

• 临床检验研究论著 •

## STAT3 及 XRCC4 基因多态性与肝细胞癌易感性的关系研究\*

刘 懿<sup>1</sup>, 余德才<sup>2</sup>, 潘明洁<sup>3</sup>, 毕永春<sup>3</sup>, 周乙华<sup>1,3,△</sup>

(南京大学医学院附属鼓楼医院: 1. 感染科; 2. 肝胆外科; 3. 检验科, 江苏南京 210008)

**摘要:**目的 探讨转录激活因子 3(STAT3)及 X 线修复交叉互补基因 4(XRCC4)基因多态性与中国人群肝细胞癌(HCC)易感性的关系。方法 采用病例对照研究,以确诊的 200 例乙型肝炎病毒(HBV)感染相关 HCC 为肝癌组,207 例性别及年龄匹配的 HBsAg 阳性患者为非肝癌组。采用 PCR-限制性长度多态性技术检测 STAT3 rs2292152 和 XRCC4 rs1805377 多态性位点的基因型,Logistic 回归分析比较不同基因型与 HCC 易感风险的关系。结果 (1)STAT3 rs2292152 位点 3 种基因型(CC、CG 和 GG 型)在肝癌组分布频率分别为 17%(34/200)、49.5%(99/200)和 33.5%(67/200),在非肝癌组中分别为 18.4%(38/207)、56.5%(117/207)和 25.1%(52/207),各基因型在两组之间的差异无统计学意义( $P>0.05$ );以 CC 基因型作参照,携带 rs2292152 GG 型的个体 HCC 患病风险差异无统计学意义( $OR=1.440, 95\%CI=0.800\sim 2.592, P=0.224$ )。(2)XRCC4 rs1805377 位点 3 种基因型(AA、GA 和 GG 型)在肝癌组分布频率分别为 61%(122/200)、30%(60/200)和 9%(18/200),在非肝癌组中分别为 59.9%(124/207)、31.9%(66/207)和 8.2%(17/207),各基因型在两组之间的差异无统计学意义( $P>0.05$ );以 AA 基因型作参照,携带 rs1805377 GG 型的个体 HCC 患病风险差异无统计学意义( $OR=1.076, 95\%CI=0.530\sim 2.185, P=0.839$ )。结论 STAT3 rs2292152 和 XRCC4 rs1805377 多态性位点可能与中国人群 HBV 相关 HCC 易感性无密切关系。

关键词:肝细胞癌; 转录激活因子 3; X 线修复交叉互补基因 4; 单核苷酸多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.07.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)07-0850-03

## A case-control study on the relationship between polymorphisms of STAT3 and XRCC4 gene and the risk of hepatocellular carcinoma\*

Liu Yi<sup>1</sup>, Yu Decai<sup>2</sup>, Pan Mingjie<sup>3</sup>, Bi Yongchun<sup>3</sup>, Zhou Yihua<sup>1,3,△</sup>

(1. Department of Infectious Diseases; 2. Department of Hepatobiliary Surgery; 3. Department of Laboratory Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

**Abstract: Objective** To investigate the association of genetic polymorphisms of STAT3 and XRCC4 with susceptibility to hepatocellular carcinoma (HCC) in Chinese population. **Methods** In this case-control study, a total of 200 HCC patients infected with hepatitis B virus (HBV) and 207 age- and gender-matched non-HCC controls infected with HBV were recruited. Genetic polymorphisms of STAT3 rs2292152 and XRCC4 rs1805377 were genotyped using polymerase chain reaction combined with restriction fragment length polymorphism method (PCR-RFLP). Logistic regression model was used to analyze the relationship between different genotypes and their susceptibility to HCC. **Results** (1) The frequencies of CC, CG and GG genotype on STAT3 rs2292152 were 17% (34/200), 49.5% (99/200) and 33.5% (67/200) respectively in the HCC group, and 18.4% (38/207), 56.5% (117/207) and 25.1% (52/207) respectively in non-HCC group, and there was no statistical significance ( $P>0.05$ ). Compared with CC genotype, rs2292152 GG genotype carriers showed no significant different in the susceptibility to HCC ( $OR=1.440, 95\%CI=0.800\sim 2.592, P=0.224$ ). (2) The frequencies of AA, GA and GG genotypes on XRCC4 rs1805377 were 61% (122/200), 30% (60/200) and 9% (18/200) respectively in the HCC group, while 59.9% (124/207), 31.9% (66/207) and 8.2% (17/207) respectively in non-HCC group, and there was no statistical significance ( $P>0.05$ ). Compared with AA genotype, rs1805377 GG genotype carriers showed no significant different in the susceptibility to HCC ( $OR=1.076, 95\%CI=0.530\sim 2.185, P=0.839$ ). **Conclusion** The polymorphisms of STAT3 rs2292152 and XRCC4 rs1805377 were not closely associated with susceptibility to HCC in Chinese population.

**Key words:** hepatocellular carcinoma; signal transducer and activators of transcription 3; X-ray repair cross complementing group 4; single nucleotide polymorphism

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见恶性肿瘤之一,病死率高<sup>[1]</sup>。慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是我国 HCC 的主要危险因素,其发病风险较健康人可超过 100 倍<sup>[2]</sup>,而且 HCC 常呈现家族聚集性<sup>[3-4]</sup>。HCC 发生与人体的遗传易感性有关。基于候选基因策略和全基因组关联分析的大量研究表明,信号传导与转录激活因子 3(signal transducer and activators of transcription 3, STAT3)及 X 线修复交叉互补基因 4(X-ray repair cross complementing

group 4, XRCC4)与多种肿瘤易感性有关,但与 HCC 的关系研究较少<sup>[5-12]</sup>。最近, Xie 等<sup>[13]</sup>和 Jung 等<sup>[14]</sup>发现, STAT3 rs2292152 和 XRCC4 rs1805377 位点与 HCC 易感性有关。作者对 200 例慢性 HBV 感染并发 HCC 的患者进行相关研究,现将结果分析如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 采用病例对照研究方法。肝癌组来自 2008 年 11 月至 2013 年 4 月南京市鼓楼医院肝胆外科收治的经临

床和影像学和(或)病理诊断确诊为 HCC 的患者,共 200 例。非肝癌组为年龄及性别匹配的无肿瘤病史的 HBsAg 阳性者 207 例。所有研究对象均为汉族,经知情同意后,留取外周血,分离血清及血细胞, -20 °C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 从外周血白细胞中分离基因组 DNA,白细胞经蛋白酶 K 消化后,酚/氯仿抽提 DNA 两次,无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤,空气干燥后溶于 100 μL Tris-ED-TA 缓冲液, -20 °C 保存。

1.2.2 基因多态性检测 采用聚合酶链反应-限制性长度多态性(PCR-RFLP)技术检测 STAT3 rs2292152 和 XRCC4 rs1805377 位点基因型。引物序列参照参考文献[15-16], rs2292152 位点:上游引物 5'-TCC CCT GTG ATT CAG ATC CC-3',下游引物 3'-CAT TCC CAC ATC TCT GCT CC-5',扩增产物 233 bp;rs1805377 位点:上游引物 5'-TTC ACT TAT GTG TCT CTT CA-3',下游引物 3'-AAC ATA GTC TAG TGA ACA TC-5',扩增产物 237 bp。PCR 反应体系总体积 50 μL,其中模板 DNA 100 ng,上下游引物各 15 pmol/L;扩增条件:94 °C 预变性 3 min,94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 30 s,循环 35 次,72 °C 延伸 5 min。酶切体系总体积 10 μL,rs2292152 和 rs1805377 位点的 PCR 产物各取 5 μL,分别加入 Msp I 内切酶 2 U(NEB,北京)及 MluC I 内切酶 2 U(NEB,北京),37 °C 水浴 2 h 后,分别用 2%和 2.5%琼脂糖凝胶(含溴化乙啶)电泳,紫外分析仪下观察结果并记录。两位点每种基因型各取 3 例 PCR 产物,纯化后测序(ABI 3130,Applied Biosystems),验证酶切方法的准确性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行数据录入与统计分析。两组间年龄差异采用 t 检验,组间等位基因及基因型分布频率采用 χ<sup>2</sup> 检验或 Fisher's 确切概率法,Logistic 单因素回归分析计算比值比(odds ratios,OR),95%可信区间(95%CI)比较不同基因型与 HCC 风险的相关性。拟合优度 χ<sup>2</sup> 检验验证对照组是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。所有的统计学检验均为双侧概率检验,检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 肝癌组和非肝癌组一般情况比较 采用病例对照研究方法。肝癌组共 200 例,其中,男性 173 例(86.5%),女性 27 例(13.5%);平均年龄(52.28±10.91)岁。非肝癌组共 207 例,男性 168 例(81.2%),女性 39 例(18.8%);平均年龄(51.62±13.51)岁。两组年龄及性别构成比差异无统计学意义(P>0.05),具有可比性。

2.2 STAT3 rs2293152 和 XRCC4 rs1805377 多态性位点等位基因及基因型分布频率与 HCC 的关系 多态性位点 rs2293152 和 rs1805377 每种基因型各取 3 例,经 DNA 序列分析,证实酶切方法准确,结果可靠。rs2293152 和 rs1805377 位点非肝癌对照组的基因型频率分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡(P>0.05),选取的标本具有人群代表性。

STAT3 rs2293152 位点的 3 种基因型检测结果见表 1。CC,CG 和 GG 型在肝癌组的分布频率分别为 17%(34/200)、49.5%(99/200)和 33.5%(67/200),在非肝癌组分别为 18.4%(38/207)、56.5%(117/207)和 25.1%(52/207),各种基因型在两组之间的差异无统计学意义(χ<sup>2</sup> = 3.494, P = 0.174);等位基因 C 和 G 在肝癌组中的频率分别为 41.75%(167/400)和 58.25%(233/400),对照组中分别为 46.6%(193/414)和 53.4%(221/414),等位基因在两组间的差异无统计学意义(χ<sup>2</sup> = 1.955, P = 0.162)。

XRCC4 rs1805377 位点的 3 种基因型检测结果见表 2。AA,GA 和 GG 型在肝癌组中的分布频率分别为 61%(122/200)、30%(60/200)和 9%(18/200),在非肝癌组中分别为 59.9%(124/207)、31.9%(66/207)和 8.2%(17/207),各种基因型在两组间的差异无统计学意义(χ<sup>2</sup> = 0.210, P = 0.900)。等位基因 A 和 G 在肝癌组中的频率分别为 76%(304/400)和 24%(96/400),非肝癌组中分别为 75.85%(314/414)和 24.15%(100/414),等位基因在两组间的差异无统计学意义(χ<sup>2</sup> = 0.003, P = 0.959)。

单因素 Logistic 回归分析显示,rs2293152 和 rs1805377 位点各基因型与 HCC 患病风险间关联性比较差异均无统计学意义(P>0.05),进一步调整年龄及性别影响因素后,其差异仍无统计学意义(P>0.05),这两个多态性位点可能与 HCC 易感无关。

表 1 肝癌组和非肝癌组 STAT3 rs2293152 基因型及等位基因分布

基因型及等位基因	肝癌组 [n(%)]	非肝癌组 [n(%)]	OR (95% CI)
基因型			
CC	34(17)	38(18.4)	1
CG	99(49.5)	117(56.5)	0.946(0.554~1.614)
GG	67(33.5)	52(25.1)	1.440(0.800~2.592)
CG+GG	166(83)	169(81.6)	1.098(0.659~1.828)
等位基因			
C	167(41.75)	193(46.6)	—
G	233(58.25)	221(53.4)	—

—:此项无数据。

表 2 肝癌组和非肝癌组 XRCC4 rs1805377 基因型及等位基因分布

基因型及等位基因	肝癌组 [n(%)]	非肝癌组 [n(%)]	OR(95% CI)
基因型			
AA	122(61)	124(59.9)	1
GA	60(30)	66(31.9)	0.924(0.601~1.420)
GG	18(9)	17(8.2)	1.076(0.530~2.185)
GA+GG	78(39)	83(40.1)	0.955(0.642~1.421)
等位基因			
A	304(76)	314(75.85)	—
G	96(24)	100(24.15)	—

—:此项无数据。

3 讨 论

肝癌的发病机制复杂,人体基因多态性位点可能通过改变氨基酸编码或者 mRNA 转录,影响基因的表达和蛋白质功能,导致疾病易感性差异,作者通过研究易感基因多态性位点与 HCC 的关系,希望对发生 HCC 的遗传学机理有更深入的认识。

STAT3 具有转录调控和信号转导双重功能,对细胞生理功能起着关键性调控作用,但其持续激活后,诱导细胞增殖、分化及凋亡相关基因的异常高表达,表现出致癌作用。STAT3 的激活在人类肿瘤中广泛存在<sup>[17-20]</sup>。

STAT3 rs2293152 是位于外显子区的标签单核苷酸多态性位点,目前,仅有 Xie 等<sup>[13]</sup>对中国人群 1 021 例 HCC,1 012 例健康对照及 990 例非肝癌 HBV 感染者进行了研究,与对照

组(健康对照+非肝癌 HBV 感染者)相比,rs2293152 GG 基因型增加了 HCC 的发病风险(调整后  $OR = 1.30, 95\% CI = 1.04 \sim 1.62, P = 0.019$ )。本研究以 HBsAg 阳性非肝癌病例作为对照,发现 rs2293152 GG 基因型与 HCC 易感性无关( $OR = 1.440, 95\% CI = 0.800 \sim 2.592, P = 0.224$ )。本研究中 rs2293152 GG 基因型增加 HCC 风险的趋势与 Xie 等<sup>[13]</sup>一致。而且,Xie 等<sup>[13]</sup>的大样本研究中,rs2293152 GG 基因型与 HCC 的关联强度实际上是较弱的( $OR = 1.30$ )。因此,STAT3 rs2293152 位点与 HCC 易感性的关系还有待更深入的研究。

XRCC4 维持基因组功能完整性及修复损伤,rs1805377 位点位于其内含子区,rs1805377 GG 基因型常常增加了肿瘤的发病风险<sup>[21]</sup>。而 Jung 等<sup>[14]</sup>对韩国人群 708 例 HBV 相关 HCC 及 388 例 HBsAg 阳性对照进行了研究,rs1805377 GG 基因型降低了 HCC 的发病风险( $OR = 0.566, 95\% CI = 0.350 \sim 0.915$ ),可能是不同肿瘤的发病机制存在差异。而本研究并未发现 rs1805377 GG 与 HCC 易感有关( $OR = 1.076, 95\% CI = 0.530 \sim 2.185$ ),种族差异和样本量较少可能是导致结果差异的因素。

总之,关于 STAT3 及 XRCC4 基因多态性与 HCC 易感性的研究尚少,作者通过比较 HBV 感染相关肝癌病例和非肝癌 HBsAg 阳性病例,初步探讨了 STAT3 rs2293152 和 XRCC4 rs1805377 位点与 HCC 易感性的关系,发现这两个位点可能与 HCC 易感性无密切关系。遗传作用本身复杂,且与环境因素相互作用,有必要纳入更多的位点进行联合分析,遗传因素与环境因素的协同作用也值得更深入的研究。

## 参考文献

- [1] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2011, 365(12):1118-1127.
- [2] Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus[J]. Hepatology, 2002, 36(5):1206-1213.
- [3] Arzumanyan A, Reis HM, Feitelson MA. Pathogenic mechanisms in HBV-and HCV-associated hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(2):123-135.
- [4] Hassan MM, Spitz MR, Thomas MB, et al. The association of family history of liver cancer with hepatocellular carcinoma: a case-control study in the United States[J]. J Hepatol, 2009, 50(2):334-341.
- [5] Butterbach K, Beckmann L, de Sanjosé S, et al. Association of JAK-STAT pathway related genes with lymphoma risk; results of a European case-control study (EpiLymph)[J]. Br J Haematol, 2011, 153(3):318-333.
- [6] Kwon EM, Holt SK, Fu R, et al. Androgen metabolism and JAK/STAT pathway genes and prostate cancer risk[J]. Cancer Epidemiol, 2012, 36(4):347-353.
- [7] Jiang B, Zhu ZZ, Liu F, et al. STAT3 gene polymorphisms and susceptibility to non-small cell lung cancer[J]. Genet Mol Res,

2011, 10(3):1856-1865.

- [8] Wu KH, Wang CH, Yang YL, et al. Significant association of XRCC4 single nucleotide polymorphisms with childhood leukemia in Taiwan[J]. Anticancer Res, 2010, 30(2):529-533.
- [9] Mittal RD, Gangwar R, Mandal RK, et al. Gene variants of XRCC4 and XRCC3 and their association with risk for urothelial bladder cancer[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(2):1667-1675.
- [10] Shao N, Jiang WY, Qiao D, et al. An updated meta-analysis of XRCC4 polymorphisms and cancer risk based on 31 case-control studies[J]. Cancer Biomark, 2013, 12(1):37-47.
- [11] Tseng HC, Tsai MH, Chiu CF, et al. Association of XRCC4 codon 247 polymorphism with oral cancer susceptibility in Taiwan[J]. Anticancer Res, 2008, 28(3A):1687-1691.
- [12] Wang LE, Gorlova OY, Ying J, et al. Genome-wide association study reveals novel genetic determinants of DNA repair capacity in lung cancer[J]. Cancer Res, 2013, 73(1):256-264.
- [13] Xie J, Zhang Y, Zhang Q, et al. Interaction of signal transducer and activator of transcription 3 polymorphisms with HBV mutations in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2013, 57(6):2369-2377.
- [14] Jung SW, Park NH, Shin JW, et al. Polymorphisms of DNA repair genes in Korean hepatocellular carcinoma patients with chronic hepatitis B: possible implications on survival[J]. J Hepatol, 2012, 57(3):621-627.
- [15] Zervou MI, Sidiropoulos P, Petraki E, et al. Association of a TRAF1 and a STAT4 gene polymorphism with increased risk for rheumatoid arthritis in a genetically homogeneous population[J]. Hum Immunol, 2008, 69(9):567-571.
- [16] Sato K, Shiota M, Fukuda S, et al. Strong evidence of a combination polymorphism of the tyrosine kinase 2 gene and the signal transducer and activator of transcription 3 gene as a DNA-based biomarker for susceptibility to Crohn's disease in the Japanese population[J]. J Clin Immunol, 2009, 29(6):815-825.
- [17] Al Zaid Siddiquee K, Turkson J. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors[J]. Cell Res, 2008, 18(2):254-267.
- [18] Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(4):945-954.
- [19] Turkson J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery[J]. Oncogene, 2000, 19(56):6613-6626.
- [20] Ho PL, Lay EJ, Jian W, et al. Stat3 activation in urothelial stem cells leads to direct progression to invasive bladder cancer[J]. Cancer Res, 2012, 72(13):3135-3142.
- [21] Tseng RC, Hsieh FJ, Shih CM, et al. Lung cancer susceptibility and prognosis associated with polymorphisms in the nonhomologous end-joining pathway genes: a multiple genotype-phenotype study[J]. Cancer, 2009, 115(13):2939-2948.

(收稿日期:2013-12-28)

(上接第 849 页)

岩藻糖苷酶在原发性肝癌中的诊断价值[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(10):1161-1163.

- [9] 熊利华, 陈春琴, 张春峰, 等. 血清 A-L-岩藻糖苷酶与甲胎蛋白和糖类抗原 19-9 在原发性肝癌诊断中的作用[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(4):263-264.
- [10] Bertino G, Ardiri A, Malaguarnera M, et al. Hepatocellular carcinoma serum markers[J]. Semin Oncol, 2012, 39(4):410-433.

- [11] 杜贤, 覃坚. 血清 AFP、AFU 和 LDH 联合检测对原发性肝癌的诊断价值[J]. 影像与检验, 2011, 9(22):765-766.
- [12] 刘萃红. 应用 ROC 曲线评价 5 项生化指标对肝炎的诊断价值[J]. 郑州大学学报:医学版, 2008, 43(6):1236-1239.

(收稿日期:2013-10-18)