

维生素 D 受体及其基因多态性与鼻咽癌的关联

王丽¹ 陈星² 程泽星³ 练状³ 孙爱东³

[摘要] 目的:探讨维生素 D 受体(VDR)及其基因多态性与鼻咽癌的关联。方法:采用荧光定量 PCR 检测 48 例鼻咽癌患者(鼻咽癌组)和 48 例对照者(对照组)外周血单个核细胞中的 VDR mRNA。运用 TaqMan-MGB 荧光探针 PCR 法检测所有研究对象的 FokI 和 ApaI 位点基因型。结果:鼻咽癌组 VDR mRNA Δ Ct 值为 9.32 ± 0.91 , 对照组为 7.31 ± 1.04 , 鼻咽癌组 VDR mRNA 表达量显著低于对照组($t=10.08, P<0.01$)。采用多因素 Logistic 回归分析,结果显示 FokI 点 Ff 基因型在鼻咽癌组中的分布显著高于对照组(调整 $OR=1.97, 95\%CI=1.33\sim 2.91$)。未发现 ApaI 位点各基因型在对照组和鼻咽癌组中分布存在差异。进一步采用单倍型分析,结果显示,与 fa 单倍型相比, Fa 单倍型在对照组中的分布显著高于鼻咽癌组(调整 $OR=0.65, 95\%CI=0.48\sim 0.87$)。2 组 FokI 位点不同基因型中 VDR mRNA 表达水平差异有统计学意义($F=194.5, P<0.01$)。结论:VDR 基因遗传变异与鼻咽癌有密切关联。

[关键词] 鼻咽肿瘤;基因多态性;维生素 D 受体

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2017.23.006

[中图分类号] R739.63 [文献标志码] A

Association of vitamin D receptor and its genetic polymorphisms with nasopharyngeal carcinoma

WANG Li¹ CHEN Xing² CHENG Zexing³ LIAN Zhuang³ SUN Aidong³

(¹Department of Oncology, Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou, 225000, China;²Department of Otorhinolaryngology, the First People's Hospital of Ningbo;³Department of Otorhinolaryngology, Affiliated Hospital of Yangzhou University)

Corresponding author: SUN Aidong, E-mail: sunaidongyz@126.com

Abstract Objective: To investigate the gene expression and polymorphisms of vitamin D receptor (VDR) in nasopharyngeal carcinoma. **Method:** The expression of VDR mRNA was detected by fluorescent quantitative PCR in PBMC from 48 patients with nasopharyngeal carcinoma and 48 controls. The FokI and ApaI loci of all subjects were detected by TaqMan-MGB fluorescent probe PCR. **Result:** The VDR mRNA Δ Ct value was 9.32 ± 0.91 and 7.31 ± 1.04 in nasopharyngeal carcinoma patients and controls, respectively. Using multivariate Logistic regression analysis, the results showed that the distribution of FokI point Ff genotype in the case group was significantly higher than that in the control group (adjusted $OR=1.97, 95\%CI=1.33-2.91$). No difference was found between the control group and the patient group at ApaI loci. Further haplotype analysis was used to find that compared with fa haplotypes, the distribution of FokI Ff genotype in the case group was significantly higher than that in the healthy control group (adjusted $OR=0.65, 95\%CI=0.48-0.87$). There were significant differences in the gene expression level of VDR among the patients with the different genotypes of FokI loci ($F=194.5, P<0.01$). **Conclusion:** Genetic variants of the VDR gene are closely associated with nasopharyngeal carcinoma.

Key words nasopharyngeal neoplasms; polymorphisms; vitamin D receptor

鼻咽癌是一种发生于鼻咽腔内的恶性肿瘤,主要表现为流涕、出血、鼻塞、偏头痛等症状^[1]。目前,鼻咽癌的治疗主要通过放射治疗,对于分化程度高、病程长的患者,亦可结合手术治疗和化学治疗。然而,临床数据显示,鼻咽癌的预后并不理想,复发以及早期转移现象很常见^[2]。流行病学调查

显示,我国为鼻咽癌好发地区^[3]。近年来研究发现,维生素 D 除了在维持机体血钙平衡及调节骨质代谢等方面发挥重要作用外,还具有抗炎、抗分化及免疫调节的功能。维生素 D 与维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)结合,才能发挥其免疫学功能。VDR 广泛表达于机体呼吸道以及肺组织中的巨噬细胞、淋巴细胞和上皮细胞,维生素 D 可与上述 VDR 结合,参与呼吸系统的免疫功能双鼻式、单鼻式、耳挂式调节^[4]。VDR 分子的表达受其基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymor-

¹扬州大学附属医院肿瘤科(江苏扬州,225000)

²宁波市第一人民医院耳鼻咽喉科

³扬州大学附属医院耳鼻咽喉科

通信作者:孙爱东, E-mail: sunaidongyz@126.com

phism, SNP) 调控^[5]。目前, 国内外对 VDR 基因多态性与鼻咽癌的研究较少, 为此, 本研究采用病例对照研究分析 VDR 及其基因多态性与鼻咽癌的关联。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集 2010-06—2017-06 在扬州大学附属医院肿瘤科收治并确诊的鼻咽癌患者 259 例(鼻咽癌组), 均符合世界卫生组织鼻咽癌病理组分型标准, 且排除心脑血管疾病、肝肾系统疾病以及其他肿瘤。对照组按照年龄、性别匹配, 选取同一时期在我院体检中心参加体检的健康人群 282 例。所有研究对象均排除妊娠、哺乳期女性, 且无血缘关系。

2 组年龄、性别以及吸烟人群分布差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$), 鼻咽癌组的吸烟指数(每天吸烟支数 \times 吸烟年数)明显高于对照组($\chi^2 = 6.73, P < 0.05$), 见表 1。吸烟指数 ≥ 400 代表大量吸烟, < 400 代表轻度吸烟。

表 1 2 组一般情况比较

变量	鼻咽癌组 ($n=259$)	对照组 ($n=282$)
年龄	46.34 \pm 16.72	45.56 \pm 13.76
性别		
男	161(62.2)	179(63.5)
女	98(37.8)	103(36.5)
吸烟		
是	191(73.7)	194(68.8)
否	68(26.3)	88(31.2)
吸烟指数		
≥ 400	98(37.8) ¹⁾	78(27.66)
< 400	161(62.2) ¹⁾	204(72.34)

与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

1.2 方法

1.2.1 一般情况调查 采用自行设计的调查表, 通过面访或者查阅病例, 调查所有研究对象的基本情况(年龄、身高、体重、吸烟史、饮酒史等), 既往疾病史(慢性病史、传染病史、其他肿瘤史等)。所有调查均获得调查对象的知情同意。

1.2.2 VDR mRNA 检测及其基因多态性检测 抽取研究对象外周静脉血 5 ml, 分离血浆和白细胞。采用荧光定量 PCR 随机检测 48 例鼻咽癌患者和 48 例对照者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中 VDR mRNA 表达情况, 反应在 ABI 7500 PCR 仪中进行, 荧光定量 PCR 的结果以每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数 Ct 值表示。Ct 值减去管家基因 β -actin 的 Ct 值得到 Δ Ct, Δ Ct 值越小, VDR 基因表达量就越高。采用酚-氯仿法提取

所有研究对象细胞基因组 DNA。结合在汉族人群中研究过的多态性位点以及从 NCBI、HapMap 等数据库中提供的有关 VDR 基因位点基因型数据, 最终选定了 FokI 和 ApaI 三个位点。运用 TaqMan-MGB 荧光探针 PCR 法检测所有研究对象的 FokI 和 ApaI 位点基因型。探针和引物均由上海骥骜生物技术公司设计。反应在 ABI 7900 PCR 仪中进行, 采用 SDS2.3 软件读取检测数据。

1.3 统计学分析

应用 EpiData3.10、SPSS17.0 和 PHASE2.0 软件对数据进行处理。采用 t 检验比较 2 组中 VDR mRNA 表达水平。采用多因素 Logistic 回归分析 VDR 基因多态性在对照组和鼻咽癌组中的分布差异, 以及这 2 个位点的单倍型分析。VDR 基因 FokI 位点不同基因型组别中 VDR mRNA 表达情况采用方差分析。本研究的检验均为双侧概率检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VDR mRNA 在鼻咽癌组和对照组中表达分布情况

采用荧光定量 PCR 检测 48 例鼻咽癌患者和 48 例对照者 PBMC 中的 VDR mRNA。结果发现, 鼻咽癌患者中 VDR mRNA Δ Ct 值为 9.32 ± 0.91 , 对照组为 7.31 ± 1.04 , 鼻咽癌患者中 VDR mRNA 的表达量显著低于对照者($t = 10.08, P < 0.01$)。

2.2 VDR 基因多态性与鼻咽癌的关联

采用多因素 Logistic 回归分析, 结果显示 FokI 点 CT 基因型在鼻咽癌组中的分布显著高于对照组(调整 $OR = 1.97, 95\% CI = 1.33 \sim 2.91$)。未发现 ApaI 位点各基因型在对照组和鼻咽癌组中的分布存在差异。进一步采用单倍型分析, 结果发现, 与 fa 单倍型相比, Fa 单倍型在对照组中的分布显著高于鼻咽癌组(调整 $OR = 0.65, 95\% CI = 0.48 \sim 0.87$)。见表 2。

2.3 VDR 基因 FokI 位点不同基因型组别中 VDR mRNA 表达情况

2 组 FokI 位点在不同基因型中 VDR mRNA 表达水平差异有统计学意义($F = 194.5, P < 0.01$), 见表 3。

3 讨论

鼻咽癌的发病机制尚未完全清楚, 但已有研究表明鼻咽癌是由多种炎症细胞介导, 炎症细胞因子参与的恶性肿瘤^[6]。1,25(OH)₂D₃ 是体内维生素 D 的活性形式, 它除在机体调节钙代谢方面发挥重要作用外, 还积极参与机体抗炎、抗分化及免疫调节的过程^[7]。一方面, 在固有免疫应答中, 1,25(OH)₂D₃ 通过介导 NF- κ B 信号转导途径减少机

表 2 VDR 基因多态性与鼻咽癌易感性的关联分析

SNP 位点	对照组(n=282)	鼻咽癌组(n=259)	调整 OR 值(95%CI)	P
FokI				
FF	106(37.6)	64(24.7)	1	—
Ff	128(45.4)	152(58.7)	1.97(1.33~2.91)	0.001
ff	48(17.0)	43(16.6)	1.48(0.87~2.48)	0.134
ApaI				
AA	124(44.0)	111(42.9)	1	—
Aa	122(43.2)	122(47.1)	1.11(0.78~1.59)	0.545
aa	36(12.8)	26(10.0)	0.81(0.45~1.42)	0.457
单倍型				
fa	178(31.6)	202(39.0)	1	—
Fa	192(34.0)	142(27.4)	0.65(0.48~0.87)	0.005
FA	148(26.2)	138(26.6)	0.82(0.61~1.12)	0.210
fA	46(8.2)	36(7.0)	0.69(0.43~1.11)	0.130

表 3 VDR mRNA 水平在 FokI 位点不同基因型中的分布

FokI	VDR mRNA Δ Ct 值		F	P
	鼻咽癌组	对照组		
FF	6.97 \pm 0.69	9.41 \pm 1.02	194.5	<0.01
Ff	7.26 \pm 1.07	9.41 \pm 0.81		
ff	8.67 \pm 0.62	9.16 \pm 1.11		

体干扰素、趋化因子等细胞因子的释放,从而减轻炎症反应;另一方面,在获得免疫中,维生素 D 主要通过与巨噬细胞、树突状细胞等共同结合来发挥作用^[8]。

维生素 D 在体内发挥生物学效应依赖于与 VDR 的结合。VDR 表达异常可导致多种疾病的发生和发展。本研究中,鼻咽癌组 VDR mRNA 表达水平显著低于对照组,笔者认为这在目前的相关研究中尚属首次报道。鉴于维生素 D 在肿瘤发病机制中的作用,可以推测鼻咽癌患者体内 VDR 介导的维生素 D 信号通路传导可能减弱,进而参与鼻咽癌的发病机制。

人 VDR 基因位于第 12 号染色体长臂上,长约 75 kb,包含 14 个外显子和 8 个内含子,可编码 427 个氨基酸^[9]。近年来,VDR 基因多态性已被发现与多种炎症相关性疾病的发病风险存在关联。其中,研究最多的是 VDR 四个限制性酶切位点 FokI、TaqI、BsmI 和 ApaI^[10]。Guy 等^[11]在高加索人群中 BsmI 位点的突变基因型 bb 可增加乳腺癌的患病风险。毕雪冰等^[12]在汉族人群中发现 FokI 位点多态性与肺癌的易感性存在关联。由于 TaqI 和 BsmI 突变野生基因型在汉族人群中分布较少,因此,本研究仅分析 FokI 和 ApaI 位点多态性与鼻咽癌的关联,结果发现,FokI 位点杂合基因型 CT 在鼻咽癌组中的分布显著高于对照组,提示 T 等位基因可能增加鼻咽癌的患病风险。这与 Huang 等^[13]研究结果不一致,究其原因,除了本研究的样本量

高于 Huang 等的研究,VDR 基因分型的方法、选择的样本人群也不同。FokI 位点位于 VDR 基因的第 2 外显子,已有报道其突变可改变 VDR 翻译编码蛋白。进一步采用单倍型分析发现结合之前单位点分析结果,提示 FokI 位点可能在 VDR 基因单倍型区段中发挥这种效应。FokI 位点位于 VDR 基因第 2 外显子,是目前唯一能改变氨基酸序列的位点。该位点发生突变可导致 VDR 翻译出的蛋白质比正常编码少 3 个氨基酸,从而最终影响维生素 D 信号通路^[14]。本研究还发现 FokI 位点的多态性与 VDR mRNA 表达水平存在关联,这进一步验证了其他学者关于 FokI 位点的多态性与 VDR mRNA 表达有关^[15],从而影响机体疾病的易感性及严重程度的研究。

综上所述,VDR 基因 FokI 位点的遗传变异与鼻咽癌密切相关,确切机制亟待深入研究。

参考文献

- [1] CHUA M L K, WEE J T S, HUI E P, et al. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Lancet, 2016, 387: 1012-1024.
- [2] 钟秋璐,李龄,曲颂,等. 局部晚期鼻咽癌 IMRT 联合化疗靶向治疗疗效与安全性对比[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2016, 25(10): 1038-1042.
- [3] HUI E P, MA B B, CHAN K C, et al. Clinical utility of plasma Epstein-Barr virus DNA and ERCC1 single nucleotide polymorphism in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer, 2015, 121: 2720-2729.
- [4] 李舟蕾,任艳鑫,李晓江. 鼻咽癌与免疫逃逸[J]. 国际肿瘤学杂志, 2016, 43(5): 372-375.
- [5] ASHMORE J H, GALLAGHER C J, LESKO S M, et al. No Association Between Vitamin D Intake, VDR Polymorphisms, and Colorectal Cancer in a Population-Based Case-Control Study[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2015, 24: 1635-1637.

肿瘤累及颈段气管患者的术前气道处理及围手术期窒息预防*

蔡强^{1△} 刘业海¹ 吴开乐¹ 吴静¹ 赵益¹ 姚长玉¹

[摘要] 目的:探讨肿瘤累及颈段气管患者术前气道处理及术后窒息预防措施,为手术的安全性提供临床依据。方法:回顾性分析 35 例不同程度的肿瘤累及颈段气管患者的临床资料,根据患者就诊时是否强迫体位、呼吸困难程度、复发肿瘤范围等情况,选择常规气管插管后麻醉、表面麻醉后清醒状态下可视喉镜辅助下插管麻醉、术前气管切开插管麻醉、横断气管插管麻醉以及体外循环技术的麻醉方法。术后根据手术中气管受累程度和处理方式以及患者的全身状况选择气管切开或造瘘。结果:35 例患者均成功实施全身麻醉,其中 17 例术前无强迫体位及呼吸困难的患者均顺利麻醉插管;术后 3 例进行了预防性气管切开。16 例伴有强迫体位的非复发肿瘤患者中,15 例术前均先吸入表面麻醉后在清醒状态下经可视喉镜辅助成功行麻醉插管,1 例无法麻醉插管也无法急诊气管切开的患者利用体外循环技术完成麻醉;本组患者术后均行预防性气管切开或造瘘。2 例伴有强迫体位的复发肿瘤患者,术前气管插管未能成功,1 例紧急横断气管再麻醉插管,1 例术前紧急气管切开插管麻醉成功,2 例均术后气管造瘘。所有患者术后均未出现大出血、窒息、心血管意外等严重并发症。结论:肿瘤累及颈段气管患者术前气道处理及术后是否行气管切开或造瘘预防窒息需根据累及颈段气管肿瘤的性质、是否为复发肿瘤、气管受累及的程度以及是否合并 OSAHS 来决定。只有综合考虑影响气道的各种因素,采取有效的方法,才能保证手术的安全性。

[关键词] 气管切开术;麻醉;气道;围手术期

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2017.23.007

[中图分类号] R653 [文献标志码] A

Preoperative airway management and perioperative period asphyxia prevention in patients with tumors invasion in the cervical tracheal

CAI Qiang LIU Yehai WU Kaile WU Jing ZHAO Yi YAO Changyu

(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, 230022, China)

Corresponding author: LIU Yehai, E-mail:liuyehai616@qq.com

* 基金项目:安徽省 2015 科技攻关计划项目(No.1501041147)
¹ 安徽医科大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科(合肥,230022)
[△] 现在铜陵市人民医院耳鼻咽喉头颈外科(安徽铜陵,244001)
通信作者:刘业海, E-mail:liuyehai616@qq.com

[6] 张水兴,贾乾君,张忠平,等.基于体素内不相干运动的扩散加权成像对鼻咽癌与炎性增生性疾病的鉴别诊断[J].中华放射学杂志,2013,47(7):617-621.

[7] 张伟,张浩,易斌,等.维生素 D 核受体在糖尿病肾病中的保护作用[J].中华肾脏病杂志,2014,30(4):313-317.

[8] 刘莉娜,王志强,朱筠.活性维生素 D3 干预保护 2 型糖尿病模型大鼠肝脏的作用机制[J].中国组织工程研究,2016,20(5):694-700.

[9] 张珍,刘春燕,王昕怡,等.维生素 D 对胰岛功能的调控作用[J].中国全科医学,2013,16(12):1404-1407.

[10] 邵雪景,缪珩,李倩倩,等.维生素 D 受体基因多态性与 2 型糖尿病及血清 1,25-二羟基维生素 D3 的相关性研究[J].医学研究杂志,2012,41(2):50-54.

[11] GUY M, LOWE L C, BRETHERTON-WATT D, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and breast cancer risk[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 5472-5481.

[12] 毕雪冰,贾友超,刘微微,等.维生素 D 受体基因多态性和非小细胞肺癌遗传易感性的临床关系[J].热带医学杂志,2016,16(7):905-908.

[13] HUANG X, CAO Z, ZHANG Z, et al. No association between Vitamin D receptor gene polymorphisms and nasopharyngeal carcinoma in a Chinese Han population[J]. Biosci Trends, 2011, 5: 99-103.

[14] 李银娟,方秋红.维生素 D 与鼻咽癌[J].现代预防医学,2015,23(42):4273-4274.

[15] 袁琛,任卫娟,顾春美,等.维生素 D 受体基因多态性与卵巢癌遗传易感性研究[J].中华疾病控制杂志,2015,19(1):5-8.

(收稿日期:2017-10-22)