

CCND1 基因多态性与肝细胞癌遗传易感性的病例对照研究

王传鹏¹ 苏成豪^{1,2} 林勇² 张一中^{1,2}

1. 厦门大学公共卫生学院 福建 厦门 361021; 2. 厦门市疾病预防控制中心 福建 厦门 361021

摘要: 目的 探讨细胞周期蛋白 D1 基因(CCND1) rs9344 位点多态性与肝细胞癌易感性的关联; 方法 采用病例对照研究, 对经肝内穿刺活检确认的 266 例原发性肝细胞癌新发病例及经年龄、性别匹配的 306 例健康对照, 应用 MALDI-TOF 法检测 CCND1 rs9344 基因多态性, 以 χ^2 检验比较 CCND1 基因型及相关危险因素在病例对照间分布的差异, 采用非条件 Logistic 回归分析基因型与肝癌发病风险的关系。结果 CCND1 rs9344 位点存在 GG、GA、AA 三种基因型, G/A 等位基因及各基因型在肝癌组与对照组中分布未见明显差异, 但在分层分析中发现, 有肝脏疾病史人群中病例组 AA 基因型携带比例高于对照组, 差异有统计学意义, 与 GG 基因型相比, AA 基因型伴有肝病史个体罹患肝细胞癌的风险比值为 5.29 (OR = 5.29, 95% CI: 1.42 - 24.49); 结论 CCND1 rs9344 位点多态性与肝细胞癌易感性无明显相关, AA 基因型携带者且有肝脏疾病史对比其他基因型携带者患肝细胞癌的风险较高。

关键词: 肝细胞癌(HCC); 细胞周期蛋白 1(CCND1); 单核苷酸多态性(SNP)

中图分类号: R181.3⁺3 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2017)03-0553-04

CCND1 gene polymorphism and susceptibility to hepatocellular carcinoma: a case control study

WANG Chuan-peng*, SU Cheng-hao, LIN Yong, ZHANG Yi-zhong

* School of Public Health of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361021, China

Abstract: Objective To explore the relationship between CCND1 polymorphism (rs9344) and the susceptibility to hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** A case-control study was conducted among 266 newly histopathological diagnosed cases with HCC and 306 cancer-free controls frequency-matched for age and sex. Genotypes of CCND1 rs9344 polymorphism was determined by using MALDI-TOF. Chi-squared test and unconditional logistic regression model were used to compare the distribution of CCND1 genotypes and related risk factors in case control and to analyze the relationship between genotype and risk of developing HCC. **Results** There were three genotypes of GG, GA and AA in CCND1 rs9344 locus, G/A allele frequency and three genotypes among CCND1 were not significantly associated with the HCC risk, but in the stratified analysis, we found that the proportion of AA genotype in patients with liver disease was higher than that in the control group. The difference was statistically significant. Compared with GG genotype, the odds ratio of developing HCC with a history of liver disease among AA genotype of subjects was 5.29 (OR = 5.29, 95% CI: 1.42 - 24.49). **Conclusion** There is no significant association between the CCND1 genotype and the risk of developing HCC, while subjects with both AA genotype and liver disease history are demonstrated a higher HCC risk than those with other genotypes.

Keywords: Hepatocellular carcinoma; CCND1; Single nucleotide polymorphism

肝癌是世界第六大常见癌症,同时也是男性第二位癌症相关死因,仅 2012 年全球就有 78 万余例新发肝癌病例产生,肝癌死亡病例达 74 万余例,其中超过半数的肝癌新发病例及肝癌死亡病例发生在中国^[1]。手术切除仍是目前肝癌最好的治疗方法,但因肝癌起病隐匿,就诊时多失去手术机会,因此肝癌的早期筛

查及寻找高危人群并进行早期干预具有重要的公共卫生意义。

肝癌的发病与慢性乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)或丙肝病毒感染的关系已被大量研究所证实,但数量庞大的感染者中仅有 1/4 的慢性感染患者进展为癌变^[2],提示除环境和病原因素外,个体的遗传因素在肝癌发病中亦起重要作用。细胞的恶性病变与原癌基因的激活、抑癌基因的失活有关,而大多数原癌基因、抑癌基因的作用最终都会影响到细胞周期调控,因此细胞周期调控异常是癌变发生的重要因

基金项目:厦门市科技局社会发展项目 3502Z20124023

作者简介:王传鹏(1989-),男,在读硕士,研究方向:流行病学

通讯作者:张一中, E-mail: wsj_zyz@xm.gov.cn

素^[3]。肿瘤的形成主要是细胞周期 G1 期到 S 期的转换失调,而 CCND1 基因编码蛋白(Cyclin D1)作为细胞进入增殖周期合成的第一个周期蛋白,可与 CDK4/CDK6 形成蛋白复合物,在调控细胞周期 G1/S 期转换过程中发挥着至关重要的作用,CCND1 已经成为潜在的肿瘤治疗靶点^[4]。rs9344 位于 CCND1 基因第四外显子,该多态性位点为 G > A 碱基突变,A 等位基因可促使 CCND1 基因表达为第五外显子缺失的 cyclinD1 b 蛋白。此外,缺失的外显子内部包含一个可被酸化修饰的苏氨酸位点,导致 cyclinD1 b 蛋白缺乏核转运信号,难以被运送至细胞质进行泛素化降解,因而 cyclinD1 b 蛋白本身可能具有促癌作用^[5]。rs9344 多态性已被证明与乳腺癌^[6]、直肠癌^[7]、肺癌^[8]、膀胱癌^[9]等多种肿瘤的发病及预后相关。

厦门地区肝癌死亡率为 35.24/10 万,远高于全国城市平均水平 19.50/10 万^[10],在厦门地区开展肝癌易感性基因的研究具有重要意义。本研究采用医院为基础的病例对照研究,通过比较肝癌患者与健康对照中 CCND1 rs9344 等位基因及基因型的差异从而分析 CCND1 基因多态性与肝癌易感性的关系,为今后肝癌早筛早治提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 对象 病例组为 2011 年 12 月到 2014 年 7 月于厦门市中山医院、厦门市中医院,经肝内穿刺活检确认的肝细胞癌新发病例,对照组选取社区健康体检人群,并按年龄(±3 岁)和性别进行成组匹配;所有研究对象均为在福建省居住 10 年以上的 20 周岁以上成年人。最终共有 266 例肝癌患者及 306 例健康对照纳入研究,均签署了知情同意书。

1.2 方法 由经过统一培训的调查员对病例组及对照组进行问卷调查,内容包括研究对象一般人口学信息及相关疾病史,采用双重录入和逻辑校对以保证录入信息的准确性;采用 EDTA 抗凝管抽取研究对象外周血 5ml 样本 DNA 提取自外周血,基因多态性检测采用 MALDI-TOF-MS 方法,检测完成后随机抽取 5% 样本进行重检,保证检测结果的准确性。

1.3 统计分析 采用 EpiData3.0 建立数据库,SPSS 20.0 处理数据,病例组与对照组间各变量比较采用 χ^2 检验,rs9344 各基因型与肝癌易感性关联采用比值比(OR)及 95% 可信区间(CI)表示,OR 值及 95% CI 采用非条件 Logistic 回归计算,所有统计采用双侧概率检验,显著性水平设定为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 病例组和对照组的一般特征 病例组共 266

人,男性多于女性(224/42);年龄分布以 51~70 岁为主;学历分布以中低学历为主,中学及以下学历占总人群的 96.24%;对照组与病例组性别、年龄差异无统计学意义,但高学历比例高于病例组,差异有统计学意义($\chi^2 = 12.60, P = 0.00$)。相关病史中,肝癌组 HBV 表面抗原阳性率及有肝脏疾病史比例均高于对照组,差异有统计学意义($\chi^2 = 223.62, P < 0.01; \chi^2 = 139.01, P < 0.01$);肝癌家族史分布未见明显差异($\chi^2 = 0.02, P = 0.90$)。见表 1。

表 1 病例组和对照组的一般特征比较

类别	病例组 n(%)	对照组 n(%)	χ^2 值	P 值
性别				
男	224(84.21%)	258(84.31%)	0.00	0.97
女	42(15.79%)	48(15.69%)		
年龄(岁)				
≤30	10(3.76%)	10(3.27%)		
31~	77(28.95%)	77(25.16%)	1.51	0.68
51~	140(52.63%)	176(57.52%)		
71~	39(14.66%)	43(14.05%)		
学历				
小学及以下	147(55.26%)	149(48.69%)		
中学	109(40.98%)	121(39.54%)	12.60	<0.01
大专及以上学历	10(3.76%)	36(11.77%)		
HBV 表面抗原				
阴性	70(26.32%)	269(87.91%)	223.62	<0.01
阳性	196(73.68%)	37(12.09%)		
肝癌家族史				
无	233(87.59%)	267(87.25%)	0.02	0.90
有	33(12.41%)	39(12.75%)		
肝病史				
无	132(49.62%)	286(93.46%)	139.01	<0.01
有	134(50.38%)	20(6.54%)		

2.2 等位基因及基因型分布 对照组中 GG、GA、AA 基因型分别为 62 例、144 例和 100 例,等位基因分布符合 Hardy-Weinberg 平衡($\chi^2 = 0.60, P = 0.74$),提示样本具有代表性;等位基因型分布中,A 等位基因较 G 等位基因、AA 及 GA 基因型较 GG 基因型 OR 值均大于 1.0,但经非条件 Logistic 调整后 OR 值均小于 1.0,调整前后比值比差异均无统计学差异;对基因型进行隐性模型(AA:GA+GG)及显性模型(AA+GA:GG)分析,差异未发现统计学意义。见表 2。

表 2 CCND1 基因型与肝癌关联分析

基因	病例组(n = 266)	对照组(n = 306)	OR 值	OR ^a (95% CI)	P 值
等位基因					
G	213	268	1. 00	1. 00(Ref)	0. 21
A	319	344	1. 17	-	
基因型					
GG	43	62	1. 00	1. 00(Ref)	
GA	127	144	1. 27	0. 95(0. 50 - 1. 80)	0. 30
AA	96	100	1. 38	0. 89(0. 46 - 1. 73)	0. 18
隐性模型					
GG + GA	170	206	1. 00	1. 00(Ref)	
AA	96	100	1. 16	0. 92(0. 57 - 1. 51)	0. 39
显性模型					
GG	43	62	1. 00	1. 00(Ref)	0. 21
AA + GA	233	244	1. 32	0. 92(0. 51 - 1. 67)	

注: OR^a: 经性别、年龄、肝病史、教育水平、乙肝表面抗原状况调整

2.3 基因型分层分析 对全部研究对象以 HBV 表面抗原、肝病史、癌症家族史状况进行分层分析,在有肝病史人群中,病例组 AA 基因型频率明显高于对照

组,差异有统计学意义(OR = 5. 29 ,95% CI: 1. 42 - 24. 49),其他因素的分层分析中病例组与对照组间基因型分布未见明显差异,见表 3。

表 3 不同因素分层分析

类别	基因型	病例组 n(%)	对照组 n(%)	OR 值(95% CI)	P 值
HBV 表面抗原					
阳性	GG	26(13. 3%)	8(21. 6%)	1. 00(Ref)	
	GA	93(47. 4%)	19(51. 4%)	1. 51(0. 59 - 3. 83)	0. 39
	AA	77(39. 3%)	10(27. 0%)	2. 37(0. 85 - 6. 64)	0. 10
阴性	GG	17(24. 3%)	54(20. 1%)	1. 00(Ref)	
	GA	34(48. 6%)	125(46. 4%)	0. 86(0. 45 - 1. 68)	0. 67
	AA	19(27. 1%)	90(33. 5%)	0. 67(0. 32 - 1. 40)	0. 29
肝癌家族史					
有	GG	7(21. 2%)	9(23. 1%)	1. 00(Ref)	
	GA	18(54. 6%)	14(35. 9%)	1. 65(0. 49 - 5. 54)	0. 42
	AA	8(24. 2%)	16(41. 0%)	0. 64(0. 18 - 2. 36)	0. 51
无	GG	36(15. 5%)	53(19. 9%)	1. 00(Ref)	
	GA	109(46. 8%)	130(48. 7%)	1. 23(0. 75 - 2. 02)	0. 40
	AA	88(37. 8%)	84(31. 4%)	1. 54(0. 92 - 2. 59)	0. 10
肝病史					
有	GG	17(12. 7%)	5(25. 0%)	1. 00(Ref)	
	GA	63(47. 0%)	12(60. 0%)	1. 54(0. 48 - 4. 99)	0. 47
	AA	54(40. 3%)	3(15. 0%)	5. 29(1. 15 - 24. 49)	0. 03
无	GG	26(19. 7%)	57(19. 9%)	1. 00(Ref)	
	GA	64(48. 5%)	132(46. 2%)	1. 06(0. 76 - 1. 85)	0. 83
	AA	42(31. 8%)	97(33. 9%)	0. 95(0. 53 - 1. 71)	0. 86

3 讨论

本研究病例组的 HBV 表面抗原阳性率、有肝脏疾病史比例明显高于对照组 (P 值均小于 0.01), 提示 HBV 感染及肝脏疾病史为肝癌发病的重要危险因素; 在学历分布中, 病例组中的中低学历比例高于对照组, 差异有统计学意义, 可能由于中低学历人群自我保健意识和健康重视程度较低, 最终导致肝癌风险高于对照组。肝癌家族史分布在病例组和对照组间未见明显差异, 即未发现肝癌的聚集性。

本次研究未发现, CCND1 rs9344 等位基因及基因型多态性与肝细胞癌之间的相关性, 研究结果与 Hu 等^[11]、Zeng 等^[12] 所报告的研究结果一致。但 Akklz^[13] 等在土耳其人群中探究 CCND1 rs9344 位点多态性与肝癌关联性时发现, 肝癌病例组 A 等位基因携带比例明显高于对照组 ($P < 0.01$), AA 基因型者患肝癌风险明显高于 GG 基因型者 ($P < 0.01$)。结果表明, rs9344 位点 A 等位基因可增加肝癌的发病风险。此差异表明单核苷酸多态性在不同地区不同民族人群中效应有所不同。Hu 等^[11] 研究发现, HBV 感染者中携带 A 等位基因更易发展为肝细胞癌, 本研究在 HBV 感染状态分层分析时未发现相似结论, 可能由于除基因易感性因素外的环境因素不同, 导致最终疾病发生状态分布不同所致; Zeng 等研究表明, 在低年龄组中 (≤ 50 岁), 携带 AA 基因型的慢性 HBV 感染肝硬化患者较携带 AG/GG 基因型患者转变为原发性肝癌的风险增加 94.3% ($OR = 1.93, P = 0.04$), 与本研究分层分析中发现的, 有既往肝脏疾病史的人群中, 携带 AA 基因型者发展为肝癌的风险明显高于 GG 基因型携带者, 提示 AA 基因型携带者在患有肝脏疾病后更易进展为肝细胞癌, 其原因可能与肝部疾病后肝脏激活细胞再生修复功能^[14], 促进了 CCND1 基因的激活与表达, 而产生的 CCND1 b 蛋白则与持久性促进细胞再生有关。

本研究虽然未能发现, CCND1 rs9344 多态性与肝细胞癌风险之间的明显关联, 但分层分析结果表明携带 AA 基因型者在患肝脏疾病后更易发展为肝细胞癌。由于单个基因及其多态性在肿瘤的作用较小, 且除了遗传异质性、表型复杂性、基因与环境相互作用复杂性、种族差异等因素外, 研究样本量大小也是影响发现稳定关联的重要原因。因此, 关于基因多态性与肿瘤的研究应注重多中心大样本联合环境因素进行。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA - A Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65(2): 87 - 108.
- [2] Chen CJ, Yu MW, Liaw YF. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 1997, 12(9/10): S294 - S308.
- [3] Helsten Teresa, Kato Shumei, Schwaederle Maria, et al. Cell - Cycle gene alterations in 4,864 tumors analyzed by Next - Generation sequencing: implications for targeted therapeutics [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2016, 15(7): 1682 - 1690.
- [4] Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, et al. Cyclin D as a therapeutic target in cancer [J]. Nature Reviews Cancer, 2011, 11(8): 558 - 572.
- [5] Lu Fengmin, Gladden B, Diehl Alan. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene [J]. Cancer Research, 2003, 63(21): 7056 - 7061.
- [6] Liu Chih, Su Hsien, Wang Chung, et al. Contribution of personalized Cyclin D1 genotype to triple negative breast cancer risk [J]. BioMedicine, 2014, 4(1): 3.
- [7] Xu Ming, Ni Bing, Yang Li, et al. CCND1 G870A polymorphism and colorectal cancer risk: An updated meta - analysis [J]. Molecular and clinical oncology, 2016, 4(6): 1078 - 1084.
- [8] Zhou Changxi, An Huaijie, Hu Mingdong, et al. The cyclin D1 (CCND1) G870A polymorphism and lung cancer susceptibility: a meta - analysis [J]. Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2013, 34(6): 3831 - 3837.
- [9] Li Jing, Luo Fei, Zhang Hongtuan, et al. The CCND1 G870A polymorphism and susceptibility to bladder cancer [J]. Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2014, 35(1): 171 - 177.
- [10] 伍啸青, 戴龙, 何志城, 等. 厦门市 2004 - 2009 年居民恶性肿瘤死亡原因分析 [J]. 中华疾病控制杂志, 2010, 14(8): 768 - 770.
- [11] Hu Z, Zhou Z, Xiong G, et al. Cyclin D1 G870A polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma in a Chinese population [J]. Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2014, 35(6): 5607 - 5612.
- [12] Zeng Z, Tu J, Cheng J, et al. Influence of CCND1 G870A polymorphism on the risk of HBV - related HCC and cyclin D1 splicing variant expression in Chinese population [J]. Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2015, 36(9): 6891 - 6900.
- [13] Akkiz Hikmet, Bayram Süleyman, Bekar Aynur, et al. Cyclin D1 G870A polymorphism is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in the Turkish population: case - control study [J]. Cancer Epidemiology, 2010, 34(3): 298 - 302.
- [14] 解东, 杨宝山. 肝再生机制研究现状 [J]. 肝脏, 2014, 19(12): 979 - 982.

收稿日期: 2016 - 09 - 30