

· 论 著 ·

ERCC1 基因多态性与肝癌患者易感性分析^{*}

李艳秋,赵惠柳[#],欧超,李美琴,利基林,朱波[△]
(广西医科大学附属肿瘤医院检验科,南宁 530021)

摘要:目的 探讨切除修复交叉互补基因 1(ERCC1)-4533/8092 位点单核苷酸多态性(SNPs)与广西壮族人群肝癌易感性之间关系。方法 通过聚合酶链反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测 88 例原发性肝癌患者和 82 例健康对照者的 ERCC1-4533/8092 基因多态性。结果 ERCC1-4533 位点的基因分型在病例组和对照组的频数分布差异无统计学意义($P > 0.05$),ERCC1-8092 位点的基因分型在病例组和对照组的频数分布差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与携带 ERCC1-8092 CC 基因型的个体相比,携带 ERCC1-C8092 CA/AA 基因型的个体具有更高的肝癌易感性(CA:OR=2.556,95%CI:1.345~4.855;AA:OR=8.667,95%CI:1.000~75.092)。以携带 ERCC1-8092 C 等位基因作为参照,携带 ERCC1-C8092 A 等位基因可以增加原发性肝癌的发病危险性(OR=2.387,95%CI:1.428~3.992)。结论 ERCC1-8092 位点基因多态性与广西壮族人群肝癌易感性有关。

关键词:ERCC1; 原发性肝癌; 基因多态性; 易感性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.18.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)18-2523-03

The relationship on polymorphisms of ERCC1-4533/8092 and the susceptibility of hepatocellular carcinoma^{*}

LI Yanqiu, ZHAO Huiliu[#], OU Chao, LI Meiqin, LI Jilin, ZHU Bo[△]

(Department of Laboratory, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship on the excision repair cross complementing gene 1(ERCC1)-4533/8092 site single nucleotide polymorphisms(SNPs) and the susceptibility to hepatocellular carcinoma(HCC) in Guangxi Zhuang population. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) method was used to detect the ERCC1-4533/8092 gene polymorphism in 88 cases with primary liver cancer and 82 cases of normal controls. **Results** There was no difference in the frequency distribution of ERCC1-4533 in the case group and the control group, the frequency distribution of the ERCC1-8092 in the case group and the control group was different($P < 0.05$). Compared with ERCC1-8092 CC, ERCC1-C8092 CA/AA had higher risk of primary hepatocellular carcinoma(CA:OR=2.556,95%CI:1.345~4.855;AA:OR=8.667,95%CI:1.000~75.092). ERCC1-8092 C allele as a reference, ERCC1-8092 A allele can increase the risk of primary liver cancer(OR=2.387,95%CI:1.428~3.992). **Conclusion** The genetic polymorphisms of ERCC1-8092 sites are associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in Guangxi Zhuang population.

Key words:ERCC1; primary hepatocellular carcinoma; polymorphisms; susceptibility

原发性肝癌的发生发展是 1 个长期并且复杂的过程,原发性肝癌不但是严重危害人类生命健康的恶性肿瘤,且初期的临床症状不明显,因此很多患者在确诊的时候已经处于原发性肝癌晚期,只有 30% 患者通过如手术切除、肝移植、经皮消融等方法治愈。近年在我国发病率呈上升趋势,因此原发性肝癌的早期诊断变得越来越重要^[1-2]。许多研究表明,基因多态性可能和某些 DNA 修复基因的功能有关,这些不同的基因多态性可能与不同癌症的易感性有关,所以,分子水平的疾病诊断可能对肿瘤的早期诊断及肿瘤的个性化治疗和预后判断做出一定的贡献^[2]。切除修复交叉互补基因 1(ERCC1)是核苷酸切除修复途径(NER)的关键酶,其与特异性核酸内切酶 DNA 修复缺乏互补酶 F(XPF)结合形成异源性二聚体结构,具有识别损伤并切除 5' 端的双重作用^[3-4]。有研究表明,ERCC1 基因多态性可以影响核苷酸切除修复过程使其功能异常,基因组的不稳定性增加,这可能导致多种肿瘤发生^[5]。因此,本研究将对 ERCC1-4533/8092 的多态性与广西壮族人群的原发性肝癌易

感性之间的关系进行探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例组选取 2015 年 7~12 月在本院病理组织学及影像学确诊未经治疗的原发性肝细胞癌 88 例,其中女 16 例,男 72 例;平均年龄(51.375±11.243)岁。对照组选自同医院同期住院的非肿瘤患者 82 例(临床检查、检验结果均无异常),其中,女 15 例,男 67 例;平均年龄(53.341±15.912)岁。病例组和对照组在年龄和性别比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。所有入选研究对象均为广西壮族人。

1.2 仪器与试剂 小量全血基因组 DNA 快速提取试剂盒、dNTPs 由北京艾德莱生物科技有限公司提供;Taq DNA 聚合酶、PmaC I、Mbo II 由日本 TaKaRa 公司提供;引物由上海生工生物工程有限公司合成;琼脂糖由西班牙 Biowest 公司提供;ProFlex PCR 仪(美国 Life Techonlogies 公司);Universal Hood III 凝胶成像系统(美国 Bio-rad 公司);DYCP-31DN 电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

* 基金项目:广西自然科学基金资助项目(2012GXNSFAA053170)。

作者简介:李艳秋,女,广西医科大学在读研究生,主要从事血清肿瘤标志物检验、肿瘤基因分型等方面的研究。[#] 共同第一作者:赵惠柳,女,副主任技师,主要从事肿瘤的诊断、发生、发展等方面的研究。△ 通讯作者,E-mail:bozhu196@163.com。

1.3 方法

1.3.1 全血 DNA 提取 抽取受检者外周静脉血 2~3 mL 置于 EDTA 抗凝管中, 按照试剂盒说明书严格操作, 使用小量全血基因组 DNA 快速提取试剂盒提取标本中的 DNA。经核酸浓度测定仪测量浓度后, A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 视为 DNA 纯度合格, 储存于 -20 ℃ 冰箱备用。

1.3.2 ERCC1 4533/8092 位点基因多态性分析 采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术对 ERCC1-4533/8092 位点基因多态性进行分析。PCR 反应体系共 25 μL , 含 5 U/ μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL , DNA 模板 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 1 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL , 10× PCR buffer(Mg^{2+} Plus)2.5 μL , 灭菌双蒸水 17 μL 。引物设计参考文献[6-7]。4533 位点: 上游引物: 5'-AGA TGT CCT CTG CTC ACC CC-3', 下游引物: 5'-GGG AGA ACA AAG TGG CTG GA-3', PCR 反应过程为 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 1 min, 61 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72 ℃ 再延伸 10 min。目的产物长 379 bp。8092 位点: 上游引物: 5'-ACA GTG CCC CAA GAG GAG AT-3', 下游引物: 5'-AGT CTC TGG GGA GGG ATT CT-3', PCR 反应过程为 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 45 s, 59 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 共 35 个循环, 72 ℃ 再延伸 10 min, 目的产物长 204 bp。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后在紫外线灯下确认为目的条带, 取 10 μL 扩增产物分别与 10 U 限制性内切酶 PmaC I (ERCC1-4533)/Mbo II (ERCC1-8092) 混匀后置于 37 ℃ 水浴箱中过夜进行酶切反应。酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后在紫外线灯下分析结果。为保证基因多态性分型的准确性, 随机抽取 20% 的标本进行重复试验, 结果与第 1 次试验一致。

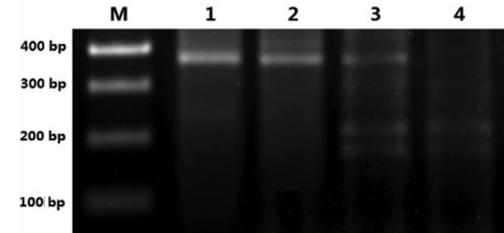
1.4 统计学处理 以 t 检验和 χ^2 检验统计分别分析计量资料和计数资料。对照组 ERCC1-4533/8092 基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡采用 χ^2 检验。应用非条件 Logistic 回归计算 ERCC1-4533/8092 基因型分布的比值比(OR)及其 95% 可信区间(95% CI)评价不同基因型和等位基因与肝癌易感性之间的相关性。所有统计检验均为双侧检验, 当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。采用 SPSS17.0 统计软件录入和分析数据。

2 结 果

2.1 ERCC1-4533/8092 位点的 PCR 扩增产物及酶切产物分析 ERCC1-4533 位点 PCR 扩增产物片段大小为 379 bp, 经限制性内切酶 PmaC I 酶切后可出现 3 种情况。基因型为纯合子 GG 时电泳结果出现 174、205 bp 2 条带, 基因型为杂合子 GA 时电泳结果出现 74、205、379 bp 3 条带, 基因型为纯合子 AA 时电泳结果出现 379 bp 1 条带。ERCC1-8092 位点 PCR 扩增产物片段大小为 204 bp, 经限制性内切酶 Mbo II 酶切后可出现 3 种情况。基因型为纯合子 CC 时电泳结果出现 204 bp 1 条带, 基因型为杂合子 CA 时电泳结果出现 204、116、88 bp 3 条带, 基因型为纯合子 AA 时电泳结果出现 116、88 bp 2 条带。见图 1、2。

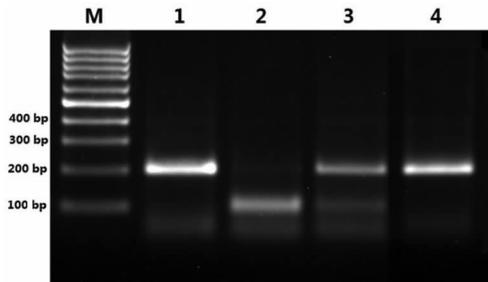
2.2 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验 为了检验 ERCC1-4533/8092 位点基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律, 对对照组的 ERCC1-4533/8092 位点基因型分布进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验, 检验结果显示, 对照组的 ERCC1-4533/8092 位点基因型分布的观察数和预期数之间的差异无统计学意义($P > 0.05$), 符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律, 对照组标本具有群体代表性。见表 1。

2.3 ERCC1-4533/8092 基因型及等位基因分布频率比较和肝癌易感性分析 ERCC1-4533 位点的基因分型的频数分布在病例组和对照组差异无统计学意义($P > 0.05$), ERCC1-8092 位点的基因分型的频数分布在病例组和对照组两组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。经非条件 Logistic 回归分析, 以 ERCC1-8092 CC 基因型作为参照, ERCC1-C8092 CA 基因型可以增加原发性肝癌的发病危险性($OR = 2.556, 95\% CI: 1.345 \sim 4.855$), ERCC1-C8092 AA 基因型可以增加原发性肝癌的发病危险性($OR = 8.667, 95\% CI: 1.000 \sim 75.092$)。以 ERCC1-8092 C 等位基因作为参照, ERCC1-C8092 A 等位基因可以增加原发性肝癌的发病危险性($OR = 2.387, 95\% CI: 1.428 \sim 3.992$)。见表 2。



注:M 表示 100 bp DNA Marker Ladder;1 表示 ERCC1-4533 PCR 扩增产物;2 表示纯合子 AA 基因型:379 bp;3 表示杂合子 GA 基因型:174、205、379 bp;4 表示纯合子 GG 基因型:116、205 bp。

图 1 ERCC1-4533 基因多态性 2% 琼脂糖凝胶电泳结果分析



注:M 表示 100 bp DNA Marker Ladder;1 表示 ERCC1-8092 PCR 扩增产物;2 表示纯合子 AA 基因型:116、88 bp;3 表示杂合子 CA 基因型:204、116、88 bp;4 表示纯合子 CC 基因型:204 bp。

图 2 ERCC1-8092 基因多态性 2% 琼脂糖凝胶电泳结果分析

表 1 对照组的 ERCC1 基因型 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验

位点	基因型	观察数(n)	预期数(n)
ERCC1-4533	GG	48	51.524
	GA	34	30.372
	AA	0	0.104
ERCC1-8092	CC	55	56.391
	CA	26	23.902
	AA	1	1.707

表 2 病例组与对照组 ERCC1-4533/8092 基因型及等位基因分布频率比较

位点	基因型/等位基因	病例组(n)	对照组(n)	OR(95% CI)
ERCC1-4533	GG	44*	48	
	GA	37*	34	

续表 2 病例组与对照组 ERCC1-4533/8092 基因型及等位基因分布频率比较

位点	基因型/ 等位基因	病例组		OR(95%CI)
		(n)	(n)	
ERCC1-8092	AA	1*	0	
	CC	36#	55	
	CA	46#	26	2.703(1.427~5.119)##
ERCC1-8092	AA	6#	1	9.167(1.059~79.350)##
	C	118#	136	
	A	58#	28	2.387(1.428~3.992)##

注:与对照组相比,* P>0.05, # P<0.05。

3 讨 论

正常细胞主要通过核苷酸切除修复途径(NER)进行DNA损伤修复,而ERCC1是核苷酸切除修复途径中的关键基因。ERCC1基因最初是由HeLa细胞克隆得到,位于人类第19号(19q13.2-3)染色体上,编码含297个氨基酸的ERCC1蛋白^[8-9]。单核苷酸多态性(SNPs)是指基因水平上由单个核苷酸变异引起的DNA序列多态性,在人群中的发生频率大于1%^[10]。ERCC1基因多态性可能影响ERCC1 mRNA表达或稳定及蛋白质功能,可能使核苷酸切除修复途径功能受影响,导致基因组的不稳定性增加,进而产生肿瘤或其他疾病发生的恶性表型行为。有研究表明,ERCC1基因多态性与非小细胞肺癌、胃癌、卵巢癌等多种肿瘤的发病机制、对铂类等抗肿瘤药物的反应性及预后有密切关系^[11-13]。

目前关于ERCC1-4533/8092位点基因多态性与原发性肝癌易感性的报道还比较少,其位点是否存在多态性且与原发性肝癌易感性是否有关尚不能确定。蓝永洪等^[8]的研究表明,海南人群中人类ERCC1-4533G/A存在多态性。郑霄雁^[14]的研究结果显示,ERCC1-4533/8092位点存在基因多态性,并且这2个位点基因多态性均与原发性肝癌的发生可能有关。在本次病例对照研究中,作者分析了ERCC1-4533/80922个位点基因多态性与广西壮族人群原发性肝癌易感性之间的关系,结果表明ERCC1-4533位点的基因分型的频数分布在病例组和对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$),ERCC1-8092位点的基因分型和等位基因的频数分布在病例组和对照组两组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。非条件Logistic回归分析结果显示,ERCC1-8092位点的A等位基因可能是广西壮族人群原发性肝癌发生的危险因素,携带ERCC1-8092A等位基因的个体患原发性肝癌的危险性是ERCC1-8092C等位基因的2.387倍($OR=2.387, 95\%CI: 1.428 \sim 3.992$)。然而,由于本次研究收集的对象数量偏少并仅限于广西壮族人群且只针对原发性肝癌这1种肿瘤进行探讨,因此,ERCC1-4533/8092基因多态性是否对原发性肝癌的易感性产生影响,是否与肝脏其他相关性疾病有关,需进一步扩大样本数量,扩大疾病范围,在不同地区、不同人群中进行更深入的探讨。

原发性肝癌在世界肿瘤相关死亡中排名第2位,有数据显示目前中国发病人数约占全球的原发性肝癌50%^[15]。广西是中国原发性肝癌的高发区,同时也是壮族人群聚集地^[16]。而ERCC1基因多态性又与铂类化疗药物的耐药性有关,因此对广西壮族人群的ERCC1基因多态性进行研究将对原发性肝癌的发病机制、基因水平的疾病诊断和个性化治疗及预后判断具有重要意义。

参考文献

[1] Llovet JM, Bruix J. Systematic review of randomized trials

- for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival[J]. Hepatology, 2003, 37(2): 429-442.
- [2] 朱薇, 葛君玲, 张利强, 等. AFP、CEA、CA199、CA-125联合检测对肝癌、肝硬化诊断的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(15): 1902-1904.
- [3] Gao H, Ge RC, Liu HY, et al. Effect of ERCC1 polymorphism on the response to chemotherapy and clinical outcome of non-small cell lung cancer[J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(4): 8997-9004.
- [4] Ueda S, Shirabe K, Morita K, et al. Evaluation of ERCC1 expression for cisplatin sensitivity in human hepatocellular carcinoma[J]. Ann Surg Oneol, 2011, 18(4): 1204-1211.
- [5] Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, et al. The structure-specific endonuclease Erccl-Xpf is required to resolve DNA inter strand cross-link-induced double-strand breaks [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(13): 5776-5787.
- [6] Metzger R. Pharmacogenetics and the practice of medicine [J]. Nature, 2003, 405: 857-865.
- [7] 王敬慧, 张权, 张卉, 等. ERCC1基因多态性与晚期非小细胞肺癌患者铂类化疗疗效的关系[J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(4): 337-341.
- [8] 蓝永洪, 郑小桃, 蔡望伟, 等. 海南人群中人类ERCC1-4533G/A多态性的研究[J]. 中国热带医学, 2006, 6(8): 1377-1378.
- [9] Westerveld A, Hoeijmakers JH, van Duin M, et al. Molecular cloning of a human DNA repair gene[J]. Nature, 1984, 310(5976): 425-429.
- [10] van Duin M, de Wit J, Odijk H, et al. Molecular characterization of the human excision repair gene ERCC-1: cDNA cloning and amino acid homology with the yeast DNA repair gene RAD10[J]. Cell, 1986, 44(6): 913-923.
- [11] 房克华, 常晓天. 单核苷酸多态性与肿瘤遗传易感性的研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(2): 151-155.
- [12] Mo J, Luo M, Cui J, et al. Prognostic value of ERCC1 and ERCC2 gene polymorphisms in patients with gastric cancer receiving platinum-based chemotherapy[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(11): 15065-15071.
- [13] 齐冰丽, 李琰, 王娜, 等. ERCC1基因多态性与卵巢上皮性癌患者铂类药物化疗敏感性及预后的关系[J]. 中华妇产科杂志, 2013, 48(11): 847-852.
- [14] 郑霄雁. 修复基因ERCC1多态性与肝癌易感性的关系[D]. 福建: 福建医科大学, 2008: 19-20.
- [15] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [16] 覃彦平, 秦雪, 曹昭, 等. IL-23R rs17375018单核苷酸多态性与广西肝癌人群的相关性[J]. 广东医学, 2014, 35(5): 674-676.

(收稿日期:2016-04-03 修回日期:2016-06-11)