, Lima G, Gabilondo F, et al. Genetic association of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)-2518 polymorphism in Mexican patients with transitional cell carcinoma of the bladder[J]. Urology,2009,74(2):414-418
- Ghilardi G, Biondi ML, La TA, et al. Breast cancer progression and hostpolymorphisms in the chemokine system:role of the macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1)-2518 G allele[J]. Clin Chem,2005,51:452
- 杨磊,时广利,宋长兴,等. 中国北方地区汉族人群 MCP-1 基因多态性与肺癌相关性研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2010,30(4):336-339
- 王威,周末花,叶军辉,等. 肺癌和结核性胸腔积液/血清 MCP-1

及其受体 CCR2 的测定及临床意义[J]. 中国高等医学教育,2012,2:142-143

- Rovin BH, Saxena R, Lu L, et al. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression[J]. Biochemical And Biophysical Research Communications,1999,259(2):344-348
- Houghton AM, Mouded M, Shapiro SD. Common origins of lung cancer and COPD[J]. Nat Med,2008,14(10):1023-1024
- 刘晶,王朝霞. 慢性炎症与肺癌发病关系的研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志,2013,36(8):603-605
- 马芙蓉,倪安民,任建功,等. 单核细胞趋化蛋白 1 基因多态性与 2 型糖尿病的相关性研究[J]. 临床荟萃,2007,22(6):396-399
- Liu SF, Wang CC, Fang WF, et al. MCP1-2518 Polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease in Taiwanese men[J]. Experimental Lung Research,2010,36(5):277-283
- Ozyurek AR, Gurses D, Ulger Z, et al. Allelic frequency of the MCP-1 promoter-2518 polymorphism in the Turkish population and in Turkish patients with juvenile rheumatoid arthritis[J]. Clin Rheumatol,2007,26(4):546-550
- Zietz B, Buchler C, Herfarth H, et al. Caucasian patients with type 2 diabetes mellitus have elevated levels of monocyte chemoattractant protein-1 that are influenced by the -2518A/G promoter polymorphism[J]. Diabetes Obes Metab,2005,7(5):570-578
- Hong SB, Jin SY, Park HJ, et al. Analysis of the monocyte chemoattractant protein 1-2518 promoter polymorphism in Korean patients with alopecia areata[J]. J Korean Med Sci,2006,21(1):90-94

(收稿日期:2014-12-10)

(修回日期:2014-12-27)

氩氦刀对肺气肿兔肺组织微创减容治疗的研究

张孝天 臧琦

摘要 目的 本研究旨在通过采用氩氦刀经皮肺穿刺对实验性兔肺气肿模型施行靶向冷消融,以确定氩氦刀经皮靶向肺减容术的有效性、可行性和安全性。**方法** 采用纯种健康新西兰成年大白兔 20 只建立肺气肿模型,分别在建立模型前后测肺功能及血气分析;模型建立后在 CT 引导下经皮穿刺行氩氦刀肺减容治疗,冷融全部采用 2 次冷融循环,冷冻为每次 5min,复温过程采用氦气主动复温,复温时间为 2min。分别于 1、3、7、14、28 天测定血气分析及肺功能结果,并且获取相应的标本观察其大体形态及其在光镜下的组织学变化。**结果** 氩氦刀冷冻消融治疗过程中,实验组术中少量出血 3 例(15%),皮下气肿 2 例(10%);肺功能及血气分析:与肺气肿模型相比,术后 1 天无明显改变($P > 0.05$),术后 3、7 天明显改变($P < 0.05$)、术后 14、28 天显著改变($P < 0.01$),肺功能和血气分析指标的最佳改善时间为 7~14 天。**结论** 氩氦刀肺减容术以达到有效破坏靶组织的目的,明显改善动物模型肺功能和血气分析指标,且创伤小、并发症少、效果好、安全性高。

关键词 兔 肺气肿 氩氦刀 肺减容术 血气分析 肺功能

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.07.019

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2010HL005)

作者单位:261053 潍坊医学院研究生部(张孝天);250012 济南,山东省千佛山医院胸外科(臧琦)

通讯作者:臧琦,主任医师,电子信箱:qzang2005@sina.com