

端粒酶逆转录酶基因多态性与肝癌的易感性研究

崔伟丽¹, 李娜², 徐保华³, 亓玉琴⁴, 史昌河¹

(1. 青岛市传染病医院, 山东 青岛 266033; 2. 青岛市中心医疗集团, 山东 青岛 266000;

3. 烟台业达医院, 山东 烟台 264000; 4. 青岛市市立医院, 山东 青岛 266000)

摘要: [目的] 探讨人类端粒酶逆转录酶(*hTERT*)基因位点(rs2075786、rs2736098)单核苷酸多态性(SNP)与肝癌的易感性。[方法] 采用聚合酶链反应—限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测肝癌患者 165 例、非肝癌乙肝病毒感染者 195 例、健康对照者 402 名的 *hTERT* 基因型分布。[结果] 肝癌组患者 rs2075786 位点 TC 及 TT 基因型频率显著高于对照组、非肝癌 HBV 感染者及所有非 HCC 者(P 均 <0.05), 携带 TC 及 TT 基因型者罹患肝癌的风险分别增加 1.88 倍和 2.72 倍, 且男性肝癌患者携带 TC 及 TT 基因型明显增加。与对照组、非肝癌 HBV 感染者及所有非 HCC 者相比, 肝癌组 rs2736098 位点各基因型分布差异无统计学意义, 多态性与肝癌患者的性别、年龄、肿瘤分化程度及 TNM 分期无相关性。[结论] *hTERT* rs2075786 基因多态性与肝癌易感性相关。

关键词: 端粒, 末端转移酶; 单核苷酸多态性; 肝肿瘤; HBV 感染

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2017)10-0825-04

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2017.10.A015

Association of Genetic Variants of *hTERT* with Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma

CUI Wei-li¹, LI Na², XU Bao-hua³, et al.

(1. Qingdao Infectious Diseases Hospital, Qingdao 266033, China; 2. Qingdao Center Medical Group,

Qingdao 266000, China; 3. Yantai Yeda Hospital, Yantai 264000, China)

Abstract: [Purpose] To explore the correlation between several single-nucleotide polymorphisms (SNPs) loci on the gene of human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*)(including rs2075786, rs2736098) and the susceptibility to hepatocellular carcinoma. [Methods] This case-control study included 165 diagnosed as hepatocellular carcinoma, 195 with chronic hepatitis B and 402 Healthy people. Polymerase chain restriction fragment length polymorphism were performed to analyze the genotype of the loci on the gene of *hTERT*. [Results] The frequency of TC and TT genotype on rs2075786 were higher in the Hepatocellular carcinoma group than that in the control group, chronic hepatitis B group and no HCC people group($P<0.05$), The additive odds ratio of TT and TC genotype for the risk of Hepatocellular carcinoma was 1.88 and 2.72, and men with hepatocellular carcinoma carried more TC and TT genotype than women. The frequency of all genotype on rs2736098 was not significantly different between hepatocellular carcinoma group and control group. The single nucleotide polymorphism of rs2736098 was not associated with the gender, age, the degree of differentiation and TNM staging of hepatocellular carcinoma. [Conclusion] There is a relationship between *hTERT* rs2075786 polymorphism and susceptibility to hepatocellular carcinoma.

Key words: telomerase; polymorphism, single nucleotide; hepatocellular neoplasms; hepatitis B virus

hTERT 基因定位于 5p15.33, 为单拷贝基因, 全长约 41Kb^[1]。研究证实, *hTERT* 基因的 SNP 位点与多种肿瘤发生有关, 如神经胶质瘤、皮肤癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌等, 我们通过聚合酶链反应—

限制性片段长度多态性检测肝癌患者、非肝癌乙肝病毒感染者、健康对照者的 *hTERT* 基因 rs2075786、rs2736098 的基因型分布, 探讨 *hTERT* 基因多态性与肝癌易感性的相关性, 结合分析与肝癌临床病理参数的关系, 观察 *hTERT* 基因多态性对肝癌细胞增殖及侵袭能力的影响。

收稿日期: 2016-10-24; 修回日期: 2017-02-15

通讯作者: 徐保华, E-mail: baohua20050908@163.com

1 资料与方法

1.1 一般资料

本试验选取 2015 年 3~9 月青岛市传染病医院肝癌患者 165 例、非肝癌乙肝病毒感染者 195 例和健康对照 402 名。采集每位研究对象空腹静脉血 2ml。所有肝癌患者均依靠组织活检、CT 或磁共振检查结合实验室检查明确诊断,非肝癌乙肝病毒感染者血清 HBsAg 及 HBeAg 阳性均大于 6 个月,排除 HIV、HCV 感染、酒精性肝病、自身免疫性肝病、药物性肝病等。

1.2 外周血 DNA 提取

选用东胜生物科技有限公司提供的 DNA 提取试剂盒提取外周血白细胞 DNA,用分光光度计检测 DNA 浓度及纯度,所提取 DNA 均符合实验要求,储存于-20℃冰箱中备用。

1.3 聚合酶链反应(PCR)

PCR 引物序列由上海生工生物有限公司合成,总反应体系为 15μl,反应条件为:94℃预变性 5min,然后进行 35 个循环:94℃变性 30s,分别以 62.5℃及 60℃退火 30s,72℃延伸 45s,最后 72℃延伸 10min,扩增的 DNA 片段长度为分别为 420bp 和 304bp。

1.4 聚合酶链反应—限制性片段长度多态法(PCR-RFLP)

PCR-RFLP 检测 rs2075786、rs2736098 位点多态性分别采用限制性内切酶 *Nci* I、*Apa* I 对扩增产物进行酶切,观察 DNA 条带。

1.5 DNA 序列分析

随机挑选 3 种不同的 PCR-RFLP 分型结果的标本,将 PCR 产物送上海生工公司进行直接测序予以确认。

1.6 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件,采用 χ^2 检验行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,各组之间的基因型分布差异以 χ^2 检验进行比较,基因多态性与肝癌发生的风险性以 OR(odds radio)值和 95%置信区间(CI)表示, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 遗传平衡检验

经 χ^2 检验,所选各组样本均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,具有群代表性。

2.2 rs2075786 位点基因多态性

2.2.1 rs2075786 位点基因型分布

肝癌组患者 TC 及 TT 基因型分布频率显著高于对照组、非肝癌 HBV 感染者及所有非 HCC 者(P 均 <0.05)。与所有非 HCC 者相比,携带 TC 基因型个体罹患肝癌的风险较携带 CC 者增加 1.88 倍(95%CI: 1.252~2.813),携带 TT 基因型个体罹患肝癌的风险较 CC 者个体增加 2.72 倍(95%CI: 1.680~4.401)(Table 1, Figure 1)。

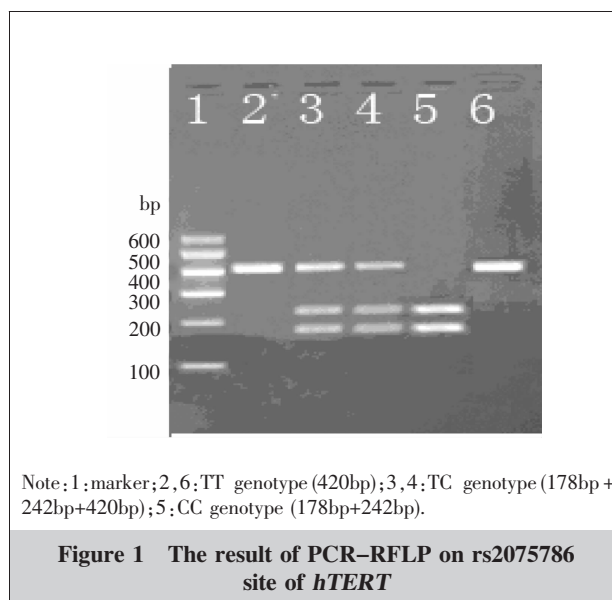


Table 1 The relationship between rs2075786 site on hTERT gene polymorphism and hepatocellular carcinoma

Gene types	Control group	Chronic hepatitis B group	HCC group	χ^2	P	OR(95%)
CC	188(46.8%)	80(41.0%)	46(27.9%)			
TC	164(40.8%)	75(38.5%)	77(46.7%)	9.348 ^a 5.592 ^b 9.466 ^c	0.002 ^a 0.018 ^b 0.002 ^c	1.919(1.260~2.923) ^a 1.786(1.102~2.892) ^b 1.877(1.252~2.813) ^c
TT	50(12.4%)	40(20.5%)	42(25.4%)	22.642 ^a 4.405 ^b 17.296 ^c	0.000 ^a 0.036 ^b 0.000 ^c	3.433(2.037~5.785) ^a 1.826(1.038~3.212) ^b 2.719(1.680~4.401) ^c

Note: a; HCC group vs. control group; b; HCC group vs. chronic hepatitis B group; c; HCC group vs. no HCC person.

2.2.2 rs2075786 位点基因多态性与肝癌临床病理参数的关系

分层分析发现,肝癌患者中男性携带 TC 及 TT 基因型的频率显著增加 ($P=0.002$ 和 0.001),而多态性与肝癌患者的年龄、肿瘤分化程度及 TNM 分期无相关性 (P 均 >0.05) (Table 2)。

2.3 rs2736098 位点基因多态性

2.3.1 rs2736098 位点基因型分布

与对照组、非肝癌 HBV 感染组及所有非 HCC 组相比,肝癌组 GG、GA 及 AA 三种基因型分布频率无明显差异 (P 均 >0.05) (Table 3, Figure 2)。

2.3.2 rs2736098 位点基因多态性与肝癌临床病理参数的关系

分层分析发现,各基因型分布频率与肝癌的性别、年龄、肿瘤分化程度及 TNM 分期均无相关性 (Table 4)。

3 讨论

研究表明,在大部分的肿瘤细胞中,端粒稳定存在,致使细胞不能发生衰老、凋亡等改变,从而导致肿瘤的发生^[2,3]。端粒的延伸受包括端粒酶在内的多种基因调控^[4],端粒酶起重要的作用,人类端粒酶是一种核糖核蛋白^[5,6],由 3 部分组成,即人端粒酶 RNA、人端粒酶相关蛋白和人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT)。其中端粒酶逆转录酶的基因表达决定着端粒酶的激活,因此通常被作为调控端粒酶活性的限速步骤而参与肿瘤的发生发展^[7]。多项全基因组关联研究 (genome wide association studies, GWAS) 表明, hTERT 基因有多个多态性位点与多种肿瘤的易感性相关,如肺癌、皮肤癌、乳腺癌、胃癌、结肠癌、宫颈癌等多种肿瘤^[8-13]。

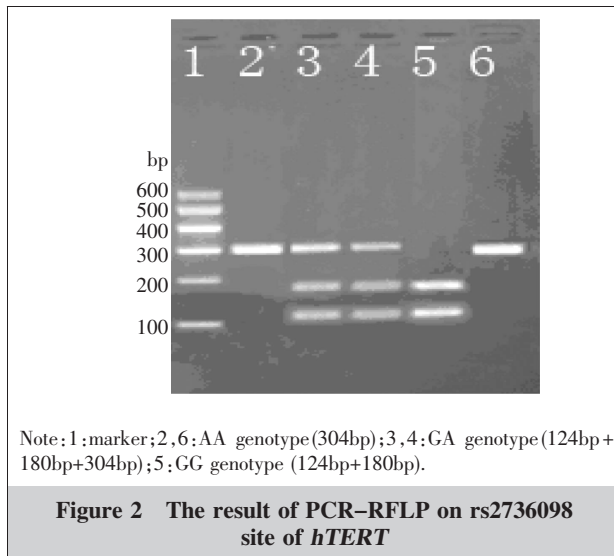


Figure 2 The result of PCR-RFLP on rs2736098 site of hTERT

Table 2 The relationship between rs2075786 site on hTERT gene polymorphism and clinicopathological parameters of hepatocellular carcinoma

Factors	Gene types			χ^2		P	
	CC	TC	TT	TC/CC	TT/CC	TC/CC	TT/CC
Gender							
Male	18	52	31	9.473	10.700	0.002	0.001
Female	28	25	11				
Age (years)							
≥ 50	20	47	19	3.581	0.028	0.058	0.868
< 50	26	30	23				
Differentiated degree							
High and moderately	17	46	21	1.635	1.069	0.201	0.301
Poorly	29	31	23				
TNM stage							
I ~ II	19	40	20	1.307	0.355	0.253	0.551
III ~ IV	27	37	22				

Table 3 The relationship between rs2736098 site on hTERT gene polymorphism and hepatocellular carcinoma

Gene types	Control group	Chronic hepatitis B group	HCC group	χ^2	P	OR(95%)
GG	156 (38.8%)	74 (38.0%)	67 (40.6%)	0.124 ^a 0.001 ^b 0.069 ^c	0.725 ^a 0.980 ^b 0.792 ^c	0.931 (0.627~1.384) ^a 0.994 (0.628~1.573) ^b 0.951 (0.652~1.386) ^c
GA	180 (44.8%)	80 (41.0%)	72 (43.6%)			
AA	66 (16.4%)	41 (21.0%)	26 (15.8%)			
				0.100 ^a 1.394 ^b 0.491 ^c	0.752 ^a 0.238 ^b 0.483 ^c	0.917 (0.536~1.569) ^a 0.700 (0.387~1.266) ^b 0.834 (0.502~1.386) ^c

Note: a: HCC group vs. control group; b: HCC group vs. chronic hepatitis B group; c: HCC group vs. no HCC person.

本研究发现,肝癌组患者 hTERT rs2075786 位点 TC 及 TT 基因型频率显著高于对照组、非肝癌 HBV 感染者及所有非 HCC 者 (P 均 <0.05),其中携

Table 4 The relationship between rs2736098 site on *hTERT* gene polymorphism and clinicopathological parameters of hepatocellular carcinoma

Factors	Gene types			χ^2		<i>P</i>	
	GG	GA	AA	GA/GG	AA/GG	GA/GG	AA/GG
Gender							
Male	37	40	12	0.002	0.969	0.002	0.410
Female	30	32	14				
Age(years)							
≥50	39	43	11	0.033	1.905	0.856	0.167
<50	28	29	15				
Differentiated degree							
High and moderately	35	39	13	0.052	0.038	0.820	0.846
Poorly	32	33	13				
TNM stage							
I ~ II	19	40	20	0.250	0.305	0.651	0.581
III ~ IV	27	37	22				

带 TC 基因型个体罹患肝癌的风险较携带 CC 者增加 1.88 倍,携带 TT 基因型个体罹患肝癌的风险较 CC 者个体增加 2.72 倍,从而证明 C 等位基因为保护基因,而 T 等位基因为肿瘤易感基因。进一步分析其基因多态性与肝癌的临床病理参数发现,男性肝癌患者携带 TC 及 TT 基因型频率显著增加,而各基因型频率与肝癌的年龄分布、肿瘤的分化程度及 TNM 分期无相关性。这与 Bellido 等^[14]关于林奇综合征的研究结论一致,该实验纳入 930 例林奇综合征患者,研究发现携带 T 等位基因者发病年龄明显提前,尤其是 TT 等位基因携带者,模拟研究还发现单核苷酸位点突变会导致端粒酶的激活,促进肿瘤形成,并发现在已经患癌的患者中 TT 基因型携带者端粒长度比 CC 基因型携带者短。

我们研究发现 rs2736098 位点的各基因型分布与对照组相比差异无统计学意义(*P*均>0.05),各基因型分布频率与肝癌的性别、年龄、肿瘤的分化程度及 TNM 分期等临床病理参数无相关性,但亦有研究证实 rs2736098 位点 A 基因型突变与肺癌、膀胱癌等肿瘤遗传易感性相关^[15],但目前尚无该位点如何影响端粒酶长度及活性的相关研究。

肝癌的发生是环境、遗传等多种因素共同作用的结果,也是某一个基因多个多态性位点相互作用的结果,我们研究发现 *hTERT* rs2075786 基因多态性与肝癌的发生相关,分层分析发现男性肝癌患者携带易感基因的频率增加。分析 *hTERT* rs2075786 基因多态性影响肝癌的发生机制可能:①T 等位基因可能会影响 *hTERT* mRNA 的表达,使端粒不断维

持在一定长度,细胞因此逃过凋亡而永生化;②可能会破坏基因转录时维生素 A 受体的结合位点,从而可导致端粒酶的激活,促进肝癌的发生。*hTERT* 基因多态性与肿瘤发生机制尚未完全明确,其多个多态性位点之间有无交互作用会影响肿瘤的发生及转移也是我们进一步研究的重点。

参考文献:

[1] Mirabello L,Yeager M,Chowdhury S,et al.Worldwide genetic structure in 37 genes important in telomere biology[J]. Heredity,2012,108(2):124-133.

[2] Podlevsky JD,Chen JJ. It all comes together at the ends: telomerase structure,function,and biogenesis[J]. Mutat Res, 2012,730(1-2):3-11.

[3] Melin BS,Nordfjäll K,Andersson U,et al. *hTERT* cancer risk genotypes are associated with telomere length [J]. Genet Epidemiol,2012,36(4):368-372.

[4] Maida Y,Masutomi K. Telomerase reverse transcriptase moonlights:therapeutic targets beyond telomerase[J]. Cancer Sci,2015,106(11):1486-1492.

[5] Masutomi K,Yu EY,Khurts S,et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells[J]. Cell,2003,114(2):241-253.

[6] Ramlee MK,Wang J,Toh WX,et al. Transcription regulation of the human telomerase reverse transcriptase(*hTERT*) Gene[J]. Genes (Basel),2016,7(8):E50.

[7] Duarte MC,Babeto E,Leite KRM,et al. Expression of *TERT* in precancerous gastric lesions compared to gastric cancer[J]. Braz J Med Biol Res,2011,44(2):100-104.

[8] Wang SM,Wu JP,Hu LM,et al. Common genetic variants in *TERT* contribute to risk of cervical cancer in a Chinese population[J]. Mol Carcinog,2012,51(1):118-122.

[9] Killedar A,Stutz MD,Sobinoff AP,et al. A common cancer risk-associated allele in the *hTERT* locus encodes a dominant negative inhibitor of Telomerase[J]. PLoS Genet, 2015,11(6):e1005286.

[10] Nan H,Qureshi AA,Prescott J,et al. Genetic variants in telomere-maintaining genes and skin cancer risk [J]. Hum Genet,2011,129(3):247-253.

[11] Shen J,Gammon MD,Terry MB,et al. Genetic polymorphisms in telomere pathway genes,telomere length,and breast cancer survival[J]. Breast Cancer Res Treat,2012,134(1):393-400.

[12] Hofer P,Baierl A,Bernhart K,et al. Association of genetic variants of human telomerase with colorectal polyps and colorectal cancer risk[J]. Mol Carcinog,2012,51(10):176-182.

[13] Bayram S,Ülger Y,Sümbül AT,et al. Polymorphisms in human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) gene and susceptibility to gastric cancer in a Turkish population:hospital-based case-control study[J]. Gene,2016,585(1):84-92.

[14] Bellido F,Guinó E,Jagmohan-Changur S,et al. Genetic variant in the telomerase gene modifies cancer risk in Lynch syndrome[J]. Eur J Hum Genet,2013,21(5):511-516.

[15] Gago-Dominguez M,Jiang X,Conti DV,et al. Genetic variations on chromosomes 5p15 and 15q25 and bladder cancer risk:findings from the Los Angeles-Shanghai bladder cancer case-control study[J]. Carcinogenesis,2011,32(2):197-202.