

MDR1基因多态性与肝癌易感性的关系

361026 福建厦门 厦门市第二医院肿瘤科

陈毅德, 杨芳, 冯水土, 张永兴¹

【摘要】 目的: 探讨MDR1基因位点单核苷酸多态性与肝癌易感性的关系。方法: 采用病例对照研究, 应用聚合酶链反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)基因型分析技术测定原发性肝癌组及正常健康对照组各100例MDR1基因G2677T/A位点。以 χ^2 检验比较MDR1多态基因型及相关危险在病例与对照之间分布的差异, 采用非条件Logistic回归分析多态基因型与肝癌发生危险度的关系。结果: 肝癌组MDR1基因2677A携带型低于健康对照组($P < 0.05$); 经Logistic回归分析发现2677A携带型的个体患肝癌的危险显著降低, 2677A携带型暴露于危险因素下患肝癌风险降低。肝癌组MDR1基因2677T携带型高于健康对照组($P < 0.05$); 经Logistic回归分析发现2677T携带型的个体患肝癌的危险增加, 2677T携带型暴露于危险因素下患肝癌风险增高。结论: MDR1基因2677A多态性可能是防止肝癌形成的保护因素, 2677T多态性可能是肝癌形成的易感因素。

【关键词】 肝细胞癌; MDR1; 基因多态性; 遗传易感性

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2009)12-1077-05

A case-control study on the association between genetic polymorphisms of MDR1 and hepatic cell cancer susceptibility

CHEN Yi-de, YANG Fang, FENG Shui-tu, ZHANG Yong-xing. Department of Medical Oncology, the Second Hospital of Xiamen, Xiamen 361026 China

【Abstract】 Objective To study the association between genetic polymorphisms of MDR1 and hepatic cell cancer susceptibility. **Methods** The experimental subjects composed of 100 cases with primary hepatocellular carcinoma and 100 healthy controls. The polymorphism genetic type of G2677T/A of MDR1 was analyzed by PCR-RFLP. The distribution differences of polymorphisms of MDR1 and related risk between the case group and control group were analyzed by chi-square test. The relationship of polymorphism genotype with risk of hepatocellular carcinoma was analyzed by logistic regression. **Results** It was observed by logistic regression analysis that the risk of suffering hepatocellular carcinoma reduced significantly in individuals carrying at least one allele of A, the risk of suffering hepatocellular carcinoma increased significantly in individuals carrying at least one allele of T. **Conclusion** MDR1 gene polymorphism of 2677A may be a protective gene of hepatocellular carcinoma, 2677T may be a risk gene for hepatocellular carcinoma.

【Key Words】 Hepatocellular carcinoma; MDR1; Genetic polymorphism; Hereditary susceptibility

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是对人类健康和生命威胁较大的恶性肿瘤之一。尽管已知HCC与乙型或丙型肝炎病毒感染、肝硬化、黄曲霉素、生活方式及环境等因素有关,但仅有小部分暴露于这些危险因素的人群发生肝癌,究其原因可能与人群或个体的肿瘤易感性有关。人类多药耐药基因(Multidrug resistance gene 1, MDR1)位于第7号染色体长臂上,含有28个外显子,内含子与外显子交界符合经典的A/G规则,全长为4.5kb,含有一个开放读框,编码1280个氨基酸多肽,经糖基化后形成

170KD的膜糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp),其生理作用是保护细胞免受毒物及代谢产物损害。近年来的研究发现,MDR1多态性不仅是影响肿瘤患者对化疗药物反应的重要遗传因素,也与患者对疾病的易感性及临床表现有关。本研究采用病例对照研究方法,应用聚合酶链反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)基因型分析技术对原发性肝癌组及正常健康对照组MDR1基因G2677T/A位点进行测定,旨在探讨MDR1基因位点单核苷酸多态性与肝癌遗传易感性的相关性,为肝癌高危人群的确立提

¹ 361260 厦门大学医学院预防医学系

供依据。

1 资料与方法

1.1 标本来源 福建地区 100例原发性肝癌病例和 100例正常健康对照者外周静脉血。病例为 2007年 1月~2008年 2月在我市三乙以上医院诊断的原发性肝癌患者,诊断符合 2001年 9月第八届全国肝癌学术会议通过的原发性肝癌的诊断标准。所有患者抽血前均未进行过化疗及放疗。正常对照选自我院健康体检的人群,体检结果报告为无肿瘤及遗传性疾病。正常对照按性别及年龄(± 5 岁)与病例频数匹配。收集每个研究对象详细的人口学资料以及相关危险因素暴露资料,并填写统一制定的调查表格。抽取肝癌患者及健康体检者外周静脉血 2ml于加有 EDTA 的抗凝试管内,迅速放入液氮罐中,再转入 -90°C 低温冰箱保存备用。

1.2 主要试剂 全血 DNA 提取试剂盒,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(Qiagen公司,德国);MDR1引物(Sangon,上海)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 取 1.5ml EP 管,用 200 μl PBS 液洗涤、重悬全血分离出的单个核细胞,加入 20% 蛋白酶 K 200 μl 再加入 200 μl Buffer 振荡混匀 15s,将含有混合液的 EP 管置于 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10min,取出 EP 管,冷却至室温,加入 200 μl 无水乙醇,充分振荡 15s。将混合液转移至试剂盒中提供的过滤柱内,14 000r/min 离心 1min,弃去滤过的液体。小心打开过滤柱盖子,加入 500 μl Buffer,将过滤柱放入另一新的空离心管,8 000r/min 离心 1min,弃去滤过的液体。小心打开过滤柱盖子,加入 500 μl Buffer,将过滤柱放入另一新的空离心管,14 000r/min 离心 3min,弃去滤过的液体。重复离心 1min,使 Buffer 液充分分离。小心打开过滤柱盖子,视细胞的量加入 100~200 μl Buffer,将过滤柱放入一干净 1.5ml EP 管,室温静置 1min,充分溶解 DNA,8 000r/min 离心 1min, -20°C 保存液体备用。

1.3.2 PCR 扩增反应 引物 G2677A,上游: AGA-GCATAGTAAGCAGTAGGAGTA,下游: GCAAAT-CTTGGGACAGGAATA; G2677T 上游: AGTAAGCA-GTAGGGAGTAAACA,下游: GATAAGAAAGAACTA-GAACGT。PCR 扩增反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 45s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 45s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45s, 共 34 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.3 PCR 产物纯化 按试剂盒说明书操作。

1.3.4 RFLP 法检测 MDR1 基因型 取干净 EP 管,依次加入下述液体,使总体积为 20 μl ,具体如下: dd H₂O 11 μl , 10 \times buffer 2 μl , 限制性内切酶 (G2677A: Rsa I, G2677T: Acl I) 1 μl , PCR 回收产物 6 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育 3h, 65 $^{\circ}\text{C}$ 酶灭活 5min 中止反应。将酶切产物 5 μl 点样于 1.5% 琼脂糖凝胶,加入 1 μl Loading Buffer 混匀上样,银染后在凝胶扫描成像系统中拍照。

1.4 统计学分析 以 χ^2 检验比较各基因型及相关危险因素暴露在病例与对照之间分布的差异。采用非条件 Logistic 回归分析多态基因型与肝癌的相关关系及其与危险因素的交互作用。采用统计软件 SPSS 12.0 作相关分析。

2 结果

2.1 研究对象的基本特征 本研究病例组和对照组共 200 例,其中对照组 100 例,病例组 100 例。所有研究对象均来自福建地区,年龄范围 30~81 岁,病例组平均年龄 (55.8 \pm 14.7) 岁,对照组 (54.5 \pm 13.9) 岁,两组间差异无显著性。病例组男性 91 例,女性 9 例,对照组男性 90 例,女性 10 例,两组间差异无显著性。

2.2 PCR 及酶切结果 MDR1 G2677A 和 G2677T 基因型依据片段长度判断, G2677A 扩增产物为 256bp 经 Rsa I 酶切后, A 基因产生 101bp, 82bp, 73bp 3 个片段, T 或 G 基因产生 183bp 和 73bp 2 个片段; G2677T 扩增产物为 114bp 经 Acl I 酶切后, T 基因产生 94bp 片段, A 或 G 基因仍经扩增为 114bp 见图 1 图 2。



图 1 MDR1 基因多态性 G2677A 的银染后基因型判定

2.3 肝癌组和对照组 MDR1 基因型分布情况 肝癌组和正常对照组基因型分布均符合 Hardy-Wein-

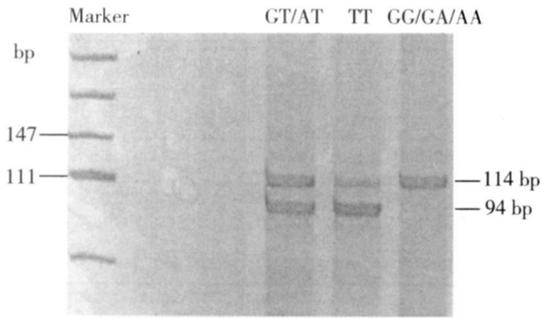


图 2 MDR1 基因多态性 G2677T 的银染后基因型判定

berg 平衡。肝癌组 A 等位基因频率 21%，而对照组为 30%；肝癌组 T 等位基因频率 33%，而对照组为 24.5%；对照组和肝癌组 A 携带型与 A 非携带型比例有显著差异 ($P < 0.05$)，T 携带型与 T 非携带型亦有显著差异 ($P < 0.05$)。见表 1 表 2。

表 1 两组基因型分布比较

项目	肝癌组 (n=100)	对照组 (n=100)
AA	6	9
AT	14	16
GA	16	26
TT	6	3
GT	40	27
GG	18	19
A 携带	36	51 [*]
A 非携带	64	49 [*]
T 携带	60	46 [*]
T 非携带	40	54 [*]

注: * $P < 0.05$

表 2 两组 MDR1 等位基因比较 [例 (%)]

等位基因	肝癌组	对照组
A	42(21.0)	60(30.0)
T	66(33.0)	49(24.5)
合计	108(54.0)	109(54.5)

2.4 MDR1 基因多态性与肝癌易感性的关系 AA 纯合体患肝癌的危险显著低于 A 杂合体；TT 纯合体患肝癌的危险显著高于 T 杂合体。以携带 A 基因型的人群为参照组，携带至少 1 个 A 等位基因的个

体患肝癌的危险显著降低，A 等位基因携带者患肝癌的危险性是 A 等位基因非携带者的 0.54 倍 (OR = 0.54, 95% CI 0.31~0.95)。携带至少 1 个 T 等位基因的个体患肝癌的危险增加，T 等位基因携带者患肝癌的危险性是 T 等位基因非携带者的 1.76 倍 (OR = 1.76, 95% CI 1.51~2.05)。基因型与肝癌易感性相关，与年龄、性别无关。见表 3 表 4。

表 3 MDR1 多态基因型与肝癌患病危险度

项目	肝癌组 (n=100)	对照组 (n=100)	OR (95% CI)	P
AA	6	9	0.41 (0.103~1.632)	0.027
AT/GA	30	42		
TT	6	3	3.58 (0.951~13.599)	0.033
AT/GT	54	43		

表 4 MDR1 多态基因型与肝癌患病危险度

项目	A 携带	A 非携带	T 携带	T 非携带
分组				
肝癌组	36	64 [*]	60	40 [*]
对照组	51	49	46	54
性别				
男	33	58	54	37
女	3	6	6	3
年龄 (岁)				
≥ 60	7	11	12	6
< 60	29	53	48	34

注: * OR = 0.54 (95% CI 0.307~0.949), $P = 0.038$; [△] OR = 1.076 (95% CI 1.51~2.05), $P = 0.041$

2.5 MDR1 基因多态性对肝癌发生的预测 将 HBV +、HCV + 和肝硬化纳入 MDR1 基因多态性对肝癌发生和预测分析模型中，已明确 HBV +、HCV + 和肝硬化均为肝癌发生的危险因素，经分别校正上述危险因素干扰后，结果显示，携带至少 1 个 A 等位基因患肝癌的危险明显降低，携带至少 1 个 T 等位基因患肝癌的危险明显增加 ($P < 0.05$)。见表 5。

3 讨论

国家卫生部 2004 年颁发的《中国癌症预防与控制规划纲要 (2004~2010)》指出：肝癌、食管癌、胃癌、宫颈癌和鼻咽癌等传统高发癌症，与发病率正在

表 5 MDR1 基因多态性与危险因素对肝癌发生的影响

因素	2677A 携带		2677A 非携带		P	2677T 携带		2677T 非携带		P
	肝癌组	对照组	肝癌组	对照组		肝癌组	对照组	肝癌组	对照组	
HBV+	24	4	58	3	0.029	49	2	33	5	0.045
HCV+	5	0	9	1	0.031	10	1	4	0	0.037
肝硬化	18	0	32	3	0.022	32	2	18	1	0.047

迅速上升的结直肠癌、肺癌及乳腺癌等并列为我国目前重点防治的八大恶性肿瘤,这 8 种恶性肿瘤死亡约占总死亡人数的 80% 以上^[1]。其中肝癌是发病率和 5 年病死率均较高的肿瘤。但是,由于与其它肿瘤相比肝癌具有发现晚、手术切除率低和生存期短等特点,对肝癌的基础研究较其它肿瘤相对较少。

原发性肝癌是指原发于肝实质细胞或肝内胆管上皮细胞的癌肿。由于绝大多数肝癌(85%~90%以上)是来源于肝细胞,所以通常所说的原发性肝癌多指肝细胞癌(HCC,以下简称肝癌)。因为肝癌早期症状隐匿,所以发现时多为晚期。而晚期病情进展迅速,因此生存时间很短,5 年生存率极低,仅约为 3%~5%。肝癌在世界范围内流行广泛,每年约有 62 万人被诊断为肝癌,发病率居所有恶性肿瘤的第 6 位。每年因肝癌死亡的人数约 60 万,居所有癌症死因的第 3 位,仅次于肺癌和胃癌。肝癌的发病情况在我国更为严峻,全世界新发的肝癌病例中,高达 55% 发生在中国^[2],也就是说,每年约有 30 多万人被诊断为肝癌。我国原发性肝癌每年的年龄调整死亡率约为 23/10 万人,即每年超过 35 万人死于肝癌。由此看来,肝癌的病因学研究在我国显得尤为重要。以往对肝癌的病因学研究结果表明,肝癌的发生可能与多种因素有关,包括乙型和丙型肝炎病毒感染、肝硬化、黄曲霉素及吸烟酗酒环境因素等^[3]。但是为什么同样处于上述危险因素之中的不同个体,却有发生与不发生肝癌的差异呢? 这些现象提示我们,肝癌的发病可能与个体对危险因素的敏感性有关。

MDR1 位于第 7 号染色体,编码相对分子质量为 170 000 的 P-gp,一般认为 P-gp 由相同的两亚基组成,每部分含 6 个跨膜区域和 1 个细胞内的 ATP 连接区,两亚基由一多肽连接物分开,两部分可相互作用形成一跨膜转运体。P-gp 作用类似一个泵,由 ATP 提供能量,可将细胞内药物泵出细胞外,其生理

作用是保护细胞免受毒物及代谢产物损害;在肿瘤细胞,则造成对多种结构及作用机制不同抗癌药的耐受。

关于多药耐药基因多态性的最初报道发表于 1989 年,但系统的对 MDR1 多态性的筛选由 Hoffmeyer 等于 2000 年完成,他们在 188 例高加索人中,共筛选出 15 种单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。此后,国外有不少关于 MDR1 基因多态性与肿瘤临床关系研究陆续报道。近年的研究发现,MDR1 基因的多态性不仅与患者对药物的耐受及化疗药物的代谢转化等有关,也与患者对疾病的易感性及临床表现有关。

目前在 MDR1 基因至少鉴定出 28 个单核苷酸多态性,其中 7 个位于内含子上,有 11 个造成氨基酸改变,其余为静止突变。MDR1 C3435T 基因多态性与白血病、结直肠癌、肾细胞癌、乳腺癌、神经胶质瘤、鼻咽癌、胃癌等恶性肿瘤易感性的相关性研究已有报道^[4-11],在肝癌方面的研究国内外尚少见报告。而关于 MDR1 2677 位点的基因多态性研究则更少,且大多为阴性结果^[12]。应当认识到,MDR1 2677A 在人群中的突变率很低,尤其在白人中更低,这可能导致与目前关于 2677A 研究的报道较少有关。本研究中,我们首次发现,MDR1 2677 基因型中至少携带一个 A 等位基因的个体罹患肝癌的危险显著降低,携带至少 1 个 T 基因的个体患肝癌的危险增加,结果有统计学差异,在暴露于危险因素下时,亦得到类似结果。提示 MDR1 2677A 等位基因可能是肝癌的保护因素,T 等位基因可能是肝癌的易感因素。这将在肝癌的早期诊断中具有重要意义。

本实验中的研究对象只局限于我国福建地区,故 MDR1 2677A 及 T 携带型在其他人群(高加索人、非洲黑人等)中的应用价值有待进一步研究。

参考文献

[1] 卫生部. 中国癌症预防与控制规划纲要(2004-2010). [J]. 中

- 国肿瘤, 2004 13: 65- 68
- [2] Parkin DM, Freddie B, Ferlay J, et al. Global cancer statistics 2002[J]. CA Cancer J Clin 2005 55: 74- 108.
- [3] Zhu KM, Cynthia M, Lee SC. Cigarette smoking and primary liver cancer: a population-based case-control study in US men[J]. Cancer Causes Control 2007 18: 315- 321.
- [4] Jan rozia k K, Mlynarski W, Balcerzak E, et al. Functional C3435 T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Eur J Haematol 2004, 72(5): 314- 321.
- [5] Kaya P, Gunduz U, Apaci E, et al. Identification of polymorphisms on the MDR1 gene among Turkish population and their effects on multidrug resistance in acute leukemia patients [J]. Am J Hematol 2005, 80(1): 26- 34.
- [6] Humeny A, Rodel F, Rodel C, et al. MDR1 single nucleotide polymorphism C3435 T in normal colorectal tissue and colorectal carcinomas detected by MALDI TOF mass spectrometry [J]. Anticancer Res 2003 23(3): 2735- 2740.
- [7] Uwai Y, Masuda S, Goto M, et al. Common single nucleotide polymorphisms of the MDR1 gene have no influence on its mRNA expression level of normal kidney cortex and renal cell carcinoma in Japanese nephrectomized patients [J]. J Hum Genet 2004, 49(1): 40- 45.
- [8] Miller KL, Kelsey KT, Wiencke K, et al. The C3435 T polymorphism of MDR1 and susceptibility to adult glioma [J]. Neuroepidemiology 2005 25(2): 85- 90.
- [9] Zhou Q, Sparreboom A, Tan EH, et al. Pharmacogenetic profiling across the irinotecan pathway in Asian patients with cancer [J]. Br J Clin Pharmacol 2005 59(4): 415- 424.
- [10] Mathijssen RH, Marsh S, Karlsson MO, et al. Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics [J]. Clin Cancer Res 2003 9(9): 3246- 3253.
- [11] Kafka A, Sauer G, Jaeger C, et al. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer [J]. Int J Oncol 2003 22(17): 1117- 1121.
- [12] van der Holt B, Van den Heuvel-Edink MM, Van Schaik RH, et al. ABCB1 gene polymorphisms are not associated with treatment outcome in elderly acute myeloid leukemia patients [J]. Clin Pharmacol Ther 2006 80: 427- 443.

收稿日期: 2009- 09- 20; 修回日期: 2009- 10- 23