

ARL 15 基因 rs4311394 多态性与非小细胞肺癌遗传易感性的关联

李盈甫¹⁾, 马千里²⁾, 王红¹⁾, 虎月燕¹⁾, 计畅¹⁾, 戴路明³⁾

(1) 昆明医科大学第一附属医院干疗科, 云南昆明 650032; 2) 昆明医科大学第三附属医院心胸外科, 云南昆明 650106; 3) 昆明医科大学第一附属医院重症呼吸科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨 ADP-核糖基化样因子 15 (ADP-ribosylation factor like 15, ARL15) 基因多态性与非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的相关性。 **方法** 采用 TaqMan 基因分型方法对 NSCLC 患者 ($n = 359$) 与健康体检人群 ($n = 376$) 进行 ARL 15 基因 SNP-rs4311394 位点基因分型, 评估这个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与 NSCLC 发生的相关性, 同时根据 NSCLC 病理类型和恶性程度进行分层分析, 评估这个位点与 NSCLC 病理类型和恶性程度的相关性。 **结果** ARL15 基因 SNP-rs 4311394 位点基因型和等位基因频率在 NSCLC 组和对照组中差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在 NSCLC 鳞癌和腺癌中 SNP-rs4311394 位点基因型和等位基因频率分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 同时, SNP-rs4311394 位点基因型和等位基因频率分布于 NSCLC 恶性程度也无相关性。 **结论** ARL15 基因 SNP-rs4311394 与 NSCLC 的发生、病理类型及临床分期无相关性。

[关键词] 癌; 非小细胞肺; ARL15; 多态性

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 04-0053-04

Association Study of ARL 15 Gene rs4311394 Polymorphisms and Genetic Predisposition of Non-small Cell Lung Cancer

LI Ying-fu¹⁾, MA Qian-li²⁾, WANG Hong¹⁾, HU Yue-yan¹⁾, JI Chang¹⁾, DAI Lu-ming³⁾

(1) Dept. of Geriatrics, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 2) Dept. of Thoracic Surgery, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Cancer Institute of Lung Cancer Research Center, Kunming Yunnan 650106; 3) Respiratory Intensive Care Unit, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** This study aimed to investigate the association of polymorphisms in ARL 15 (ADP-ribosylation factor like 15) gene and non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** 359 patients with NSCLC and 376 healthy controls in Chinese Han were included in present study. SNP-rs4311394 in ARL 15 gene was genotyped using TaqMan technique. The correlations of the SNPs with NSCLC pathologic types and clinical stages were evaluated. **Results** The genotypic and allelic frequencies of SNP-rs4311394 showed no significant difference between NSCLC and the control groups ($P > 0.05$). The genotypic and allelic frequencies of SNP-rs4311394 showed no significant difference between the squamous carcinoma and the adenocarcinoma groups ($P > 0.05$). The genotypic and allelic frequencies of SNP-rs4311394 showed no significant difference between the stage I+II and stage III+IV groups ($P > 0.05$). **Conclusion** ARL 15 SNP-rs4311394 was not associated with the occurrence, pathologic types and clinical stages of NSCLC.

[Key words] Carcinoma; Non-small-cell lung; ADP-ribosylation factor like 15; Polymorphism

[基金项目] 云南省卫生科技计划项目 (2014NS139); 云南省应用基础研究基金资助项目 (2012FB064)

[作者简介] 李盈甫 (1978~), 男, 云南昆明市人, 在职硕士研究生, 主治医师, 主要从事老年呼吸系统肿瘤临床工作。

[通讯作者] 戴路明. E-mail: dailuming6622@hotmail.com

目前肺癌被认为是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 每年死于肺癌的病人超过百万^[1], 而其中非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 占肺癌发病率 80%~85%。肺癌的发生有明显的家族聚集现象, 这一现象表明遗传因素在肺癌的发生发展过程中可能起到重要的作用。

最近的证据表明, 血清中的脂联素水平与包括 NSCLC, 子宫内膜癌, 肾细胞癌, 乳腺癌, 结肠癌等多种癌症的发生风险呈负相关^[2-6]。笔者前期的研究发现脂联素基因启动子区域 SNP-11426 与 NSCLC 的发生有关, 其中 G 等位基因可能增加 NSCLC 的患病风险^[7]。除了脂联素基因启动子区域突变可能影响血清脂联素水平外, 其他基因也能影响血清脂联素水平, 比如 ADP-核糖基化样因子 15 (ADP-ribosylation factor like 15, ARL15)。最新研究发现, ARL15 基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) rs4311394 与血清脂联素水平高度相关, 其中 G 等位基因可能降低血清脂联素水平^[8]。

基于以上的研究背景, 本实验拟通过对血清脂联素影响的另一个基因 ARL15 的研究, 来探讨其变异 SNP-rs4311394 与 NSCLC 发生的相关性; 同时根据 NSCLC 病理类型和恶性程度进行分层分析, 评估 SNP-rs4311394 位点与 NSCLC 病理类型和恶性程度的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般情况

根据知情同意原则, 获得在 2012 年 9 月至 2014 年 6 月在昆明医科大学第一和第三附属医院确诊的 NSCLC 患者 359 例 (男 =246, 女 =133) 和健康对照人群 376 例 (男 =257, 女 =119), 病例组平均年龄 (55.89 ± 10.65) 岁, 对照组 (56.51 ± 8.83) 岁, 2 组间的性别和年龄分布无统计学差异 ($P > 0.05$)。其中病例组包括鳞癌 138 例, 腺癌 221 例, 其临床分期中 I 期 53 例、II 期 62 例、III 期 131 例、IV 期 113 例。非小细胞肺癌诊断及纳入标准: 经外科手术切片病理学确诊为原发性非小细胞肺癌 (NSCLC) 并且手术前未接受放疗、化疗等任何形式抗癌治疗, 无肺癌家族史。对照组为同期到昆明医科大学第一和第三附属医院体检的健康人群, 其纳入标准为: 经 PET-CT、CT、超声等临床检查结果排外肺部占位性病变、无胸痛、血痰或痰中带血等相关症状。

1.2 NSCLC 诊断及分期

NSCLC 的诊断通过开胸手术、胸腔镜检查、纤维支气管镜等方式获取组织, 并经病理学诊断确诊证实^[9]。对非手术治疗的患者, 根据影像学等检查结果进行临床分期^[10], 对肺癌完全切除术的患者, 采用国际肺癌研究协会 (international association for the study of lung cancer, IASLC) 2009 年第七版^[11]分期标准进行病理分期。

1.3 样品处理

采集空腹静脉血 5 mL, 使用 AxyPrep 血基因组试剂盒提取 DNA。

1.4 ARL15 基因 SNP 位点基因分型

使用 TaqMan 探针基因分型方法, 定制 SNP-rs 4311394 引物及探针 (Applied Biosystems 公司), SNP-rs 4311394 位点运用罗氏 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪进行基因分型。PCR 反应体积为 10 μ L, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性, 92 $^{\circ}$ C 15s 变性, 60 $^{\circ}$ C 1min 退火, 共 40 个循环, 40 $^{\circ}$ C 5 min 长延伸。每一块 96 孔反应板中包括经测序验证获得的 3 个已知基因型 (野生纯合子、突变纯合子、杂合子) 的标准样品作为对照。

1.5 统计学分析

使用 Hardy-Weinberg 平衡检验基因型频率的代表性。 χ^2 检验比较非小细胞肺癌组与正常对照组 ARL15 基因 SNP-4311394 基因型、等位基因频率差异。 χ^2 检验比较非小细胞肺癌不同病理类型和不同临床分期中 ARL15 基因 SNP-rs 4311394 基因型、等位基因频率差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ARL15 基因 SNP-rs4311394 位点在 NSCLC 组与对照组的等位基因与基因型频率分布特征

2 组分型结果符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$), 证明样品具有代表性。表 1 显示, 在病例组和对照组中, ARL15 基因 SNP-rs4311394 等位基因 A 和 G 的频率分别为 56.7%、43.3% 和 57.0%、43.0%; AA、AG、GG 基因型频率分别为 31.5%、50.4%、18.1% 和基因型频率分别为 34.6%、44.9%、20.5%。SNP-rs 4311394 的等位基因频率在病例和对照组中的分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 ARL15 基因 SNP-rs4311394 多态性位点在鳞癌组与腺癌组中的等位基因与基因型频率分布特征

在鳞癌组和腺癌组中, SNP-rs4311394 等位基因 A 和 G 的频率分别为 55.4%、44.6% 和 57.5%、42.5%; AA、AG、GG 基因型频率分别为 31.9%、47.1%、21.0% 和 31.2%、52.5%、16.3%。SNP-rs4311394 的等位基因频率在鳞癌组和腺癌组的分布差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 2。

2.3 ARL15 基因 SNP-rs4311394 多态性位点在不同临床分期中 Stage I+II 和 Stage III+IV 的等位基因与基因型频率分布特征

在 Stage I+II 和 Stage III+IV 中, SNP-rs4311394 等位基因 A 和 G 的频率分别为 57.4%、42.6% 和 56.4%、43.6%; AA、AG、GG 基因型频率分别为 29.6%、55.7%、14.8% 和 32.4%、48.0%、19.7%。SNP-rs4311394 的等位基因频率在 Stage I+II 组和 Stage III+IV 组的分布无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3。

表 1 SNP-rs4311394 位点在病例组和对照组的基因型和等位基因频率分布

Tab. 1 The comparison of rs4311394 genotype and allele frequency between NSCLC and control groups

组别	基因型			χ^2	<i>P</i>	等位基因		χ^2	<i>P</i>
	AA	AG	GG			A	G		
病例组	0.315	0.504	0.181	2.222	0.329	0.567	0.433	0.020	0.888
对照组	0.346	0.449	0.205			0.570	0.430		

表 2 SNP-rs4311394 位点在鳞癌组和腺癌组的基因型和等位基因频率分布

Tab. 2 The comparison of rs4311394 genotype and allele frequency between squamous carcinoma and adenocarcinoma

组别	基因型			χ^2	<i>P</i>	等位基因		χ^2	<i>P</i>
	AA	AG	GG			A	G		
鳞癌组	0.319	0.471	0.210	1.548	0.461	0.554	0.446	0.286	0.593
腺癌组	0.312	0.525	0.163			0.575	0.425		

表 3 SNP-rs4311394 位点在不同临床分期中 Stage I+II 和 Stage III+IV 的基因型和等位基因频率分布

Tab. 3 The comparison of rs4311394 genotype and allele frequency between Stage I+II and Stage III+IV

组别	基因型			χ^2	<i>P</i>	等位基因		χ^2	<i>P</i>
	AA	AG	GG			A	G		
Stage I+II	0.296	0.557	0.148	2.184	0.342	0.574	0.426	0.069	0.739
Stage III+IV	0.324	0.480	0.197			0.564	0.436		

3 讨论

ARL15 属于分泌性蛋白质, 基因定位在人类染色体 5p15.2, 包含 5 个外显子和 4 个内含子。ARL15 功能研究较少, 目前的研究仅发现其在脂肪组织和骨骼肌等组织中表达, 其结构与 ADP 核糖基化因子和 Ras- 相关的 GTP 结合蛋白相似^[8]。2009 年, Richards 等应用全基因组关联研究技术对加拿大人群的 2 型糖尿病患者、冠心病患者与正常对照组进行关联研究, 结果发现 ARL15 基因 SNP

(rs4311394-G) 与血清脂联素水平降低高度相关^[8]。2013 年, 崔正伟等利用 SnaPshot 单碱基延伸技术对延边地区朝鲜族 2 型糖尿病患者合并大血管病变患者进行 ARL15 基因 3 个 SNPs 位点 (rs4311394、rs26770 和 rs359419) 进行病例对照研究, 结果显示 ARL15 基因 rs26770 G 等位基因与延边朝鲜族 2 型糖尿病显著相关^[12]。以上研究提示, ARL15 可能通过影响血清脂联素水平从而与 2 型糖尿病的发生具有相关性。

脂联素是脂肪组织分泌的一种新型蛋白, 可减轻肥胖及 2 型糖尿病患者的高脂血症及胰岛素抵

抗。近期大量研究证实,脂联素在恶性肿瘤的发生发展中可能起到抑制作用。脂联素与脂联素受体结合并激活受体和下游的信号转导通路,直接作用于肿瘤细胞;或者通过抗血管生成,诱导肿瘤细胞凋亡或其他机制调节细胞增殖^[13]。2007年 Petridou 等的研究发现,肺癌病人血清中的脂联素水平与对照组相比并无明显差异,但是在晚期肺癌患者血清中的脂联素水平明显降低^[14]。随后,杨文平等研究发现,发生远处转移后肺癌患者血清中脂联素的表达水平与未远处转移的肺癌患者血清脂联素水平有统计学差异,低血清脂联素水平与肺癌发生远处转移相关^[5]。因此,脂联素水平的降低提示肺癌患者具有更高的侵袭性和转移性。2014年,李盈甫等研究结果发现,脂联素基因启动子区域的 SNP-rs12140 位点与 NSCLC 的发生具有相关性,且 A 等位基因对 NSCLC 的发生可能具有保护性作用 (OR = 0.622, 95% CI: 0.398 ~ 0.971)^[7]。

基于以上的结果,本实验拟通过对血清脂联素影响的另一个基因 ARL15 的研究,来探讨其变异与 NSCLC 发生的相关性,研究结果提示 ARL15 基因 SNP-rs4311394 与 NSCLC 的发生、病理类型及临床分期无相关性。笔者认为无相关性的原因可能有以下几个方面,首先,肺癌是一个环境和遗传因素共同起作用的复杂疾病,其发生、发展受多种因素影响,发病机制复杂。血清脂联素可能只是影响其发生发展的众多因素之一,因此,影响血清脂联素水平的遗传因素,如 ARL15 的变异对肺癌的发生发展影响可能较小,但不排除等位基因异质性的存在,也就是该位点可能与肺癌的发生发展无相关性,而该基因其他位点的突变可能与肺癌的发生发展相关。其次,尽管大量研究提示 ARL15 变异与血清脂联素和 2 型糖尿病相关,但是 ARL15 与疾病的相互作用的具体机制不详,因此,还需对 ARL15 基因的功能进行进一步的研究,特别对影响血清脂联素水平和疾病发生的方面进行研究。最后,样本量也是本研究的一个局限,因此,在未来的研究中,笔者将扩大样本量或者进行前瞻性研究来进一步验证本研究结果。同时,也会对 ARL15 基因的其他位点进行基因分型,结合笔者前期的脂联素基因变异的数据综合分型,探讨 ARL15 基因-脂联素基因相互作用对肺癌发生发展的影响。

[参考文献]

[1] LAWRENCE R E, SALGIA R. MET molecular mechanisms and therapies in lung cancer [J]. *Cell Adh Migr*,

- 2010, 4 (1):146 - 152.
- [2] WILLIAMS C J, MITSIADES N, SOZOPOULOS E, et al. Adiponectin receptor expression is elevated in colorectal carcinomas but not in gastrointestinal stromal tumors [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2008, 15 (1):289 - 299.
- [3] DAL MASO L, AUGUSTIN L S, KARALIS A, et al. Circulating adiponectin and endometrial cancer risk [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89 (3):1 160 - 1 163.
- [4] HORIGUCHI A, ITO K, SUMITOMO M, et al. Decreased serum adiponectin levels in patients with metastatic renal cell carcinoma [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2008, 38 (2): 106 - 111.
- [5] ISHIKAWA M, KITAYAMA J, KAZAMA S, et al. Plasma adiponectin and gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11 (2):466 - 472.
- [6] MIYOSHI Y, FUNAHASHI T, KIHARA S, et al. Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (15): 5 699 - 5 704.
- [7] 李盈甫, 钱旭, 周竞贤, 等. 脂联素基因多态性与非小细胞肺癌遗传易感性的关联 [J]. *昆明医科大学学报*, 2014, 35 (9):52 - 55.
- [8] RICHARDS J B, WATERWORTH D, RAHILLY S, et al. A genome wide association study reveals variants in ARL15 that influence adiponectin levels [J]. *PLoS Genet*, 2009, 5 (12): 1 000 768.
- [9] 高俊珍, 付秀华, 王立红, 等. 无症状肺癌的临床特点及其诊断方法分析 [J/CD] [J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6 (4):990 - 992.
- [10] 马云川. PET 概述及其在肺癌诊疗中的应用 [J/CD] [J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2008, 2 (11):1 313.
- [11] SHEPHERD F A, CROWLEY J, VAN HOUTTE P, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer lung cancer staging project: Proposals regarding the clinical staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2007, 2 (12):1 067 - 1 077.
- [12] 曹玲, 崔正伟, 杨康鹏, 等. ARL15 单核苷酸多态性与 2 型糖尿病合并大血管病变相关性研究 [J]. *国际遗传学杂志*, 2013, 36 (5):220 - 223.
- [13] 李盈甫, 马千里, 姚宇峰. 脂联素基因与非小细胞肺癌相关性研究进展 [J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2013, 7 (23):10 944 - 10 946.
- [14] PETRIDOU E T, MITSIADES N, GIALAMAS S, et al. Circulating adiponectin levels and expression of adiponectin receptors in relation to lung cancer: two case-control studies [J]. *Oncology*, 2007, 73 (3-4):261 - 269.
- [15] 杨文平, 蔡曦光, 刘华, 等. 脂联素在肺癌患者血清中的表达及意义 [J]. *国际呼吸杂志*, 2012, 32 (10): 769 - 772.

(2015 - 02 - 21 收稿)