

网络出版时间: 2019-12-18 17:13 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20191217.1516.026.html

## 缺氧诱导通路基因多态性与肺癌及临床特征的关联性研究

于伟玲<sup>1</sup>, 肖莎<sup>2</sup>, 谢宇宙<sup>1</sup>, 黄琰菁<sup>3</sup>, 陈元<sup>4</sup>

**摘要** 目的 缺氧诱导因子 2A(HIF2A)和血管内皮生长因子 A(VEGFA)是缺氧诱导途径中的重要基因。HIF2A 多态性位点 rs13419896 和 VEGFA 多态性位点 rs833061 与肺癌相关性是研究的热点。该研究旨在揭示 rs13419896 和 rs833061 与中国人人群中肺癌患者的遗传相关性及其临床意义。方法 应用病例对照研究方法收集肺癌患者 438 例和健康对照 456 例,应用 Taqman Genotyping 方法对收集的样本进行靶位点基因分型,并分析其与临床特征的关系。结果 研究发现位于 HIF2A 基因 rs13419896 A 等位基因对比 G 等位基因具有降低肺癌发病风险 [ $OR = 0.72, 95\% CI(0.58 \sim 0.88), P = 0.001$ ], 加性遗传模型分析该位点结果 rs13419896 AA 降低肺癌的发病风险 [ $OR = 0.74, 95\% CI(0.61 \sim 0.90), P = 0.002$ ]。通过调整吸烟、饮酒、年龄影

响 rs13419896 AA 仍显示显著降低肺癌的发病风险 [ $OR = 0.75, 95\% CI(0.60 \sim 0.93), P = 0.009$ ]。而未发现 rs13419896 基因型与肺癌中病理类型和临床分期相关,且 VEGFA 基因多态位点 rs833061 未发现与肺癌的相关性。结论 研究结果显示在中国海南人群中 HIF2A 基因多态性位点 rs13419896 与肺癌发生显著相关。rs13419896 基因型与肺癌相关性经过多中心及大样本的验证,可作为潜在的遗传易感性分子标记。

**关键词** 低氧诱导因子 2A; 血管内皮生长因子 A; 基因多态性; 肺癌

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)01-0123-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.01.026

2019-09-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81660550); 海南省自然科学基金(编号: 310150)

作者单位: <sup>1</sup>海口市人民医院肿瘤科, 海口 570208

<sup>2</sup>海南医学院公共卫生学院, 海口 571199

<sup>3</sup>海南省人民医院肿瘤科, 海口 570311

<sup>4</sup>华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤科, 武汉 430030

作者简介: 于伟玲, 女, 硕士研究生;

陈元, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: che-nyuan008@163.com

肺癌是世界范围内死亡率最高的恶性肿瘤之一。在全球范围内, 2012 年诊断出约 180 万新发肺癌病例, 占世界癌症总发病率的 12.9%, 同年其死亡 159 万人, 占癌症死亡总数的 19.4%<sup>[1]</sup>。目前的流行病学研究结果显示中国过去 10 年肺癌发病率和死亡率呈持续上升趋势, 平均每年以 1.6% 的比例上升<sup>[2]</sup>。

肺癌细胞的形成和转移与缺氧微环境适应和生长密切相关<sup>[3-4]</sup>, 现有研究发现缺氧诱导因子相关通路分子异常与肺癌进展有重要联系<sup>[5]</sup>, 其遗传多

protein(TROAP) in lung adenocarcinoma. **Methods** The differential expression of TROAP and its impact on patients prognosis were analyzed by exploring multiple public databases. Immunohistochemical staining was used to detect the histological score (H-Score) of TROAP in 30 patients with lung adenocarcinoma. The differences in expression and clinicopathological features (sex, age, TNM stage, Ki-67 level, smoking history, pleural effusion and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutation status) were analyzed. **Results** Database analysis suggested that this gene was highly expressed in various solid tumors such as lung cancer. The survival of lung adenocarcinoma patients with high expression of TROAP gene was significantly shortened. Immunohistochemical staining suggested that the expression of this gene in tumor tissues of lung adenocarcinoma patients [H-Score (Histological Score) = 150.00 (100.00, 180.00)] was significantly higher than that in adjacent normal lung tissues [H-Score = 80.00 (58.75, 125.00)]. This difference had statistical significance ( $P = 2.69 \times 10^{-5}$ ). In addition, the expression of TROAP gene expression was significantly different in disease stages ( $P = 0.039$ ), whether there was distant metastasis ( $P = 0.031$ ) and different Ki-67 expressions ( $P = 0.006$ ). **Conclusion** TROAP may play an important role in the tumorigenesis, development, invasion and metastasis of lung adenocarcinoma. It could be used as a potential biomarker for pathogenesis, treatment and prognosis.

**Key words** lung adenocarcinoma; TROAP; expression; clinicopathological features

态性与肺癌发生密切相关<sup>[6-7]</sup>。近期日本人群研究发现缺氧诱导因子 rs13419896 ( Hypoxia-inducible factor , HIF2A) 与血管内皮生长因子 A rs833061-AA ( vascular endothelial growth factor A , VEGFA) 基因的多态性与肺癌发生风险相关<sup>[8-9]</sup>。由于亚太地区人在生活环境和人群遗传背景具有较高的相似性 , 而上述结果在中国地区的目前无相关证实 , 该研究拟探讨上述肺癌易感位点与我国肺癌发生的相关性。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 样本来源海南汉族人群 , 共纳入肺癌患者 438 例 , 为 2011 年 3 月 ~ 2017 年 7 月间 , 海口市人民医院和海南省人民医院病理检查确诊的肺癌患者 , 456 例对照样本来源于同时期海南地区健康体检中心常规体检人群 , 无呼吸系统疾病及肺癌家族史。

**1.2 流行病学调查** 制定统一流行病学调查量表 , 内容包括: 一般人口学特征、吸烟、饮酒以及既往糖尿病史 , 排除呼吸系统家族史等。吸烟者定义为不吸烟者、既往吸烟者和目前正在吸烟者 , 饮酒者同样定义为不饮酒者、既往饮酒者和正在饮酒者 , 并收集临床病理分型和临床肺癌分期。临床数据整理和分析 , 按照第 8 版肺癌 TNM 分期标准。

**1.3 样本采集** 在获取知情同意 , 并签署知情同意后 , 分别采集肺癌患者和对照组外周静脉血 3 ml , EDTA 抗凝 , -20 °C 冰箱保存。

**1.4 DNA 提取** 采用外周血 DNA 提取试剂盒 ( Axygen Biosciences 公司) 提取人全基因组 DNA , 提取步骤按操作说明书进行 , 提取的 DNA 保存于 -60 °C 冰箱。

**1.5 基因分型** rs13419896 和 rs833061 基因分型应用 Taqman genotyping assays ( applied biosystems , ABI) , HIF2A , rs13419896 , C\_\_31180907\_10 和 VEGFA , rs833061 , C\_\_1647381\_10 基因分型的探针 , 反应的条件如下 2 倍 Taqman genotyping master mix ( ABI) 2.5 μl , 20 SNP genotyping assay mix ( ABI) 0.25 μl。模板 DNA 2.25 μl。PCR 反应条件 95 °C、10 min , 95 °C 变性 15 s , 60 °C 延长 90 s , 共 40 个循环 , 完成后读取荧光信号完成基因分型。

**1.6 统计学处理** 采用 STATA 10.0SE 软件对数据进行统计学分析。配对 *t* 检验比较病例组和对照组间性别、年龄、饮酒及吸烟情况 , Hardy-Weinberg 平衡检验检验对照组样本是否来源于同一个群体;

$\chi^2$  检验比较两组间高危因素情况及不同基因型在两组间的频率分布 , 应用 Logistic 多因素回归分析计算 OR 和 95% CI 以估计不同基因型与肺癌风险之间的相关性 , 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 临床特点** 肺癌病例组平均年龄为 29 ~ 87 ( 55.8 ± 15.1 ) 岁; 对照组平均年龄为 30 ~ 72 ( 48.1 ± 8.07 ) 岁 , 年龄上肺癌病例组年龄较健康对照组大 (  $P < 0.001$  ) , 而肺癌病例组与对照组之间性别无明显差异 (  $P = 0.96$  ) 。通过吸烟和饮酒行分类分析 , 不同肺癌病例组吸烟个体和持续饮酒个体与对照组相比 , 差异有统计学意义 , 具体见表 1。

表 1 病例组和对照组临床特点 [ *n*( % ) ]

临床特点	病例组 ( <i>n</i> = 438 )	对照组 ( <i>n</i> = 456 )	<i>P</i> 值
年龄( 岁 $\bar{x} \pm s$ )	55.8 ± 15.1	48.1 ± 8.07	< 0.001
男性	305( 69.6 )	319( 70.0 )	0.96
吸烟			
从不吸烟	201( 45.9 )	316( 69.3 )	0.000 2
过去吸烟	105( 24.0 )	75( 16.5 )	0.022
现在吸烟	132( 30.1 )	65( 14.3 )	< 0.001
饮酒			
从不饮酒	204( 46.6 )	252( 55.3 )	0.138
过去饮酒	125( 28.5 )	141( 30.9 )	0.566
现在饮酒	109( 24.9 )	63( 13.8 )	0.006
病理类型			
鳞癌	156( 35.6 )		
腺癌	255( 58.2 )		
小细胞肺癌	16( 3.7 )		
非小细胞肺癌	11( 2.5 )		
临床分期			
I a	74( 16.89 )		
I b	13( 2.97 )		
II a	119( 27.17 )		
II b	45( 10.27 )		
III a	86( 19.63 )		
III b	36( 8.22 )		
IV a	49( 11.19 )		
IV b	16( 3.65 )		

**2.2 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验** rs13419896 和 rs833061 成功分型为 98.2% 和 99.0%。通过 Hardy-Weinberg 检验分析对照组是否来源于同一个整体 , rs13419896 (  $\chi^2 = 1.88$  ,  $P = 0.17$  ) 、rs833061 (  $\chi^2 = 0.38$  ,  $P = 0.532$  ) , 差异无统计学意义 , 证明样本的收集来源一个总体。

**2.3 HIF2A 基因 rs13419896 和 VEGFA rs833061 多态性位点与肺癌关联分析** 分析结果显示携带

rs13419896 A 等位基因对比 G 等位基因具有降低肺癌发病风险 [OR = 0.72, 95% CI (0.58 ~ 0.88), P = 0.001 1] 通过对基因型的加性模型、隐性模型和显性模型遗传模型进行分析,发现在加性模型和显性模型中差异有统计学意义,见表 2。进一步分析 rs13419896 基因型与肺癌中病理类型( $\chi^2 = 3.27$ , P = 0.77) 和临床分期( $\chi^2 = 8.88$ , P = 0.18) 无相关性。而 rs833061 位点的等位基因 C 及 T 在肺癌组和对照组的分布情况分析,无统计学差异;对 rs833061 基因型进行三种不同遗传模型分析,亦无统计学差异,见表 2。

**2.4 HIF2A 基因 rs13419896 基因型与肺癌发病相关** 通过对比 rs13419896 基因型、年龄、吸烟、饮酒、2 型糖尿病等在条件回归模型中的影响,结果显示 rs13419896 基因型、吸烟、饮酒和年龄与肺癌相关,见表 3。通过多因素回归分析,调整吸烟、饮酒和年龄的影响,rs13419896 基因型仍可降低肺癌发生率,而回归模型中 2 型糖尿病和性别与肺癌的发病率无明显关联,见表 3,回归分析中 wald 检验值为

156.13。

**2.5 肺癌高危因素肺癌分层分析** 进一步对肺癌高危因素进行分层分析,将以前有吸烟史和现在仍吸烟的定义为吸烟者,同样方法定义饮酒者。分析发现对于不吸烟者,rs13419896 AA 基因型具有保护作用,而在吸烟人群中保护作用不明显;rs13419896 AA 基因型对饮酒者和不饮酒者均有降低肺癌的发生率;对于年龄大于 50 岁的患者,rs13419896 AA 基因型对降低肺癌的发生率较为明显,见表 4。

### 3 讨论

本研究通过对缺氧通路的多态性位点进行验证,发现在中国海南地区 HIF2A 基因 rs13419896 多态性位点与肺癌的发生具有相关性,rs13419896 位点 AA 基因型降低肺癌发生,而同为该位点的等位基因 GG 型增加肺癌的发病风险,但未发现该阳性位点与临床分期和病理类型的关系。

通过对环境因素的分析表明,除吸烟外,饮酒和

表 2 rs13419896 和 rs833061 与肺癌的关联性 [n( % )]

多态性位点	病例组	对照组	$\chi^2$ 值	OR( 95% CI)	P 值
rs13419896					
A	247( 28.5)	326( 36.7)		1	
G	619( 71.5)	586( 64.3)	10.61	0.72( 0.58 ~ 0.88)	0.0011
AA	41( 9.5)	65( 14.2)			
AG	165( 38.1)	196( 43.0)			
GG	227( 52.4)	195( 42.8)			
加性模型			9.97	0.74( 0.61 ~ 0.90)	0.002
显性模型( AA + AG 对比 GG)			8.31	0.68( 0.52 ~ 0.89)	0.004
隐性模型( GG + AG 对比 AA)			0.91	1.14( 0.87 ~ 1.51)	0.320
rs833061					
C	248( 28.8)	262( 30.0)		1	
T	617( 71.2)	624( 70.0)	0.17	0.96( 0.78 ~ 1.19)	0.706
CC	29( 6.7)	36( 8.1)			
CT	191( 44.1)	127( 42.9)			
TT	213( 49.2)	217( 49.0)			
加性模型			0.15	0.96( 0.78 ~ 1.19)	0.70
显性模型( CC + TC 对比 TT)			0.97	1.20( 0.82 ~ 1.74)	0.32
隐性模型( CC 对比 TC + TT)			3.39	0.72( 0.50 ~ 1.04)	0.07

表 3 多因素 Logistic 回归分析肺癌的高危因素

高危因素	回归系数	回归系数标准误	Z 值	OR( 95% CI)	P 值
rs13419896	0.29	0.11	2.66	0.75( 0.60 ~ 0.93)	0.009
吸烟	0.70	0.10	7.25	2.01( 1.67 ~ 2.43)	<0.001
饮酒	0.36	0.10	3.67	1.43( 1.19 ~ 1.74)	<0.001
年龄	0.06	0.01	8.70	1.06( 1.05 ~ 1.07)	<0.001
糖尿病	0.01	0.15	0.06	1.01( 0.76 ~ 1.35)	0.930
性别	0.21	0.17	1.13	0.83( 0.60 ~ 1.15)	0.220

表 4 rs13419896 在吸烟、饮酒和年龄在肺癌组和健康对照组分层分析

危险因素分层	AA	AG	GG	P 值	OR( 95% CI)
吸烟者					
病例组	14( 10.4)	48( 35.6)	73( 54.0)	0.83	1.05( 0.68 ~ 1.62)
对照组	7( 10.8)	24( 36.9)	34( 52.3)		
不吸烟者					
病例组	28( 9.2)	119( 39.3)	156( 51.5)	0.002	0.71( 0.56 ~ 0.88)
对照组	58( 14.8)	172( 44.0)	161( 41.2)		
饮酒者					
病例组	15( 13.4)	40( 35.7)	57( 50.9)	0.025	0.60( 0.39 ~ 0.94)
对照组	10( 15.9)	35( 55.6)	18( 28.5)		
不饮酒者					
病例组	26( 8.0)	125( 38.3)	175( 53.7)	0.007	0.74( 0.59 ~ 0.92)
对照组	55( 14.0)	161( 41.0)	177( 45.0)		
年龄 > 50 岁					
病例组	18( 7.8)	81( 35.4)	130( 56.8)	< 0.001	0.54( 0.40 ~ 0.73)
对照组	30( 18.0)	73( 43.7)	64( 38.3)		
年龄 ≤ 50 岁					
病例组	23( 11.0)	89( 42.6)	97( 46.4)	0.720	0.95( 0.73 ~ 1.24)
对照组	35( 12.1)	123( 42.6)	131( 45.3)		

年龄也是中国海南地区肺癌发生的重要因素。同时对肺癌高危因素进行分层分析表明,对于吸烟患者其 rs13419896-AA 基因型保护作用不明显,而对于不吸烟患者保护作用较为明显,提示吸烟可能降低了 rs13419896-AA 基因型保护作用,rs13419896-AA 保护作用与吸烟与否有密切相关。无论是饮酒患者或者不饮酒肺癌患者 rs13419896-AA 基因型均有保护作用,可能的机制是饮酒不影响 rs13419896-AA 对肺癌发生保护机制,或者饮酒通过其他的通路致肺癌发生,本研究的结果显示饮酒本身仍是增加肺癌发生率的高危因素。

本研究结果与 Yamamoto et al<sup>[8]</sup>对日本九州地区肺癌患者的研究结果相同,rs13419896-AA 可以显著降低肺癌的发生率,而未发现上述研究中 VEGFA 基因 rs833061 与肺癌的相关性,可能与该多态性位在中国人群( C/T: 0.279/0.721) 和日本人( C/T: 0.343/0.656) rs833061 等位基因频率差异有关。不同于 Kim et al<sup>[10]</sup>在广岛地区的研究结果,该研究对 76 例肺癌患者基因型分析,提示 rs13419896-AA 基因型增加肺癌发生率,并且对基因型的生物学功能进行了深入的验证,发现其有一定的相关性。该易感性结果的差异可能来源于研究中肺癌病例样本收集较少,或者样本来源地区的基因频率的差异,因而对在该地区进行独立大样本的验证,显得尤为必要。同时该研究对多态性位点的生物学功能进行分析发现 rs13419896 A 基因型相对于 G 基因型在 A549、PC-9 和 HSC-2 细胞内可以

增加转录活性,rs13419896-AA 基因型与肺癌的临床进展和预后有关。虽然认为肺癌 HIF2A 组织高表达与肿瘤的进展和预后不良相关<sup>[10-11]</sup>。但也有研究指出 HIF 家族基因通过调节不同靶基因的转录活性,发挥促瘤与抗肿瘤的双重作用<sup>[12-13]</sup>。因而该上述结果仍然需要进一步独立的功能分析来证实,同时联系其临床特征来进一步完善对 HIF2A 在肺癌发生的认识。

少部分遗传易感性研究出现结果差异,这些差异主要来源于人群种族和种族内人群分层<sup>[14]</sup>,或者独立研究本身的限制,这种情况使得跨区域的重验证性研究具有重要的应用意义。虽然本研究分析了海南地区 438 例肺癌病人样本和 456 例健康对照人中 rs13419896 与肺癌的关系,但研究结果来源单一中心,仍需要多中心的进一步验证,明确 rs13419896 与肺癌的关系。验证后的结果将为精准医疗和个体化预防,提供一定的理论基础和临床参考。同时 rs13419896 位于 HIF2A 的转录调控区,为后续进一步的功能验证提供便利,也为探索 HIF2A 基因 SNP 位点在缺氧条件下,研究调节下游靶基因的机制提供了可能。

参考文献

[1] Torre L A , Bray F , Siegel R L , et al. Global cancer statistics , 2012 [J]. *CA Cancer J Clin* 2015 65( 2) : 87 - 108.

[2] 陈万青 张思维 邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究 [J]. *中国肺癌杂志* 2010 13( 5) : 488 - 93.

[3] Semenza G L. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral

- hypoxia and oncogenic mutations [J]. *J Clin Invest* ,2013 ,123 (9) : 3664 – 71.
- [4] Harris A L. Hypoxia: a key regulatory factor in tumour growth [J]. *Nat Rev Cancer* 2002 ,2(1) : 38 – 47.
- [5] Chun Y S , Lee K H , Choi E , et al. Phorbol ester stimulates the nonhypoxic induction of a novel hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  isoform [J]. *Cancer Res* 2003 63(24) : 8700 – 7.
- [6] Lind H , Zienolddiny S , Ekstrom P O , et al. Association of a functional polymorphism in the promoter of the MDM2 gene with risk of non small cell lung cancer [J]. *Int J Cancer* 2006 ,119(3) : 718 – 21.
- [7] Kiyohara C , Horiuchi T , Takayama K , et al. Genetic polymorphisms involved in the inflammatory response and lung cancer risk: a case – control study in Japan [J]. *Cytokine* 2014 65(1) : 88 – 94.
- [8] Yamamoto Y , Kiyohara C , Ogata-Suetsugu S , et al. Association between genetic polymorphisms involved in the hypoxia-inducible factor pathway and lung cancer risk: a case-control study in Japan [J]. *Asia Pac J Clin Oncol* ,2017 ,13(3) : 234 – 42.
- [9] Putra A C , Eguchi H , Lee K L et al. The A allele at rs13419896 of EPAS1 is associated with enhanced expression and poor prognosis for non-small cell lung cancer [J]. *PLoS One* ,2015 ,10(8) : e0134496.
- [10] Kim W Y , Perera S , Zhou B , et al. HIF2 $\alpha$  cooperates with RAS to promote lung tumorigenesis in mice [J]. *J Clin Invest* 2009 , 119(8) : 2160 – 70.
- [11] Vaupel P , Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome [J]. *Cancer Metastasis Rev* ,2007 ,26(2) : 225 – 39.
- [12] Mazumdar J , Hickey M M , Pant D K , et al. HIF-2 $\alpha$  deletion promotes Kras-driven lung tumor development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ,107(32) : 14182 – 7.
- [13] Boelens M C , Van Den Berg A , Fehrmann R S , et al. Current smoking-specific gene expression signature in normal bronchial epithelium is enhanced in squamous cell lung cancer [J]. *J Pathol* , 2009 ,218(2) : 182 – 91.
- [14] Freedman M L , Reich D , Penney K L , et al. Assessing the impact of population stratification on genetic association studies [J]. *Nat Genet* ,2004 ,36(4) : 388 – 93.

## Association analysis between genetic polymorphisms in the hypoxia – inducible factor pathway and lung cancer

Yu Weiling<sup>1</sup> , Xiao Sha<sup>2</sup> , Xie Zongzhou<sup>1</sup> , et al

(<sup>1</sup>*Dept of Oncology Haikou City People's Hospital , Haikou 570208;*

<sup>2</sup>*School of Public Health of Hainan Medical University , Haikou 571199 )*

**Abstract Objective** Hypoxia-inducible factor 2A ( HIF2A) and vascular endothelial growth factor A ( VEGFA) are important genes in the hypoxia-inducible pathway , the association of rs13419896 in HIF2A and rs833061 in VEGFA with lung cancer recently becomes the focus. Our study is to demonstrate genetic association rs13419896 and rs833061 with lung cancer in Chinese population. **Methods** A case-control study was performed between 438 patients with lung cancer and 456 healthy controls. The collected samples were genotyped by Taqman Genotyping method , and the association and clinical characteristics were analyzed. **Results** The rs13419896 A allele decreased the risk of lung cancer [OR = 0.72 , 95% CI ( 0.58 ~ 0.88) , P = 0.001 1 ] , comparing to rs13419896 G allele , and further analysis found that rs13419896-AA significantly decreased risk of lung cancer in the additive model [OR = 0.74 , 95% CI ( 0.61 ~ 0.90) , P = 0.002]. After adjustment the effects of smoke , alcohol and age , rs13419896 genotypes still significantly decreased the risk of lung cancer [OR = 0.75 , 95% CI ( 0.60 ~ 0.93) , P = 0.009]. However , the rs13419896 genotypes had no significant relationship with pathological types and clinical stages in lung cancer , and there was no association between lung cancer and rs833061 in VEGFA. **Conclusion** The results show that polymorphism of rs13419896 in HIF2A is associated with lung cancer in Hainan area of China . It can be used as a potential genetic marker for lung cancer after validation by multi-center and large sample studies.

**Key words** hypoxia-inducible factor 2A; vascular endothelial growth factor A; genetic polymorphism; lung cancer