

ERCC1 基因多态性与肝癌易感性研究

胡志坚 薛金发 张小阳 史习舜 周红

【摘要】 目的 研究 ERCC1 基因多态性与福州地区人群肝癌易感性之间关系,及其与环境因素交互作用对肝癌发生的影响。方法 采用病例对照研究收集病例和对照暴露信息,采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术对 ERCC1-C8092A 基因多态性进行检测;通过广义线性模型模拟 ERCC1-C8092A 基因多态性与肝癌主要环境危险因素交互作用的结构模型。结果 以 ERCC1-C8092A CC 作为参照,ERCC1-C8092A CA/AA 基因型可以增加原发性肝癌的发病危险性($OR=3.789, 95\%CI: 2.792 \sim 5.142$);ERCC1-C8092A 突变与饮沟塘水、乙型肝炎病毒感染的联合作用最适模型均为超相加模型,与霉变食品联合作用为超相乘模型。结论 ERCC1-C8092A 多态可能与肝癌遗传易感有关,并与肝癌主要环境因素间存在协同作用。

【关键词】 肝肿瘤; ERCC1; 病例对照研究; 基因多态性

Relationship between genetic polymorphism of ERCC1 and susceptibility to liver cancer HU Zhi-jian¹, XUE Jin-fa², ZHANG Xiao-yang², SHI Xi-shun¹, ZHOU Hong². 1 Epidemiology and Statistics Department, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China; 2 Fuzhou Health Supervision Office
Corresponding author: HU Zhi-jian, Email: hzj99955888@126.com

This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. C0710019) and the Science & Technology Program of Fuzhou (No. 2006S-G24).

【Abstract】 **Objective** To investigate the association between genetic polymorphisms of ERCC1-C8092A and susceptibility to liver cancer, as well as the gene-environmental interaction on the etiology of liver cancer in Fuzhou. **Methods** A case-control study was conducted to collect the information on environmental exposure while genetic polymorphism of ERCC1 was analyzed by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. General relative risk regression models were further applied to fit the interaction between genetic polymorphisms of ERCC1-C8092A and the environmental factors of liver cancer. **Results** ERCC1-C8092A variant genotypes were associated with significant increasing risk of liver cancer adjusted odds ratio ($OR=3.789, 95\%CI: 2.792 \sim 5.142$), compared to the wild-type homozygote. Data from the analysis of interaction showed that genetic polymorphism of ERCC1-8092A appeared super-additive interaction with drinking pond-ditch or with hepatitis B, and super-multiplicative interaction with eating moldy food. **Conclusion** The point mutation in ERCC1-8092A was possibly susceptible to liver cancer, and related synergistically with other risk factors in hepatocellular carcinogenesis in Fuzhou.

【Key words】 Liver cancer; ERCC1; Case-control study; Gene polymorphism

原发性肝癌(PHC)的发生和演进是典型的多因素、多基因和多阶段、多途径的复杂过程,是遗传与环境因素相互作用的结果。目前,乙型肝炎病毒(HBV)感染、黄曲霉毒素污染、饮水污染已被公认为导致肝癌的三大环境因素,而这些环境致癌物又可通过外源和内源性 DNA 损伤试剂与细胞基因组

DNA 共价结合,导致细胞遗传物质的损伤。如果 DNA 损伤得不到及时有效的修复,可能最终导致基因突变和细胞癌变。因此, DNA 修复基因多态性与肝癌易感性的关系已成为当前国内外学者研究的热点。修复基因 ERCC1 (excision repair cross-complementing 1),属于核苷酸切除修复基因家族,有研究表明, ERCC1 基因多态性会导致核苷酸切除修复机制受损,影响 DNA 的损伤修复能力,进而增加人体对多种肿瘤发生的易感性^[1]。本研究应用病例对照方法探讨 ERCC1 基因多态性与福州地区人群肝癌遗传易感性的关联,并应用相对危险度函数

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.11.020

基金项目:福建省自然科学基金(C0710019);福州市科技资助项目(2006S-G24)

作者单位:350004 福州,福建医科大学流行病与卫生统计系(胡志坚、史习舜);福州市卫生监督所(薛金发、张小阳、周红)

通信作者:胡志坚, Email: hzj99955888@126.com

对 *ERCC1* 基因多态与肝癌主要的环境因素饮水污染、HBV 感染、食用霉变食品(黄曲霉毒素污染)进行模型分析,为认识肝癌的病因提供科学依据。

对象与方法

1. 研究对象:全部病例和对照均为在福州市居住 20 年以上的常住人口。2006 年 12 月至 2008 年 12 月收集福州市各大医院经诊断为 PHC 的住院病例共 388 例。病例诊断严格依照国际疾病分类 ICD-10 制定的诊断标准,排除恶性肝癌继发病例、复发病例及放疗后病例。对照选自同一医院,同期住院的非肿瘤、非消化系统疾病患者 388 例。

2. 调查内容:采用统一编制的调查表,由经过培训考核合格的调查员,经知情同意,采用面对面问卷及由调查员填写的方式收集调查表资料。病例组和对照组的问卷调查方式保持一致。调查每名研究对象的人口学特征、环境与职业暴露、日常生活行为习惯、饮食习惯、家族史及个人史。主要变量定义:① 饮沟塘水:曾饮沟塘水超过 5 年患者;② HBV 感染:HBsAg 检测阳性患者;③ 吃霉变食品:对霉变食品处理方式为直接食用或处理后食用者判为吃霉变食品,回答丢弃判为不吃霉变食品。

3. 研究方法:

(1) 血标本收集和 DNA 提取:静脉采集肝癌患者和对照外周血标本每例 5 ml,经过 EDTA 抗凝处理,离心提取白细胞,并用 DNAzol(上海生工生物工程技术有限公司)进行 DNA 提取。

(2) *ERCC1* 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)方法对 *ERCC1*-8092C→A 多态性进行分析。引物:5'-ACA GTG CCC CAA GAG GAG AT-3'(上游引物),5'-AGT CTC TGG GGA GGG ATT CT-3'(下游引物),扩增目标片段长度为 204 bp。PCR 反应体系为:总体积为 25 μ l,其中 10 \times PCR buffer(Mg²⁺ Plus)2.5 μ l,2.5 mmol/L dNTP 混合液 2 μ l,10 μ mol/L 上下游引物各为 1 μ l,5 U/ μ l Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l,DNA 模板 1 μ l,超纯水 17 μ l。PCR 反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min,变性 94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 59.3 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 45 s,35 个循环,最后延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。取 PCR 产物 5~10 μ l 进行电泳鉴定(用 Marker),于 2% 琼脂糖凝胶,90 V/cm 的电压下电泳。用 Mbo II 限制性内切酶进行酶切,酶切反应体系:超纯水 7.5 μ l;缓冲液 2 μ l;内切酶 0.5 μ l;PCR 扩增产物 10 μ l。在 37 $^{\circ}$ C 恒温箱水浴 4 h。取 5 μ l 的酶切产物,2% 的琼

脂糖凝胶中电泳,紫外灯下观察酶切条带。纯合野生型 CC 为 204 bp 1 个条带,杂合型 CA 为 204 bp、116 bp 和 88 bp 3 个条带,纯合突变型 AA 为 116 bp、88 bp 2 个条带(图 1)。

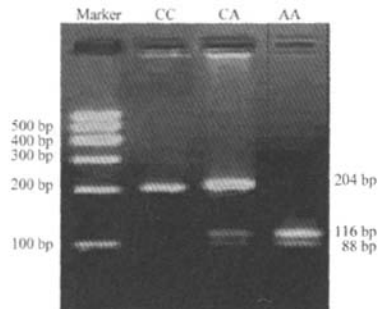


图 1 *ERCC1*-8092A 的基因分型酶切电泳结果

4. 统计学分析:以 χ^2 检验比较研究对象的人口学资料,各基因型分布情况在病例组和对照组之间的差异。单因素和多因素 logistic 回归计算比值比(OR)及其 95%CI,分析各基因型与肝癌发生危险性的关系,利用广义线性模型确定因素交互作用的结构模型^[2]。所有的统计检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 SAS 统计软件。

结 果

1. 一般情况:共调查病例组和对照组各 388 例,其人口学资料见表 1。两组在年龄、性别、文化程度上的差异无统计学意义($P > 0.05$),但在人均经济收入上的差异有统计学意义($\chi^2 = 44.473, P < 0.05$)。

表 1 研究对象人口学资料情况

特征变量	病例组		对照组		χ^2 值	P 值
	人数	构成比(%)	人数	构成比(%)		
年龄(岁)					1.749	0.883
<30	4	1.0	6	1.5		
30~	36	9.3	32	8.2		
40~	91	23.5	102	26.3		
50~	140	36.1	131	33.8		
60~	85	21.9	82	21.1		
≥ 70	32	8.2	35	9.0		
性别					0	1.000
男	303	78.1	303	78.1		
女	85	21.9	85	21.9		
文化程度					7.406	0.116
文盲及半文盲	26	6.7	28	7.2		
小学	57	14.7	72	18.6		
初中	170	43.8	134	34.5		
高中及中专	98	25.3	114	29.4		
大专及以上	37	9.6	40	10.3		
人均收入(元)					44.473	<0.001
<1000	259	66.8	194	50.0		
1000~	70	18.0	154	39.7		
≥ 2000	59	15.2	40	10.3		

2. *ERCC1* 多态性基因型与PHC危险性的关系: 表2可见, *ERCC1*-C8092A CC、CA和AA基因型在病例中的频率分别为43.56%、38.66%和17.78%, 在对照中分别为74.74%、21.65%和3.61%, 分布差异有统计学意义($P < 0.05$)。logistic回归分析发现 *ERCC1*-C8092A CA/AA基因型可以增加PHC发病危险性, A等位基因携带者(CA+AA)患肝癌的风险是CC型纯合子3.789倍($OR = 3.789, 95\%CI: 2.792 \sim 5.142$)。基因多态性位点在对照人群中均符合Hardy-Weinberg平衡(*ERCC1*-C8092A: $\chi^2 = 4.98, P > 0.05$)。

(1) *ERCC1*-C8092A 突变与饮沟塘水间交互作用分析: 由表3和图2可见, 虽然相加模型和相乘模型都能较好地拟合数据, $\lambda = 0.5$ 时, 模型的偏差度最小(Deviance=0.0026), 因此饮沟塘水与 *ERCC1*-C8092A 突变之间联合作用为超相加模型, 两者联合作用使相对危险度增加到8.20。

(2) *ERCC1*-C8092A 突变与HBV感染交互作用分析: 由表4和图3可见, 相乘模型能较好地拟合数据, 而相加模型拟合结果较差($P < 0.05$)。进一步分析可知: $\lambda = 0.001$ 时, 模型的偏差度最小(Deviance=0.0035), 拟合效果最好, 因此 *ERCC1*-C8092A 突变与HBV感染之间联合作用为超相加模型。因此两者联合作用使RR值增加到105.56。

(3) *ERCC1*-C8092A 突变与霉变食品交互作用分析: 由表5和图4可见, 相乘模型对数据的拟合效果比相加模型效果好。进一步分析提示: $\lambda = -0.1$ 时, 模型的偏差度最小(Deviance=-0.0079), 因此饮沟塘水与 *ERCC1*-C8092A 突变之间联合作用为超相乘模型。因此两者联合作用使RR值增加到17.02。

讨 论

修复基因 *ERCC1* 是核苷酸切除修复途径(NER)中的关键基因, 参于DNA的双链断裂修复^[3]。*ERCC1* 编码的297个氨基酸组成的蛋白质, 在NER

表3 *ERCC1*-C8092A 突变与饮沟塘水交互作用模型比较

<i>ERCC1</i>	饮沟塘水	观察人数	病例数	RR值		
				$\lambda=0$	$\lambda=1$	$\lambda=0.5$
-	-	438	155	1.00	1.00	1.00
-	+	21	14	3.76	2.05	3.61
+	-	290	197	2.86	2.18	3.86
+	+	27	22	10.75	3.23	8.20

模型拟合优度检验($df=1$)

偏差度	0.6409	0.1393	0.0026
χ^2 值	0.6623	0.1365	0.0026
P值	0.4157	0.7118	0.9593

表4 *ERCC1*-C8092A 突变与HBV感染交互作用模型比较

<i>ERCC1</i>	HBV感染	观察人数	病例数	RR值		
				$\lambda=0$	$\lambda=1$	$\lambda=0.001$
-	-	305	44	1.00	1.00	1.00
-	+	154	125	26.39	6.15	27.71
+	-	146	57	3.89	2.76	3.83
+	+	171	162	102.66	7.91	105.56

模型拟合优度检验($df=1$)

偏差度	0.0419	11.890	0.0035
χ^2 值	0.0416	11.313	0.0035
P值	0.8384	0.0008	0.9528

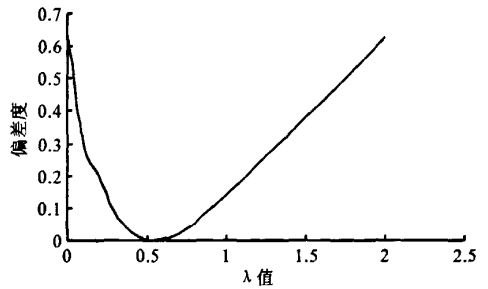


图2 对表2数据拟合相对危险性模型的偏差度曲线

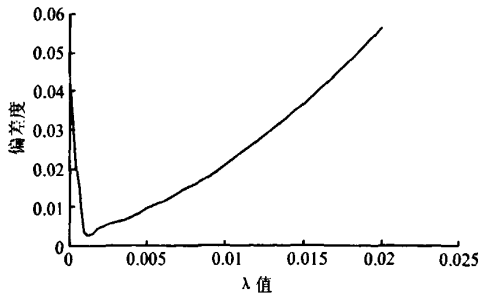


图3 对表3数据拟合相对危险性模型的偏差度曲线

通路中能识别DNA损伤, 参与同源重组和DNA链间交叉修复, 以清除体内多种DNA氧化损伤^[4]。

目前, 国内外已有不少学者对 *ERCC1* 基因多态性与肿瘤的相关性进行研究, 结果表明, *ERCC1* 基因多态

表2 两组人群 *ERCC1* 基因型和等位基因频率以及与肝癌危险性的关系

基因型	病例组(n=388)		对照组(n=388)		P值	logistic分析* OR值(95%CI)	P值
	例数	频率(%)	例数	频率(%)			
<i>ERCC1</i> -C8092A CC	169	43.56	290	74.74	<0.001		
CA	150	38.66	84	21.65		3.040(2.189 ~ 4.221)	<0.001
AA	69	17.78	14	3.61		8.270(4.512 ~ 15.161)	<0.001
AA+CA	219	56.44	98	25.26		3.789(2.792 ~ 5.142)	<0.001
A allele	288	37.11	112	14.43	<0.001		

注: *对家庭人均收入进行调整

表5 ERCCI-C8092A突变与霉变食品交互作用模型比较

ERCCI	霉变食品	观察人数	病例数	RR值		
				$\lambda=0$	$\lambda=1$	$\lambda=-0.1$
-	-	425	147	1.00	1.00	1.00
-	+	34	22	3.67	1.99	3.53
+	-	296	200	3.98	1.97	3.95
+	+	21	19	14.61	2.96	17.02

模型拟合优度检验($df=1$)

偏差度	0.1108	2.2253	0.0079
χ^2 值	0.1066	1.9163	0.0078
P值	0.7440	0.1663	0.9296

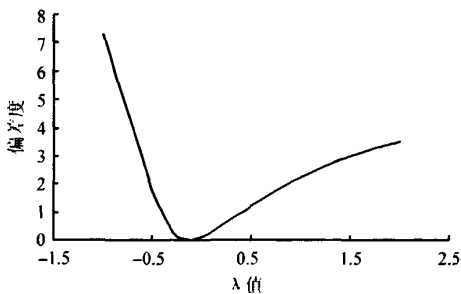


图4 对表4数据拟合相对危险性模型的偏差度曲线

性与肺癌^[5]、鼻咽癌^[6]、食管癌^[7]和白血病^[8]等多种肿瘤的发生发展有关联,但与肝癌的关系研究还较少。本研究选择ERCCI-C8092A突变位点,分析ERCCI基因多态性与福州地区人群肝癌遗传易感性的关联。结果显示:该位点基因型和等位基因频数分布在病例组和对照组间有差异,表明该SNP位点的基因多态性可能与福州地区人群肝癌发病有关联。进一步研究以携带ERCCI-C8092A的CC基因型的个体为参照,并对家庭人均经济收入进行调整,经过logistic回归分析显示:CA基因型的携带者患肝癌的风险是CC型纯合子的3.040倍($OR=3.040$, $95\%CI:2.189 \sim 4.221$),而AA基因型的携带者患肝癌的风险是CC型纯合子的8.270倍($OR=8.270$, $95\%CI:4.512 \sim 15.161$),说明CA/AA基因型可以增加PHC的发病危险性。

肝癌的发生是遗传与环境因素相互作用的结果。本次研究针对ERCCI基因多态性与饮水污染、HBV感染、黄曲霉毒素污染等肝癌的三大环境因素之间的交互作用进行分析。结果显示:ERCCI-C8092A突变与环境因素同时暴露时,大大

增加了个体患肝癌的易感性,其中ERCCI-C8092A突变与饮沟塘水及与HBV感染的联合作用最适模型均为超相加模型,ERCCI-C8092A突变与饮沟塘水联合作用的 $RR=8.20$,ERCCI-C8092A突变与HBV感染的 $RR=105.56$;而ERCCI-C8092A突变与霉变食品联合作用为超相乘模型,联合作用使RR值增加到17.02。表明基因突变与环境因素暴露同时存在时,可使患肝癌的风险大大增加,因此要预防肝癌的发生,对于一些特殊人群,比如ERCCI-C8092A突变的人群,更应加大干预措施以减少环境因素暴露,达到预防肝癌目的。

参考文献

- [1] Crew KD, Gammon MD, Terry MB, et al. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes, polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16(10):2033-2041.
- [2] Tian J. A method and SAS programs of determination the value of λ in power transformation of the odds. *J Math Med*, 2002, 15(6): 481-484. (in Chinese)
田俊. 比数幂变换的 λ 确定方法及SAS程序. *数理医药学杂志*, 2002, 15(6):481-484.
- [3] Ahmad A, Robinson AR, Uensing A, et al. ERCCI-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(16):5082-5092.
- [4] Choi YJ, Ryu KS, Ko YM, et al. Biophysical characterization of the interaction domains and mapping of the contact residues in the XPF-ERCCI complex. *J Biol Chem*, 2005, 280(31): 28644-28652.
- [5] Deng Q, Sheng L, Su D, et al. Genetic polymorphisms in ATM, ERCCI, APE1 and iASPP genes and lung cancer risk in a population of southeast China. *Med Oncol*, 2010, 31:177-184.
- [6] Yang ZH, Dai Q, Kong XL, et al. Association of ERCCI polymorphisms and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog*, 2009, 48(3):196-201.
- [7] Tse D, Zhai R, Zhou W, et al. Polymorphisms of the NER pathway genes, ERCCI and XPD are associated with esophageal adenocarcinoma risk. *Cancer Causes Control*, 2008, 19(10): 1077-1083.
- [8] Wang SL, Zhao H, Zhou B, et al. Polymorphisms in ERCCI and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. *Leuk Res*, 2006, 30(11):1341-1345.

(收稿日期:2010-04-28)

(本文编辑:张林东)