

CyclinA2 基因多态性与肝细胞肝癌易感性的关系

袁国辉,戴超,吴兆平,陈伟力,梅保华

(九江市第一人民医院肝胆外科,江西 九江 332000)

摘要:目的 探讨 CyclinA2 启动子区单核苷酸多态性与肝细胞肝癌发病风险的关系。方法 选取 2012 年 10 月~2017 年 9 月在九江市第一人民医院确诊的原发性肝细胞肝癌患者 180 例,同时选择行体检的健康志愿者 180 例作为对照组。分别采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法对 cyclinA2 基因的 rs769236 位点进行多态性检测,比较不同基因型与原发性肝细胞癌发病风险的关系。结果 rs769236 等位基因 A(GA+AA)携带者患原发性肝细胞癌的风险显著高于 rs769236GG 野生基因型的个体(校正 OR=1.825,95%CI=1.133-2.940)。结论 CyclinA2 基因 rs769236(G/A)位点 A 变异可能会增加原发性肝细胞癌的发病风险。

关键词:肝细胞肝癌;CyclinA2;单核苷酸多态性

中图分类号:R735.7

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2018.22.021

文章编号:1006-1959(2018)22-0077-04

Relationship between Polymorphism of CyclinA2 Gene and Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma

YUAN Guo-hui,DAI Chao,WU Zhao-ping,CHEN Wei-li,MEI Bao-hua

(Department of Hepatobiliary Surgery,the First People's Hospital of Jiujiang,Jiujiang 332000,Jiangxi,China)

Abstract:Objective To investigate the relationship between cyclinA2 promoter single nucleotide polymorphism (SNP) and the risk of hepatocellular carcinoma.Methods From October 2012 to September 2017, 180 patients with primary hepatocellular carcinoma diagnosed in the First People's Hospital of Jiujiang city were selected,at the same time, 180 healthy volunteers were selected as control group.Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect the rs769236 locus of cyclinA2 gene and compare the relationship between different genotypes and the risk of primary hepatocellular carcinoma.Results The risk of rs769236 allele A (GA+AA) carriers with primary hepatocellular carcinoma was significantly higher than that of the rs769236GG wild genotype (corrected OR=1.825, 95% CI=1.133-2.940). Conclusion CyclinA2 gene rs769236 (G/A) site A mutation may increase the risk of primary hepatocellular carcinoma.

Key words:Hepatocellular carcinoma;CyclinA2;Single nucleotide polymorphism

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是一种常见的恶性肿瘤,全球范围内每年新增患病人数超过 62 万人次,且 1 年生存率还不足 50%^[1],其发病率及死亡率分别占第 5 位和第 3 位^[2,3],我国是肝细胞癌的高发地区之一,占全球新发病例的 56%^[4]。流行病学研究表明,肝细胞癌主要与 HBV、HCV 病毒感染、黄曲霉素 B₁(AFB₁)暴露、吸烟、饮酒等致病因素有关^[5,6]。近年来,随着对肿瘤细胞分子生物学研究的不断深入,人们已经逐渐认识到,肿瘤是一类细胞周期性疾病,细胞周期的调节紊乱容易导致细胞的增殖失控,增殖和凋亡的平衡一旦被打破,便可能会导致肿瘤的发生和发展^[7]。国内外均有研究发现,在肝细胞癌中存在着细胞周期素 A2(cyclinA2)的过表达,并与肝细胞癌的发生、发展有着密切的关系^[8,9]。最近国外有研究发现 cyclinA2 基因启动子区

rs769236 位点 G/A 多态性与肝细胞癌的易感性有关^[10],到目前为止,尚未见关于 cyclinA2 基因 rs769236 位点 G/A 多态性与中国人群原发性肝细胞癌发病风险的相关性的研究报道。故本文就重点讨论 cyclinA2 启动子区 rs769236 位点 G/A 多态性在中国汉族人群中分布频率的差异,分析与原发性肝细胞癌发生发展的关系,并为原发性肝细胞癌的早期诊断、治疗及判断预后提供新的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 10 月~2017 年 9 月在九江市第一人民医院就诊确诊为原发性肝细胞癌的患者 180 例设为病例组,诊断符合 2001 年 9 月第八届原发性肝细胞癌学术会议上通过的原发性细胞肝癌的诊断标准。选择同期来我院健康体检的健康人群 180 例设为对照组。本研究经九江市第一人民医院伦理委员会审核通过。所有患者抽血前均未接受过化疗及放疗,均未输过血,采用统一的流行病学调查问卷,研究对象均签署知情同意书。研究对象的人口

作者简介:袁国辉(1985.12-),男,黑龙江佳木斯人,硕士,主治医师,研究方向:肝胆外科临床及基础研究
通讯作者:戴超(1992.5-),男,江西九江人,硕士,医师,研究方向:肝胆外科临床及基础研究

学信息及相关危险因素暴露资料具体标准 吸烟、饮酒史:按 WHO 标准,一生中连续或累计吸烟 6 个月或以上者定义为吸烟者,每周饮酒至少一次,连续 6 个月或以上者定义为饮酒者;HBV 感染定义:血清感染标志物 HBsAg 阳性判定为 HBV 感染;HCV 感染定义:血清 HCV-RNA 及抗 HCV 均阳性或 HCV-RNA 单独阳性即可判定为 HBV 感染。肿瘤家族史:一级亲属和(或)二级亲属患有癌症者定义为有癌症家族史,否则就定义为无。

1.2 方法 两组患者均于清晨采集外周静脉血 2 ml, EDTA-Na 抗凝,用于 PCR 检测,采用 PCR-RFLP 技术检测 Cyclin A2 基因型。

1.2.1 DNA 提取 采用 DNA 提取试剂盒(北京全式金生物技术公司),提取每份抗凝外周血的总 DNA,操作均按说明书进行,将提取好的 DNA 溶解于 pH8.0 TE 中, -20℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 PCR (PCR 试剂购自 TAKARA 公司)扩增含有 rs769236(G/A)位点的片段:上游引物 5'-CGCTCACTAGGTGGCTCAG-3' 和下游 5'-CC-GAGGAGGTTGCGAAAGG-3'(南京金斯瑞生物科技有限公司合成)。PCR 反应在 20 μl 体系中进行,PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min, 然后 95℃ 变性 30 sec, 60℃ 退火 30 sec, 72℃ 延伸 30 sec, 共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。

1.2.3 PCR 产物凝胶回收 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,然后切胶回收,操作均按琼脂糖凝胶回收试剂盒(promega 公司)说明书进行操作。

1.2.4 酶切反应 建立 20 μl 酶切反应体系,其中双蒸水 10 μl,缓冲液 2 μl,PCR 回收产物 7 μl,Bgl I 内切酶(Fermentas 公司)1 ul,37℃ 恒温 2 h,酶切产物以含溴化乙锭(EB)的 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像系统成像。PCR 扩增片段为 342bp, GG 基因型能被 Bgl I 内切酶酶切产生两个片段(259bp、83bp),AA 基因型只产生 1 个片段(342bp),杂合子 GA 基因型则产生 3 个片段(342bp、259bp 和 83bp),见图 1。

1.3 统计学分析 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,采用 χ^2 检验比较原发性肝细胞癌组和对照组的人口学数据、基因型以及等位基因频数分布。以拟合优度 χ^2 检验计算 SNP 位点各基因型在对照组中的分布是否符合哈迪-温伯格遗传平衡定律(HWE)。以单因素和多因素 logistic 回归计算比值比(ORs)及其 95%可信区限(CI),分析各基因型与肝

癌发生易感性的关系, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义, $P<0.001$ 表示统计学意义显著。

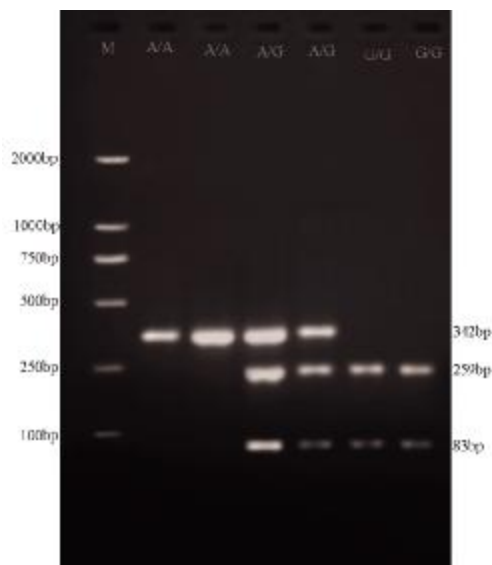


图 1 CyclinA2 基因 rs769236(G/A)酶切结果

2 结果

2.1 两组一般情况比较 两组研究对象年龄、性别、HCV 感染分布比较,差异无统计学意义($P>0.05$);吸烟史、饮酒史、HBV 感染比较,统计学意义显著($P<0.001$),肿瘤家族史比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 原发性肝细胞癌组和对照组一般情况的比较[n(%)]

变量	病例组	对照组	χ^2	P
年龄				
≥55 岁	99(55.00)	102(56.67)	0.101	>0.05
<55 岁	81(45.00)	78(43.33)		
性别				
男	152(84.44)	142(78.89)	1.855	>0.05
女	28(15.56)	38(21.11)		
吸烟史				
是	65(36.11)	32(17.78)	15.367	<0.001
否	115(63.89)	148(82.22)		
饮酒史				
是	68(37.78)	31(17.22)	19.073	<0.001
否	112(62.22)	149(82.78)		
HBsAg				
阳性(+)	145(80.56)	24(13.33)	163.288	<0.001
阴性(-)	35(19.44)	156(86.67)		
HCV				
阳性(+)	6(3.33)	7(3.89)	0.080	>0.05
阴性(-)	174(96.67)	173(96.11)		
肿瘤家族史				
是	22(12.22)	8(4.44)	7.127	<0.05
否	158(87.78)	172(95.56)		

表 2 CyclinA2 基因多态性与原发性肝细胞癌发病风险[n(%)]

基因型	病例组	对照组	OR(95%CI)	OR(95%CI)*
rs769236	/	/	/	/
GG	41(22.78)	60(33.33)	1.00	1.00
GA	85(47.22)	84(46.67)	1.481(0.899~2.438)	1.725(1.030~2.891)
AA	54(30.00)	36(20.00)	2.195(1.230~3.918)	2.176(1.185~3.997)
GA+AA	139(77.22)	120(66.67)	1.695(1.063~2.702)	1.825(1.133~2.940)

注:*校正年龄、性别

2.2 CyclinA2 基因多态性与原发性肝细胞癌易感性的关系 对照组中 cyclinA2 基因 rs769236 位点(G/A) 各基因型分布频率符合 Hardy-Weinberg 平衡($\chi^2=0.446$, $P=0.504$)。Logistic 回归分析,rs769236 等位基因 A(GA+AA)携带者患原发性肝细胞癌的风险显著高于 rs769236GG 野生基因型的个体(校正 $OR=1.825$, $95\%CI=1.133-2.940$),见表 2。

3 讨论

细胞周期素、细胞周期素依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)和细胞周期素依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI) 共同调控着细胞周期的顺利进行^[10,11]。Wang J 等^[12]于 1990 年首次在原发性肝细胞癌 HBV DNA 整合部位上检测到 CyclinA2 基因它定位于人类染色体 4q27 上,由 432 个氨基酸组成的,于 G₁ 晚期开始合成,其含量在 S 期逐渐增加,并于 G₂/M 期达到高峰,在 M 中后期降解。CyclinA2 作为细胞周期的正性调控因子,在细胞周期进程中起重要作用,可分别与 CDK2、CDK1 相结合,以复合物的形式作用于 G₁/S 期和 G₂/M 期 2 个检查点的转换,而且具有调节 DNA 合成和促进细胞有丝分裂的双重作用^[13-15]。

有研究证明,CyclinA2 不仅在原发性肝细胞癌中存在高表达^[8],在非小细胞肺癌^[16]、乳腺癌^[16]、胃癌^[17]、大肠癌^[10,18]等多种肿瘤中也存在高表达,并与这些肿瘤的预后及早期复发的诊断关系密切。近期研究也表明,抑制 CyclinA2 的表达可以有效阻止肝癌细胞的增殖^[9],从而有效控制肿瘤的进一步发生及发展^[20]。CyclinA2 可通过 Akt/FOXO3a/IQGAP/mTOR 等信号通路促进细胞增殖,抑制细胞凋亡^[21-23],但具体机制及其他相关机制目前还需进一步研究。

单核苷酸多态(SNP)是人类遗传变异最常见的类型,位于启动子区域的 SNP 通常对疾病的发生和发展起重要作用^[24,25]。本研究提供了 CyclinA2 基因启动子区多态性与中国汉族人群原发性肝细胞癌发病风险相关联的新信息,本研究发现 rs769236 等位

基因 A(GA+AA)携带者患原发性肝细胞癌的风险高于 rs769236GG 野生基因型的个体(校正 $OR=1.825$, $95\%CI=1.133-2.940$);通过进一步的分层分析,发现在无肿瘤家族史者中携带 rs769236 等位基因 A 者与原发性肝细胞癌的发病风险有显著关联,这说明 rs769236 位点 A 变异可能是一个致病因素。我们推测,当 CyclinA2 基因启动区的 rs769236 位点发生 A 变异后,使得其基因启动子的活性增加,cyclinA2 基因转录活性增强,从而使得其蛋白表达升高。张益等^[19]研究认为,CyclinA2 蛋白的表达失控主要是由于其基因的转录活性增强,也有一部分可能与蛋白质翻译以及翻译后调节失控或蛋白质降解减少有关。当 CyclinA2 过表达时,可在整个细胞周期持续性激活 CDK2 磷酸化的底物,并直接或间接地释放过量的转录因子(如 E2F 等),促进 G₁/S 期转换和 DNA 合成,如超越了细胞周期的调控机制便会导致细胞的异常增殖,并最终癌变。CyclinA2 基因启动子区多态性的发现改变了我们对基因表达的认识,尽管我们在这一领域的认识不断进步但还有大量问题需要解决,如 CyclinA2 基因启动子区多态性是否与原发性肝细胞癌的进展、侵袭力、转移情况、预后等有相关性,至今国内外尚未见报道。

本研究中还发现肝癌组和对对照组比较在年龄、性别、HCV 感染分布差异无统计学意义($P>0.05$),与既往相关文献报道结果不一致,考虑其原因可能与本实验入组样本存在种族差异、地域差异有关,也可能与本实验样本量小存在一定的抽样误差有关,在后续研究中我们将继续扩大样本量并在不同族群、多个地域间抽样,进一步探讨 CyclinA2 基因启动子区多态性引发原发性肝细胞癌的具体分子机制,并为肝癌的早期诊断、治疗及判断预后提供新的理论依据。

参考文献:

- [1]Altekruse SF,McGlynn KA,Reichman ME.Hepatocellular Carcinoma Incidence, Mortality, and Survival Trends in the United States From 1975 to 2005 [J].Journal of clinical oncology:

official journal of American Society of Clinical Oncology, 2009,27(9):1485-1491.

[2]Siegel RL,Miller KD,Jemal A.Cancer statistics, 2016 [J].Ca-Cancer J Clin. 2016(66):7-30.

[3]Williams R.Global challenges in liver disease [J].Hepatology, 2006,44(3):521-526.

[4]Jemal A,Bray F,Melissa M,et al.Global Cancer Statistics [J].Ca-Cancer J Clin 2011,61(2):69-90.

[5]Farazi PA,DePinho RA.Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment [J]. Nat Rev Cancer,2006,6(9): 674-687.

[6]Hernandez-Vargas H,Lambert MP,Le Calvez-Kelm F,et al. Hepatocellular Carcinoma Displays Distinct DNA Methylation Signatures with Potential as Clinical Predictors [J].PLoS ONE, 2010,5(3): e9749.

[7]Hartwell LH,Kastan MB.Cell cycle control and cancer[J].Science,1994,266(5192):1821-1828.

[8]Chao Y,Shih YL,Chiu JH,et al.Overexpression of cyclin A but not Skp 2 correlates with the tumor relapse of human hepatocellular carcinoma[J].Cancer Res,1998,58(5):985-990.

[9]周奇,梁力建,王广田,等.Cyclin A 在肝细胞癌中的表达及其意义[J].肿瘤学杂志,2003,9(6):363-365.

[10]Kim DH,Park SE,Kim M,et al.A Functional Single Nucleotide Polymorphism at the Promoter Region of Cyclin A2 is Associated With Increased Risk of Colon,Liver,and Lung Cancers[J].Cancer,2011,117(17):4080-4091.

[11]Sherr CJ.Mammalian G1 cyclins [J].Cell,1993,73 (6):1059-1065.

[12]Wang J,Chenivresse X,Henglein B,et al.Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma[J].Nature,1990,343(6258):555-557.

[13]Bendris N,Lemmers B,Blanchard JM.Cyclin A2 Mutagenesis Analysis: A New Insight into CDK Activation and Cellular Localization Requirements[J].PLoS ONE,2011,6(7):e22879.

[14]Gheghiani L,Loew D,Lombard B,et al.PLK1 Activation in Late G2 Sets Up Commitment to Mitosis [J]. Cell Rep,2017,19 (10):2060-2073.

[15]Deng H,Cheng Y,Guo Z,et al.Overexpression of CyclinA2 ameliorates hypoxia-impaired proliferation of cardiomyocytes[J]. Exp Ther Med,2014,8(5):1513-1517.

[16]Li HP,ji JF,Hou KY,et al.Prediction of recurrence risk in early breast cancer using human epidermal growth factor 2 and cyclinA2[J].Chin Med J (Engl),2010,23(4):431-437.

[17]Mrena J,Wiksten JP,Kokkola A,et al.Prognostic significance of cyclin A in gastric cancer [J].International Journal of Cancer, 2006,119(8):1897-1901.

[18]Li JQ,Miki H,Wu F,et al.Cyclin a correlates with carcinogenesis and metastasis,and p27 correlates with lymphatic invasion, in colorectal neoplasms [J].Human pathology,2002,33(10): 1006-1015.

[19]Hung YH,Huang HL,Chen WC,et al.Argininosuccinate lyase interacts with cyclin A2 in cytoplasm and modulates growth of liver tumor cells[J].Oncol Rep,2017,37(2):969-978.

[20]Feng W,Cai D,Zhang B,et al.Combination of HDAC inhibitor TSA and silibinin induces cell cycle arrest and apoptosis by targeting survivin and cyclinB1/Cdk1 in pancreatic cancer cells[J]. Biomed Pharmacother,2015(74):257-264.

[21]Ye Q,Lei L,Aili AX.Identification of potential targets for ovarian cancer treatment by systematic bioinformatics analysis[J]. Eur J Gynaecol Oncol,2015,36(3):283-289.

[22]Zhao GX,Xu LH,Pan H,et al.The BH3-mimetic gossypol and noncytotoxic doses of valproic acid induce apoptosis by suppressing cyclin-A2/Akt/FOXO3a signaling [J].Oncotarget, 2015, 6(36):38952-38966.

[23]Gao C,Liang C,Nie Z,et al.Akannin inhibits growth and invasion of glioma cells C6 through IQGAP/mTOR signal pathway[J].Int J Clin Exp Med,2015,8(4):5287-5294.

[24]Wang DG,Fan JB,Siao CJ,et al.Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome[J].Science,1998,280(5366):1077-1082.

[25]张益,彭海志,袁国强,等.周期蛋白 A 在原发性肝癌中的表达及意义[J].中华肿瘤杂志,2002,24(4):353-355.

收稿日期:2018-7-17;修回日期:2018-8-15

编辑/肖婷婷