

· 临床研究 ·

IL-10基因启动子区单核苷酸多态性和吸烟交互作用与膀胱癌的关联研究

陈占国 周武 戴美洁 武志刚 金嵘

【摘要】 目的 探讨IL-10基因启动子区单核苷酸多态性和吸烟的交互作用与膀胱癌的关系。**方法** 以医院资料为基础,采用病例对照研究方法,应用AS-PCR法对400例膀胱癌病例和400例健康对照者进行IL-10基因启动子区单核苷酸多态性检测和分析,探讨膀胱癌的遗传和环境因素。**结果** IL-10基因启动子区单核苷酸多态性与膀胱癌易感性相关,-1082、-819及-592位点的纯合突变型可能增加膀胱癌发病风险(OR 值分别为2.058、1.979及1.979);IL-10基因启动子区单核苷酸多态性在膀胱癌不同临床分期和病理分级间差异无统计学意义(均 $P>0.05$);IL-10基因启动子区-1082A/A、-819T/T和-592A/A与吸烟均存在正向交互作用($OR=2.264$, $\gamma=10.213$; $OR=2.438$, $\gamma=6.750$; $OR=2.438$, $\gamma=6.750$)。**结论** IL-10基因启动子区-1082A/A、-819T/T和-592A/A与吸烟的交互作用可能增加膀胱癌的发病风险。

【关键词】 膀胱癌;白介素10;多态性;吸烟

Association between the interaction polymorphisms of interleukin-10 and smoking on patients with bladder cancer risk from a case-control study CHEN Zhan-guo¹, ZHOU Wu¹, DAI Mei-jie¹, WU Zhi-gang², JIN Rong³. 1 The Centre for Laboratory Diagnosis, 2 Department of Urology, 3 Department of Epidemiology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

Corresponding author: JIN Rong, Email: jinrongjrjr@163.com

This work was supported by grants from the National Science Foundation of Zhejiang (No. Y12H200010) and the Foundation of Wenzhou Science and Technology Bureau (No. Y20090280).

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between both polymorphisms of interleukin-10 (IL-10), smoking and the susceptibility to bladder cancer. **Methods** A case-control study was conducted to study the promoter polymorphisms of IL-10 gene by allele specific PCR amplification (AS-PCR) and to explore the possible genetic and environmental factors on bladder cancer, based on data from a hospital which included 400 patients with bladder cancer and another 400 healthy controls. **Results** The genotypes of IL-10 gene might be associated with the susceptibility to bladder cancer. Homozygous mutant of IL-10 gene at the point of 1082, 819 and 592 could enhance the risk of bladder cancer (OR value is 2.058, 1.979, 1.979, respectively). No statistically significant correlation was found between the divergence of IL-10 genotype and the different clinical stages and pathological grade of bladder cancer ($P>0.05$). Interactions were noticed between polymorphisms in IL-10 gene and their correlation with smoking on bladder cancer. The positive interaction of 1082 site homozygous variant (AA), 819 site homozygous variant (TT), 592 site homozygous variant (AA) and smoking were revealed in the occurrence rates of bladder cancer ($OR=2.264$, $\gamma=10.213$; $OR=2.438$, $\gamma=6.750$; $OR=2.438$, $\gamma=6.750$). **Conclusion** Our research findings showed that the significant interactions between IL-10 gene with homozygous mutant and smoking might increase the risk of bladder cancer.

【Key words】 Bladder neoplasia; Interleukin 10; Polymorphism; Smoking

膀胱癌是我国常见的泌尿系统恶性肿瘤,吸烟

与膀胱癌明显相关,是膀胱癌发生的危险因素。白介素10(IL-10)是多种免疫抑制及刺激功能的重要免疫调节因子,可能参与膀胱癌的发病过程,IL-10基因启动子区基因多态性可能与膀胱癌遗传易感性有关^[1-4],但IL-10基因启动子区单核苷酸多态性与吸烟交互作用对膀胱癌是否存在影响尚不太清

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.02.018

基金项目:浙江省自然科学基金资助(Y12H200010);温州市科技局资助(Y20090280)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院实验诊断中心(陈占国、周武、戴美洁),泌尿外科(武志刚),流行病学教研室(金嵘)

通信作者:金嵘, Email: jinrongjrjr@163.com

楚。本研究以医院资料为基础,采用病例对照研究,分析中国浙江地区汉族人群 IL-10 基因启动子区单核苷酸多态性和吸烟交互作用与膀胱癌危险性的关系。

对象与方法

1. 研究对象:2009 年 1 月至 2011 年 3 月在温州医学院附属第一医院泌尿外科住院的 400 例患者作为病例组,平均年龄(63.1 ± 10.2)岁,均为初次发病,采血前未经化疗、放疗,术后病理诊断为膀胱移行细胞癌,其中临床分期为浅表性(Ta 期至 T1 期)278 例和浸润性(T2 期至 T4 期)122 例;病理分级为高分化(G1)192 例、中分化(G2)158 例及低分化(G3)50 例。按照性别相同和年龄(± 5 岁)与病例组 1:1 匹配的原则选择 400 例同期健康体检者作为对照组,平均年龄(62.9 ± 9.5)岁,要求无职业性暴露史(即没有从事芳香胺、染料、橡胶、铝、皮革生产等)、无慢性疾病、无泌尿系统疾病、无恶性肿瘤家族史,排除膀胱肿瘤及其他部位恶性肿瘤。所有研究对象均为浙江地区汉族人群,彼此之间无血缘关系,均签署知情同意书,本研究得到本院伦理委员会同意。

2. 流行病学调查:调查员经培训合格,以面对面的方式完成调查,内容包括性别、年龄、职业、文化程度、疾病史、吸烟史和饮酒情况等,其中吸烟定义为每天吸烟 1 支及以上,时间超过 6 个月或戒烟小于 1 年。调查完成后采集静脉血 2 ml(EDTA-K2 抗凝),置 -70°C 冰箱保存,1 个月内完成 DNA 提取。

3. DNA 提取:应用血液基因组 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA,严格按试剂盒说明书操作。紫外分光光度仪用于 DNA 定量,用洗脱液将 DNA 溶液稀释至 $20\text{ ng}/\mu\text{l}$, -20°C 保存。

4. IL-10 基因多态性:①基因扩增:IL-10 基因-1082G/A 位点和-819C/T 位点引物序列及扩增条件参见文献[5],PCR 反应体系 $25.0\text{ }\mu\text{l}$,含模板 $1\text{ }\mu\text{l}$, $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 $0.75\text{ }\mu\text{l}$, $2 \times \text{PCR Master Mix}$ (购自北京天根生化科技有限公司) $12.5\text{ }\mu\text{l}$ 和去离子水 $10\text{ }\mu\text{l}$ 。②结果判断:PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳确认基因型。-592C/A 位点直接通过推算得到,由于-592C/A 位点与-819C/T 位点存在连锁不平衡,当-819 等位基因是 C 时,-592 的等位基因也是 C;-819 等位基因是 T 时,-592 的等位基因是 A。③质量控制:所提取的标本均进行内参基因验证有效性,每次 PCR 均设立对照;为提高 AS-PCR 方法可靠性,抽取 10% 盲样进行测序验证,测序由上海桑尼

公司完成,测序结果与 AS-PCR 检测的一致率为 100%。

5. 统计学分析:应用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, χ^2 检验用于分析 Hardy-Weinberg 遗传平衡,以及性别、年龄、吸烟、饮酒、职业及文化程度在组间的分布差异。条件 logistic 回归模型分析吸烟与基因型的交互作用。根据 Khoury 和 Wagener^[6]提出的交互作用模型和交互系数($\gamma = \beta_{\text{eg}}/\beta_e$)判断基因-环境交互作用模型以及交互作用类型。判断依据 1: $\gamma > 1$ 为正向交互作用, $\gamma < 1$ 为负向交互作用, $\gamma = 1$ 为无交互作用。判断依据 2: $OR_{\text{eg}} = OR_e \times OR_g$ 为相乘模型; $OR_{\text{eg}} > OR_e \times OR_g$ 为超相乘模型; $OR_{\text{eg}} < OR_e \times OR_g$ 为次相乘模型; $OR_{\text{eg}} = OR_e + OR_g - 1$ 为相加模型。所有统计采用双侧概率检验($\alpha = 0.05$),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 基本特征:研究对象基本特征见表 1。病例组和对照组在性别、年龄、吸烟、饮酒、职业及文化程度等分布差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 研究对象基本特征

特征	对照组		病例组		χ^2 值	P 值
	例数	构成比 (%)	例数	构成比 (%)		
性别					0.030	0.862
男	316	79.0	318	79.5		
女	84	21.0	82	20.5		
年龄(岁)					1.067	0.302
<60	150	37.5	136	34.0		
≥ 60	250	62.5	264	66.0		
吸烟					0.181	0.670
是	180	45.0	186	46.5		
否	220	55.0	214	53.5		
饮酒					0.103	0.749
是	108	27.0	104	26.0		
否	292	73.0	296	74.0		
职业					1.270	0.260
农民	260	65.0	275	68.7		
非农民	140	35.0	125	31.3		
文化程度					1.302	0.292
小学及以下	312	78.0	325	81.2		
初中及以上	88	22.0	75	18.8		
临床分期						
浅表性			278	69.5		
浸润性			122	30.5		
病理分级						
G1			192	48.0		
G2			158	39.5		
G3			50	12.5		

2. IL-10 基因启动子区单核苷酸多态性与膀胱癌易感性: 对照组和病例组的 IL-10 基因启动子区 3 个位点 -1082G/A、-819C/T、-592C/A 的基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡。经条件 logistic 回归分析, 携带 -1082 位点 AA 基因型是携带 GG+GA 基因型者患膀胱癌风险的 2.058 倍 ($OR=2.058$, $95\%CI: 1.254 \sim 3.382$); 携带 -819 位点 TT 型患膀胱癌的风险是携带 CC 型者的 1.979 倍 ($OR=1.979$, $95\%CI: 1.063 \sim 3.676$) ($P<0.05$); 携带 -819 位点 CT 型与 CC 型者差异无统计学意义 ($P>0.05$)。-592 位点 AA 型的个体患膀胱癌的危险性是 CC 型的 1.979 倍 ($OR=1.979$, $95\%CI: 1.063 \sim 3.676$) ($P<0.05$), 携带 -592 位点 CA 型与 CC 型差异者无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 2。

表 2 IL-10 基因启动子区单核苷酸多态性与膀胱癌的易感性

基因型	病例组	对照组	χ^2 值	OR^a 值	95%CI	P 值
-1082G/A						
GG	1(0.25)	2(0.5)	-	-	-	-
GA	25(6.25)	48(12.0)	-	-	-	-
GG+GA ^a	26(6.5)	50(12.5)	-	1.000	-	-
AA	374(93.5)	350(87.5)	8.385	2.058	1.254 ~ 3.382	<0.05
-819C/T						
CC	42(10.5)	64(16.0)	-	1.000	-	-
CT	140(35.0)	168(42.0)	0.464	1.272	0.672 ~ 2.399	>0.05
TT	218(54.5)	168(42.0)	4.743	1.979	1.063 ~ 3.676	<0.05
-592C/A						
CC	42(10.5)	64(16.0)	-	1.000	-	-
CA	140(35.0)	168(42.0)	0.464	1.272	0.672 ~ 2.399	>0.05
AA	218(54.5)	168(42.0)	4.743	1.979	1.063 ~ 3.676	<0.05

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为构成比(%); ^a调整了性别、年龄、吸烟、饮酒、职业和文化程度; ^b-1082 位点因 GG 型例数较少, 故将 GG 型和 GA 型合并

3. IL-10 启动子区单核苷酸多态性与膀胱癌临床分期及病理分级关系: IL-10 启动子区 3 个位点 (-1082、-819 和 -592 位点) 基因型与临床分期和病理分化程度 (G1 归为低风险组, G2 和 G3 归为高风险组) 差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3。

4. IL-10 基因启动子区单核苷酸多态性和吸烟的交互作用与膀胱癌的关系: 携带 -1082 位点 GA+GG 基因型者吸烟的 OR_c 为 1.083 ($95\%CI: 0.405 \sim 2.831$); 单独携带 -1082 位点 AA 型的 OR_g 为 2.042 ($95\%CI: 0.934 \sim 4.469$), 两者同时存在时, 交互作用 OR_{cg} 值为 2.264 ($95\%CI: 1.031 \sim 4.987$), γ 值为 $10.213>1$, $OR_{cg}(2.264)>OR_c(1.083)\times OR_g(2.042)$ 。携带 -819 位点 TT 型同时吸烟的交互作用 OR_{cg} 值为 2.438 ($95\%CI: 1.320 \sim 4.498$), γ 值为 $6.750>1$, $OR_{cg}(2.438)>OR_c(1.141)\times OR_g(1.789)$ 。携带 -592 位点 AA 型同时吸烟的交互作用 OR_{cg} 值为 2.438 ($95\%CI: 1.320 \sim 4.498$), γ 值为 $6.750>1$, $OR_{cg}(2.438)>OR_c(1.141)\times OR_g(1.789)$, 见表 4。

讨 论

膀胱癌发生是遗传因素和环境因素共同作用的结果。吸烟是导致膀胱癌的重要因素, 吸烟者膀胱癌的发病概率是非吸烟者的 1.89 倍^[7], 然而并非所有吸烟个体都发生膀胱癌, 这可能与致癌物在体内的代谢及个体遗传易感性的差异有关。IL-10 能明显抑制肿瘤的发生, 可能的机制是 IL-10 通过自身分泌途径直接作用于肿瘤细胞, 或作用于肿瘤血管生成和营养供应系统而影响肿瘤与机体的关系, 也可调节机体对肿瘤的免疫应答, 从而影响肿瘤的转归。研究表明, IL-10 可能参与膀胱癌的发生和发

表 3 IL-10 启动子区单核苷酸多态性与膀胱癌临床分期及临床病理分级关系

基因型	临床分期						临床病理分级					
	浅表性 (n=278)	浸润性 (n=122)	χ^2 值	OR^a 值	95%CI	P 值	低风险 (n=192)	高风险 (n=208)	χ^2 值	OR^a 值	95%CI	P 值
-1082G/A												
GG+GA ^a	16(5.8)	10(8.2)	-	1.000	-	-	12(6.3)	14(6.7)	-	1.000	-	-
AA	262(94.2)	112(91.8)	0.842	1.465	0.654 ~ 3.322	>0.05	180(93.7)	194(93.3)	0.039	0.925	0.416 ~ 2.051	>0.05
-819C/T												
CC	24(8.6)	18(14.7)	-	1.000	-	-	19(9.9)	23(11.1)	-	1.000	-	-
CT	100(36.0)	40(32.8)	1.528	0.536	0.194 ~ 1.468	>0.05	64(33.3)	76(36.5)	0.031	0.982	0.492 ~ 1.962	>0.05
TT	154(55.4)	64(52.5)	1.488	0.556	0.215 ~ 1.449	>0.05	109(56.8)	109(52.4)	0.321	0.827	0.427 ~ 1.605	>0.05
CT+TT	254(91.4)	104(85.3)	1.697	0.549	0.219 ~ 1.377	>0.05	173(90.1)	185(88.9)	0.145	0.885	0.465 ~ 1.681	>0.05
-592C/A												
CC	24(8.6)	18(14.7)	-	1.000	-	-	19(9.9)	23(11.1)	-	1.000	-	-
CT	100(36.0)	40(32.8)	1.528	0.536	0.194 ~ 1.468	>0.05	64(33.3)	76(36.5)	0.031	0.982	0.492 ~ 1.962	>0.05
TT	154(55.4)	64(52.5)	1.488	0.556	0.215 ~ 1.449	>0.05	109(56.8)	109(52.4)	0.321	0.827	0.427 ~ 1.605	>0.05
CT+TT	254(91.4)	104(85.3)	1.697	0.549	0.219 ~ 1.377	>0.05	173(90.1)	185(88.9)	0.145	0.885	0.465 ~ 1.681	>0.05

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为构成比(%); ^a调整了性别、年龄、吸烟、饮酒、职业和文化程度; ^b-1082 位点因 GG 型例数较少, 故将 GG 型和 GA 型合并

表4 IL-10启动子区单核苷酸多态性与吸烟的交互作用

基因型	吸烟	膀胱癌组	对照组	OR值 ^a	95%CI	β 值	β_{se} 值	γ 值
-1082G/A								
GA+GG ^b	无	10(4.7)	20(9.1)	1.000	-	-	-	-
AA	无	204(95.3)	200(90.9)	2.042 ^c	0.934 ~ 4.469	-	-	-
GA+GG ^b	有	16(8.6)	30(16.7)	1.083 ^d	0.405 ~ 2.831	0.080	-	-
AA	有	170(91.4)	150(83.3)	2.264 ^c	1.031 ~ 4.987	-	0.817	10.213
-819C/T								
CC	无	21(5.25)	34(8.5)	1.000	-	-	-	-
CT	无	80(20.0)	99(24.8)	1.311	0.706 ~ 2.433	-	-	-
TT	无	96(24.0)	87(21.7)	1.789 ^c	0.963 ~ 3.312	-	-	-
CC	有	21(5.25)	30(7.5)	1.141 ^d	0.520 ~ 2.485	0.132	-	-
CT	有	60(15.0)	69(17.3)	1.409	0.740 ~ 2.686	-	0.343	-
TT	有	122(30.5)	81(20.2)	2.438 ^c	1.320 ~ 4.498	-	0.891	6.750
-592C/A								
CC	无	21(5.25)	34(8.5)	1.000	-	-	-	-
CA	无	80(20.0)	99(24.8)	1.311	0.706 ~ 2.433	-	-	-
AA	无	96(24.0)	87(21.7)	1.789 ^c	0.963 ~ 3.312	-	-	-
CC	有	21(5.25)	30(7.5)	1.141 ^d	0.520 ~ 2.485	0.132	-	-
CA	有	60(15.0)	69(17.3)	1.409	0.740 ~ 2.686	-	0.343	-
AA	有	122(30.5)	81(20.2)	2.438 ^c	1.320 ~ 4.498	-	0.891	6.750

注:^a调整了性别、年龄、饮酒、职业和文化程度;^b-1082位点因GG型例数较少,故将GG型和GA型合并;^c单独纯合突变型暴露的OR值(OR_e);^d单独吸烟暴露的OR值(OR_s);^e吸烟与纯合突变交互后的OR值(OR_{se})

展, IL-10 基因在启动子区存在 3 个 SNP 位点 (即-1082G/A、-819C/T 和-592C/A), 其单核苷酸多态性和膀胱癌遗传易感性相关^[4]。血清 IL-10 表达与 IL-10 启动子区域的基因型密切相关, 其基因多态性可能与膀胱癌遗传易感性有关。

Ahirwar 等^[4]发现, 携带-1082 位点突变杂合型 GA 和突变纯合型 AA 的个体, 其膀胱癌风险增高了 1.91 倍和 2.01 倍, 携带-819 位点突变杂合型 CT 和突变纯合型 TT 的个体, 其膀胱癌风险增高了 1.75 倍和 1.81 倍。考虑到吸烟是膀胱癌致病危险因素, 本研究采用交互作用的模型理论, 探讨 IL-10 基因启动子区单核苷酸多态性和吸烟的交互作用与膀胱癌的关系。结果显示, 浙江地区汉族人群携带-1082 位点 AA 基因型、-819 位点 TT 基因型、-592 位点 AA 基因型增加了膀胱癌的发病风险 (OR 值分别为 2.058、1.979 和 1.979)。这与 Ahirwar 等^[4]研究结果基本一致, 不同之处在于中国浙江地区汉族人群 IL-10 基因型杂合突变型也可增加发病风险, 但差异无统计学意义。通过 IL-10 基因启动子区单核苷酸多态性与吸烟的交互作用, -1082AA、-892TT 和-592AA 与吸烟均存在正向交互作用, 且为超相乘模型。以上结果提示, 在 IL-10 基因启动子

区-1082、-819 和-592 位点, 纯合突变型可能比杂合突变型更能影响 IL-10 水平, 导致低 IL-10 水平, 进而容易诱发膀胱癌的发生。在吸烟危险因素的交互作用下, 携带 IL-10 基因纯合突变型具有更高的膀胱癌发病风险。膀胱癌是多基因遗传因素和环境因素共同作用的结果, 单个突变位点或杂合突变基因型对其危险性可能并不明显, 但是纯合突变基因型与环境因素共同作用后有可能大大提高膀胱癌患病风险。

由于本研究是基于医院的病例对照研究, 可能存在样本选择偏倚, 此外, 不同基因之间、多个基因与环境危险因素之间的交互作用也有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] Luo Y, Han R, Evanoff DP, et al. Interleukin-10 inhibits mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells. Clin Exp Immunol, 2010, 160(3): 359-368.

[2] Dufresne M, Dumas G, Asselin E, et al. Pro-inflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages differentially modulate cell survival and invasion of human bladder carcinoma T24 cells. Mol Immunol, 2011, 48(12-13): 1556-1567.

[3] Loskog A, Ninalga C, Paul-Wetterberg G, et al. Human bladder carcinoma is dominated by T-regulatory cells and Th1 inhibitory cytokines. J Urol, 2007, 177(1): 353-358.

[4] Ahirwar D, Mandhani A, Mittal RD. Interleukin-10 G-1082A and C-819T polymorphisms as possible molecular markers of urothelial bladder cancer. Arch Med Res, 2009, 40(2): 97-102.

[5] Perrey C, Turner SJ, Pravica V, et al. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms. Transpl Immunol, 1999, 7(2): 127-128.

[6] Khoury MJ, Wagener DK. Epidemiological evaluation of the use of genetics to improve the predictive value of disease risk factors. Am J Hum Genet, 1995, 56(4): 835-844.

[7] Dai QS, He HC, Cai C, et al. Multicenter case-control study of the relationship between smoking and bladder cancer in China. Natl Med J Chin, 2011, 91(34): 2407-2410. (in Chinese)

戴奇山, 何慧婵, 蔡超, 等. 吸烟与中国人膀胱癌相关性的多中心病例对照研究. 中华医学杂志, 2011, 91(34): 2407-2410.

(收稿日期: 2012-08-03)

(本文编辑: 卢亮平)