

吸烟及烟碱型乙酰胆碱受体亚单位 $\alpha 5$ 基因rs17486278位点多态性对肺癌的交互作用

李琴 江梅 赵劭娟 吴晓瑛 周珊宇 刘涛 王辉 张亚雷 陈维清

【摘要】 目的 探讨在中国男性人群中吸烟、烟碱型乙酰胆碱受体亚单位 $\alpha 5$ (*CHRNA5*) 基因多态性与肺癌的关联及其交互作用。方法 采用成组病例对照研究设计, 收集男性原发性肺癌病例204例, 正常健康对照者821例。采用结构化问卷调查社会人口学特征、吸烟行为及健康状况等, 采集静脉血检测 *CHRNA5* SNP 位点rs17486278的多态性。应用多因素 logistic 回归模型分析吸烟、*CHRNA5* 的基因多态性与肺癌的关系及其交互作用。结果 控制潜在混杂因素后, 每天吸烟量>15支者发生肺癌的风险高于不吸烟者 ($OR=3.49, 95\%CI: 2.29 \sim 5.32$), 未发现 *CHRNA5* 上的rs17486278多态性与肺癌有统计学关联。进一步交互作用分析显示, 每天吸烟量1~15支并携带rs17486278 纯合变异基因型(CC)者对肺癌的发生存在正交互作用 ($OR=16.13, 95\%CI: 1.27 \sim 205.33$)。根据rs17486278多态性和吸烟行为进行分层分析, 与不吸烟并携带rs17486278 野生基因型(AA)者相比, 每天吸烟量1~15支并携带纯合变异基因型(CC)者、每天吸烟量>15支并携带野生基因型(AA)者和每天吸烟量>15支并携带杂合变异基因型(AC)者发生肺癌风险增高, OR 值分别为8.14 ($95\%CI: 1.17 \sim 56.56$)、3.84 ($95\%CI: 1.30 \sim 11.40$) 和5.32 ($95\%CI: 1.78 \sim 15.93$)。结论 在中国男性人群中 *CHRNA5* 的基因多态性与吸烟行为对肺癌的发生存在正交互作用。

【关键词】 吸烟; 烟碱型乙酰胆碱受体亚单位 $\alpha 5$ 基因; 基因多态性; 肺癌

Interaction between smoking and nicotine acetylcholine receptor subunits alpha 5 gene rs17486278 polymorphisms on lung cancer Li Qin¹, Jiang Mei^{1,2}, Zhao Shaojuan¹, Wu Xiaoying¹, Zhou Shanyu¹, Liu Tao¹, Wang Hui¹, Zhang Yale³, Chen Weiqing¹. 1 Department of Medical Statistics and Epidemiology, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2 The Institute of Respiratory Disease, 3 Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University

Corresponding author: Chen Weiqing, Email: chenwq@mail.sysu.edu.cn

This work was supported by a grant from Science and Technology Plan Projects of Guangdong Province (No. 2011B061300111).

【Abstract】 **Objective** To investigate the association and interaction between smoking and the nicotine acetylcholine receptor subunits alpha 5 (*CHRNA5*) gene polymorphisms on lung cancer in Chinese men. **Methods** A case-control study was employed with a total of 204 male lung cancer patients and 821 healthy control subjects enrolled in the study. All the subjects were interviewed under a structured questionnaire with the contents on socio-demographic status and smoking behavior. Venous blood samples were collected to measure single nucleotide polymorphism of rs17486278 in *CHRNA5*. A series of multivariate logistic regression models were performed to assess the association and interaction between smoking and the *CHRNA5* gene polymorphisms on lung cancer. **Results** After controlling for potential confounding factors, data from the multivariate logistic regression analysis showed that individuals with smoking >15 cigarettes per day would significantly increase the risk of lung cancer when compared to the non-smokers ($OR=3.49, 95\%CI: 2.29-5.32$). However, no associations between *CHRNA5* rs17486278 polymorphisms and lung cancer were found. Furthermore, those who smoked 1-15 cigarettes per day had a positive interactive effect between rs17486278 CC genotype and lung cancer ($OR=16.13, 95\%CI: 1.27-205.33$). Results from further

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.01.016

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B061300111)

作者单位: 510080 广州, 中山大学公共卫生学院医学统计与流行病学系(李琴、江梅、赵劭娟、吴晓瑛、周珊宇、刘涛、王辉、陈维清); 广州医科大学第一附属医院呼吸疾病研究所(江梅), 胸外科(张亚雷)

通信作者: 陈维清, Email: chenwq@mail.sysu.edu.cn

stratified analysis on smoking behaviors and rs17486278 genotypes indicated that when compared with non-smokers on rs17486278 AA genotype, those individuals who smoked 1–15 cigarettes per day with rs17486278 CC genotype, individuals smoking >15 cigarettes per day with AA genotype and individuals smoking >15 cigarettes per day with AC genotype, all had a higher risk of developing lung cancer, with their *OR* value as 8.14 (95% *CI*: 1.17–56.56), 3.84 (95% *CI*: 1.30–11.40) and 5.32 (95% *CI*: 1.78–15.93), respectively. **Conclusion** There was an interaction between smoking and *CHRNA5* gene polymorphism on lung cancer.

【Key words】 Smoking; Nicotine acetylcholine receptor subunits alpha 5; Gene polymorphism; Lung cancer

2008年在欧洲人群中进行的3个全基因组关联研究(GWAS)发现位于15q25上烟碱型乙酰胆碱受体亚单位 $\alpha 5-\alpha 4-\beta 4$ (*CHRNA5-A3-B4*)基因簇上的rs1051730、rs8034191和rs16969968等单核苷酸多态性(SNP)与肺癌发生有关,此后多项研究显示,*CHRNA5-A3-B4*基因多态性与肺癌相关^[1-3]。在美籍非洲人群中的研究显示,位于*CHRNA5* rs17486278的SNP与肺癌发生有关^[4],但在中国不吸烟人群中并未发现这种联系^[5],本研究对中国男性人群中该基因位点多态性及吸烟对肺癌的发生有无交互作用进行探讨。

对象与方法

1. 研究对象:病例组为2013年5—10月在广州医科大学第一附属医院接受治疗的男性原发性肺癌患者。病例入选标准:①病理组织学确诊为原发性支气管肺癌;②单一肺癌,未合并其他肿瘤;③无肺癌家族史;④无职业性致癌因素接触史。肺癌诊断根据细胞学或病理组织学进行确证,参照WHO肺癌组织学分型标准分为鳞癌、大细胞癌、小细胞癌、腺癌、腺鳞癌及其他^[6]。对照组来源于2006年7月至2007年6月在广州市和珠海市斗门区开展慢性病流行病学调查中的健康人群。对照人群纳入标准:①男性,无慢性非传染性疾病史;②与病例无血缘关系;③无肺癌等肿瘤家族史;④无职业性致癌因素接触史。本研究共收集肺癌患者204例,对照组821例。本研究得到中山大学伦理委员会的批准,调查对象均签署知情同意书。

2. 研究方法:

(1)问卷调查:采用结构式问卷,由经过培训的医科大学学生对调查对象进行面对面调查,内容包括一般情况、吸烟史(一生之中最少吸过20包烟,或者每天至少吸1支烟,持续超过1年^[7])和其他健康相关行为等信息。利用医院的病例管理系统搜集肺癌患者的病理分型和分期等情况。

(2)*CHRNA5*的rs17486278多态性检测:抽取研究对象早晨空腹静脉血2 ml,采用宝生物工程

(大连)有限公司的血液基因组DNA提取试剂盒提取全血中的DNA。根据相关文献及HapMap数据库^[8-9],本研究选择位于*CHRNA5*基因上的SNP位点rs17486278进行检测,由上海天昊生物科技有限公司完成,采用SNapShot分型技术(基于荧光标记单碱基延伸原理的分型技术)进行SNP检测,分型为纯合野生型(AA)、杂合变异型(AC)、纯合变异型(CC)。所有检测样本在完成第一次检测后随即抽取5%样本进行重测,一致性接近100%。

3. 统计学分析:分类变量采用构成比表示。采用 χ^2 检验分析病例组和对照组之间一般人口学特征、吸烟史、基因型等差别。在控制年龄、文化程度、职业、婚姻状况等混杂因素后,首先将吸烟情况纳入多因素logistic回归方程,然后将*CHRNA5* rs17486278多态性引入方程,最后将二者的交互作用项加入方程,用*OR*值及其95%*CI*表达自变量与肺癌的关联强度。Hardy-Weinberg(H-W)遗传平衡检验采用STATE/SE 12.0软件进行,其他统计学分析由SPSS 19.0软件完成,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

1. 基本情况:病例组与对照组的年龄、职业、文化程度、婚姻状况及吸烟行为差异有统计学意义($P<0.05$),民族及饮酒情况差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

2. rs17486278多态性、吸烟行为与肺癌的关联:对照组rs17486278的基因频率分布符合H-W遗传平衡定律($P<0.05$)。采用logistic回归分析,在控制了潜在混杂因素后,每天吸烟量>15支者发生肺癌的风险高于不吸烟者($OR=3.49$, 95% *CI*: 2.29~5.32),未发现rs17486278多态性与肺癌之间有统计学关联。进一步吸烟行为分层分析显示,在不吸烟者中未发现携带rs17486278 AC基因型者和携带CC基因型者发生肺癌的风险高于AA基因型者,*OR*值分别为0.69 (95% *CI*: 0.33~1.41)和0.21 (95% *CI*: 0.03~1.73),见表2。

3. 吸烟与rs17486278多态性对肺癌的交互作

表 1 肺癌病例组和正常对照组的人口学特征

变量	肺癌组 (n=204)		对照组 (n=821)		χ^2 值	P值
	例数	构成比 (%)	例数	构成比 (%)		
年龄(岁)					82.88	<0.001
20~	3	1.46	41	4.99		
30~	4	1.96	127	15.47		
40~	28	13.73	166	20.22		
50~	57	27.94	278	33.86		
60~	77	37.75	162	19.73		
70~81	35	17.16	47	5.73		
职业					76.46	<0.001
工人	24	11.76	229	27.89		
农民	38	18.63	71	8.65		
行政干部	2	0.98	42	5.12		
科技、医务人员、教师	9	4.41	49	5.97		
个体工商户、企业、政府 工作人员	33	16.18	118	14.37		
离退休人员	83	40.69	171	20.83		
待业人员	11	5.39	101	12.30		
其他	4	1.96	40	4.87		
文化程度					25.60	<0.001
文盲	7	3.43	52	6.33		
小学	50	24.51	105	12.79		
初中	66	32.35	230	28.01		
高中、中专	56	27.45	264	32.16		
大专、大学及以上	25	12.25	170	20.71		
婚姻状况					14.15	<0.001
已婚	195	95.59	706	85.99		
其他	9	4.41	115	14.01		
吸烟量(支/天)					150.54	<0.001
0	45	22.06	302	36.78		
1~	18	8.82	316	38.49		
>15	141	69.12	203	24.73		
rs17486278					0.91	0.632
AA	99	48.53	408	49.70		
AC	91	44.61	343	41.78		
CC	14	6.86	70	8.52		
饮酒					0.78	0.378
无	141	69.12	593	72.23		
有	63	30.88	228	27.77		
民族					0.19	0.656
汉	201	98.53	812	98.90		
其他	3	1.47	9	1.10		

用:在控制年龄、职业、文化程度和婚姻状况等混杂因素之后,每天吸烟量 1~15 支并携带 CC 基因型者对肺癌的发生存在正交互作用($OR=16.13, 95\%CI: 1.27 \sim 205.33$)。根据 rs17486278 多态性和吸烟行为进行分层分析,与不吸烟者并携带 rs17486278 AA 基因型者相比,每天吸烟量 1~15 支并携带 CC 基因

型者、每天吸烟量>15 支并携带 AA 基因型者和携带 AC 基因型者发生肺癌的风险增高,OR 值分别为 8.14 (95% CI: 1.17 ~ 56.56)、3.84 (95% CI: 1.30 ~ 11.40) 和 5.32 (95% CI: 1.78 ~ 15.93), 见表 3。

表 2 吸烟行为和 rs17486278 多态性与肺癌的关联

变量	肺癌组 (n=204)	对照组 (n=821)	OR 值(95%CI)
吸烟量(支/天)			
0	45(22.06)	302(36.78)	1
1~	18(8.82)	316(38.49)	0.34(0.19 ~ 0.61) ^a
>15	141(69.12)	203(24.73)	3.49(2.29 ~ 5.32) ^{a,b}
rs17486278			
AA	99(48.53)	408(49.70)	1
AC	91(44.61)	343(41.78)	1.29(0.72 ~ 2.35) ^c
CC	14(6.86)	70(8.52)	0.81(0.25 ~ 2.59) ^c

注:^a校正 rs17486278 多态性、年龄、职业、文化程度及婚姻状况等变量;^b $P<0.05$;^c校正吸烟行为、年龄、职业、文化程度及婚姻状况等变量

表 3 吸烟与 rs17486278 多态性对肺癌的交互作用

变量	rs17486278	肺癌组 (n=204)	对照组 (n=821)	OR 值(95%CI) ^a
吸烟量(支/天)				
0	AA	25(12.25)	147(17.90)	1
	AC	19(9.31)	130(15.83)	1.15(0.36 ~ 3.62)
	CC	1(0.49)	25(3.05)	0.36(0.03 ~ 4.24)
1~	AA	8(3.92)	170(20.71)	0.29(0.07 ~ 1.15)
	AC	7(3.43)	125(15.23)	0.30(0.07 ~ 1.30)
	CC	3(1.47)	21(2.56)	8.14(1.17 ~ 56.56) ^b
>15	AA	66(32.35)	91(11.08)	3.84(1.30 ~ 11.40) ^b
	AC	65(31.86)	88(10.72)	5.32(1.78 ~ 15.93) ^b
	CC	10(4.90)	24(2.92)	0.78(0.12 ~ 4.98)
交互作用				
1~15	AC	7(3.43)	125(15.23)	1.34(0.36 ~ 4.94)
1~15	CC	3(1.47)	21(2.56)	16.13(1.27 ~ 205.33) ^b
>15	AC	65(31.86)	88(10.72)	1.27(0.54 ~ 2.95)
>15	CC	10(4.90)	24(2.92)	2.65(0.28 ~ 25.46)

注:^a校正年龄、职业、文化程度及婚姻状况等变量;^b $P<0.05$

讨 论

本研究未发现 *CHRNA5* 上的 rs17486278 位点多态性与肺癌的发生有关,这一结果与 Hansen 等^[4]在 美籍非洲人群中的发现相反,可能与种族差异有关,类似情况也出现在 *CHRNA5* 的 rs16969968 及 rs8034191 多态性与肺癌的关系中,如在欧洲人群中进行的 GWAS 研究发现上述基因位点多态性与肺癌发生有关^[1-3],但在中国人群中未发现这种关联^[11]。在不吸烟者中也未发现 rs17486278 多态性与肺癌之间有统计学关联,这一结果与 Li 等^[5]在中国不吸烟者中的研究一致,提示种族差异影响 *CHRNA5* 基因多态性与肺癌的关联研究。

本研究进一步交互作用分析显示,每天吸烟量1~15支和携带rs17486278 CC基因型对肺癌的发生存在正交互作用。根据rs17486278多态性和吸烟行为进行分层分析,与不吸烟并携带rs17486278野生基因型(AA)者相比,吸烟量增大并携带变异基因型者发生肺癌的风险增高,提示吸烟和rs17486278多态性对肺癌的发生存在正交互作用。有关*CHRNA5-A3-B4*基因簇上的SNP与吸烟对肺癌的交互作用在国内外已开展过多项研究,但结果不一致,例如Thorgeirsson等^[1]和Wang等^[11]在欧洲人群中发现*CHRNA5-A3-B4*基因簇上的rs1051730、rs8042374和rs12914385多态性对肺癌的影响存在交互作用,但另有学者在欧洲人群中未发现*CHRNA5*基因簇上的rs16969968、rs8034191、rs3841324及rs2036527位点的多态性与吸烟对肺癌产生存在交互作用^[2,12-13],Shen等^[14]在中国人群中也未发现*CHRNA5*上的rs503464多态性与吸烟对肺癌的发生存在交互作用。上述结果出现差异可能与不同研究对象存在人种差异和不同研究所选择*CHRNA5-A3-B4*基因簇上的SNP位点不同有关。

本研究存在不足。首先,本研究仅选用中国男性人群,使得研究结果仅能应用于男性,不具有普遍性。其次,本研究病例组总样本量较小,且在分层分析中每天吸烟量1~15支并携带rs17486278 CC基因型者和每天吸烟量>15支并携带CC基因型者的病例组样本量均较少,从而导致与其他层相比,前者发生肺癌的风险明显增高,但后者未发现增高肺癌发生风险。此外,研究对象的吸烟行为通过回顾性调查获得,可能存在回忆偏倚,从而影响吸烟行为分层及研究结果。由于rs17486278位于*CHRNA5*的内含子上,不能进行进一步的功能学研究验证,其作用路径可能是通过和其他真正的易感功能性SNP间存在连锁不平衡,从而间接影响受体功能。

[感谢广州医科大学第一附属医院胸外科、海珠区疾病预防控制中心(CDC)、白云区CDC、黄浦区卫生监督所及斗门区CDC对本项目的支持]

参 考 文 献

- [1] Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease[J]. *Nature*, 2008, 452(7187): 638-642.
- [2] Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25[J]. *Nature*, 2008, 452(7187): 633-637.
- [3] Amos CI, Wu X, Broderick P, et al. Genome-wide association scan of tag SNP identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(5): 616-622.
- [4] Hansen HM, Xiao Y, Rice T, et al. Fine mapping of chromosome 15q25.1 lung cancer susceptibility in African-Americans [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(18): 3652-3661.
- [5] Li Z, Bao S, Xu X, et al. Polymorphisms of *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* Gene Cluster and NSCLC Risk in Chinese population[J]. *Transl Oncol*, 2012, 5(6): 448-452.
- [6] Wang DS. *Clinical oncology* [M]. 3ed. Beijing: Science Press, 2010: 303-304. (in Chinese)
万德森. 临床肿瘤学[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2010: 303-304.
- [7] Improgo MR, Scofield MD, Tapper AR, et al. From smoking to lung cancer the *CHRNA5-A3-B4* connection [J]. *Oncogene*, 2010(29): 4874-4884.
- [8] Wassenaar C, Dong Q, Wei Q, et al. Relationship between *CYP2A6* and *CHRNA5-A3-B4* variation and smoking behaviors and lung cancer risk [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103(17): 1342-1346.
- [9] Schuller H. Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(3): 195-205.
- [10] Wu C, Hu Z, Yu D, et al. Genetic variants on chromosome 15q25 associated with lung cancer risk in Chinese populations [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(12): 5065-5072.
- [11] Wang Y, Broderick P, Webb E, et al. Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(12): 1407-1409.
- [12] Amos CI, Gorlov IP, Dong Q, et al. Nicotinic acetylcholine receptor region on chromosome 15q25 and lung cancer risk among African Americans: a case-control study [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(15): 1199-1205.
- [13] Wei C, Han Y, Spitz MR, et al. A case-control study of a sex-specific association between a 15q25 variant and lung cancer risk [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011, 20(12): 2603-2609.
- [14] Shen B, Zhu Q, Zheng MQ, et al. *CHRNA5* polymorphism and susceptibility to lung cancer in a Chinese population [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2013, 46(1): 79-84.

(收稿日期:2014-08-19)

(本文编辑:万玉立)

[1] Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial