

[文章编号] 1671-587X(2018)03-0558-05

DOI:10.13481/j.1671-587x.20180319

硒蛋白 S 基因单核苷酸多态性与肝癌发病风险的关联性分析

邢少姬¹, 郑连生², 王殿栋³, 张莹⁴, 池敏⁵

(1. 包头医学院医学技术学院临床生物化学检验与分子诊断学教研室, 内蒙古包头 014060; 2. 内蒙古自治区包头市肿瘤医院胸腹外科, 内蒙古包头 014030; 3. 包头医学院第二附属医院肿瘤外科, 内蒙古包头 014030; 4. 内蒙古自治区包头市肿瘤医院检验科, 内蒙古包头 014030; 5. 内蒙古自治区人民医院核医学科, 内蒙古呼和浩特 012000)

[摘要] 目的: 探讨内蒙古自治区汉族人群硒蛋白 S (SelS) 基因单核苷酸多态性 (SNP) 在肝癌患者和健康对照者的分布情况, 阐明其与肝癌发病风险的关联性。方法: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术检测内蒙古自治区汉族肝癌患者 ($n=96$) 和健康对照者 ($n=135$) SelS 基因 rs34713741 位点基因型和等位基因频数分布, 结果经测序验证。分析 SelS 基因 SNP 与肝癌发病风险的关系。结果: SelS 基因 rs34713741 位点的 3 种基因型 CC、CT、TT 及等位基因 C、T 的频数分布在肝癌组和健康对照组间比较差异均无统计学意义 ($\chi^2=2.679$, $\chi^2=2.331$, $P>0.05$)。肝癌组和健康对照组饮酒者 CC、CT、TT 基因型和等位基因 C、T 频数分布比较差异均有统计学意义 ($\chi^2=6.533$, $\chi^2=6.417$, $P<0.05$); 携带 T 等位基因的饮酒个体患肝癌的风险增加, 是 CC 基因型的 2.297 倍 (OR=2.297, 95%CI: 1.202~4.393)。结论: SelS 基因和饮酒交互作用可能与内蒙古汉族人群肝癌的发病有关联。

[关键词] 硒蛋白 S; 单核苷酸多态性; 肝肿瘤; 基因型; 等位基因

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A

Analysis on association between single nucleotide polymorphism of selenoprotein S gene and risk of liver cancer

XING Shaoji¹, ZHENG Liansheng², WANG Diandong³, ZHANG Xuan⁴, CHI Min⁵

(1. Department of Clinical Biochemistry Laboratory and Molecular Diagnostics, Institute of Medical Technology, Baotou Medical College, Baotou 014060, China; 2. Department of Thoracic and Abdominal Surgery, Baotou Tumor Hospital, Inner Mongolia Autonomous Region, Baotou 014030, China; 3. Department of Oncological Surgery, Second Affiliated Hospital, Baotou Medical College, Baotou 014030, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Baotou Tumor Hospital, Inner Mongolia Autonomous Region, Baotou 014030, China; 5. Department of Nuclear Medicine, People's Hospital, Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the distribution of single nucleotide polymorphism (SNP) of selenoprotein S (SelS) gene in the patients with liver cancer and the healthy controls, and to clarify the correlation of the SNP and the risk of liver cancer in the Inner Mongolia Han population. **Methods:** The distribution of genotypic and allelic frequencies at rs34713741 site was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method among 96 patients with liver cancer and 135 healthy controls, and verified by gene sequencing analysis. The relationship between SNP of SelS gene and the risk of liver cancer was analyzed. **Results:** There were no differences of the frequencies of CC, CT, and TT genotypes and C and T alleles at

[收稿日期] 2017-04-04

[基金项目] 内蒙古自治区科技厅自然科学基金面上项目资助课题 (2015MS0812)

[作者简介] 邢少姬 (1977-), 女, 内蒙古自治区包头市人, 副教授, 医学硕士, 主要从事临床生物化学检验与分子诊断方面的研究。

[通信作者] 邢少姬, 副教授 (Tel: 0472-7167927, E-mail: 13664772965@163.com)

rs34713741 site of SelS gene between the patients with liver cancer and the healthy controls ($\chi^2 = 2.679$, $\chi^2 = 2.331$, $P > 0.05$). The differences in the frequencies of CC, CT, and TT genotypes and C and T alleles at rs34713741 site of SelS gene of the drinkers between liver cancer group and healthy control group were significant ($\chi^2 = 6.533$, $\chi^2 = 6.417$, $P < 0.05$). The relative risk of liver cancer in the drinkers carrying T allele was 2.297 times of the drinkers carrying genotype CC (OR = 2.297, 95% CI: 1.202 - 4.393). Conclusion: The gene-environment interaction of SelS and drinking may associate with liver cancer in the Inner Mongolia Han population.

KEYWORDS selenoprotein S; single nucleotide polymorphism; liver neoplasms; genotype; allele

原发性肝细胞癌(简称肝癌)是我国的一个重要公共健康问题,全球大约一半的肝癌患者在中国^[1]。现已明确我国肝癌的发生与乙型、丙型肝炎病毒感染及食物中黄曲霉素 B1 的摄入等环境危险因素有密切关联。但面临同样的危险因素,如粮食中的黄曲霉素 B1 污染,却只有少数人罹患肝癌^[2],提示肝癌的发生也与宿主个体遗传因素或基因与环境的交互作用有关。目前国内已有多项研究表明宿主基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与肝癌的发病风险有关。王艳等^[3]和李艳秋等^[4]研究发现:白细胞介素 28B(IL-28B)基因 rs4803223 位点和切除修复交叉互补基因 1(ERCC1)8092 位点多态性分别与广西汉族和壮族人群肝癌易感性有关。王维伟等^[5]发现:郑州和桂林两地区人群醌氧化还原酶 1(NQO1)基因型频数可能不同,但 NQO1 基因多态性与郑州和桂林两地区人群的肝癌易感性均可能具有关联性,且均与吸烟和饮酒存在协同作用。

硒蛋白 S(selenoprotein S, SelS)为硒蛋白家族的成员之一,是一种内质网和细胞膜驻留蛋白,在人体各种组织中广泛存在,如下丘脑、肝脏、脂肪组织、睾丸、心脏和肾脏等^[6],其具有抗氧化、减少细胞凋亡和抑制炎症反应等主要生理功能^[7]。因此,一旦个体 SelS 基因发生突变,可能影响其蛋白质的抗氧化损伤和抗炎反应等正常生物学功能的发挥,进而降低人体细胞抵御癌症发生的能力。近年来,国内外研究^[8-10]显示:SelS 基因启动子位点的多态性与消化系胃肠道恶性肿瘤发病有密切关联,但未见其与消化系肝癌相关性的报道。本研究旨在探讨内蒙古自治区汉族人群中肝癌患者和健康体检者 SelS 基因启动子 rs34713741 位点多态性,分析其与肝癌发生的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象 ①原发性肝癌组:选择 2015 年

1 月—2017 年 2 月内蒙古自治区包头市肿瘤医院、包头医学院第一和二附属医院及内蒙古自治区人民医院收治的原发性肝癌患者 96 例,其中男性 71 例,女性 25 例,年龄 39~81 岁,平均年龄(60.32±11.20)岁;②健康对照组:来自同期社区健康体检者 135 人,其中男性 85 人,女性 50 人,年龄 35~80 岁,平均年龄(60.07±10.42)岁。所有纳入对象均对本研究知情同意,经询问病史、体检和实验室检查排除患有其他肿瘤、冠心病、糖尿病和高血压等疾病者,且无肿瘤家族史,均已在内蒙古地区居住 10 年以上,为无血缘关系的汉族人群。同时调查记录所有入选者的饮酒状况(本研究将饮酒者定义为现时饮酒者,指饮高度白酒每月至少 4 次或每周至少 1 次,持续半年以上)。

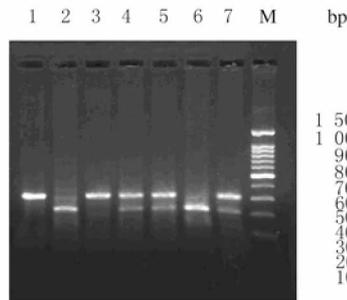
1.2 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测 ①基因组 DNA 的提取:采集研究对象空腹静脉血 2 mL 于 EDTA 抗凝管中,严格按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取外周血基因组 DNA, -20℃保存;②引物设计与合成:SelS 基因 SNP rs34713741 引物序列见参考文献[10],上游序列 5'-CTTCCGGTGCGCTCCTAC-3',下游序列 5'-GGCGACCACTGACTTCCTT-3',目的基因长度为 302 bp。并通过 PubMed-SNP 数据库查询 SelS 基因 rs34713741 两侧基因序列(NC_000015.10)的准确性,采用 BLAST 软件验证引物特异性。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;③PCR 扩增。PCR 反应体系总体积为 25 μL:模板 6 μL(约 100 ng),10 μmol⁻¹上下游引物各 1 μL,2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL,去离子水 4.5 μL。PCR 反应参数设置:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,62℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃最后延伸 5 min;④基因分型和测序:酶切反应总体积为 20 μL,包括 PCR 扩增产物 12 μL,内切酶 *Hinf* I 2.0 μL,10×限制性内切酶 Buffer

2.0 μL , 去离子水 4.0 μL 。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后, 酶切产物于 2.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 采用分子凝胶成像仪分析其基因型 (TT 型为 302 bp 1 个片段, CT 型为 302、198 和 104 bp 3 个片段, CC 型为 198 和 104 bp 2 个片段)。为验证限制性片段长度多态性 (RFLP) 基因分型的准确性, 随机选取 50 份 PCR 产物送至上海美吉生物北京实验基地测序, 测序结果与 RFLP 基因分型结果一致率达 100%。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。2 组研究对象基因型和等位基因频数比较采用 χ^2 检验。采用非条件 Logistic 回归计算风险比 (odds ratio, OR) 及其 95% 可信区间 (confidence interval, CI), 评价基因型和等位基因与肝癌发病风险的关系。检验均为双侧检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

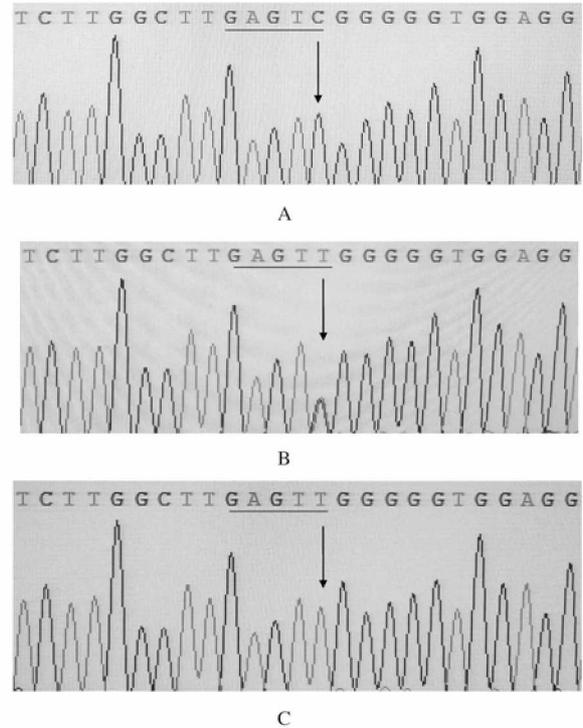
2.1 SelS 基因 rs34713741 位点 RFLP 基因分型 通过限制性内切酶 *Hinf* I 对 PCR 产物消化后电泳确定 SelS 基因 rs34713741 多态位点有 2 个等位基因 C 和 T, 可组合形成 CC、CT 和 TT 3 种基因型。见图 1。



M: 100 bp DNA ladder marker; Lane 1, 3: TT; Lane 2, 6: CC; Lane 4, 5, 7: CT.

图 1 SelS 基因 rs34713741 位点 RFLP 基因分型电泳图
Fig. 1 Electrophorogram of RFLP genotypes at rs34713741 site of SelS gene

2.2 SelS 基因 rs34713741 位点测序结果 PCR 产物测序结果显示: SelS 基因 SNP rs34713741 位点有 CC、CT 和 TT 3 种基因型, 测序结果与酶切结果完全一致。见图 2。



A: CC genotype; B: CT genotype; C: TT genotype; Line segment: Endonuclease *Hinf* I recognition site; Arrow: rs34713741 site.

图 2 SelS 基因 rs34713741 位点 PCR 产物测序结果
Fig. 2 Sequencing results of PCR products of rs34713741 site of SelS gene

2.3 2 组研究对象的一般资料 健康对照组和肝癌组研究对象在年龄和性别方面匹配, 组间比较差异无统计学意义 (年龄: $\chi^2 = 0.644$, $P = 0.422$; 性别: $\chi^2 = 3.094$, $P = 0.079$); 肝癌组饮酒者占比高于对照组, 但组间比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.888$, $P = 0.089$)。见表 1。

表 1 健康对照组和肝癌组研究对象的一般资料

Tab. 1 General informations of subjects in healthy control group and liver cancer group

| Group | Age(year) | | Gender | | Drinking | |
|-----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|----------------|----------------|
| | ≥ 50 | < 50 | Male | Female | Yes | No |
| Healthy control | 72.6% (98/135) | 27.4% (37/135) | 63% (85/135) | 37% (50/135) | 62.2% (84/135) | 37.8% (51/135) |
| Liver cancer | 67.7% (65/96) | 32.3% (31/96) | 74% (71/96) | 26% (25/96) | 72.9% (70/96) | 27.1% (26/96) |
| P | 0.422 | | 0.079 | | 0.089 | |

2.4 2 组研究对象 SelS 基因 rs34713741 位点的基因型和等位基因频数分布 为了检验研究对象 SelS 基因 rs34713741 位点多态性分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 对健康对照组人群的基因型频数进行遗传平衡检验, 结果表明: 所观察的样本具有群体代表性 ($\chi^2=0.543$, $P=0.762$)。

肝癌组患者 SelS 基因 rs34713741 位点 CC、CT 和 TT 3 种基因型分布频数分布与健康对照组比较差异无统计学意义 ($\chi^2=2.679$, $P=0.262$); C 和 T 2 种等位基因频数分布组间比较差异亦无统计学意义 ($\chi^2=2.331$, $P=0.127$)。见表 2。

表 2 2 组研究对象 SelS 基因 rs3471374 位点基因型和等位基因频数分布

Tab. 2 Distribution of genotypic and allelic frequencies at rs34713741 site of SelS gene of subjects in two groups

| Group | n | Genotypic frequency | | | Allelic frequency | |
|-----------------|-----|---------------------|----------|---------|-------------------|----------|
| | | CC | CT | TT | C | T |
| Healthy control | 135 | 78(57.8) | 47(34.8) | 10(7.4) | 203(75.2) | 67(24.8) |
| Liver cancer | 96 | 45(46.9) | 42(43.8) | 9(9.3) | 132(68.8) | 60(31.2) |

2.5 2 组饮酒者 SelS 基因 rs34713741 位点 SNP 与肝癌发病风险的关系 肝癌组和健康对照组中饮酒者 CC、CT 和 TT 基因型频数分布比较差异有统计学意义 ($\chi^2=6.533$, $P=0.038$; OR = 2.297,

95%CI: 1.202~4.393); 等位基因 C 和 T 频数分布比较差异有统计学意义 ($\chi^2=6.417$, $P=0.011$; OR = 1.901, 95%CI: 1.153~3.134)。见表 3。

表 3 2 组研究对象中饮酒者 SelS 基因 rs34713741 位点基因型和等位基因频数分布

Tab. 3 Distribution of genotypic and allelic frequencies at rs34713741 site of SelS gene of drinkers in two groups [n(η/%)]

| Group | n | Genotypic frequency | | | Allelic frequency | |
|-----------------|----|---------------------|----------|---------|-------------------|----------|
| | | CC | CT | TT | C | T |
| Healthy control | 84 | 52(61.9) | 26(31.0) | 6(7.1) | 130(77.4) | 38(22.6) |
| Liver cancer | 70 | 29(41.4) | 32(45.7) | 9(12.9) | 90(64.3) | 50(35.7) |

3 讨论

目前研究^[10]显示: 与消化系肿瘤密切相关的硒蛋白 SNP 位点多位于基因的启动子区, 该处基因的变异相比于编码区对硒蛋白表达的影响更大, 更易改变个体罹患胃肠道肿瘤的风险。SelS 基因定位于 15q26.3, 包含 6 个外显子和 5 个内含子, 分别由 1 250 和 1 292 个碱基组成 2 个转录变体, 最终编码产物均为由 189 个氨基酸残基组成的 SelS, 其中第 188 位是硒代半胱氨酸残基^[11]。目前国内外研究最多的是位于基因启动子区的 rs28665122 和 rs34713741 位点。研究^[12]显示: SelS 基因 rs28665122 位点 SNP 可调节 SelS 的表达, 并对促炎性细胞因子的释放产生影响。Meplan 等^[9]发现: 捷克人群 SelS 基因 rs34713741 位点 SNP 与结直肠癌的发病有关联, TT 纯合子个体的患病风险是 CC 纯合子个体的 1.68 倍。毛华杰等^[8]和张龙等^[10]针对 SelS 基因启动子区 rs34713741 位点 SNP 与胃肠道癌症遗传易感性的

相关性研究发现: SelS 基因 rs34713741 位点 SNP 与结直肠癌和胃癌的发病有关, T 等位基因可能是中国人群胃肠癌发病的危险因素之一。本课题组研究^[13]显示: SelS 基因 rs34713741 位点 SNP 与内蒙古汉族人群胃癌的发病有关联, T 等位基因可能是胃癌发病的危险因素之一, 同时吸烟可增加发病的风险。

本研究采用 PCR-RFLP 技术对 96 例内蒙古汉族肝癌患者及 135 例体检健康对照者 SelS 基因 rs34713741 位点的基因型和等位基因频数进行检测分析, 结果表明: 肝癌组患者 SelS 基因 rs34713741 位点 CC、CT 和 TT 3 种基因型频数分布与健康对照组比较差异无统计学意义, C 和 T 2 种等位基因频数分布 2 组比较差异无统计学意义; 但在肝癌组和健康对照组饮酒者中 CC、CT 和 TT 基因型频数分布比较差异有统计学意义, C 和 T 等位基因频数分布比较差异亦有统计学意义, 提示 SelS 基因及饮酒存在交互作用, 且与肝癌的发病可能有关联。

大量饮酒是导致肝癌的危险因素之一,其机制主要涉及2个方面:首先,酒精在体内的代谢产物乙醛能与DNA形成加合物,造成DNA损伤和基因突变,对动物有明显致癌作用;其次,乙醇可诱导肝微粒体乙醇氧化途径,不仅增加乙醛浓度,也促使大量氧自由基的产生,进而作用于人体细胞基因组DNA,引起其损伤,最终导致基因突变或细胞癌变^[14-15]。本研究结果显示:肝癌组饮酒者占72.9%,高于对照组(62.2%),但组间比较差异无统计学意义;可能与内蒙古自治区人群的饮酒习惯和标本量少有一定关系,同时酒的品牌、饮酒频率和酒龄等不同亦可能影响肝癌的发病,具体情况有待进一步研究。

肝癌是一种多种危险因子共同参与、相互作用的恶性肿瘤^[16],一项河北省原发性肝癌易感因素的病例对照研究^[17]显示:吸烟,饮酒,体质指数(BMI)增高,常食用霉变食物、腌制食品和剩饭菜,乙肝和肝癌家族史等均是导致肝癌发病率增高的危险因素。肝癌发生也是一个受多基因、遗传与环境因素等综合影响的复杂过程,在注重遗传基因多态性识别同时,需要更加深入探讨可能存在的遗传与环境因素之间的交互作用^[18]。本研究结果也进一步表明了基因与环境因素共同作用可能使个体罹患癌症的风险增加。但由于本研究所涉样本例数较少,易出现结果偏倚。在后续的研究中需继续增加样本例数,进一步对各基因型在各组中的分布进行分析,探讨其与患者性别、年龄、吸烟、家族史和乙肝病毒感染史等的相关性。

[参考文献]

- [1] Chen W, Zheng R, Zeng H, et al. Annual report on status of cancer in China, 2011 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27 (1): 2-12.
- [2] 杨志国, 谢裕安, 匡志鹏, 等. 广西扶绥人群 GSTM1 和 GSTT1 基因多态性与肝癌易感性关系的研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2009, 16 (13): 970-973.
- [3] 王 艳, 张恒辉, 陈衍辉, 等. 白细胞介-28B 基因多态性与原发性肝细胞肝癌的关系 [J]. *中华预防医学杂志*, 2012, 46 (6): 527-532.
- [4] 李艳秋, 赵惠柳, 欧 超, 等. ERCC1 基因多态性与肝癌患者易感性分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37 (18): 2523-2525.
- [5] 王维伟, 陈国勇, 孙建军, 等. 郑州和桂林两地区醌氧化还原酶 1 基因多态性与肝癌易感性的关系 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2013, 19 (11): 836-840.
- [6] Walder K, Kantham L, McMillan JS, et al. Tanis: a link between type 2 diabetes and inflammation? [J]. *Diabetes*, 2002, 51 (6): 1859-1866.
- [7] 张 龙, 王晓春. 硒蛋白家族基因变异与胃肠道肿瘤遗传易感性的关联性研究进展 [J]. *广东医学*, 2014, 35 (7): 1128-1131.
- [8] 毛华杰, 朱 燕, 卢淑华, 等. 硒蛋白 S 基因 G-105A、G-254A 位点多态性与湖南汉族人群胃癌遗传易感性的相关研究 [J]. *肿瘤防治研究*, 2015, 42 (6): 582-586.
- [9] Meplan C, Hughes DJ, Pardini B, et al. Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31 (6): 1074-1079.
- [10] 张 龙, 黄玉梅, 李春波, 等. 硒蛋白 S 基因多态性与结直肠癌遗传易感性的相关性 [J]. *临床检验杂志*, 2014, 32 (7): 528-531.
- [11] Olsson M, Olsson B, Jacobson P, et al. Expression of the selenoprotein S (SELS) gene in subcutaneous adipose tissue and SELS genotype are associated with metabolic risk factors [J]. *Metab Chin Exp*, 2011, 60 (1): 114-120.
- [12] 杜新爱, 熊咏民. 硒蛋白 S 基因变异与疾病的研究进展 [J]. *国外医学: 医学地理分册*, 2013, 34 (1): 16-18.
- [13] 邢少姬, 郑连生, 王殿栋, 等. 硒蛋白 S 基因多态性与内蒙古汉族人群胃癌发病风险的关联研究 [J]. *现代预防医学杂志*, 2017, 44 (13): 2305-2308.
- [14] 薛开先. 乙醇代谢酶遗传多态与癌易感性关系的研究 [J]. *国外医学: 遗传学分册*, 2000, 23 (1): 24-27.
- [15] 贺菽嘉, 顾永耀, 廖志红. II 相代谢酶基因多态性联合烟酒习惯对肝癌易感性的影响 [J]. *基础医学与临床*, 2007, 27 (6): 666-669.
- [16] 师 金, 李道娟, 梁迪. 河北省肝癌发病和死亡 40 年变化趋势分析 [J]. *肿瘤防治研究*, 2016, 43 (11): 990-995.
- [17] 刘 英, 赵 桐, 徐 英, 等. 河北省原发性肝癌易感因素的病例对照研究 [J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2014, 17 (12): 2009-2012.
- [18] 赵君慧, 李 华, 迪 吉. 青海地区藏族人群着色性干皮病基因 D、谷胱甘肽-S 转移酶 M1 基因多态性与肝癌易感性的关系 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2014, 22 (11): 831-836.