

HBV、HCV 感染和 XPC 基因 Ala499Val、Lys939Gln 与肝癌关系的 1:1 匹配病例对照研究

蔡旭玲 部艳晖 余卓文 吴兆权 周卫平 杨翌 许雅 宋韶芳 陈思东

【摘要】 目的 探讨环境因素 HBV、HCV 感染与 DNA 修复基因 XPC 第 8 外显子 Ala499Val、第 15 外显子 Lys939Gln 交互作用在原发性肝癌(肝癌)发生中的作用。方法 在广东省顺德地区采用 1:1 匹配的病例对照研究,PCR 技术检测 Ala499Val、Lys939Gln 基因型,条件 logistic 回归分析环境与基因单独作用和交互作用对肝癌的影响。结果 HBsAg 阳性者中,无携带 Ala499Val 突变型基因者和至少携带一个突变型基因者的 OR 值分别为 3.768(95%CI: 1.137~12.485)和 3.667(95%CI: 1.122~11.981);无携带 Lys939Gln 突变型基因者和至少携带一个突变型基因与肝癌关联的 OR 值分别为 6.778(95%CI: 2.025~22.688)和 3.152(95%CI: 1.062~9.351)。HCV 感染者中,无携带 Ala499Val 突变型基因和至少携带一个突变型基因的 OR 值为 2.955(95%CI: 0.587~14.869)和 1.085(95%CI: 0.307~3.839);携带至少一个突变型基因和无携带 Lys939Gln 突变型基因相比,OR 值由 4.197(95%CI: 0.870~20.243)降低为 0.887(95%CI: 0.228~3.448)。但基于相乘模型的基因和环境交互作用均未达到统计学意义。结论 携带 Ala499Val 突变型基因有降低 HCV 感染者的肝癌发病风险的趋势;而携带 Lys939Gln 突变型基因对 HBV 感染者和 HCV 感染者的肝癌发病风险都有降低的趋势,需要加大样本量进一步研究。

【关键词】 原发性肝癌; XPC 基因多态性; 乙型肝炎病毒感染; 丙型肝炎病毒感染; 交互作用

A 1:1 matched case-control study on the interaction between HBV, HCV infection and DNA repair gene XPC Ala499Val, Lys939Gln for primary hepatocellular carcinoma CAI Xu-ling^{*}, GAO Yan-hui, YU Zhuo-wen, WU Zhao-quan, ZHOU Wei-ping, YANG Yi, XU Ya, SONG Shao-fang, CHEN Si-dong. *Public Health College, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510310, China*
Corresponding author: CHEN Si-dong, Email: chensidong@tom.com

【Abstract】 Objective To evaluate the interaction between environmental factors, HBV/HCV infections and DNA repair gene XPC exon 8 Ala499Val, exon 15 Lys939Gln on related risks to primary hepatocellular carcinoma (PHC). **Methods** A 1:1 matched case-control study was conducted in Shunde city, Guangdong province. The genotypes of Ala499Val and Lys939Gln were detected by polymerase chain reaction restrictive fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis, and gene-environment interactions were analyzed by conditional logistic regression. **Results** Among people infected by HBV with non- or at least one mutant gene of Ala499Val carriers, the risk of PHC significantly increased, with ORs as 3.768 (95% CI: 1.137-12.485) and 3.667 (95% CI: 1.122-11.981) respectively. With non- or at least one mutant gene of Lys939Gln, the risk was increasing with ORs as 6.778 (95% CI: 2.025-22.688) and 3.152 (95% CI: 1.062-9.351) respectively. In those with HCV infection, non- or at least one mutant gene of Ala499Val might increase the risk with ORs as 2.955 (95% CI: 0.587-14.869), 1.085 (95% CI: 0.307-3.839) respectively. However, when compared to the ones with no mutant gene of Lys939Gln among the same research subjects, those carrying at least one gene may decrease the risk, with OR lowered from 4.197(95%CI: 0.870-20.243) to 0.887(95%CI: 0.228-3.448). But the interactions between HBV infection, HCV infection and XPC genes were not statistically significant. **Conclusion** Among people infected by HCV, the mutant gene of Ala499Val had the tendency to lower the risk of PHC, and the mutant gene of Lys939Gln also appeared the same in the population with either HBV infection or HCV infection in Shunde, Guangdong. Another study with large samples should be performed to analyze the interactions among environments-genes.

【Key words】 Primary hepatocellular carcinoma; XPC gene polymorphisms; Hepatitis B virus infection; Hepatitis C virus infection; Interaction

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.09.020

基金项目:国家自然科学基金青年基金(30500421)

作者单位:510310 广州,广东药学院公共卫生学院(蔡旭玲、部艳晖、周卫平、杨翌、许雅、宋韶芳、陈思东);佛山市顺德区慢性病防治中心(余卓文、吴兆权)

通信作者:陈思东, Email: chensidong@tom.com

我国原发性肝癌(肝癌)的年发病率和死亡率均占癌症第 2 位^[1]。近年来的研究显示,环境因素如 HBV、HCV 作用于机体,可能引起机体的 DNA 损伤或影响机体 DNA 修复的能力,从而导致肿瘤的发生^[2]。DNA 修复基因是一条与环境应答有关的通路,其中 XPC(xeroderma pigmentosum group C)基因编码的 XPC 蛋白可与损伤的 DNA 结合,从而启动核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)作用^[3]。XPC 第 8 外显子 Ala499Val SNP、第 15 外显子 Lys939Gln SNP 位点碱基的改变,使机体的 DNA 损伤修复能力和癌症的易感性各不相同^[4-7]。多数研究局限于环境或基因的研究,缺少基因-环境交互作用的关注,但后者在肿瘤的发生、发展中起着更重要的作用。目前,HBV、HCV 感染与 Ala499Val、Lys939Gln 的交互作用和肝癌的发病风险关系尚未见报道。2006 年全国第三次死因调查(顺德区)资料显示该地区肝癌的标化死亡率(标准人口采用 2000 年第五次全国人口普查结果)为 60.66/10 万^[8],成为当地最主要的公共卫生问题。本研究在顺德地区进行 1:1 匹配的病例对照研究,探索 HBV、HCV 的感染和人群 XPC 第 8 外显子 Ala499Val、第 15 外显子 Lys939Gln 各自的主效应及交互作用与肝癌的关联,为其病因学研究提供线索。

对象与方法

1. 研究对象:本研究现场调查时间为 2006—2008 年。病例组来源于 1996—2007 年广东省顺德地区各医院(顺德区第一人民医院、顺德区中医院、勒流医院、均安医院、杏坛医院、乐从医院、容奇医院、桂州医院、伦教医院、北滘医院、陈村医院、大良医院)和广东省肿瘤医院 13 家医院经临床资料和组织病理学检查确诊为肝癌且在顺德地区居住 10 年及以上,调查时仍存活的住院病例,共 78 例,其中 6 例(7.69%)为 2004 年前诊断。对照组来自各镇居民住户名单,采用 1:1 匹配方法,选取年龄与病例发病年龄(以诊断时年龄为准)±3 岁、同性别、居住在同村 10 年及以上、与病例无血缘关系的健康个体 78 人。调查员经统一培训,在各镇医院防保科工作人员的协调下入户调查,完成调查表的同时,采集血样 5 ml。

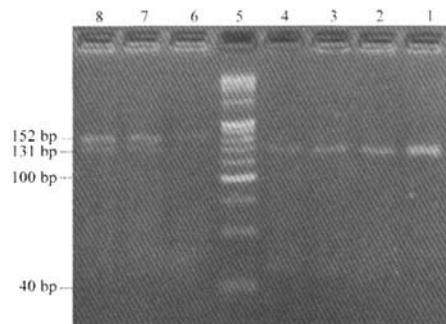
2. 血清学指标检测:按说明书采用 ELISA 方法检测病例与对照的 HBsAg、抗-HCV 并判定结果。试剂盒为上海科华生物科技有限公司生产。

3. DNA 提取:收集研究对象的静脉血标本,采

用改良 Miller 法抽提人外周血白细胞 DNA^[9], -20℃ 低温冰箱保存。

4. 基因分型:应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测 XPC 基因第 8 外显子 Ala499Val 及第 15 外显子 Lys939Gln 基因型。

(1) XPC 基因第 8 外显子 Ala499Val: ① PCR 反应体系为 20 μl, 其中模板 DNA 100 ng, 10×PCR 缓冲液(15 mmol/L MgCl₂) 2 μl, Taq DNA 聚合酶(大连宝生物公司) 1 U, 2.5 mmol/L 的 dNTPs 1.3 μl, 20 μmol/L 的上游引物(5'-TAA GGA CCC AAG CTT GCC CG-3')以及下游引物(5'-CCC ACT TTT CCT CCT GCT CAC AG-3')各 0.1 μl。② PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min 后, 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环后, 72℃ 继续延伸 7 min。③ PCR 产物经限制性内切酶 Sac II(大连宝生物公司)于 37℃ 酶切 16 h 后, 进行 4% 琼脂糖凝胶电泳。C/C 基因型(野生型)存在 Sac II 的识别位点产生 131 bp 和 21 bp 两条 DNA 片段, 而 T/T 基因型(突变型)缺乏 Sac II 的识别位点保持原有 PCR 后的 152 bp 的片段, C/T 基因型(杂合型)则显示为 152、131 和 21 bp 3 条片段(图 1, 其中 21 bp 因片段太小无法在图中显示)。

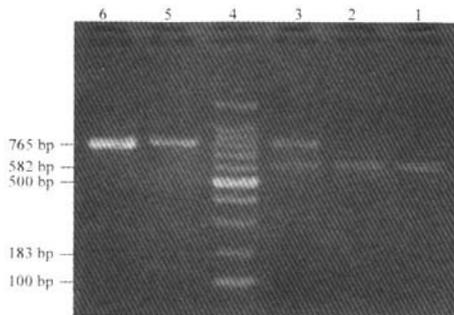


注:1~4:C/C 基因型; 5:20 bp DNA Ladder Marker; 6:T/T 基因型; 7,8:C/T 基因型

图 1 XPC Ala499Val 基因型分型

(2) XPC 基因第 15 外显子 Lys939Gln: ① PCR 反应体系为 20 μl, 其中模板 DNA 100 ng, 10×PCR 缓冲液(15 mmol/L MgCl₂) 2.6 μl, Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 2.5 mmol/L 的 dNTPs 1.6 μl, 20 μmol/L 的上游引物(5'-GGA GGT GGA CTC TCT TCT GAT G-3')和下游引物(5'-TAG ATC CCA GCA GAT GAC C-3')各 0.2 μl。② PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min 后, 94℃ 变性 45 s, 65℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环后, 72℃ 继续延伸 1 min。③ PCR 产物经限

制性内切酶 Pvu II (大连宝生物公司)于 37℃ 酶切 16 h 后。进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。C/C 基因型(突变型)存在 Pvu II 的识别位点产生 582 bp 和 183 bp 2 条 DNA 片段,而 A/A 基因型(野生型)缺乏 Pvu II 的识别位点,保持原有 PCR 产物 765 bp 片段,A/C 基因型(杂合型)则显示为 765、582 和 183 bp 3 条片段(图 2)。



注:1,2:C/C 基因型;3:A/C 基因型;4:100 bp DNA Ladder Marker;5,6:A/A 基因型

图 2 XPC Lys939Gln 基因型分型

对于基因分型结果,随机挑选 3 种不同基因型约 10% 的样本标本重复检测,都获得了 100% 的一致结果。

5. 统计学分析:数据录入与分析分别采用 EpiData 3.1 和 SPSS 13.0 统计软件;应用条件 logistic 回归模型分析 HBV、HCV 感染与 Ala499Val、Lys939Gln 基因单独作用和联合作用及基于相乘模型的交互作用^[10],探讨其与肝癌的关联,用 OR 值及其 95%CI 描述关联的大小。

结 果

1. 研究对象一般情况:病例与对照组中男性各 70 例,占 89.7%;女性各 8 例,占 10.3%。病例组诊断年龄为 32~82 岁,平均 57.31 岁±11.96 岁。对照组年龄为 29~82 岁,平均 56.91 岁±11.88 岁;病例组与对照组的文化程度分布差异无统计学意义($\chi^2=4.080, P=0.253$)。

2. HBV、HCV 感染与 Ala499Val 基因的单、联合与交

互作用效应:表 1 为 HBV、HCV 感染与 Ala499Val 基因叉生分析表,可见 HBsAg 阴性者携带 Ala499Val 至少一个突变型基因的 OR 值是 0.800 (95%CI: 0.310~2.064);HBsAg 阳性者中,无携带 Ala499Val 突变型基因者和至少携带一个突变型基因者的 OR 值分别为 3.768 (95%CI: 1.137~12.485) 和 3.667 (95%CI: 1.122~11.981)。抗-HCV 阴性者携带 Ala499Val 至少一个突变基因的 OR 值为 0.649 (95%CI: 0.322~1.305);但抗-HCV 阳性者中至少携带一个突变型基因和无携带 Ala499Val 突变型基因相比,OR 值由 2.955 (95%CI: 0.587~14.869) 降为 1.085 (95%CI: 0.307~3.839),但交互作用还未达到统计学意义。

3. HBV、HCV 感染与 Lys939Gln 基因的单、联合与交互作用效应:表 2 为 HBV、HCV 感染与 Lys939Gln 基因的叉生分析表。在 HBsAg 阳性者中,未携带 Lys939Gln 突变型基因与肝癌关联的 OR 值为 6.778 (95%CI: 2.025~22.688),而携带至少一个突变基因与肝癌关联的 OR 值降低为 3.152 (95%CI: 1.062~9.351)。抗-HCV 阳性者中携带至少一个突变型基因和未携带 Lys939Gln 突变型基因

表 1 HBV、HCV 感染与 Ala499Val 基因和肝癌的关系

变 量	病例组		对照组		OR 值(95%CI)	P 值
	例数	构成比(%)	例数	构成比(%)		
HBsAg Ala499Val						
-	14	17.95	19	24.36		
+	18	23.08	40	51.28	0.800(0.310~2.064)	0.645
+	22	28.21	8	10.26	3.768(1.137~12.485)	0.030
+	24	30.77	11	14.10	3.667(1.122~11.981)	0.031
HBsAg Ala499Val* 抗-HCV					1.216(0.256~5.783)	0.806
-	28	35.90	24	30.77		
+	36	46.15	46	58.97	0.649(0.322~1.305)	0.225
+	8	10.26	3	3.85	2.955(0.587~14.869)	0.189
+	6	7.69	5	6.41	1.085(0.307~3.839)	0.899
抗-HCV Ala499Val*					0.566(0.075~4.260)	0.581

注:Ala499Val -无携带突变基因(C/C 基因型);+携带至少一个突变型基因(C/T 或和 T/T 基因型);*相乘模型的交互作用

表 2 HBV、HCV 感染与 Lys939Gln 基因和肝癌的关系

变 量	病例组		对照组		OR 值(95%CI)	P 值
	例数	构成比(%)	例数	构成比(%)		
HBsAg Lys939Gln						
-	14	17.95	26	33.33		
+	18	23.08	33	42.31	1.063(0.443~2.546)	0.892
+	25	32.05	7	8.97	6.778(2.025~22.688)	0.002
+	21	26.92	12	15.38	3.152(1.062~9.351)	0.039
HBsAg Lys939Gln* 抗-HCV					0.438(0.091~2.113)	0.304
-	30	38.46	31	39.74		
+	34	43.59	39	50.00	0.876(0.423~1.817)	0.722
+	9	11.54	2	2.56	4.197(0.870~20.243)	0.074
+	5	6.41	6	7.69	0.887(0.228~3.448)	0.862
抗-HCV Lys939Gln*					0.241(0.028~2.064)	0.194

注:Lys939Gln -无携带突变基因(A/A 基因型);+携带至少一个突变型基因(A/C 或和 C/C 基因型);*相乘模型的交互作用

相比, *OR* 值由 4.197(95%*CI*: 0.870 ~ 20.243) 降低为 0.887(95%*CI*: 0.228 ~ 3.448)。

讨 论

HBV、HCV 感染是肝癌的主要危险因素。曾运红和谭卫仙^[11]对近 15 年的肝癌危险因素流行病学研究结果进行 Meta 分析, 表明环境因素中的 HBV 感染、抗-HCV 与肝癌关系的合并 *OR* 值分别为 8.90(95%*CI*: 7.19 ~ 11.00)、4.41(95%*CI*: 2.72 ~ 7.14)。流行病学调查发现, HBV 感染与肝癌地理分布一致, 与肝癌发病之间的关系非常显著且有高度特异性, 在 HBV 携带者中未见其他类型癌症增加^[12]。合并 HBV 感染的 PHC 存在高水平的 HBV 复制, 其 HBV DNA 含量越高, 整合入肝细胞染色体 DNA 的机会越大, 肝细胞癌变的可能性增大^[13]。而 HCV 感染与日本和欧美部分国家肝癌发生密切相关^[14]。与 HBV 的作用机制相比, HCV 的致癌机制尚不明确, 可能与 HCV 在体内不断变异并在体内长期贮存、复制和积累细胞基因的突变, 最终发生恶性转变有关^[15]。

暴露于相同环境危险因素的不同个体间患病存在很大的差异, 提示遗传因素可能在肿瘤的发病中起重要作用。DNA 修复基因是影响环境的遗传易感性的主要因素之一。它对环境致癌物通过外源或内源性诱变因素导致肝细胞的 DNA 损伤进行核苷酸切除修复(NER), 以减少 DNA 损伤造成的基因突变, 是抗癌的重要机制^[16]。XPC 基因是 NER 系统的重要组成部分, 其第 8 外显子第 499 位密码子 C→T 多态可引起 Ala→Val 氨基酸替代, 第 15 外显子第 939 位密码子 A→C 多态可引起 Lys→Gln 氨基酸替代, 可能导致个体间 DNA 修复能力存在差异和对多种肿瘤发病风险的不同^[4-7]。

研究表明, 肿瘤是多因素、多步骤综合作用的结果, 其中基因单独作用比较微弱, 研究基因-环境交互作用有助于揭示肿瘤的发病机制。广东省顺德地区是肝癌的高发区, 但有关基因、环境的研究甚少。本次研究未显示携带 Ala499Val 有对 HBV 感染者患肝癌的风险降低作用, 但有降低 HCV 感染者发生肝癌风险的趋势; 而携带 Lys939Gln 至少一个突变型基因具有降低 HBV 感染者和 HCV 感染者发生肝癌风险的趋势, 尽管本研究受样本量小的限制, HBV、HCV 感染与两基因的交互作用都未达到统计学意义。文献报道 XPC Ala499Val 变异基因型与吸烟具有超相乘模型的交互作用, 同时有两个位点变异等位基因并吸烟者肺癌风险增加可高达 7.36 倍

(95%*CI*: 3.19 ~ 17.0)^[17]; 携带第 15 外显子 Lys939Gln C/C 基因型可能增加非吸烟个体食管癌的发病风险^[18], 但目前未见 XPC 基因与 HBV、HCV 感染的交互作用与肝癌发病风险的报道。此外, 基因-环境交互作用的结果可能与研究采用的设计, 基因的种族、地域差异, 环境中的致癌物暴露强度等因素有关。因此, 有必要在不同种族、地区扩大样本量, 进行多种环境危险因素与 DNA 修复基因间的交互作用研究, 为肝癌的防治提供更多的依据。

参 考 文 献

- [1] Wong CH, Chan SK, Chan HL, et al. The molecular diagnosis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2006, 43(1): 69-101.
- [2] 张豪, 孙桂菊. 乙型肝炎病毒和化学致癌物致肝细胞癌变的研究进展. *肿瘤*, 2004, 24(5): 509-511.
- [3] Hastly P. The impact of DNA damage, genetic mutation and cellular responses on cancer prevention, longevity and aging: observations in humans and mice. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126(1): 71-77.
- [4] Blankenburg S, Konig IR, Moessner R, et al. Assessment of 3 xeroderma pigmentosum group C gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma: a case-control study. *Carcinogenesis*, 2005, 26(6): 1085-1090.
- [5] Weiss JM, Weiss NS, Ulrich CM, et al. Interindividual variation in nucleotide excision repair genes and risk of endometrial cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14(11): 2524-2530.
- [6] Sanyal S, Festa F, Sakano S, et al. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis*, 2004, 25(5): 729-734.
- [7] Forsmti A, Angelini S, Festa F, et al. Single nucleotide polymorphism in breast cancer. *Oncol Rep*, 2004, 11(4): 917-922.
- [8] 广东佛山市顺德区慢性病防治中心工作总结报告. 2006.
- [9] Miller SA, Bykes DD, Polesky HF, et al. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res*, 1988, 16(3): 1215.
- [10] 王培桦, 沈洪兵, 陈峰, 等. 叉生分析在基因-环境交互作用研究中的应用与意义. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(1): 54-57.
- [11] 曾运红, 谭卫仙. 原发性肝癌发病主要危险因素的 Meta 分析. *现代预防医学*, 2004, 31(2): 172-174.
- [12] 陈成伟. 血清乙型肝炎病毒载量与肝细胞癌发生的关系. *中华内科杂志*, 2005, 44(9): 715-716.
- [13] 郭耿龙, 徐启桓, 陈祿彪, 等. 265 例原发性肝癌患者的乙型肝炎病毒血清学标志物分析. *新医学*, 2007, 38(1): 28-29.
- [14] 袁萍, 唐伟, 文进, 等. 中国四川和日本东京两地原发性肝癌手术患者肝炎病毒感染状况. *中华预防医学杂志*, 2005, 39(5): 332-334.
- [15] Kulesza P, Torbenson M, Sheth S. Cytopathologic grading of hepatocellular carcinoma on fine-needle aspiration. *Cancer*, 2004, 102(4): 247-258.
- [16] Goode EL, Ulrich CM, Potter JD, et al. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2002, 11(12): 1513-1530.
- [17] 胡志斌, 王永岗, 马红霞, 等. DNA 修复基因 XPC Ala499Val、Lys939Gln 多态与肺癌易感性. *中华医学遗传学杂志*, 2005, 22(4): 415-418.
- [18] 周荣秒, 李琰, 王娜, 等. XPC 基因 Ala499Val、Lys939Gln 多态与食管癌、贲门癌发病风险的关联. *癌症*, 2006, 25(9): 1113-1119.

(收稿日期: 2009-03-07)

(本文编辑: 张林东)