

# 重组人肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导蛋白 3 基因多态性对食管鳞癌预后的影响

王海莉, 巩天晓, 周士霞, 张中冕  
(郑州大学第二附属医院, 河南 郑州 450014)

**摘要:** [目的] 探讨重组人肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 3(TNFAIP3)的多态性位点 6304 A>G 和食管鳞癌预后的相关性。[方法] 纳入 175 例接受完全手术切除的食管鳞癌患者。在手术前收集患者的外周血 5ml 提取基因组 DNA, 采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)的方法对 6304 A>G 位点进行基因分型, 应用 SPSS19.0 软件对该位点基因型和基线临床资料进行相关性分析, 并用 Kaplan-Meier 方法进行该位点和预后的生存分析。[结果] 6304 A>G 位点在研究人群的基因分布频率为: AA 型 133 例 (76.00%), AG 型 39 例 (22.29%), GG 型 3 例 (1.71%), 最小等位基因频率为 0.13, 三种基因型分布频率符合哈迪温伯格平衡 ( $P=0.942$ )。野生型 AA 型相对于 AG/GG 型患者者具有明显较晚的肿瘤分期 ( $P<0.001$ )。AA 型和 AG/GG 型患者的复发比例分别为 71.43% 和 52.38%, 差异有统计学意义 ( $P=0.022$ )。AA 型患者和 AG/GG 型患者的中位总生存期(OS)分别为 36.2 个月和 48.5 个月, 差异有统计学意义 ( $P=0.017$ )。经多变量 Cox 模型校正后该位点对患者 OS 具有独立的影响 ( $OR=0.85, P=0.043$ )。[结论] TNFAIP36304G>A 多态性位点和食管鳞癌患者总生存期显著相关, G 等位基因携带者的预后更好。

**关键词:** 食管鳞癌; 重组人肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 3; 多态性; 预后  
**中图分类号:** R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)04-0325-05  
**doi:** 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.04.B008

## Association of TNFAIP3 Gene Polymorphisms with Prognosis of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma

WANG Hai-li, GONG Tian-xiao, ZHOU Shi-xia, ZHANG Zhong-mian  
(The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the association between TNFAIP3 gene polymorphism and the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma(ESCC). [Methods] One hundred and seventy five patients with ESCC undergoing radical resection were enrolled. Genomic DNA were extracted from peripheral blood samples before the surgery and genotype of TNFAIP3 gene 6304A>G was analyzed by PCR-RFLP. The survival of patients was examined by Kaplan-Meier method and the association between genotypes of TNFAIP3 gene and prognosis of patients were analyzed by SPSS19.0. [Results] The prevalence of TNFAIP3 gene 6304A>G among the study population were as follows: AA genotype in 133 cases (76.00%), AG genotype in 39 cases (22.29%), GG genotype in 3 cases (1.71%), the minor allele frequency of 6304A>G was 0.13. The distribution of three genotypes was in accordance with Hardy-Weinberg Equilibrium ( $P=0.942$ ). Patients with wild genotype AA showed more advanced tumor stages compared to those with AG/GG genotypes ( $P<0.001$ ). The relapse rate of patients with AA genotype and AG/GG genotype were 71.43% and 52.38% respectively ( $P=0.022$ ). The median overall survival(OS) of AA genotype and AG/GG genotype patients were 36.2 months and 48.5 months, respectively ( $P=0.017$ ). Multivariate Cox regression analysis showed that 6304A>G genotype was an independent factor for OS ( $OR=0.85, P=0.043$ ). [Conclusion] The polymorphism 6304A>G of TNFAIP3 gene is associated with overall survival of patients with ESCC, and the G allele carriers may have a better prognosis.

**Subject words:** esophageal squamous carcinoma; TNFAIP3; polymorphism; prognosis

食管癌(esophageal cancer, EC)是世界范围内发

病率较高的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 目前我国每年新发病例 47.7 万, 死亡病例 37.4<sup>[2]</sup>。我国食管癌类型 90% 以上为食管鳞癌(ESCC)<sup>[3]</sup>。ESCC 主要的致死原因是局部复发或远处转移<sup>[1]</sup>。目前, 食管癌的治疗也是一个

**通信作者:** 张中冕, 主任, 主任医师, 硕士; 郑州大学第二附属医院肿瘤科, 河南省郑州市金水区经八路 2 号(450014); E-mail: 13613835778@163.com

**收稿日期:** 2017-12-06; **修回日期:** 2018-03-02

多学科综合治疗的过程。因此,在具体的治疗方案制定之前一个全面的风险评估变得尤为重要。然而,用于食管癌风险评估的分子生物学方面的生物标志物尚处于空白<sup>[4]</sup>。目前,临床上完全的手术切除术后的最小残留病灶通过常规的检测技术尚无法诊断出,这使得对术后 EC 患者的病程监测变得较为困难<sup>[5]</sup>。理想的预后标志物应该是容易检测,目前,符合这样标准的生物标志物的有生殖细胞系突变的多态性<sup>[6]</sup>。

*TNFAIP3* 基因位于染色体 6q23.3,研究表明该基因为各种自身免疫性疾病的风险基因<sup>[7]</sup>。该基因编码了细胞质内的蛋白 A20,在细胞的生长、炎症以及免疫方面发挥重要作用<sup>[8]</sup>。相关研究已经证实,A20 蛋白在淋巴瘤和实体瘤中具有抗肿瘤特性<sup>[9]</sup>。另外,*TNFAIP3* 基因在不同人群中具有较大的个体差异。目前,该基因的多态性在致癌基因领域尚少有较为深入的研究。先前的报道中,*TNFAIP3* 基因的多态性位点 rs610604 为食管癌预后的独立预测因子<sup>[10]</sup>。该基因上另外一个多态性位点 6304A>G 尽管位于内含子区域,但是却发现了它在人体自身免疫性疾病比如类风湿性关节炎患者上显著较低的致病风险<sup>[11]</sup>。本研究旨在探讨 *TNFAIP3* 基因 6304A>G 位点与中国 ESCC 患者基线临床资料以及预后的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

本研究为回顾性分析,入组患者为 2010 年 5 月至 2016 年 5 月在郑州大学第二附属医院普外科及肿瘤科接受食管癌 R0 切除术的食管鳞癌患者 175 例。食管癌病理分期依据 AJCC 分期标准进行 TNM 分期。所有入组患者均签署知情同意书,研究得到了医院伦理委员会的批准。

175 例入组患者,男性 145 例(82.86%),60 岁以下 99 例(56.57%),AJCC III 期 93 例(53.14%);所有患者均为完全食管癌手术切除,切缘无肿瘤残留且无远处器官转移。82 例患者接受了 5-Fu+顺铂的辅助化疗方案(46.86%)。

术后患者的辅助治疗情况如下:辅助化疗开始于术后 3~4 周。27 例(15.43%)患者接受了卡培他滨单药辅助化疗,1000mg/m<sup>2</sup>,每天 2 次,第 1~14d,每

21d 为 1 个周期,4~6 个周期。卡培他滨单药患者的化疗完成情况:平均化疗 4.5 个周期,患者均可耐受,没有发生剂量调整。82 例(46.86%)患者接受了 5-Fu 联合顺铂的辅助化疗方案,5-Fu 800mg/m<sup>2</sup>,静脉滴注 24h,第 1~5d,顺铂 15mg/m<sup>2</sup>,静脉滴注,第 1~5d,每 21d 为 1 个周期,4~6 个周期。5-Fu 联合顺铂的患者的化疗完成情况:平均化疗 3 个周期,化疗过程中 9 例患者(10.98%)因为毒副作用出现剂量调整。66 例(37.71%)患者接受了卡培他滨联合顺铂的辅助化疗方案,卡培他滨,1000mg/m<sup>2</sup>,每天 2 次,第 1~14d,顺铂 60-80mg/m<sup>2</sup>,静脉滴注,第 1d,每 21d 为 1 个周期。卡培他滨联合顺铂的患者的化疗完成情况:平均化疗 4 个周期,化疗过程中 4 例患者(6.06%)因手足综合征出现剂量调整。

本研究从 2010 年 5 月开始入组,符合入组条件的患者在术后接受辅助化疗期间可以按照每个化疗周期定期随访,结束最长 6 个周期辅助化疗之后每半年进行一次电话随访,最后一次随访时间在 2017 年 6 月,中位随访时间为 35 个月(1~72 个月)。随访期间共 19 例患者失访(10.86%),失访的患者的总生存期根据最后一次随访时的时间定为删失数据。总生存期(OS)的计算定义为从开始手术时间到患者因为任何原因出现死亡或最后一次随访结束。无病生存期(DFS)的计算为从开始手术时间至疾病复发或死亡或者最后一次随访结束。

### 1.2 6304G>A 多态性位点基因分型

每例入组患者在手术前收集 5ml 血液标本,用来提取基因组 DNA(苯酚氯仿法)。对于 6304A>G(rs583522)位点的分型采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)的方法进行。上下游引物分别为:5'-GCTTAAAGCCTCCCTTCCTC-3'和 5'-TTCCATCCTGGAAATAACCTG-3'。扩增出 287bp 的 PCR 产物用限制性内切酶 *TaqI* 进行孵育处理。通过不同条带的大小来判断该位点的基因型。AA 型有两条带,一条 46bp,一条 241bp;AG 型有三条带,一条 46bp,一条 241bp,一条 287bp;GG 型有一条带,一条 287bp 带。

### 1.3 数据分析

本研究中所有的变量均采用 SPSS 统计分析软件进行(IBM, Armonk, NY)分析。 $\chi^2$  检验分析多态性位点基因分型是否符合哈迪温伯格平衡。在基线临

床资料当中,离散型的变量和 rs583522 位点不同基因型的分布采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确检验。连续型的变量和 rs583522 位点不同基因型的分析采用非参检验的 Mann-Whitney U (两组间) 或 Kruskal-Wallis H (多组间) 检验。通过绘制 Kaplan-Meier 曲线比较不同基因型患者 OS 差异, 曲线间的差异用对数秩检验进行比较。多变量分析时,对 OS 构建采用 Cox 风险比例模型,用向后 LR 的选择步骤来筛选和校正潜在的混杂变量。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 6304G>A 多态性位点基因分型结果

根据酶切结果判断该位点的基因型结果。6304G>A 多态性位点分型结果如下:GG 型患者 3 例 (1.71%),AG 型患者 39 (22.29%),AA 型患者 133 例 (76.00%),该位点最小等位基因频率为 0.13,三种基因型的分布符合哈迪温伯格平衡 ( $P=0.249$ )。由于 GG 型患者少,为比较方便将 GG 型和 AG 型的合

并为一组。不同基因型患者及基线临床资料如 Table 1 所示。

### 2.2 TNFAIP3 基因 rs583522 位点和基线临床资料的相关性分析

基线临床资料和 rs583522 位点三个基因型的相关性分析如 Table 1 所示,该位点不同基因型和 AJCC 的病理分期相关 ( $P<0.001$ ),携带纯合子型 A 等位基因的患者通常伴随了相对较晚的病理分期,而 AG/GG 基因型的患者的病理分期集中在 I~III 期。而且,淋巴结转移情况和该位点的相关性分析也提示了:该位点 AA 型的患者伴随较多的淋巴结阳性,但差异无统计学意义。共有 117 例患者 (66.86%) 发生复发,且野生型 AA 型患者相对于 G 等位基因携带者具有较高的复发比例 (71.43% vs 52.38%,  $P=0.022$ )。

### 2.3 TNFAIP3 基因 rs583522 位点对临床治疗结果的影响

针对 OS 的单变量分析当中, TNFAIP3 基因 rs583522 位点对 OS 有显著影响 (如 Figure 1), AA 型和 AG/GG 型患者的中位总生存期 (OS) 分别为 36.2 个月和 48.5 个月,差异有统计学意义 ( $P=0.017$ )。另外,为了对该位点对预后的影响进行校正,本研究构建了 Cox 风险比例模型,将可能影响 OS 的风险因素如年龄、性别、淋巴结转移、病理分期以及 rs583522 位点纳入该模型,经过多变量校正,结果显示,病理分期、年龄、淋巴结转移及 rs583522 位点对 OS 具有独立的影响意义 (Table 2)。

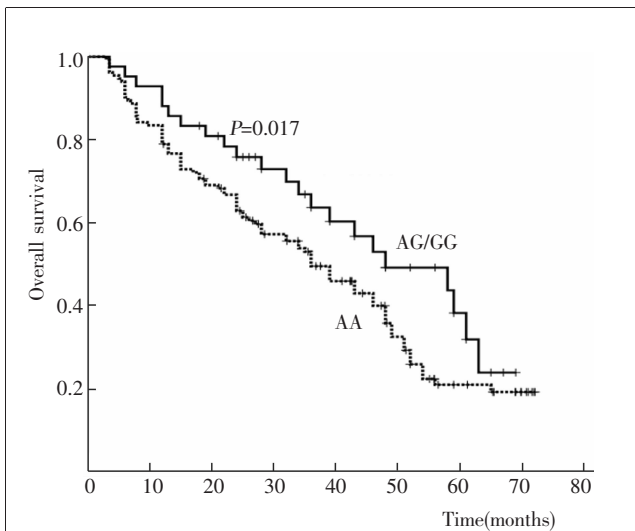
**Table 1 Comparison of baseline characteristics in ESCC patients with different TNFAIP3 rs583522 genotypes**

Characteristics	rs583522 genotypes		$\chi^2$	P
	AG/GG (%)	AA (%)		
Age(years)				
≤60	24 (57.14)	75 (56.39)	0.007	0.932
>60	18 (42.86)	58 (43.61)		
Gender				
Male	34 (82.60)	111 (83.46)	0.141	0.707
Female	8 (17.40)	22 (16.54)		
AJCC stage				
I	9 (21.43)	0 (0)	71.181	<0.001
II	29 (69.05)	25 (18.80)		
III	4 (9.52)	89 (66.92)		
IV a	0 (0)	19 (14.28)		
Lymph node metastasis status				
Negative	13 (30.95)	25 (18.80)	2.774	0.096
Positive	29 (69.05)	108 (81.20)		
Adjuvant chemotherapy				
Fluoropyrimidinesingle drug	6 (14.29)	21 (15.79)	0.189	0.910
5-Fu+Cisplatin	19 (45.24)	63 (47.37)		
Capecitabine+Cisplatin	17(40.47)	49 (36.84)		
Relapse status				
Yes	22 (52.38)	95 (71.43)	5.226	0.022
No	20 (47.62)	38 (28.57)		

Note:staging were based on the sixth edition of AJCC tumor staging system

## 3 讨论

本研究发现了 TNFAIP3 基因 rs583522 位点不同的基因型和淋巴结转移情况,病理分期以及疾病复发显著相关。另外,三种基因型的患者在针对 OS 的单变量分析结果显示,野生型的 AA 基因型患者相对于携带 G 等位基因的 AG 和 GG 基因型患者具有较差的预后,且经过 Cox 风险比例模型校正后显示该位点对 OS 仍具有独立的影响意义。



**Figure 1** The overall survival curve in ESCC patients with different *TNFAIP3* rs583522 genotypes

**Table 2** Univariate and multivariate Cox analysis for the influencing factors of overall survival

Characteristics	Univariate OR (95% CI)	P	Multivariate OR (95% CI)	P
Age(years)				
≤60	1.00	0.006	1.00	0.012
>60	1.82(1.31~2.63)		1.78(1.16~2.68)	
Gender				
Male	1.00	0.853	-	-
Female	0.96(0.67~1.22)		-	
Lymph node metastasis status				
Negative	1.00	0.009	1.00	0.023
Positive	1.57(1.21~2.14)		1.31(1.02~2.03)	
Staging(AJCC 6th)				
I~II	1.00	0.001	1.00	0.007
III~IVa	3.22(1.76~9.12)		2.67(1.55~7.33)	
rs583522 genotype				
AA	1.00	0.017	1.00	0.043
AG/GG	0.69(0.41~1.03)		0.85(0.48~1.14)	

本研究ESCC术后的辅助化疗在两种基因型患者中的分布基本均衡，这样就排除了其他混杂因素的影响，使得患者的预后更能体现ESCC疾病生物学本质。

关于生殖细胞系基因多态性和不同肿瘤易感性的全基因组关联研究目前已经开展很多<sup>[12,13]</sup>。当然，之前的一些相关性研究都是集中在药物代谢和药物作用靶点方面的基因变异和特定药物的副作用方面的研究<sup>[14,15]</sup>。然而，在肿瘤中生殖细胞系基因的多态性和预后的相关性的背后机制目前尚不清楚<sup>[16]</sup>。

本研究结果显示 *TNFAIP3* 基因 rs583522 位点在中国人群当中比较保守，最小等位基因频率只有 0.13, 这和 Pubmed 数据库中的中国人群数据基本一致。本研究和之前 Ghadban 等<sup>[17]</sup>研究成果基本一致，他们的研究纳入了 158 例接受手术切除的食管癌患者，发现 *TNFAIP3* 基因上的 rs583522 位点的 A 等位基因携带者和加高的肿瘤分析以及复发风险相关，与本研究结果基本一致，但是该研究纳入的患者无接受术后辅助化疗人群，与本研究有较大区别。最近的一项关于食管癌血管生成通路的基因多态性和预后的研究证实了，血管生成通路上的基因多态性和仅接受手术治疗的 EC 患者的预后显著性相关，并可用来对食管癌预后进行风险分层<sup>[18]</sup>。而针对 *TNFAIP3* 基因的开展的相关研究也有很多，先前的全基因组关联分析发现在多种炎症相关的疾病，包

括类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮中 *TNFAIP3* 基因上的等位基因具有显著的发病风险<sup>[19]</sup>。当然，大部分生殖细胞系基因的多态性的生物学和功能学的研究目前不多。在乳腺癌的 *FGFR2* 基因多态性的研究表明了这些基因多态性通过改变 OCT1、RUNX2 等转录因子的结合能力而影响了 *FGFR2* 的表达。因此，有可能 *TNFAIP3* 基因的多态性也是通过影响了该基因的表达而使得最终影响了患者的预后。

本研究有一定局限性，首先是尽管血液样本是在手术之前收集，但本研究为回顾性分析研究，这在一定程度上降低了研究的循证医学价值；另外，虽然 rs583522 位于内含子区域，有可能会和该基因上的位于外显子区域的多态性位点呈现较强的连锁不平衡，不过本研究并没有进行全基因组关联研究的分析，所以本研究也没有做关于 *TNFAIP3* 基因表达的实验。本研究探讨的 ESCC 人群的整体 OS 数据和目前的大型 III 期临床研究的数据比较一致，说明纳入样本有一定代表性。在基线临床资料的相关性分析当中，本研究发现 rs583522 位点不同基因型和病理分期、复发风险呈明显相关性，有可能是因为该位点的 AA 基因型通过伴随了较晚的病理分期而影响了患者的长期生存。且在之后构建的 Cox 风险比例模型当中，经过多变量校正后该位点独立的预后影响意义仍然存在，这也说明该位点还在另外一些方面

影响着患者的预后，更深入的研究尚需要进一步的探讨和验证。

总之，本研究结果表明 *TNFAIP3* 基因的多态性位点 rs583522 可能是通过伴随了患者的较晚的病理分期而影响了食管鳞癌患者较差的 OS。研究结果对于 ESCC 患者预后的风险评估具有一定的临床意义。

## 参考文献：

- [1] Naik KB, Liu Y, Goodman M, et al. Concurrent chemoradiotherapy with or without surgery for patients with resectable esophageal cancer: an analysis of the National Cancer Data Base[J]. *Cancer*, 2017, 123(18):3476–3485.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115–132.
- [3] Liang H, Fan JH, Qiao YL. Epidemiology, etiology, and prevention of esophageal squamous cell carcinoma in China[J]. *Cancer Biol Med*, 2017, 14(1):33–41.
- [4] Peerlings J, Van De Voorde L, Mitea C, et al. Hypoxia and hypoxia response-associated molecular markers in esophageal cancer: A systematic review [J]. *Methods*, 2017, 130:51–62.
- [5] Yang Y, Jia J, Sun Z, et al. Prognosis impact of clinical characteristics in patients with inoperable esophageal squamous cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (8): e0182660.
- [6] Chang JS, Hsiao JR, Chen CH. ALDH2 polymorphism and alcohol-related cancers in Asians: a public health perspective[J]. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1):19.
- [7] Shimane K, Kochi Y, Horita T, et al. The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the Japanese population [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(2):574–579.
- [8] Jallades L, Baseggio L, Sujobert P, et al. Exome sequencing identifies recurrent BCOR gene alterations and the absence of KLF2, TNFAIP3 and MYD88 mutations in splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma [J]. *Haematologica*, 2017, 102(10):1758–1766.
- [9] Osako M, Itsumi M, Yamaguchi H, et al. A20 restores phorbol ester-induced differentiation of THP-1 cells in the absence of nuclear factor-kappaB activation[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 119(2):1475–1487.
- [10] Ghadban T, Schmidt-Yang M, Uzunoglu FG, et al. An A/C germline single-nucleotide polymorphism in the TNFAIP3 gene is associated with advanced disease stage and survival in only surgically treated esophageal cancer [J]. *J Hum Genet*, 2014, 59(12):661–666.
- [11] Plant D, Prajapati R, Hyrich KL, et al. Replication of association of the PTPRC gene with response to anti-tumor necrosis factor therapy in a large UK cohort [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(3):665–670.
- [12] Takahashi Y, Sugimachi K, Yamamoto K, et al. Japanese genome-wide association study identifies a significant colorectal cancer susceptibility locus at chromosome 10p14 [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(11):2239–2247.
- [13] Tang H, Wei P, Chang P, et al. Genetic polymorphisms associated with pancreatic cancer survival: a genome-wide association study[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(4):678–686.
- [14] Foti A, Dorendorf F, Leimkuhler S. A single nucleotide polymorphism causes enhanced radical oxygen species production by human aldehyde oxidase [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7):e0182061.
- [15] Zhang X, Yin JF, Zhang J, et al. UGT1A1\*6 polymorphisms are correlated with irinotecan-induced neutropenia: a systematic review and meta-analysis [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 80(1):135–149.
- [16] Lou J, Lin NM, Wang G, et al. Study on the genomics of nucleoside transporters of gemcitabine[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2016, 21(5):586–594. [楼江, 林能明, 王刚, 等. 吉西他滨的核苷酸转运体基因组学研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2016, 21(5):586–594.]
- [17] Ghadban T, Schmidt-Yang M, Uzunoglu FG, et al. Evaluation of the germline single nucleotide polymorphism rs583522 in the TNFAIP3 gene as a prognostic marker in esophageal cancer[J]. *Cancer Genet*, 2015, 208(12):595–601.
- [18] Lurje G, Leers JM, Pohl A, et al. Genetic variations in angiogenesis pathway genes predict tumor recurrence in localized adenocarcinoma of the esophagus [J]. *Ann Surg*, 2010, 251(5):857–864.
- [19] Adrianto I, Wen F, Templeton A, et al. Association of a functional variant downstream of TNFAIP3 with systemic lupus erythematosus[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(3):253–258.