

# 苏皖地区汉族人群 XRCC4 rs6869366 多态性与前列腺癌易感性的关系

李久明<sup>1</sup>, 吴宏飞<sup>1\*</sup>, 糜远源<sup>2</sup>, 冯宁翰<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属南京明基医院泌尿外科, 江苏 南京 210019; <sup>2</sup>南京医科大学第一附属医院泌尿外科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:研究中国苏皖地区汉族人群 X 线修复交叉互补组 4(XRCC4) rs6869366 多态性与前列腺癌(prostate cancer, PCa)易感性的关系。方法:采用病例-对照研究,提取 187 例 PCa 患者(病例组)和 210 例非肿瘤患者(对照组)外周血基因组 DNA,应用聚合酶链反应-连接酶特异检测技术(polymorphism chain reaction and ligase detection reaction, PCR-LDR)分析两组 XRCC4 rs6869366 位点的多态性,比较不同基因型与 PCa 易感性的关系。结果:以携带 TT 基因型的对象为参照组,携带 GT 基因型者患 PCa 的风险是携带 TT 基因型的 1.15 倍(OR=2.15, 95%CI: 1.02~4.53)。结论:XRCC4 rs6869366 与苏皖地区汉族人群 PCa 的易感性有关,GT 可能是 PCa 的易感基因型。

**[关键词]** XRCC4;前列腺癌;基因多态性;易感性

**[中图分类号]** R737.25

**[文献标识码]** B

**[文章编号]** 1007-4368(2012)12-1704-04

目前前列腺癌(prostate cancer, PCa)的发病率在美国已经超过肺癌,成为首位危害男性健康的肿瘤。流行病学统计,欧美国家 2010 年 PCa 新发 217 730 例,32 050 例死于 PCa,是导致欧美男性死亡的第 2 大肿瘤<sup>[1]</sup>。近年来,我国前列腺癌发病率呈逐渐增加趋势<sup>[2]</sup>。

Minelli 等<sup>[3]</sup>最近的研究表明 PCa 发病与氧化应激导致的 DNA 损伤有关。在真核细胞中,最严重的 DNA 损伤形式是双链断裂(double strand break, DSB)。如不能很快修复,将导致染色质畸变,最终损害组织器官并引发肿瘤<sup>[4]</sup>。而 XRCC4 在该修复过程起关键作用。近年来研究 XRCC4 的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)包括启动子区 rs6869366、rs2075685、rs2075686 和 rs7727691。但 PCa 与 XRCC4 rs6869366 位点多态性的文献鲜有报道。本研究采用聚合酶链反应-连接酶特异检测技术(polymorphism chain reaction and ligase detection reaction, PCR-LDR)方法检测 PCa 患者和正常健康人 XRCC4 rs6869366 位点的 SNP 变异情况,探讨

XRCC4 rs6869366 位点基因多态性与 PCa 遗传易感性的关系,为进一步阐明 PCa 的发生发展机制奠定基础。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

收集 2006~2010 年南京医科大学第一附属医院、南京明基医院的 PCa 患者 187 例,年龄 51~94 (73.58 ± 8.36) 岁。对照组为同期门诊体检的非肿瘤、年龄相匹配的非前列腺疾病的男性志愿者 210 例,年龄 47~96(72.40 ± 9.84) 岁。病例组和对照组人群均为长期居住于苏、皖地区的汉族人。PCa 患者均经穿刺活检或根治手术病理检查证实,对照组经病史询问、临床症状和体征及其他辅助检查(如 X 线、CT、MR 等)排除肿瘤。

### 1.2 方法

使用美国癌症研究中心的“PCa 危险因素调查表”对本实验所有研究对象进行问卷调查。包括一般情况、工作情况、既往史及服药史、生活及生育史、家族史、环境设施,以及吸烟、饮酒、饮食等生活方式。吸烟习惯定义为每天>5 支且时间>5 年;饮酒习惯定义为每周>3 次且时间>10 年;肿瘤家族史定义为一级亲属(父母、兄妹、子女)中有患肿瘤的。肿瘤分期使用国际通用的 TNM 分期,通过病理诊断、盆腔 CT、MRI 及核素骨扫描来确定。

ReadyAmp 基因组纯化系统试剂盒(Promega 公

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81272831);南京明基医院科研基金(SRD20100004),江苏省自然科学基金(BK2010577);江苏省兴卫工程重点人才(RC20 1178);江苏省六大人才高峰资助

\*通讯作者, E-mail: Willis.Wu@benqmedicalcenter.com; fnh888@njmu.edu.cn

司,美国)、ABI 9600 PCR 扩增仪和 ABI 3730 测序仪(ABI 公司,美国)、*Taq* 酶和 dNTP(MBI 公司,美国)、*Taq* DNA ligase(NEB 公司,美国)。

外周血样品中 DNA 使用 ReadyAmp 基因组纯化系统试剂盒提取。利用 PCR-LDR 技术对 DNA 进行基因分型。PCR 扩增引物由上海捷瑞公司合成: F 5'-AGATGCCAACTCAAAGATACT-3'; R 5'-TTA-GACATAGGTGGAAAACGG 3'。PCR 扩增体系:模版 DNA 1  $\mu$ l, 10 $\times$  缓冲液 1.5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L) 1.5  $\mu$ l, dNTP(10 mmol /L) 0.3  $\mu$ l, 正、反引物(10 pmol/ $\mu$ l) 0.25  $\mu$ l, *Taq* 酶 (5 U/ $\mu$ l) 0.25  $\mu$ l, 补水至 15  $\mu$ l。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 保温 3 min。扩增产物大小片段为 167 bp。探针设计与合成均由上海捷瑞公司完成: TG: 5'-TTTTTTTTTTTCGTAGCTCTGCAAACAATGAACTG-3'; TT: 5'-TTTTTTTTTTTTCGTAGCTCTGCAAACAATGAACTT-3'; TR: 5'-P-TTGACATCCCAAGCTCACAGG-AATATTTTTT-FAM-3'。TG 和 TT 代表两种不同碱基的左端探针, TR 代表带荧光的右端共用探针。连接 PCR 产物的大小为 64/G, 67/T。连接反应: PCR 产物 3  $\mu$ l, 10 $\times$  *Taq* DNA ligase 缓冲液 1  $\mu$ l, *Taq* DNA 连接酶(40 U/ $\mu$ l) 0.125  $\mu$ l, 探针(10 pmol/ $\mu$ l) 0.01  $\mu$ l, 补水至 10  $\mu$ l。连接条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 min, 共 25 个循环。取 1  $\mu$ l 连接产物, 加 10  $\mu$ l 上样缓冲液(已混入 MARKER), 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 立即冰水浴。最后 ABI 3730 测序仪检测结果。红色为 MARKER, 蓝色为目的条带。

### 1.3 统计学方法

根据 Hardy-Weinberg 定律, 了解各基因型在人群中遗传平衡符合程度。两组间基因型分布的差异采用卡方检验。多因素 Logistic 回归计算比值比(odds ratios, OR)及其 95% 可信区间(confidence intervals, CI)表示相对风险度。所有数据处理均采用 SAS 统计软件(Vesion 9.1.3; SAS Institute, Inc, Cary, NC)。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

本课题组之前研究发现 PCa 组和对照组年龄与吸烟、饮酒习惯比较差异无统计学意义<sup>[5]</sup>。PCa 组中体质指数 > 23 的患者比例高于对照组, 组间差异有统计学意义(P = 0.029); 且 PCa 组中有肿瘤家族史的患者比例亦高于对照组, 组间差异也有统计学意义(P = 0.001, 表 1)。

表 1 病例组和对照组一般情况 [n(%)]

观察指标	病例组(n=187)	对照组(n=210)	P 值
年龄			0.255
≤ 70 岁	55 (29.41)	73 (34.76)	
> 70 岁	132 (70.59)	137 (65.24)	
体质指数			0.029
≤ 23	74 (39.57)	106 (50.48)	
> 23	113 (60.43)	104 (49.52)	
肿瘤家族史			0.001
无	136 (72.73)	181 (86.19)	
有	51 (27.27)	29 (13.81)	

XRCC4 基因 rs6869366 基因型分析为 3 种: GG、GT 和 TT。通过 ABI 3730 测序仪测出每个样本的基因型(图 1)。

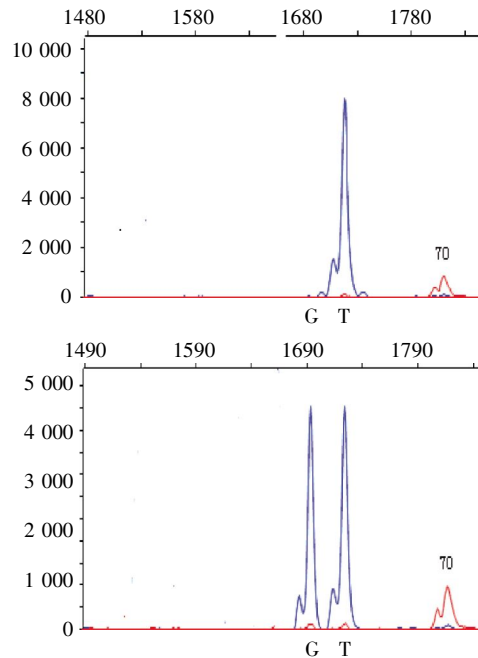


图 1 基因型分型图谱(上图为 TT, 下图为 GT)

XRCC4 基因 rs6869366 位点基因型分布情况: rs6869366 位点在对照组中杂合子基因型 GT 占 6.19%, 病例组占 11.76%; 对照组纯合子基因型 TT 占 93.81%, 病例组占 88.24%; 而基因型 GG 均为 0。比较 PCa 组和对照组间 rs6869366 位点多态性分布情况, 分布符合 Hardy-Weinberg 平衡(P = 0.039)。在调整了一些潜在的混杂因素(年龄、体质指数和肿瘤家族史)以后, 以携带 TT 基因型的个体为参照组, Logistic 回归分析显示, 携带有 GT 基因型的个体与 PCa 发病风险之间有相关性 (OR = 2.15, 95% CI: 1.02~4.53, 表 2)。

## 3 讨论

流行病学研究表明, 遗传可能是 PCa 发生发展

表2 PCa组和对照组基因型频率分布

	病例组[n(%)]	对照组[n(%)]	校正前P值	校正后P值*	校正前OR(95%CI)	校正后OR(95%CI)*
GG	0	0				
GT	22(11.76)	13(6.19)	0.051	0.044	2.02(0.99~4.14)	2.15(1.02~4.53)
TT	165(88.24)	197(93.81)			1.0	1.0

\* :经年龄、体重指数和肿瘤家族史调整。

的重要危险因素<sup>[6-7]</sup>。遗传学中,基因多态性研究对于早期发现和预测癌症高危人群具有重要的现实意义<sup>[8]</sup>。近年来基因研究逐渐深入,某些位于基因内部的SNPs有可能直接影响蛋白质结构或者表达水平,它们可能代表疾病遗传机制中的某些作用因素<sup>[9]</sup>。

非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)被认为是真核细胞DSB修复的主要途径,而XRCC4基因在NHEJ途径中起关键作用<sup>[10]</sup>。在NHEJ途径中,DNA末端首先被多种蛋白如KU70/80、DNA依赖的蛋白激酶催化亚基等互补封闭,后被X线修复交叉互补组4/连接酶IV复合体修复连接<sup>[11]</sup>,Difilippantonio等<sup>[12]</sup>在XRCC4基因敲除小鼠中,观察到晚期胚胎大量死亡,伴有神经生成缺陷,并通过实验证实与有丝分裂后的新生成神经细胞大量凋亡有关,提示细胞分裂中DNA的修复依赖XRCC4末端连接蛋白的作用。XRCC4基因敲除小鼠的致死性可因P53基因的缺陷而解救,然而,尽管XRCC4/P53双基因敲除小鼠出生后能生存一段时间,但它们最终死于前B细胞淋巴瘤<sup>[13]</sup>。与XRCC4基因敲除小鼠类似,DNA连接酶IV基因敲除小鼠也在胚胎生长期死亡。连接酶IV/P53双基因敲除与XRCC4/P53双基因敲除有着同样的效果<sup>[14]</sup>。XRCC4/连接酶复合体突变中,表现出对辐射的高敏感、V(D)J重组受损及染色体变性,这些发现提示XRCC4/连接酶复合体可能作为哺乳动物DNA监护人起着抑制肿瘤的重要作用。

Chiu等<sup>[15]</sup>研究发现XRCC4基因rs6869366位点的GT或GG基因型胃癌的发病率比TT基因型高(OR=3.79,95%CI:1.47~9.82),rs6869366位点的GT或GG基因型乳腺癌发病率比GG基因型高(OR=2.33,95%CI:1.37~3.98)<sup>[16]</sup>。XRCC4 rs6869366位点携带G等位基因的基因型(GT+GG)可显著增加肺癌的患病风险(OR=1.607,95%CI:1.138~2.270)<sup>[17]</sup>。在本研究中,GT基因型个体罹患前列腺癌风险明显比TT基因型高,OR(95%CI)为2.15(1.02~4.53)。对于不同肿瘤之间研究结果的差异可能与XRCC4基因rs6869366位点的多态性在肿瘤形成过程中起的不同作用有关。

本研究通过对397例苏、皖地区汉族人群的病例对照研究结果表明,XRCC4基因rs6869366位点基因多态性与PCa易感性有显著差异,携带GT基因型的个体患前列腺癌的风险性增加。XRCC4 rs6869366与苏皖地区汉族人群PCa的易感性有关,GT可能是PCa的易感基因型,但本文的样本量相对较少,因此,需要在更大样本中进行更广泛的研究,才能得到更全面客观的结论。

## [参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300
- [2] 李鸣, 张思维, 马建辉, 等. 中国部分市县前列腺癌发病趋势比较研究 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2009, 30(6): 368-370
- [3] Minelli A, Bellezza I, Conte C, et al. Oxidative stress-related aging: A role for prostate cancer? [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1795(2): 83-91
- [4] Burma S, Chen BP, Chen DJ. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity [J]. DNA Repair (Amst), 2006, 5(9-10): 1042-1048
- [5] 吴宏飞, 许斌, 李久明. 苏皖地区汉族人群P53 codon72多态性与前列腺癌易感性的关系 [J]. 中国男科学杂志, 2010, 24(5): 7-11
- [6] Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, et al. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer [J]. Nat Genet, 2008, 40(3): 310-315
- [7] Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility [J]. Nat Genet, 2008, 40(3): 316-321
- [8] Torring N, Borre M, Sorensen KD, et al. Genome-wide analysis of allelic imbalance in prostate cancer using the Affymetrix 50K SNP mapping array [J]. Br J Cancer, 2007, 96(3): 499-506
- [9] Arg462Gln and Asp541Glu polymorphisms in ribonuclease L and prostate cancer risk: a meta-analysis [J]. Journal of Biomedical Research, 2010, 5: 365-373
- [10] Pfeiffer P, Goedecke W, Kuhfittig-Kulle S, et al. Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations [J]. Cytogenet Genome Res, 2004, 104(1-4): 7-13

(下转至1710页)

pancreatic carcinoma [J]. *World J Surg*, 2002, 26 (6): 715-720

[7] Ceyhan GO, Bergmann F, Kadıhasanoglu M, et al. Pancreatic neuropathy and neuropathic pain—a comprehensive pathomorphological study of 546 cases [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(1): 177-186

[8] Eisenberg E, Carr DB, Chalmers TC, et al. Neurolytic celiac plexus block for treatment of cancer pain; a meta-analysis [J]. *Anesth Analg*, 1995, 80(2): 290-295

[9] Yan BM, Myers RP. Neurolytic celiac plexus block for pain control in unresectable pancreatic cancer [J]. *Am J Gastroenterol*, 2007, 102(2): 430-438

[10] Köninger J, Wente MN, Müller MW, et al. Surgical palliation in patients with pancreatic cancer [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2007, 392(1): 13-21

[11] Xie B, Ling JJ. The efficacy of high-intensity focused ultrasound (HIFU) in advanced pancreatic cancer [J]. *Clin Oncol Cancer Res*, 2008, 5(3): 183-186

[12] Xiong LL, Hwang JH, Huang XB, et al. Early clinical experience using high intensity focused ultrasound for palliation of inoperable pancreatic cancer [J]. *J Pancreas*, 2009, 10(2): 123-129

[13] 王榕生, 穆庆霞, 刘凌翔, 等. 高能聚焦超声热疗合并化疗治疗晚期胰腺癌近期疗效观察 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2003, 23(5): 460-462

[收稿日期] 2012-04-23

(上接至 1706 页)

[11] Valerie K, Povirk LF. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair [J]. *Oncogene*, 2003, 22(37): 5792-5812

[12] Difilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, et al. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation [J]. *Nature*, 2000, 404 (6777): 510-514

[13] Gao Y, Ferguson DO, Xie W, et al. Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development [J]. *Nature*, 2000, 404 (6780): 897-900

[14] Frank KM, Sharpless NE, Gao Y, et al. DNA ligase IV deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway [J]. *Mol Cell*, 2000, 5(6): 993-1002

[15] Chiu CF, Wang CH, Wang CL, et al. A novel single nucleotide polymorphism in XRCC4 gene is associated with gastric cancer susceptibility in Taiwan [J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(2): 514-518

[16] Chiu CF, Wang HC, Wang CH, et al. A new single nucleotide polymorphism in XRCC4 gene is associated with breast cancer susceptibility in Taiwanese patients [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(1A): 267-270

[17] 陈星, 樊丽辉, 邱月锋, 等. DNA 双链断裂修复基因 XRCC4 多态性与肺癌易感性的关系 [J]. *肿瘤*, 2010, (10): 852-859

[收稿日期] 2012-03-23