

DNA 修复基因 *XPD* 单核苷酸多态性和环境因素的交互作用与肝细胞癌的关联研究

曾小云 仇小强 纪龙 余红平

【摘要】 目的 探讨 *XPD* 基因 751、312 位点单核苷酸多态性和环境因素的交互作用与肝细胞癌的关系。方法 采用以医院为基础的病例对照研究方法,运用 TaqMan MGB 荧光定量实时 PCR 分析方法对病例组 300 例肝细胞癌患者和对照组 312 例非肿瘤患者进行 *XPD* 基因 751 和 312 位点的基因型分析。以非条件 logistic 回归模型分析比较各基因型在两组中分布频率的差异,以及基因多态性和环境因素的交互作用。结果 *XPD* 基因 751 位点 3 种基因型 AA、AC、CC 在病例组和对照组中的分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$),与携带 *XPD*751 野生纯合子 AA 基因型者比较,携带 *XPD*751 AC 或 CC 基因型者患肝细胞癌风险无显著增加 ($P > 0.05$)。 *XPD* 基因 312 位点 3 种基因型 GG、GA、AA 在病例组和对照组中的分布差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与携带 *XPD*312 野生纯合子 GG 基因型者比较,携带 *XPD*312 AA 基因型个体罹患 HCC 的风险是携带 *XPD*312 GG 基因型的 2.67 倍 ($OR = 2.67, 95\% CI: 0.431 \sim 16.537$),但差异无统计学意义;携带至少一个 *XPD*312A 等位基因的个体罹患肝细胞癌的风险是 GG 基因型的 2.62 倍 ($95\% CI: 1.626 \sim 4.222$),且差异有统计学意义。交互作用分析结果表明 *XPD* 基因 751 位点多态性与吸烟、*XPD* 基因 312 位点多态性与吸烟、*XPD* 基因 312 位点多态性与 HBsAg 阳性之间在肝细胞癌发生中存在交互作用,交互作用的 *OR* 值分别为 4.291、5.341、7.348。结论 DNA 修复基因 *XPD*312A 等位基因可能是广西南部地区人群肝细胞癌的危险等位基因,*XPD* 基因多态性与吸烟、HBsAg 阳性之间在肝细胞癌发生中存在交互作用,能增加罹患肝细胞癌的风险。

【关键词】 肝细胞癌; *XPD* 基因; 遗传多态性; 病例对照研究

Study on the relationship between hepatocellular carcinoma and the interaction between polymorphisms in DNA repair gene *XPD* and environmental factors ZENG Xiao-yun^{*}, QIU Xiao-qiang, JI Long, YU Hong-ping. *Public Health School, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China*
Corresponding author: YU Hong-ping, Email: yhp268@163.com

【Abstract】 **Objective** To study the relationship between hepatocellular carcinoma and the interaction of polymorphisms in DNA repair gene *XPD* with environmental factors. **Methods** A hospital-based case-control study on hepatocellular carcinoma was conducted. All the hepatocellular carcinoma cases ($n=300$) were newly diagnosed and controls ($n=312$) were diagnosed with non-tumor cases. *XPD* genotype (*Lys751 Gln* and *Asp312 Asn*) from blood derived DNA was determined using TaqMan MGB Real-time PCR. Unconditional logistic regression was used to estimate the odds ratios (*ORs*) and 95% confidence intervals (*CI*s). **Results** For *XPD* condon 751 genotypes, there was no significant difference between frequencies of the AC or CC among patients and controls ($P > 0.05$) (referent AA). The frequency of *XPD*312A allelic gene was higher in cases than that in controls and was associated with an increased risk (adjusted $OR = 2.62, 95\% CI: 1.626 \sim 4.222$) for hepatocellular carcinoma when compared with GG genotype. Interactions were found between infection of HBsAg and *XPD*312 ($OR = 7.348$), as well as between smoking and non-wild type gene of *XPD*751 ($OR = 4.291$) and *XPD*312 ($OR = 5.341$). **Conclusion** DNA repair *XPD*312A allelic gene might increase the risk of Hepatocellular carcinoma. Interactions between HBsAg infection, smoking and *XPD* were observed in Hepatocellular carcinoma.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; *XPD* gene; Genetic polymorphisms; Case-control study

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.07.014

基金项目:国家自然科学基金(30660162);广西科学研究与技术开发计划(桂科攻0719006-2-13);广西青年基金(桂科青0728066)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学公共卫生学院流行病学教研室(曾小云、纪龙、余红平);桂林医学院(仇小强)

通信作者:余红平, Email: yhp268@163.com

环境致癌物及/或其代谢产物攻击机体细胞,引起DNA损伤,如果DNA损伤得不到及时有效修复,细胞将发生基因突变或癌变。DNA修复基因对维持基因组完整性,修复致癌因素所致的DNA损伤有着重要作用。核苷酸切除修复(NER)为DNA修复的重要途径,主要涉及的基因有*XPD*、*XPC*、*ERCC1*等,且核苷酸切除修复基因具有高度多态性。修复基因突变后可能引起DNA修复能力的改变,从而导致机体对肿瘤易感性的改变。*XPD*基因是NER系统的主要成员。研究显示,*XPD*基因单核苷酸多态性(SNP)可能通过改变DNA修复能力,影响肺、食管、乳腺等多个部位肿瘤的发病风险^[1-4]。本研究采用TaqMan MGB荧光定量实时PCR分析方法,探讨*XPD*基因2个最常见的多态位点*XPD A35931C (Lys751 Gln)*、*XPD G23591A (Asp312 Asn)*多态性与肝细胞癌(HCC)的关系及其基因-环境交互作用,为寻找个体对HCC易感的分子标志物提供依据。

对象与方法

1. 研究对象:采用以医院为基础的病例对照研究方法。所有研究对象均来自具有相似暴露背景的广西肝癌高发区。病例组选择参照2000年中国肝癌协会专业委员会修订的临床诊断标准,从2007年6月至2008年6月,选择到广西医科大学第一附属医院住院的HCC新发病例320例,病例均同意参与调查并经组织病理学确诊,且未接受化疗和放射治疗;对照组选自同期住院的脊柱骨科、创伤外科非肿瘤患者,与病例来自相同地区,共收集对照340例。

2. 现场调查:采用统一的调查表,经患者知情同意后,由专门培训的调查员对研究对象进行面对面调查。内容包括:基本情况、既往史、个人史、家族史、吸烟史、饮酒史等。于研究对象入院次日清晨采集空腹静脉血标本3 ml,置于抗凝管中混匀备用,于当日提取基因组DNA。采用常规酚/氯仿法提取基因组DNA, -20℃保存备用。

3. *XPD*基因分型:基因分型采用美国应用生物系统(ABI)公司的7500 Fast实时定量PCR仪和TaqMan SNP基因分型试剂盒。分析的2个等位基因位点为:*XPD751 (rs13181)*和*XPD312 (rs1799793)*。PCR反应体系总体积为25 μ l,包括2 \times TaqMan Universal PCR Mix 12.50 μ l, 20 \times SNP Genotyping Assay Mix 1.25 μ l, DNA 1.00 μ l, H₂O 10.25 μ l。PCR反应条件为95℃ \times 10 min \rightarrow (92℃ \times 15 s \rightarrow 60℃ \times 1 min) \times 40个循环。基因分型应用7500

Fast System V1.3.1 SDS软件进行分析。对实验中不能分型的样本,可结合实时定量PCR的结果来寻找原因,然后重复检测,重复检测不出结果的样本剔除。为了提高实验结果的可靠性,在所有样本中随机抽取10%重复检测,2次检测结果不一致的样本也剔除。

4. 统计学分析:应用SPSS 13.0软件进行统计分析。样本均数的比较采用*t*检验,计数资料的比较采用 χ^2 检验。以比值比(OR)及其95%可信区间(CI)表示相对危险度,OR及其95%CI、因素间的交互作用以非条件logistic回归模型进行分析。所有统计检验均为双侧概率检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

1. 一般情况:调查共收集到符合要求、资料完整的HCC新发病例300例和相应对照312例。经均衡性检验,病例组与对照组在年龄、性别、民族方面差异均无统计学意义($P>0.05$),但吸烟、饮酒、HBsAg阳性在两组间差异均有统计学意义($P<0.05$),结果见表1。

表1 病例组和对照组的一般情况

特征	病例组(n=300)	对照组(n=312)	P值
性别			0.174
男	253	250	
女	47	62	
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	48.88 \pm 11.37	48.10 \pm 11.42	0.398
民族			0.319
汉族	214	211	
壮族	84	96	
其他民族	2	5	
吸烟			0.022
是	85	59	
否	215	253	
饮酒			<0.001
是	103	66	
否	197	246	
HBsAg			<0.001
阳性	198	60	
阴性	102	252	

2. Hardy-Weinberg平衡吻合度检验:将对照组的*XPD751*位点和*XPD312*位点各基因型做Hardy-Weinberg遗传平衡吻合度检验,各型 χ^2 值=(实际数-预期数)²/预期数计算得出。结果表明对照组中各基因型分布符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律,对照组研究对象具有群体代表性。

3. *XPD*基因多态性与HCC发病风险的关系:*XPD*基因751位点3种基因型AA、AC、CC在病例组

的分布频率分别为 87.7%、10.6%、1.7%，在对照组的分布频率分别为 86.5%、12.5%、1.0%，但两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。XPD 基因 312 位点 3 种基因型 GG、GA、AA 在病例组的分布频率分别为 68.0%、30.7%、1.3%，在对照组的分布频率分别为 80.8%、17.3%、1.9%，两组比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 15.11, P < 0.01$)。经多因素调整后，与携带 XPD312 野生纯合子 GG 基因型者比较，携带 AA 突变纯合基因型个体罹患 HCC 的风险是 GG 基因型的 2.67 倍 (95%CI: 0.431 ~ 16.537)，但差异无统计学意义；携带至少一个 XPD312 A 等位基因的个体罹患 HCC 的风险是 GG 基因型的 2.62 倍 (95%CI: 1.626 ~ 4.222)，且差异有统计学意义，可认为 XPD 基因 312 位点多态性与 HCC 的发生有统计学关联，XPD312 GA 或 AA 基因型个体患 HCC 危险性增高，XPD312A 是 HCC 的危险等位基因。结果见表 2。

表 2 XPD 各基因型在病例组与对照组中频率分布及其与 HCC 风险的关系

基因型	病例组* (n=300)	对照组* (n=312)	OR 值(95%CI)	P 值*
XPD 基因 751 位点				
AA	263(87.7)	270(86.5)	1.000	
AC	32(10.6)	39(12.5)	0.391(0.075 ~ 2.046)	0.266
CC	5(1.7)	3(1.0)	0.268(0.046 ~ 1.556)	0.142
AC+CC	37(12.3)	42(13.5)	0.753(0.409 ~ 1.386)	0.363
XPD 基因 312 位点				
GG	204(68.0)	252(80.8)	1.000	
GA	92(30.7)	54(17.3)	0.992(0.165 ~ 5.976)	0.993
AA	4(1.3)	6(1.9)	2.670(0.431 ~ 16.537)	0.291
GA+AA	96(32.0)	60(19.2)	2.620(1.626 ~ 4.222)	0.000

注：*括号外数据为人数，括号内数据为百分比(%)；^a经调整吸烟、饮酒、HBsAg 阳性等因素

4. XPD 基因-基因、基因-环境交互作用与 HCC 易感性的关系：对 XPD 基因的 2 个位点及吸烟、饮酒、HBsAg 阳性 3 个危险因素进行基因-基因、基因-环境因素两两组合，共得到 7 个组合，将 7 个组合进行非条件 logistic 逐步回归分析，按选入 $\alpha = 0.05$ ，剔除 $\alpha = 0.1$ 水平，结果表明 XPD 基因 312 位点多态性与吸烟、751 位点多态性与吸烟、312 位点多态性与 HBsAg 阳性之间存在交互作用，结果见表 3。

讨 论

XPD 是 ATP 依赖的 5' → 3' 解旋酶，参与核苷酸切除修复，同时还参与组成 II 型转录因子 H 复合物及 p53 介导的凋亡反应，是一个多功能的基因^[5]。密码子 312 G → A (Asp → Asn) 和密码子 751 A → C (Lys → Gln) 为 XPD 基因最常见的 2 个多态性位点。大量分

表 3 XPD 基因-基因、基因-环境交互作用的 logistic 逐步回归分析结果

因 素	β	Wald χ^2 值	P 值	OR 值(95%CI)
XPD751*XPD312	-0.106	0.625	0.429	0.899(0.691 ~ 1.170)
XPD312*吸烟	1.675	9.770	0.002	5.341(1.868 ~ 15.269)
XPD312*饮酒	-0.110	0.032	0.857	0.896(0.270 ~ 2.973)
XPD312*HBsAg 阳性	1.994	20.602	0.000	7.348(3.106 ~ 17.386)
XPD751*吸烟	1.456	7.068	0.008	4.291(1.466 ~ 12.500)
XPD751*饮酒	0.629	1.078	0.299	1.876(0.572 ~ 6.153)
XPD751*HBsAg 阳性	0.340	0.641	0.423	1.405(0.611 ~ 3.232)

子流行病学研究结果显示，XPD312 和 XPD751 与恶性肿瘤危险性有关，且这 2 个多态位点的基因型分布存在种族和地区差异，提示存在基因与环境的交互作用。

本研究选择广西肝癌高发区的 HCC 患者及其对照作为研究对象，结果显示，XPD 基因 751 位点 3 种基因型 AA、AC、CC 在 HCC 组的分布频率分别为 87.7%、10.6%、1.7%，在对照组的分布频率分别为 86.5%、12.5%、1.0%，经调整吸烟、饮酒、HBsAg 阳性等因素后，基因型分布两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，认为 XPD 基因 751 位点多态性与 HCC 的发生无统计学关联。但有研究显示 XPD751 位点基因多态性与 HCC 风险可能有关^[6]，由于该样本量太小其结果仍需进一步验证。Yu 等^[7]研究显示，XPD751 Gln/Gln 基因型个体患食管鳞癌的危险性升高 ($OR = 6.71$)；在吸烟者中，XPD751 Gln/Gln 基因型比 751 Lys/Lys 基因型者患食管鳞癌的危险性增加 8 倍 ($OR = 8.42$)。但有研究发现 Lys751 Gln 突变等位基因是肺鳞癌的可疑危险因素 ($OR = 1.52$)，而与肺腺癌无关^[8]。应用匹配病例对照研究也发现 XPD751 Gln/Gln 及 751 Lys/Gln 与患膀胱癌危险性无关^[9]，但是携带 Lys/Lys 或 Lys/Gln 基因型的吸烟者患膀胱癌的危险性比 Gln/Gln 基因型的吸烟者高 2 倍。本研究结果与同类研究结果并不一致，主要是因为本研究所选择的对象和使用的检测方法不同，提示不同地区和人群存在遗传差异，XPD 基因 751 位点多态变异在不同肿瘤的发生中发挥不同作用；当然，XPD 基因 751 位点 SNP 与各种肿瘤是否确有关联，还需要有多中心大样本的前瞻性研究加以验证。

有关 XPD 基因 312 位点 SNP 与 HCC 的关系研究，国内外鲜见报道。梁刚等^[10]的研究发现，XPD312 Asn 等位基因以及 751 Gln 等位基因可能是中国上海地区人群胆道癌尤其是壶腹部癌风险的遗传易感因素。Hu 等^[11]为了阐明 XPD 基因多态性对肺癌危险的影响，对 9 项病例对照研究的 3725 例肺癌

和 4152 名对照的数据进行 Meta 分析, 结果表明 *XPD751C* 和 312 A 是肺癌的危险等位基因, 携带 *XPD751Gln* 和 312 Asn 基因型个体患肺癌危险性增高。本研究率先探讨 *XPD312* SNP 与 HCC 的关系, 结果表明, 携带 AA 突变纯合基因型个体罹患 HCC 的风险是 GG 基因型的 2.67 倍, 但差异无统计学意义; 携带至少一个 *XPD312 A* 等位基因的个体罹患肝癌细胞癌的风险是 GG 基因型的 2.62 倍, 差异有统计学意义; 可认为 *XPD* 基因 312 位点多态性与 HCC 的发生有统计学关联, *XPD312 GA* 或 AA 基因型个体患 HCC 危险性增高, *XPD 312 A* 是 HCC 的危险等位基因。其具体的机制有待进一步研究。

饮酒是肝癌的重要危险因素之一。已知酒精在体内的代谢过程主要为乙醇转化为乙醛, 乙醛转化为乙酸, 乙醛已被证实有明显的致癌作用。但本次研究未能发现 *XPD* 基因 SNP 与饮酒之间存在交互作用。这可能是由于酒的种类很多, 度数有高有低, 多少度的酒才算是饮酒暴露, 在调查过程中有时很难把握, 会存在信息偏倚, 也许 *XPD* 基因 SNP 与饮酒之间确实不存在交互作用, 在 HCC 的发生过程中单独发挥作用。HBV 慢性感染是 HCC 发生的主要危险因素, 且广西南部地区是 HBV 感染的高暴露区。HBV 感染患者并同时伴有 *XPD751* 位点为 *Gln/Lys* 或 *Gln/Gln* 基因型的个体, 其 HCC 发生的危险性是 HBV 阴性及 *XPD751* 位点为 *Lys/Lys* 野生型基因型个体的 6.68 倍 ($OR=6.68$)^[6], *XPD751* 位点基因多态性和 HBV 感染之间可能存在基因-环境交互作用。本次研究结果表明, *XPD751* 位点基因多态性和 HBV 感染之间不存在基因-环境交互作用, 与上述结果不一致; 而 *XPD312* 位点和 HBV 感染之间存在基因-环境交互作用, 且有 *XPD312* 突变 A 等位基因的个体其 HCC 发生的危险性 ($OR=7.35$) 远比携带 *XPD312 A* 等位基因单独作用 ($OR=2.62$) 时高, HBV 感染阳性能加强 *XPD312* 基因多态在 HCC 发生中的作用。我国人群中吸烟率较高, 吸烟与肿瘤关系的研究也是一个普遍被关注的问题, 然而, 迄今为止国内有关吸烟与肿瘤关系的流行病学研究结果多不一致。本研究结果表明 *XPD* 基因 312 位点多态性与吸烟、751 位点多态性与吸烟之间存在交互作用。这与 Xing 等^[8] 在肺癌的研究中发现 312 Asn 和 751 Gln 与吸烟有明显交互作用的结果一致。吸烟增加患肝癌的风险, 一些与吸烟有关的肿瘤极易转移到肝脏继发肝癌, 烟草中含有多种有毒有害物质并可产生活性氧化自由基, 从而可导致 DNA 损伤和细

胞癌变。

有研究显示, 单独突变基因型对肿瘤危险性或许并不明显, 但是携带突变基因者暴露于环境危险因素后可能发生肿瘤的危险性极大提高, 环境因素可能通过基因突变的机制来影响肿瘤的发生。本次研究结果也证明了这一点, 这对制定相关肿瘤的一级预防是非常重要的。当我们发现携带有某一易感基因的对象时, 目前尚不能通过改变其肿瘤易感的基因型来预防或治疗肿瘤, 但可以根据其与环境因素交互作用的特点, 针对携带突变基因的个体, 采取相应的环境暴露控制措施, 如通过个人戒烟、公共场所控烟、对高危人群进行乙肝疫苗的接种等措施来达到有效预防肝癌的目的。因此, 正确地认识和识别基因-环境的交互作用, 在肿瘤易感性基础上评价环境危险因素在肝癌发生中的地位, 对制定相应的预防措施和了解 HCC 的发病机制有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Parikh S, Hyman D. Hepatocellular cancer: a guide for the internist. *Am J Med*, 2007, 120(3): 194-202.
- [2] Spitz MR, Wu X, Wang Y, et al. Modulation of nucleotide excision repair capacity by *XPD* polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res*, 2001, 61(4): 1354-1357.
- [3] Ye W, Kumar R, Bacova G, et al. The *XPD751Gln* allele is associated with an increased risk for esophageal adenocarcinoma: a population-based case-control study in Sweden. *Carcinogenesis*, 2006, 27(9): 1835-1841.
- [4] Terry MB, Gammon MD, Zhang FF, et al. Polymorphism in the DNA repair gene *XPD*, polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, cigarette smoking, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13(12): 150-155.
- [5] Lunn RM, Hellzlsouer KJ, Parshad R, et al. *XPD* polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis*, 2000, 21(4): 551-555.
- [6] 许丽, 吴一迁, 金晏, 等. DNA 修复基因 *XPD* 多态性和肝细胞肝癌危险性的病例-对照研究. *肿瘤*, 2004, 24(6): 526-529.
- [7] Yu HP, Wang XL, Sun X, et al. Polymorphisms in the DNA repair gene *XPD* and susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004, 154(1): 10-15.
- [8] Xing DY, Tan W, Wei QY, et al. Polymorphisms of the DNA repair gene *XPD* and risk of lung cancer in a Chinese population. *Lung Cancer*, 2002, 38(2): 123-129.
- [9] Stern MC, Johnson LR, Bell DA, et al. *XPD* codon 751 polymorphism metabolism genes smoking and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002, 11(10 Pt 1): 1004-1011.
- [10] 梁刚, 程家蓉, 张学宏, 等. DNA 修复基因 *XPD* 核苷酸多态与胆道癌遗传易感性. *肿瘤*, 2006, 26(5): 444-449.
- [11] Hu Z, Wei Q, Wang X, et al. DNA repair gene *XPD* polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis. *Lung Cancer*, 2004, 46(1): 1-10.

(收稿日期: 2008-09-16)

(本文编辑: 尹廉)