

· 论 著 ·

中国上海及其周边省份汉族人群 XRCC3 基因 Thr241Met 多态与脑胶质瘤遗传易感性关联研究

周可可¹, 刘艳红², 张海石¹, 钟 逾², 刘宏亮², 卢大儒², 黄峰平¹, 周良辅^{1*}

(1. 复旦大学上海医学院附属华山医院神经外科, 神经外科学系, 上海 200040; 2. 复旦大学生命科学院遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 分析上海及其周边省份汉族人群中脑胶质瘤患者 X 线交叉互补修复基因 3(X-ray repair cross-complementing group 3, XRCC3) Thr241Met 单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism, SNP), 探讨其与脑胶质瘤遗传易感性的相关性。**方法:** 应用 TaqMan 技术检测我国上海及其周边省份(江苏、浙江、安徽等)汉族人群中 771 例脑胶质瘤患者(病例组)和 752 例非肿瘤对照受试者(对照组)XRCC3 基因 Thr241Met 多态性; 应用统计学方法对 TaqMan 技术成功检测分型结果进行处理, 分析该位点多态性与脑胶质瘤遗传易感性的相关性。**结果:** 1 468 例受试者(病例组 760 例, 对照组 708 例)应用 TaqMan 技术成功进行了目标基因检测及分型, 基因分型成功率为 96.4%。统计学分析发现: 对照组 C 和 T 等位基因频率以及 TC、TT 基因型频率与病例组无显著差异。经年龄和性别因素校正, TC 基因型($P=0.909$; $OR=0.981$; $95\%CI=0.701\sim 1.371$)或 TT 基因型($P=0.642$; $OR=0.7$; $95\%CI=0.156\sim 3.146$)与 CC 基因型相比并不增加脑胶质瘤的发生风险。**结论:** 我国上海及其周边省份汉族人群 XRCC3 基因 Thr241Met 的变异基因型 TC 和 TT 可能不是脑胶质瘤的遗传高危因素。

[关键词] 脑肿瘤; 神经胶质瘤; 疾病遗传易感性; XRCC3 基因; 多态性, 单核苷酸

[中图分类号] R 730.264 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)04-0364-05

Association between XRCC3 Thr241Met polymorphism and genetic susceptibility to glioma in Chinese Han population living in Shanghai and surrounding provinces in east China

ZHOU Ke-ke¹, LIU Yan-hong², ZHANG Hai-shi¹, ZHONG Yu², LIU Hong-liang², LU Da-ru², HUANG Feng-ping¹, ZHOU Liang-fu^{1*} (1. Department of Neurosurgery, Huashan Hospital & Institute of Neurosurgery, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200040, China; 2. State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the possible association between Thr241Met polymorphism in the DNA repair gene X-ray repair cross-complementing group 3 (XRCC3) with genetic susceptibility to glioma in a Chinese Han population living in Shanghai and the surrounding provinces in east China. **Methods:** Genotyping by a TaqMan assay was performed in 771 brain glioma patients living in Shanghai and the surrounding provinces (Jiangsu, Zhejiang, Anhui, etc.) and in 752 control participants matched in age and gender. The genotyping results of TaqMan assay and the association between Thr241Met polymorphism in the DNA repair gene XRCC3 with genetic susceptibility to glioma were statistically analyzed. **Results:** Genotypes of 1 468 subjects (760 with brain glioma and 708 were cancer-free control) were successfully performed by TaqMan assay, with the successful rate being 96.4%. Statistical analysis result showed that gene(C/T) and genotype(C/C, T/C, T/T) frequencies of XRCC3 were not significantly different between the glioma and cancer-free groups. Compared with the CC genotype, the variant TC($P=0.909$; adjusted by age and gender $OR=0.981$; $95\%CI=0.701-1.371$) or TT($P=0.642$; adjusted by age and gender $OR=0.7$; $95\%CI=0.156-3.146$) genotypes of XRCC3 Thr241Met were associated with a non-statistically significant increase of glioma risk. **Conclusion:** The variant TC or TT genotypes of XRCC3 Thr241Met may not be risk factors for brain glioma in Chinese Han population living in Shanghai and the surrounding provinces in east China.

[KEY WORDS] brain neoplasms; glioma; genetic predisposition to disease; XRCC3; polymorphism, single nucleotide

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(4): 364-368]

胶质瘤(glioma)是中枢神经系统最常见的肿瘤, 大约占脑肿瘤的 45%~50%。随着现代医学的发展, 脑胶质瘤的诊断和治疗水平有了很大地提高, 但其疗效并没有显著改善, 恶性脑胶质瘤患者大多在确诊后一年内死亡^[1]。因此, 在脑胶质瘤防治上

积极寻找突破点是当前神经外科学研究的热点。已

[作者简介] 周可可, 博士生。

E-mail: zhoukeke1975@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: lfzhuoc@online.sh.cn

有研究^[2]表明,X线交叉互补修复基因3(XRCC3)主要经同源重组途径参与DNA双链断裂/重组修复,在保持基因组稳定性中发挥重要作用。目前关于XRCC3 Thr241Met多态与多种肿瘤易感的研究已有不少报道^[3],但相关研究结果并不一致,提示XRCC3基因Thr241Met多态可能在不同类型肿瘤中的作用并不相同。目前关于脑胶质瘤与Thr241Met多态的研究均集中在欧美人群,鲜有中国汉族人群的大样本研究。我们的前期研究^[4]对中国上海及其周边省份汉族人群脑胶质瘤及非肿瘤对照DNA损伤修复途径中XRCC5、XRCC6及XRCC7基因的多态位点进行检测、分型,发现脑胶质瘤遗传易感与XRCC5、XRCC6基因多态有一定关联。为进一步探讨中国汉族人群XRCC3 Thr241Met多态与脑胶质瘤的相关性,本研究对中国上海及其周边省份汉族人群中脑胶质瘤患者XRCC3 Thr241Met多态进行检测和分析,筛选我国汉族人群脑胶质瘤的遗传学高危因素及易感基因,为临床进行针对性防治提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象 脑胶质瘤及非肿瘤对照受试对象与我们前期研究^[4]一致,本文简单描述如下。受试对象主要为中国上海及其周边省份(江苏、浙江和安徽省等)汉族人群,其中脑胶质瘤患者771例(病例组),非肿瘤对照752例(对照组)。病例为复旦大学上海医学院附属华山医院2004年10月~2006年5月收住入院的771例脑胶质瘤患者(新发、复发胶质瘤分别占91%、9%),年龄、性别和病理分型不限,患者之间无血缘关系,术后均经病理证实为脑胶质瘤。752例非肿瘤对照为同期住院的外伤患者(20%)及门诊健康体检者(80%),年龄(±5岁)、性别均与病例组相匹配。研究通过复旦大学人类学研究伦理委员会审核;研究中受试者临床资料以及外周静脉血样的获取均征得受试对象的知情同意并签署知情同意书。

1.2 现场调查和样本获取 现场调查内容及方法与前期研究^[4]一致,本文简单描述如下。对符合入选标准的受试者进行登记注册,询问有关受试者的人口统计学信息、吸烟暴露史、职业电离辐射暴露史以及癌症家族史等。其中,非吸烟者定义为平均每天吸烟少于1支且持续时间少于1年者;癌症家族

史是指受试者一级亲属中有患癌症者;电离辐射暴露职业包括飞行驾驶员、机组工作人员、宇航员、核电站工作人员、放射科医生以及其他接受电离辐射的工种。因为对电离辐射暴露剂量很难进行估计,因此本研究以放射性工作年(radiological work-years)代替。调查人员一次性采集受试者外周静脉血3~5 ml,并置于5 ml ACD抗凝血管内,经初步处理后置于-70℃低温冰箱保存,留待DNA抽提。

1.3 DNA提取和基因分型 常规采用QIAGEN盐酸胍试剂盒(Qiagen公司),按产品使用说明抽提样本基因组DNA。采用荧光5'核酸酶TaqMan分析技术(Applied Biosystems, Foster City, CA)对位点XRCC3 Thr241Met进行基因分型。

1.3.1 TaqMan探针和引物序列 TaqMan引物和FAM或VIC标记探针由美国ABI公司采用Primer Express 2.0软件(ABI PRISM)设计合成,并经授权使用。具体序列如下,Forward primer:5'-CCA GGG CCA GGC ATC TG-3';Reverse primer:5'-CAG CAC AGG GCT CTG GAA-3';VIC dye reporter:5'-CAG CGT GGC CCC CA-3';FAM dye reporter:5'-CAG CAT GGC CCC CA-3'。

1.3.2 基因分型 PCR反应体系为5 μl,含5 ng基因组DNA(干燥)、2.5 μl 2× TaqMan Universal PCR master Mix、0.083 μl 40× Assay Mix。待测样品加入384孔板上,于ABI 9700荧光定量PCR仪上反应:50℃预热2 min,95℃预变性10 min,继而95℃变性15 s,60℃复性1 min共进行40个循环。最后在ABI 7900上检测荧光信号。基因分型数据采用Sequence Detector System 2.0软件分析。

1.4 质量控制 现场调查的质量控制包括:研究对象均为上海市及其周边的江苏、浙江和安徽等省居民。参照文献^[5],对受试者一级亲属(包括生物学父母、同胞和子女)的年龄(或出生日期)、生存情况或死亡年龄(或死亡时间)进行调查,并且询问受试者及其一级亲属是否有恶性肿瘤病史。对胶质瘤患者的病历及病理资料进行了回顾,对患者的一般情况、病理类型及病理级别等指标加以确认。问卷调查和临床资料回顾都由神经外科专业人员经统一培训后完成。实验室质量控制如下:实验采用双盲法进行;实验前,先抽取一部分样品进行预实验,充分估计实验中可能遇到的问题;实验过程中严格遵守实验操

作规程预防交叉感染;为确定实验的可靠性,设立阳性、阴性对照,随机抽取 10%样品进行重复实验,证实其结果的真实性。

1.5 统计学处理 计算两组等位基因频率及基因型频率分布,吻合度检验确定是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。群体间等位基因频率及基因型频率差别比较用 χ^2 检验。以比数比(OR)及 95%可信区间(CI)表示各基因型与脑胶质瘤的相关性。OR 值以非条件 Logistic 回归计算,并经年龄和性别调整。所有数据使用 SPSS 12.0 软件进行统计学处理, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的一般特征 本研究中病例组和对

照组受试对象的主要资料见表 1。病例组和对照组的平均年龄分别为 44.10 岁和 42.63 岁。两组受试者之间的年龄和性别构成差异无统计学意义。提示两组之间在分析 XRCC3 Thr241Met 是否为致病危险因素时具有可比性。771 例胶质瘤中胶质母细胞瘤 295 例(38.26%),间变性星形细胞瘤 242 例(31.39%),而其他胶质瘤 234 例(30.35%),包括少枝胶质肿瘤(8.17%)、其他星形细胞瘤(9.47%)以及混合胶质瘤(12.71%)。在所有受试者中,有 21 例胶质瘤患者和 9 例对照受试者自报有职业电离辐射暴露史,分别占两组的 3.64%和 1.70%,二者间有统计学差异,但并不显著($P = 0.047$)。而胶质瘤患者一级亲属中癌症的发生率(19.94%)高于对照组(14.68%),且具有统计学差异($P = 0.01$)。

表 1 病例组及对照组受试对象一般特征比较
Tab 1 Comparison of general data of glioma and control group

Item	Glioma[n(%)]	Control[n(%)]	P value
Age(years)			0.935
Children(≤18)	85(11.0)	84(11.2)	
Adults(> 18)	686(89.0)	668(88.8)	
Gender			0.780
Male	462(60.87)	463(61.57)	
Female	297(39.13)	289(38.43)	
Occupational IR exposure histories			0.047
No	556(96.36)	521(98.30)	
Yes	21(3.64)	9(1.70)	
Smoking status			0.321
Non-smokers	432(63.34)	490(65.86)	
Smokers	250(36.66)	254(31.14)	
Family history of cancer			0.010
No	526(80.06)	622(85.32)	
Yes	131(19.94)	107(14.68)	

2.2 XRCC3 基因 Thr241Met 多态与脑胶质瘤的相关性 应用 TaqMan 技术最终成功地对 1 468 例受试者(病例组 760 例,对照组 708 例)进行了目标 SNP 位点的检测和分型,基因分型成功率为 96.4%。在对照组和病例组中,XRCC3 基因 Thr241Met 各基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡规律。

病例组和对照组中 XRCC3 Thr241Met 基因型和等位基因型的分布情况见表 2。病例组中 XRCC3 Thr241Met TC+TT 基因型频率(10.9%)小于对照组(11.2%);T 等位基因频率(5.7%)也略小于对照组(5.9%),但统计学上均无差异($P = 0.893, 0.813$)。

表 2 胶质瘤病例组和对照组中 XRCC3 Thr241Met 多态基因型和等位基因频率
Tab 2 Genotypes and allele frequencies of XRCC3 Thr241Met polymorphism in glioma and control group

Genotype/ gene	Glioma [n(%)]	Control[n(%)]	χ^2	P value
C/C	677(89.1)	629(88.8)	0.227	0.893
T/C	80(10.5)	75(10.6)		
T/T	3(0.4)	4(0.6)		
T/C+ T/T	83(10.9)	79(11.2)		
C	1 434(94.3)	1 333(94.1)	0.056	0.813
T	86(5.7)	83(5.9)		

XRCC3 基因 Thr241Met 多态与胶质瘤发生风险的关联见表 3。非条件 Logistic 回归分析提示 TC 基因型($P=0.958$; $OR=0.991$; $95\%CI=0.71\sim 1.383$)或 TT 基因型($P=0.637$; $OR=0.697$; $95\%CI=0.155\sim 3.126$)与 CC 基因型相比并不增加胶质瘤的发生风险。为了控制混杂因素对结果的影响,比较客观地评价 XRCC3 Thr241Met 对胶质瘤所起

的作用,在单因素分析的基础上建立多因素非条件 Logistic 回归模型,经年龄和性别因素校正后发现, XRCC3 Thr241Met 与胶质瘤的发生依然没有关联,与携带 CC 基因型个体相比,TC+TT 基因型携带者并不增加胶质瘤的发生风险($P=0.839$; $OR=0.966$; $95\%CI=0.696\sim 1.342$)。详见表 3。

表 3 XRCC3 基因 Thr241Met 多态与胶质瘤发生风险的关联

Tab 3 Association between XRCC3 Thr241Met polymorphism with risk of glioma

Genotype	Glioma(n)	Control(n)	P value;Crude OR(95%CI)	P value ;Adjusted OR(95%CI) *
C/C	677	629	1.00;1.00(reference)	1.00;1.00(reference)
T/C	80	75	0.958;0.991(0.71-1.383)	0.909;0.981(0.701-1.371)
T/T	3	4	0.637;0.697(0.155-3.126)	0.642;0.7(0.156-3.146)
T/C+T/T	83	79	0.885;0.976(0.704-1.353)	0.839;0.966(0.696-1.342)

* Adjusted for age and gender

3 讨论

流行病学资料^[6]显示电离辐射是被确认的胶质瘤危险因素之一。电离辐射暴露可以造成包括 DNA 单、双链断裂在内的各种形式的 DNA 损伤,其中双链 DNA 断裂损伤(double-strand breaks, DSBs)是最严重的 DNA 损伤形式,有可能导致染色体断裂或重排,从而导致肿瘤的发生^[7]。单核苷酸多态性是继限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和短串联重复序列(short tandem repeat, STR)之后确认的第三代遗传标记。由于数目众多、遗传稳定、易于自动化高通量检测等优点,已越来越多地应用于癌症等复杂疾病相关基因的研究中。

DNA 链断裂损伤修复酶基因在保持基因组稳定性中发挥重要作用。由于每个 DNA 修复基因都扮演着独特的角色,一旦这些修复基因发生变异,就有可能影响其编码蛋白的功能,进而引发疾病或癌症^[3,8]。研究^[6,9]表明胶质瘤患者外周血淋巴细胞对 γ 射线敏感,容易发生染色体断裂损伤。由此推测, DNA 损伤修复酶基因遗传多态可能与胶质瘤易感性之间存在相关性。我们在前期研究^[4]中对中国上海及其周边省份汉族人群脑胶质瘤及非肿瘤对照 DNA 损伤修复途径中 XRCC5、XRCC6 及 XRCC7 基因的多态位点进行检测、分型,证实脑胶质瘤遗传易感与 XRCC5、XRCC6 基因多态有一定关联。

XRCC3 基因也是 DNA 损伤修复中的一个重

要基因,位于染色体 14q32.3,主要经同源重组途径参与 DNA 双链断裂/重组修复,以保持染色体的稳定性^[2]。其编码蛋白是 RAD51 相关蛋白家族的成员之一,其功能是把 RAD51 招募到断裂的 DNA 末端并维持其稳定。XRCC3 缺失细胞系受到放射损伤后不能形成 RAD51 复合体,而表现出遗传不稳定以及对 DNA 致伤剂的敏感性增高^[10]。Jiang 等^[11]的研究也发现 XRCC3 基因转录水平下调可能与星形胶质细胞瘤的发生存在关联。因此, XRCC3 基因目前被高度怀疑为癌症遗传易感相关候选基因之一^[12],但其与肿瘤发生之间的确切关系及具体机制尚不清楚。

Shen 等^[13]发现 XRCC3 基因第 7 外显子 18 607 位点 C→T 单核苷酸多态可导致相应 241 位密码子苏氨酸→蛋氨酸(Thr→Met)的改变,推测氨基酸残基上的羟基转变为巯基可能会影响其蛋白质结构,从而改变其 DNA 损伤修复功能。有研究^[9,14]发现 XRCC3 Thr241Met 基因多态在正常人外周血淋巴细胞中与 DNA 加合物水平增高有关,提示该基因多态可能参与 DNA 加合物的修复过程并影响其修复能力。目前关于 XRCC3 Thr241Met 多态与肿瘤易感的研究已有不少报道^[3],但相关研究结果并不一致。Han 等^[12]对 48 项有关 XRCC3 基因多态与癌症相关性病例对照研究进行荟萃分析,认为 XRCC3 基因可能是一个低外显率癌症遗传易感基因(尤其是对乳腺癌,膀胱癌,头颈部癌和非黑色素皮肤癌),但其与胶质瘤的遗传易感性还不确切。因

此,本研究在前期研究的基础上进一步分析中国上海及其周边省份汉族人群 XRCC3 基因 Thr241Met 多态与胶质瘤的相关性。

本研究发现中国上海及其周边省份汉族人群中非肿瘤对照受试者中 XRCC3 基因 18 607 位 T 等位基因频率为 5.9%,与 Shen 等^[15]报道的 4.8%相近。而 Hapmap 计划数据显示 XRCC3 基因 18 607 位 T 等位基因在中国北京汉族人群中的分布频率为 6.7%,高于本研究结果。但本研究样本量较大(708 例),明显多于 Hapmap 计划中的 45 例;且本研究受试者主要是中国东南部上海及其周边省份,不同于 Hapmap 计划中的北京汉族人群。分析二者间的差异可能是由于样本量及受试对象来源不同引起的。国外研究报道结果也不一致,美国黑人为 22.2%^[16],波兰人为 33%^[17],而意大利人为 35%^[18],均明显高于中国汉族人群。这说明 XRCC3-18 067 T 等位基因在不同种族中的分布频率可能存在差异。

本研究发现 XRCC3 Thr241Met 多态与脑胶质瘤患病风险之间无显著关联,与 Wang 等^[19]的结果基本一致。这说明 XRCC3 变异基因型 18 067 TC 和 TT 在中国上海及周边省份汉族人群中可能并不是脑胶质瘤的遗传高危因素。但是,由于 XRCC3 Thr241Met 多态较少,在中国汉族人群中等位基因频率较低,目前的样本量可能还不足以确定该位点和胶质瘤的确切关系,今后有必要通过扩大研究的样本数,以进一步验证 XRCC3 Thr241Met 多态和脑胶质瘤之间的关系,并对多个基因之间以及基因与环境之间的相互作用进行深入研究。

[参考文献]

- [1] Kleihues P, Cavenee W K. Pathology and genetics of tumors of the nervous system[M]. Lyon (France): IARC Press, 2000; 129-157.
- [2] Tebbs R S, Zhao Y, Tucker J D, et al. Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995,92:6354-6358.
- [3] Goode E L, Ulrich C M, Potter J D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk[J]. Cancer Epi-

demol Biomark Prev, 2002,11:1513-1530.

- [4] Liu Y H, Zhang H S, Zhou K K, et al. Tagging SNPs in non-homologous end-joining pathway genes and risk of glioma[J]. Carcinogenesis, Advance Access published on March 26,2007; doi:10.1093/carcin/bgm073. http://www.carcinogenesis.com
- [5] Hill D A, Inskip P D, Shapiro W R, et al. Cancer in first-degree relatives and risk of glioma in adults[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003,12:1443-1448.
- [6] Bondy M L, Wang L E, El-Zein R, et al. Gamma-radiation sensitivity and risk of glioma[J]. J Natl Cancer Inst,2001,93:1553-1557.
- [7] Morgan W F, Corcoran J, Hartmann A, et al. DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability[J]. Mutat Res,1998,404(1-2):125-128.
- [8] Friedberg E C. DNA damage and repair[J]. Nature,2003,421:436-440.
- [9] Bondy M L, Kyritsis A P, Gu J, et al. Mutagen sensitivity and risk of gliomas: a case-control analysis[J]. Cancer Res, 1996,56:1484-1486.
- [10] Masson J Y, Stasiak A Z, Stasiak A, et al. Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2001,98:8440-8446.
- [11] Jiang Z, Hu J, Li X G, et al. Expression analysis of 27 DNA repair genes in astrocytoma by TaqMan low-density array[J]. Neurosci Lett, 2006,409:112-117.
- [12] Han S, Zhang H T, Wang Z, et al. DNA repair gene XRCC3 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 48 case-control studies[J]. Eur J Hum Genet,2006,14 1136-1144.
- [13] Shen M R, Jones I M, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans[J]. Cancer Res,1998,58:604-608.
- [14] Matullo G, Palli D, Peluso M, et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and ³²P-DNA adducts in a sample of healthy subjects[J]. Carcinogenesis,2001,22:1437-1445.
- [15] Shen H, Wang X, Hu Z, et al. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC3 Thr241Met and risk of gastric cancer in a Chinese population[J]. Cancer Lett,2004,206:51-58.
- [16] Wang Y F, Liang D, Spitz M R, et al. XRCC3 genetic polymorphism, smoking, and lung carcinoma risk in minority populations [J]. Cancer,2003,98:1701-1706.
- [17] Butkiewicz D, Rusin M, Enewold L, et al. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer[J]. Carcinogenesis, 2001,22:593-597.
- [18] Matullo G, Guarrera S, Carturan S, et al. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study[J]. Int J Cancer,2001,92:562-567.
- [19] Wang L E, Bondy M L, Shen H, et al. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of glioma[J]. Cancer Res, 2004, 64: 5560-5563.

[收稿日期] 2007-03-08

[修回日期] 2007-03-29

[本文编辑] 贾泽军