

广西人群中VEGF基因启动子区-460 T/C单核苷酸多态性与鼻咽癌的易感性

程小伟, 汪春林, 黄小庆, 张勇

VEGF Gene Promoter Region-460 T/C Single Nucleotide Polymorphisms and Nasopharyngeal Carcinoma Susceptibility in Guangxi Population

CHENG Xiaowei, WANG Chunlin, HUANG Xiaoqing, ZHANG Yong

Department of Radiotherapy, Affiliated No.1 Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding Author: ZHANG Yong, E-mail: zhangyonggx@163.com



Abstract: Objective To explore the relationship between vascular endothelial growth factor(VEGF) gene promoter region-460 T/C single nucleotide polymorphisms(SNP) and nasopharyngeal carcinoma(NPC) susceptibility in Guangxi population. **Methods** We analyzed SNP of VEGF-460 T/C in 240 patients with NPC and 245 healthy controls, using polymerase chain reaction(PCR) sequence specific primers method. The association of the polymorphism with NPC susceptibility was determined by multivariate logistic regression analysis after mixed factors revision. **Results** Genotypic distributions of VEGF-460 T/C polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. The distribution of VEGF-460 T/T(52.9%) and T/C+C/C(47.1%) differed from those(63.3%,36.7%) in control group($\chi^2=5.335$, $P=0.021$). Compared with control group(20.6%), the frequency of C allele in NPC group(27.5%) was significantly higher($\chi^2=6.303$, $P=0.012$). Compared with T allele, the C allele might increase the risk of nasopharyngeal carcinoma (OR=1.458, 95%CI:1.115~1.952). Furthermore, compared with genotype T/T, the genotype T/C+C/C containing C allele increased the risk of lymphatic metastasis (OR=2.214, $P=0.038$). **Conclusion** There is significant correlation between VEGF-460 T/C polymorphism and NPC susceptibility.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma; Vascular endothelial growth factor(VEGF); SNP; Susceptibility

摘要: 目的 探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 基因启动子区-460 T/C单核苷酸多态性(SNP)在广西人群中与鼻咽癌发生发展的易感性。**方法** 鼻咽癌组240例, 健康组245例。采用聚合酶链式反应(PCR), 直接测序法检测两组人群VEGF-460 T/C单核苷酸的多态性。多元Logistic回归分析校正混杂因素, 对VEGF-460 T/C基因多态性与鼻咽癌易感性进行相关统计学分析。**结果** VEGF-460 T/C基因多态性分布符合Hardy-Weinberg平衡定律; VEGF-460位点T/T、T/C+C/C基因型在病例组中的频率分别为52.9%、47.1%, 在对照组中的频率分别为: 63.3%、36.7%, 差异有统计学意义($\chi^2=5.335$, $P=0.021$)。鼻咽癌组中VEGF-460 T/C SNP C等位基因频率(27.5%)明显高于对照组(20.6%), 差异有统计学意义($\chi^2=6.303$, $P=0.012$)。与T等位基因相比, 携带有C等位基因的基因型可增加鼻咽癌发病风险(OR=1.458, 95%CI: 1.115~1.952); 与T/T基因型相比, 携带有C等位基因的基因型(T/C+C/C)能增加淋巴结转移的风险(OR=2.214, 95%CI: 1.276~3.842, $P=0.038$)。**结论** VEGF基因启动子区-460 T/C单核苷酸多态性与鼻咽癌易感性显著相关。

关键词: 鼻咽癌; 血管内皮生长因子; 单核苷酸多态性; 易感性

中图分类号: R739.62 文献标识码: A

0 引言

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)

收稿日期: 2013-08-19; 修回日期: 2013-11-13

基金项目: 广西自然科学基金面上项目(2011GXNSFA018242)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院放疗科

通信作者: 张勇, E-mail: zhangyonggx@163.com

作者简介: 程小伟(1986-), 男, 硕士, 医师, 主要从事鼻咽癌基础与临床研究

是常见的头颈部恶性肿瘤, 其发病有明显的地区差异, 中国华南地区为全世界最高发的区域。这种区域集中发病模式提示鼻咽癌的发生可能与遗传及环境因素有关, 同时, EB病毒感染、环境中化学致癌物质以及基因位点的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)都可能是NPC发病的影响因素^[1-3]。尽管近年来, 放疗技术和设备不断的更新, 采用调强放疗和新辅助化疗

相结合的综合治疗,使NPC的治疗效果较以往有显著改善,但是,其5年总生存率仍然只有70%左右^[4-5]。因此,寻找易感基因,确定高危人群,提高早期诊治率是目前鼻咽癌研究的热点之一。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是已知的最重要血管生成调控因子之一,能特异性作用于血管内皮细胞,刺激内皮细胞增殖,诱导血管形成。并且已有研究^[6]表明VEGF蛋白的高表达与鼻咽癌患者的临床特征及预后关系密切。VEGF-460 T/C位点的单核苷酸多态性可能通过影响VEGF转录、表达而影响NPC的发生、发展及预后。因而本研究旨在探讨广西人群中VEGF-460 T/C基因多态性与NPC易感性的关系。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选取2011年11月至2012年11月期间在广西医科大学第一附属医院放疗科住院治疗的鼻咽癌患者240例,年龄17~74岁,平均年龄(44.80±11.680)岁。其中男179例,中位年龄46岁;女61例,中位年龄45岁。入组标准:所有病例均为病理学诊断的初治患者,分期标准参照鼻咽癌2008分期(中国鼻咽癌临床分期工作委员会 2008)。对照组为同一时期在广西医科大学第一附属医院体检的健康人群245例,年龄21~73岁,平均年龄(43.17±12.663)岁。其中男189例,中位年龄47岁,女56例;中位年龄45.5岁。入组标准:无肿瘤病史,无耳鼻咽喉疾病史,与病例组之间无血缘关系。病例与对照组人群通过流行病学面访调查,获得个人的年龄、性别、民族、是否有肿瘤家族史及吸烟情况等资料,其中吸烟情况分为吸烟指数<400和≥400。本研究经过广西医科大学伦理委员会批准,所有研究对象均同意参加此研究并自愿提供血液样本。

1.2 方法

治疗前采集研究对象的空腹静脉血5 ml,枸橼酸钠抗凝,置于4℃冰箱保存。DNA提取试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品,按照说明书方法在采集血液标本后72 h内提取外周血白细胞DNA,产物于-20℃条件下保存,聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增目的DNA片段,引物由上海生工生物技术有限公司设计并合成。上游引物:5'-TGTGCAGACGGCAGTCACAT-3',下游引物:5'-CCGCTACCAGCCGACTTT-3',产物长度588 bp,

PCR扩增反应体系(20 μl):含Taq Master Mix 10 μl,上游引物0.6 μl,下游引物0.6 μl, DNA模板2 μl,超纯水6.8 μl。采用美国ABI公司的9700PCR扩增仪,94℃预变性4 min,循环:变性94℃ 30 s,退火62℃ 30 s,延伸72℃ 45 s,共进行循环35次,终末延伸72℃ 2 min。PCR产物由北京三博远志生物技术有限责任公司进行正向测序。

EBV-VCA-IgA试剂盒为美国RD公司分装,按照说明书操作步骤用ELISA法检测,用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度(OD值),与临界值(CUT OFF)相比较,CUT OFF值计算:临界值=阴性对照孔平均值+0.15。

1.3 统计学方法

采用SPSS19.0软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。对照组基因型频率进行Hardy-Weinberg平衡分析。采用卡方检验对病例组及对照组的一般资料进行统计分析。用多因素非条件Logistic回归法计算经性别、年龄、民族、吸烟情况、EB-VCA-IgA抗体及肿瘤家族史等状况校正的相对风险度的比值比(odds ratio, OR)及其95%可信区间(confidence interval, CI)。

2 结果

2.1 测序结果

PCR扩增产物行基因测序,结果采用Chromas软件分析峰图,人工读取具有双峰的碱基,即为杂合子,单峰的碱基则为纯合子(图略)。

2.2 一般资料

鼻咽癌组与对照组在性别、年龄、民族、吸烟指数≥400方面比较差异无统计学意义($P > 0.05$);鼻咽癌组中,具有鼻咽癌家族史和EB-VCA-IgA阳性的人数明显高于对照组,两组的分布差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.3 HW平衡分析

VEGF-460T/C基因型T/T、T/C、C/C在对照组中的频率分别为63.3%、32.2%、4.5%,经Arlequin软件分析,基因型频率的分布符合Hardy-Weinberg平衡($P > 0.05$),说明对照组为遗传平衡群体,具有代表性。

2.4 VEGF-460T/C基因型及等位基因在两组人群中的分布及与鼻咽癌易感性的关系

本实验结果显示,VEGF-460T/C基因型及等位基因在鼻咽癌组和对照组中普遍存在,统计结果显示:VEGF-460T/C SNP T和C等位基因在鼻咽癌组中的频率分别为72.5%、27.5%,在对照组中的频率分别为79.4%、20.6%,鼻咽癌组中C等位

表1 鼻咽癌病例组与对照组一般资料比较[n(%)]

Table1 Comparison of general data between NPC group and control group [n(%)]

Variable	NPC	Control	χ^2	$P^{\#}$
Gender				
Male	179(74.6)	189(77.1)	0.434	0.51
Female	61(25.4)	56(22.9)		
Age (years)				
<30	23(9.6)	31(12.7)	2.246	0.325
30-50	144(60.0)	152(62.0)		
≥50	73(30.4)	62(25.3)		
Nationality				
Han	142(59.2)	154(62.9)	0.694	0.405
Minorities	98(40.8)	91(37.1)		
NPC family history				
Yes	33(13.8)	19(7.8)	4.552	0.033
No	207(86.2)	226(92.2)		
Smoking index				
≥400	106(44.2)	91(37.1)	2.48	0.115
<400	134(55.8)	154(62.9)		
EB-VCA-IgA				
Positive	209(87.1)	37(15.1)	251.13	0.000
Negative	31(12.9)	208(84.9)		

Notes: $^{\#}$: Two-tailed Chi-square test

基因的频率明显高于对照组,差异有统计学意义($P=0.012$, $OR=1.458$, $95\%CI$: 1.115~1.952),见表2,提示C等位基因可增加鼻咽癌的发病风险。两组基因型差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.5 VEGF-460T/C与NPC患者临床指标的关系

按照年龄、性别、病理类型、TNM分期进行分

层分析,按照WHO2003分类进行病理类型分型,按鼻咽癌2008分期对患者进行TNM分期。结果显示:N0~1期组C等位基因的频率显著低于N2~3组($OR=2.214$, $95\%CI$: 1.276~3.842, $P<0.05$),提示C等位基因可增加NPC淋巴结转移的概率,见表3。

表2 VEGF-460T/C 位点基因型和等位基因在病例组和对照组中的分布

Table2 Distribution of VEGF-460T/C locus genotype and allele in NPC group and control group

	NPC	Control	OR $^{\&}$	95%CI $^{\&}$
Genotype(%)				
T/T n	127(52.9)	155(63.3)	1	—
T/C n	94(39.2)	79(32.2)	1.445 $^{\#}$	0.984-2.322
C/C n	19(7.9)	11(4.5)	2.112 $^{\#}$	0.951-4.614
T/C+C/C n	113(47.1)	90(36.7)	1.532 $^{\#}$	1.066-2.203
SNP				
T allele	348(72.5)	389(79.4)	1	—
C allele	132(27.5)	101(20.6)	1.458 *	1.115-1.952

Notes: $^{\#}$: compared with genotype T/T; * : compared with SNP T allele;

—: reference; $\&$: correction factors such as gender, age, ethnic, etc

3 讨论

VEGF又名血管通透因子,由Ferrara等于1989年从牛垂体滤泡星状细胞培养物中提纯分离得到,它能够特异性地作用于血管内皮细胞,促进其增殖,在体内诱导血管形成,并增加新生血管的通透性。人类VEGF基因位于第六号染色体的P12~P21

表3 VEGF-460 C/T 基因型和等位基因分布与NPC临床指标的关系

Table3 Relationship between NPC clinical index and distribution of VEGF-460T/C genotype and allele

Variable	Genotype		T allele	C allele	OR	95%CI	P
	T/T	T/C+C/C					
Gender							
Male	97	82	264	94	1.252	0.821-1.987	0.284
Female	30	31	84	38			
Age (years)							
<30	13	10	33	13			
30-50	68	76	204	84	1.045	0.524-2.084	0.900
≥50	46	27	111	35	0.800	0.380-1.687	0.558
Nationality							
Han	82	60	206	78	1.009	0.672-1.514	0.988
Minorities	45	53	142	54			
Pathologic							
Nonkeratinizing	118	107	330	120	1.839	0.865-3.914	0.117
Other	9	6	18	12			
T stage							
T1-2	18	22	52	28	0.658	0.397-1.085	0.13
T3-4	109	91	296	104			
N stage							
N0-1	36	18	90	18	2.214	1.276-3.842	0.038
N2-3	91	95	258	114			
M stage							
M0	121	107	330	126	0.875	0.334-2.253	0.781
M1	6	6	18	6			
Clinical stage							
I - II	6	9	21	9	0.876	0.387-1.962	0.748
III -IV	121	104	327	123			

区,全长为14 kb,由8个外显子和7个内含子构成。VEGF基因存在多个单核苷酸多态性位点,这些多态性位点可能通过影响其转录和表达从而影响VEGF蛋白的表达水平,其中位于启动子5'-末端非翻译区域的-460T/C与RNA的剪接有关,并且,目前的实验证据趋向于认为其与VEGF的表达有关,并且具有功能上的差别^[7-8],从而引起个体对肿瘤易感性的差异。近年来,国内外临床研究报道了VEGF-460基因多态性与多种恶性肿瘤关系密切。台湾Ku等^[9]报道了VEGF-460 T/C基因型和等位基因在病例组和对照组之间分布频率的多态性差异有统计学意义($P<0.001$),并且认为该VEGF-460可作为预测口腔癌发病的生物学标志物。Lin等^[10]在研究台湾地区前列腺癌时也有类似的报道,但Onen等^[11]认为VEGF-460基因型和等位基因多态性与土耳其地区前列腺癌的发病无明显相关性($P>0.05$),而且,VEGF-460基因型与该地区临床患者的TNM分期、GS评分及血清PSA水平也无相关性($P>0.05$)。Chen等^[12]报道在携带有VEGF-460 T/C和C/C基因型的结直肠癌患者中,肿瘤内和循环VEGF水平较携带纯合子T/T基因型的患者VEGF水平有明显增高($P<0.01$),说明VEGF-460 T/C和C/C基因型可增加VEGF蛋白的表达水平;在Ⅱ/Ⅲ期接受根治性手术治疗的患者中,T/C和C/C基因型与术前局部侵犯、淋巴结侵犯、组织分化程度差、和术后转移、生存率的下降明显正相关($P<0.01$);在携带T/C和C/C基因型的远处转移患者对FOLFOX-4方案化疗的敏感度较差($P=0.03$),生存率也相对较短($P<0.001$);笔者认为,VEGF-460是结直肠癌的一个增加肿瘤复发及预后较差的独立性关键因素。Masago等^[13]报道非小细胞肺癌中,携带有C/C基因型的患者中位生存时间较短($P<0.01$),提示C/C基因型与非小细胞肺癌患者的不良预后相关。高峰等^[14]报道国内肺癌患者中,携带有等位基因C增加了不吸烟人群($P=0.006$)及总体人群($P=0.0029$)肺癌的发病风险,同时,也增加肺鳞癌及小细胞肺癌的发病风险(95%CI: 1.058~3.295, OR=1.867; 95%CI: 1.036~4.224, OR=2.092)。然而贾皓等^[15]发现,相对于T等位基因,等位基因C可降低非贲门胃癌的发病风险(95%CI: 0.329~0.824, OR=0.52)。

本研究结果表明:在广西人群中,VEGF-460 SNPC与鼻咽癌的发生及淋巴结转移有一定的关联,但具体的分子生物学机制以及VEGF-460 SNP C与鼻咽癌放疗敏感度、化疗耐受性以及预后的关系尚不清楚,需要进一步的基础及临床研究证实。同时,需要结合分析VEGF基因其他SNP对鼻咽癌易感性的影响,为明确鼻咽癌发生机制、以及对鼻咽癌的预防和早期诊治有重要意义。

参考文献:

- [1] Feng X L, Zhou W, Li H, *et al.* The DLC-1-29A/T polymorphism is not associated with nasopharyngeal carcinoma risk in Chinese population[J]. *Genet Test*, 2008, 12(3): 345-9.
- [2] Hildesheim A, Wang CP. Genetic predisposition factors and nasopharyngeal carcinoma risk: a review of epidemiological association studies, 2000–2011: Rosetta Stone for NPC: genetics, viral infection, and other environmental factors[J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(2): 107-16.
- [3] Li XH, Meng YL, Zhao LJ, *et al.* Epstein-barr virus antibodies response for zhuang npc patients of different ages[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2013, 40(4): 377-80. [李晓华, 蒙以良, 赵丽娟, 等. EB病毒抗体检测在不同年龄壮族鼻咽癌患者中的应用[J]. *肿瘤防治研究*, 2013, 40(4): 377-80.]
- [4] Lin JC, Jan JS, Hsu CY, *et al.* Outpatient weekly neoadjuvant chemotherapy followed by radiotherapy for advanced nasopharyngeal carcinoma: high complete response and low toxicity rates[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(2): 187-94.
- [5] Palazzi M, Orlandi E, Bossi P, *et al.* Further improvement in outcomes of nasopharyngeal carcinoma with optimized radiotherapy and induction plus concomitant chemotherapy: an update of the Milan experience[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 74(3): 774-80.
- [6] Jiang W, Zhang C, Luo Y, *et al.* Correlation between nasopharyngeal carcinoma and the expression of VEGF protein in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Xian Dai Zhong Liu Yi Xue*, 2010, 18(12): 2354-7. [蒋伟, 张成, 罗元, 等. VEGF蛋白表达与鼻咽癌临床特征相关性研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2010, 18(12): 2354-7.]
- [7] Cosin R, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, *et al.* Vascular endothelial growth factor polymorphisms (-460C/T, +405G/C, and 936C/T) and endometriosis: their influence on vascular endothelial growth factor expression[J]. *Fertil Steril*, 2009, 92(4): 1214-20.
- [8] Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, *et al.* Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production[J]. *Cytokine*, 2000, 12(8): 1232-5.
- [9] Ku KT, Wan L, Peng HC, *et al.* Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for oral cancer[J]. *Oral Oncol*, 2005, 41(5): 497-502.
- [10] Lin CC, Wu HC, Tsai FJ, *et al.* Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for prostate cancer[J]. *Urology*, 2003, 62(2): 374-7.
- [11] Onen IH, Konac E, Eroglu M, *et al.* No association between polymorphism in the vascular endothelial growth factor gene at position -460 and sporadic prostate cancer in the Turkish population[J]. *Mol Biol Rep*, 2008, 35(1): 17-22.
- [12] Chen MH, Tzeng CH, Chen PM, *et al.* VEGF-460T/C polymorphism and its association with VEGF expression and outcome to FOLFOX-4 treatment in patients with colorectal carcinoma[J]. *Pharmacogenomics J*, 2010, 11(3): 227-36.
- [13] Masago K, Fujita S, Kim YH, *et al.* Effect of vascular endothelial growth factor polymorphisms on survival in advanced-stage non-small-cell lung cancer[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(10): 1917-22.
- [14] Gao F, Zhou XT, Zhang ZF, *et al.* Relationship between single nucleotide polymorphisms of -460T/C in VEGF gene and the susceptibility of lung cancer in Hebei province[J]. *Zhonghua Zhong Liu Fang Zhi Za Zhi*, 2012, 19(8): 575-8. [高峰, 周雪涛, 张泽峰, 等. VEGF 基因-460T/C 单核苷酸多态性与河北地区汉族人群肺癌发病风险相关性分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2012, 19(8): 575-8.]
- [15] Jia A, Gong J, Li YC. Relationship between vascular endothelial growth factor gene-460C/T polymorphism and noncardiac gastric cancer[J]. *Wei Chang Bing Xue He Gan Bing Xue Za Zhi*, 2012, 21(5): 399-402. [贾皓, 龚均, 厉英超. 血管内皮生长因子-460C/T 基因多态性与非贲门胃癌的关系[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2012, 21(5): 399-402.]

[编辑: 黄园玲; 校对: 周永红]