

survivin 基因易感性及其单倍型与原发性肝细胞癌关系

李玉华¹, 王姣锋¹, 江峰¹, 林文尧², 沈福民¹, 孟炜¹

摘要:目的 探讨汉族人群中存活素(survivin)基因 rs8073069 及 rs1042489 位点与原发性肝细胞癌(HCC)的相关性,为采取干预措施提供参考依据。方法 采用病例对照研究方法对在江苏省海门市 10 个社区收集的 176 例汉族 HCC 病例和随机匹配的 196 名健康汉族人群进行一般情况问卷调查以及 survivin 基因 rs8073069 和 rs1042489 位点基因型。结果 rs8073069 位点 CC、CG、GG 基因型和 C、G 2 个等位基因在 HCC 病例组的频率分别为 8.52%、35.22%、56.25%、26.14%、73.86% 在对照组的频率分别为 6.12%、39.80%、54.08%、26.02%、73.98% 不同遗传模式下 rs8073069 位点基因型和等位基因分布在 HCC 病例组与对照组间分布差异均无统计学意义($P > 0.05$); rs1042489 位点 CC、CT、TT 基因型和 C、T 2 个等位基因在 HCC 病例组的频率分别为 17.61%、55.68%、26.70%、45.45%、54.55% 在对照组的频率分别为 13.78%、52.04%、34.18%、39.80%、60.20% 不同遗传模式下 rs1042489 位点基因型及等位基因在 HCC 病例组与对照组间分布差异均无统计学意义($P > 0.05$); 多因素 Logistic 回归分析结果表明 在相加遗传模式下,HBsAg+ 和有乙肝史是 HCC 的危险因素,rs8073069G-rs1042489T 单倍型是 HCC 的保护因素;不同遗传模式下环境因素与单倍型交互作用分析结果表明,显性、隐性和相加遗传模式均未发现单倍型与环境因素的交互作用($P > 0.05$)。结论 汉族人群 survivin 基因 rs8073069 和 rs1042489 位点多态性与 HCC 的易感性无关;rs8073069G-rs1042489T 单倍型是 HCC 的保护单倍型。

关键词:原发性肝细胞癌;存活素;基因;单倍型

中图分类号: R 735.7

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)02-0177-03

Association of survivin gene susceptibility and haplotype with hepatocellular carcinoma LI Yu-hua, WANG Jiao-feng, JIANG Feng, et al. Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, Key Laboratory of Public Health Security, Ministry of Education (Shanghai 200032, China)

Abstract: Objective To explore the association of rs8073069 and rs1042489 in survivin gene with hepatocellular carcinoma(HCC) in Han population and to provide basis for effective protective measure. **Methods** Under the design of case-control study 176 Han HCC cases and 196 Han controls were selected in communities of Haimen city, Jiangsu province. Questionnaire survey on basic information was carried out and two loci of rs8073069 and rs1042489 from survivin gene were genotyped. **Results** The frequency of CC, CG, GG, C and G in rs8073069 was 8.52%, 35.22%, 56.25%, 26.14%, and 73.86% in HCC group and 6.12%, 39.80%, 54.08%, 26.02%, and 73.98% in the control group, respectively. In different genetic models, no statistically significant difference was found in genotype or allele distribution of HCC case group relative to the control group in rs8073069($P > 0.05$). In HCC group, the frequency of CC, CT, TT, C and T in rs1042489 was 17.61%, 55.68%, 26.70%, 45.45% and 54.55% and 13.78%, 52.04%, 34.18%, 39.80% and 60.20% in the control group, respectively. No statistically significant difference was found in rs1042489($P > 0.05$) either. Multivariate logistic regression indicated that HBsAg positive and the history of hepatitis B were risk factors for HCC. In addition, the haplotype of rs8073069G-rs1042489T was a protective factor for HCC in additive genetic model. However, no haplotype-environment interaction was found in different genetic models($P > 0.05$). **Conclusion** Neither rs8073069 nor rs1042489 in survivin gene is associated with the susceptibility of HCC in Han population, but rs9904341G-rs1042489T in survivin gene is a protective haplotype for HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma; survivin; gene; haplotype

存活素(survivin)属凋亡抑制蛋白家族,不仅能抑制细胞凋亡,还能调节细胞周期参与细胞的分化^[1],在多种肿瘤的发生和发展中起关键作用^[2-3]。有研究表明,survivin 基因在原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)癌组织内高表达,其表达水平与 HCC 的恶性进展及病情的复发有关^[4-5]。为探讨汉族人群中 survivin 基因 rs8073069 及 rs1042489 位点与 HCC 的相关性,为采取干预措施提供参考依据,本研究于 2006 年 6 月-2010 年 3 月采用病例对照研究方法对在江苏省海门市 10 个社区收集的 176 例汉族 HCC 病例和随机匹配的 196 名健康汉族人群进行一般情况问卷调查以及 survivin 基因 rs8073069 和 rs1042489 位点基因型。结

果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 采用病例对照研究方法,对在江苏省海门市 10 个社区收集的 176 例汉族 HCC 病例和随机匹配的 196 名健康汉族人群进行一般情况问卷调查以及 survivin 基因 rs8073069 和 rs1042489 位点基因型。所有 HCC 病例均为按照中国抗癌协会肝癌专业委员会制定标准^[6]确诊的汉族 HCC 患者;对照组人群为年龄、性别与病例组呈频数匹配且与病例组无血缘关系,同时排除有外科病史或慢性疾病史的汉族人群。

1.2 方法 (1) 问卷调查:采用自行设计调查表,由经过统一培训的调查员对研究对象进行面访调查。内容包括年龄、性别、吸烟史、饮酒史、乙肝史等一般情况。(2) 基因分型:对每个研究对象抽取 5 mL 静脉血,分离血清后于 -80 °C 保存。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术对 rs8073069 及 rs9904341 位点进行基因分型;采用 RelaxGene

作者单位: 1. 复旦大学公共卫生学院流行病学教研室 公共卫生安全教育部重点实验室,上海 200032; 2. 江苏省海门市疾病预防控制中心

作者简介: 李玉华(1985-),女,河南人,硕士在读,研究方向:遗传流行病学。

通讯作者: 孟炜, E-mail: wmeng@shmu.edu.cn

血凝块基因组提取试剂盒(北京天根生物技术有限公司) 抽提基因组 DNA。rs8073069 位点 PCR 引物设计及酶切分型参照文献^[7], PCR 扩增条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 15 s, 60.2 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 15 s, 扩增 33 个循环, 72 °C 延伸 2 min, rs8073069 位点分 CC(164 bp), CG(164、145、19 bp), GG(145、19 bp) 3 种基因型; rs1042489 位点上游引物序列为: 5' - GCTTA CCAGGTGAGAAGTGAGG - 3', 下游引物序列为: 5' - GTATCTGCCAGACGCTTCCTATC - 3', PCR 扩增条件为: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 30 s, 64.4 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 扩增 33 个循环, 72 °C 延伸 5 min; PCR 产物用 Msp I 酶(加拿大 Fermentas 公司)于 37 °C 水浴 30 min 2% 琼脂糖凝胶电泳, rs1042489 位点分 CC(297、179 bp), CT(476、297、179 bp), TT(476 bp) 3 种基因型。实验过程设立阴性对照, 严格控制交叉污染, 同时随机抽取 2% 的样本进行重复实验 2 次实验结果的符合率达 100%。

1.3 统计分析 应用 HWE 软件对 2 个位点基因型进行哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg, H-W)平衡检验; SPSS 16.0 进行单因素分析; Unphase 3.14 及 Arlequin 2.0 软件进行连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)分析; Hapstat 3.0 软件进行环境因素及单倍型环境因素的多因素 Logistic 回归分析。

2 结果

表 1 不同遗传模式下 rs8073069 和 rs1042489 位点基因型及等位基因分布

位点	遗传模式	基因型或等位基因	病例组		对照组		χ^2 值	P 值	OR 值	95% CI
			例	%	例	%				
rs8073069	显性	CC	15	8.52	12	6.12	0.794	0.373	1.000	-
		CG/GG	161	91.48	184	93.88				
	隐性	CC/CG	77	43.75	90	45.92	0.176	0.675	1.000	-
		GG	99	56.25	106	54.08				
	相加	CC	15	8.52	12	6.12	1.330	0.514	1.000	-
		CG	62	35.22	78	39.80				
	GG	99	56.25	106	54.08			0.747	0.333 ~ 1.675	
相乘	C	92	26.14	102	26.02	0.001	0.971	1.000	-	
	G	260	73.86	290	73.98					
rs1042489	显性	CC	31	17.61	27	13.78	1.038	0.308	1.000	-
		CT/TT	145	82.39	169	86.22				
	隐性	CC/CT	129	73.30	129	65.82	2.441	0.118	0.701	0.449 ~ 1.095
		TT	47	26.70	67	34.18				
	相加	CC	31	17.61	27	13.78	2.797	0.247	1.000	-
		CT	98	55.68	102	52.04				
		TT	47	26.70	67	34.18			0.611	0.323 ~ 1.155
	相乘	C	160	45.45	156	39.80	2.430	0.119	1.000	-
T		192	54.55	236	60.20					

2.4 连锁不平衡分析 连锁不平衡分析结果表明, rs8073069 和 rs1042489 2 位点在病例组及对照组中的连锁不平衡常数 D' 分别为 0.923 2 和 0.980 8, r^2 分别为 0.361 9、0.511 9, D' 经统计学检验, 均有统计学意义($P < 0.001$) 提示 rs8073069 与 rs1042489 位点间存在强连锁不平衡。

2.5 环境因素及单倍型多因素 Logistic 回归分析

2.5.1 不同遗传模式下环境因素及单倍型多因素 Logistic 回

2.1 一般情况 176 例病例组 HCC 患者中, 男性 134 例, 占 76.14%, 女性 42 例, 占 23.86%; 年龄 34 ~ 76 岁, 平均(53.31 ± 8.45) 岁; 196 名对照组人群中, 男性 153 人, 占 78.06%, 女性 43 人, 占 21.94%; 年龄(23 ~ 76) 岁, 平均(52.48 ± 8.47) 岁; 2 组性别、年龄比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。病例组饮酒、HBsAg + 和有乙肝史的比例分别为 42.61% (75/176)、72.73% (128/176) 和 40.34% (71/176), 均高于对照组的 31.12% (61/196)、6.12% (12/196) 和 0.51% (1/196), 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 病例组和对照组的吸烟比例分别为 25.57% (45/176) 和 34.18% (67/196), 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 吻合度检验 H-W 平衡检验结果表明, rs8073069 和 rs1042489 2 个位点均符合 H-W 定律(病例组中 χ^2 值分别为 1.351、2.659, 对照组中 χ^2 值分别为 0.222、1.451, P 值均 > 0.05) 提示本研究选择的样本具有较好的代表性。

2.3 基因型和等位基因频率分析(表 1) 病例组 rs8073069 位点 CC、CG、GG 基因型和 C、G 2 个等位基因与对照组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$); 病例组 rs1042489 位点 CC、CT、TT 基因型和 C、T 2 个等位基因与对照组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

归分析(表 2) 将饮酒、HBsAg +、乙肝史和 C-C、G-T 单倍型引入多因素 Logistic 回归模型进行单倍型分析, 分别以无饮酒史、HBsAg -、无乙肝史和不具有 C-C、G-T 单倍型为对照组引入模型, 根据赤池信息量准则(Akaike's Information Criteria, AIC) 值最小原则, 筛选出相加遗传模式下的回归模型为最优模型; 多因素 Logistic 回归分析结果表明, 在相加遗传模式下, HBsAg + 和有乙肝史是 HCC 的危险因素, rs8073069G -

rs1042489T 单倍型是 HCC 的保护因素。

表 2 不同遗传模式下环境因素及单倍型多因素 Logistic 回归分析

因素	显性模式			隐性模式			相加模式		
	β	P 值	OR 值	β	P 值	OR 值	β	P 值	OR 值
饮酒	0.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000
HBsAg +	3.297	<0.001	27.020	3.297	<0.001	27.020	3.297	<0.001	27.020
乙肝史	4.007	<0.001	54.976	4.007	<0.001	54.976	4.007	<0.001	54.976
C - C ^a	-0.098	0.631	0.906	0.105	0.754	1.111	-0.406	0.080	0.666
G - T ^a	-0.021	0.930	0.979	-0.427	0.039	0.653	-0.473	0.021	0.623
AIC	1 406.684			1 402.425			1 401.455		

注: a C - C、G - T 单倍型结构为 rs8073069 - rs1042489。

2.5.2 不同遗传模式下环境因素及单倍型交互作用多因素 Logistic 回归分析(表 3) 将 HBsAg +、乙肝史、G - T 单倍型以及 G - T 单倍型* HBsAg + 和 G - T 单倍型* 乙肝史 2 个单倍型 - 环境交互项引入多因素 Logistic 回归模型,分别在显

性、隐性、相加遗传模式下分析单倍型与环境因素的交互效应,结果显示,不同遗传模式下环境因素与单倍型均未发现有交互作用($P > 0.05$)。

表 3 不同遗传模式下环境因素与单倍型交互作用多因素 Logistic 回归分析

因素	显性模式			隐性模式			相加模式		
	β	P 值	OR 值	β	P 值	OR 值	β	P 值	OR 值
HBsAg +	3.305	<0.001	27.246	3.379	<0.001	29.338	3.431	<0.001	30.907
乙肝史	4.223	<0.001	68.122	4.051	<0.001	57.472	4.160	<0.001	64.065
G - T ^a	0.122	0.770	1.130	-0.170	0.618	0.844	-0.089	0.706	0.915
G - T* HBsAg +	-0.010	0.983	0.990	-0.279	0.471	0.757	-0.119	0.638	0.888
G - T* 乙肝史	-0.262	0.527	0.770	-0.149	0.683	0.861	-0.137	0.547	0.872
AIC	1 406.481			1 401.634			1 403.756		

注: a G - T 单倍型结构为 rs8073069 - rs1042489。

3 讨论

本研究结果表明,在不同遗传模式下,rs8073069 及 rs1042489 2 位点的基因型及等位基因分布在病例组和对照组间均无统计学差异,提示 *survivin* 基因 rs8073069 和 rs1042489 多态性与 HCC 的易感性无关。rs1042489 位点位于 *survivin* 基因的 3' 非编码区,本研究表明,rs1042489 多态性可能不会影响 *survivin* mRNA 的稳定性或其翻译效率。rs8073069 即 *survivin* 基因 - 625 位点, Yang 等^[7-8] 研究表明, - 625G/C 多态性与食管癌发病有关;而 Jang 等^[9] 研究未发现 - 625G/C 多态性与肺癌发病有关,与本研究中未发现? 625G/C 多态性与 HCC 有关的结果类似,这可能与不同组织来源的肿瘤受基因多态性影响的程度不同有关,也可能与 HCC 中 *survivin* 基因 - 625G/C 多态性不影响 *survivin* 基因的表达或该多态性的改变不足以导致 HCC 的病理改变有关,当然也不排除本研究样本量不足的可能性。

单个位点分析存在局限性,同时进行基因内多个位点的关联分析可能会获得更多的信息,连锁不平衡分析是研究位点间关联性的一种方法,通过 LD 分析有助于发现与疾病关联的 SNP 位点^[10]。本研究显示 rs8073069 和 rs1042489 2 位点存在强连锁不平衡;在相加遗传模式下,以不具有 G - T 单倍型为参照,具有 G - T 单倍型者 HCC 的发病风险降低($OR = 0.623$ $P = 0.021$) 提示 rs8073069G - rs1042489T 单倍型是 HCC 的保护因素。与单个位点结果不一致的原因可能是 rs8073069 和 rs1042489 多态性与 HCC 发病的关联较弱,单个位点分析效能较低,因而未能发现统计学差异,但由于这 2 个

位点间存在强连锁不平衡,因此进行 2 位点的联合效应分析提高了其检验效能,但具体原因还需进一步证实。

参考文献

- Johnson ME, Howerth EW. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein [J]. *Vet Pathol* 2004; 41(6): 599 - 607.
- 段琼红, 张金荣, 卢祖洵, 等. 大肠癌中 *survivin* 表达及相关性 [J]. *中国公共卫生* 2006; 22(12): 1421 - 1423.
- 施渺筱, 宋宝安, 杨松. 卵巢癌筛查标记物研究进展 [J]. *中国公共卫生* 2007; 23(9): 1150 - 1152.
- Montorsi M, Maggioni M, Falleni M, et al. Survivin gene expression in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma [J]. *Hepato-gastroenterology* 2007; 54(79): 2040 - 2044.
- 李先东, 曾斌, 谢立群. *survivin* 蛋白及 β - catenin 蛋白在原发性肝癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *现代肿瘤医学* 2008; 16(1): 62 - 66.
- 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌诊断标准 [J]. *中华肝脏病杂志* 2000; 8(3): 135.
- Yang X, Xiong G, Chen X, et al. Polymorphisms of *survivin* promoter are associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135(10): 1341 - 1349.
- Yang X, Xiong G, Chen X, et al. Survivin expression in esophageal cancer: correlation with p53 mutations and promoter polymorphism [J]. *Dis Esophagus* 2009; 22(3): 223 - 230.
- Jang JS, Kim KM, Kang KH, et al. Polymorphisms in the *survivin* gene and the risk of lung cancer [J]. *Lung Cancer* 2008; 60(1): 31 - 39.
- Huang Q, Fu YX, Boerwinkle E. Comparison of strategies for selecting single nucleotide polymorphisms for case/control association studies [J]. *Hum Genet* 2003; 113(3): 253 - 257.

收稿日期: 2010-10-25

(郭薇编辑 李贵福校对)