

ERCC1 Asn118Asn (rs11615) 和 *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* 基因多态性与胆囊癌的关联性研究

幸赞西, 包昶宇

作者单位: 重庆市红十字会医院(江北区人民医院)普外科, 重庆 400020

摘要:目的 探讨 *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)* 和 *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* 单核苷酸多态性与胆囊癌的关系。方法 选择 2014 年 5 月至 2016 年 5 月期间重庆市红十字会医院普外科收治的 50 例胆囊癌病人为胆囊癌组, 应用聚合酶链反应检测 *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)* 和 *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* 基因多态性, 比较胆囊癌组与健康人群(对照组) *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)* 和 *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* 基因型的分布频率差异以及等位基因频率差异。结果 胆囊癌组和对照组 *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)* 基因型分布频率野生型 CC 为 54% 比 66%, 杂合型 CT 为 26% 比 26%, 突变型 TT 为 20% 比 8%, 两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 7.05, P = 0.028$), 等位基因频率野生型 C 为 67% 比 79%, 突变型 T 为 33% 比 21%, 两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 5.27, P = 0.026$)。 *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* 基因型分布频率野生型 AA 为 20% 比 56%, 杂合型 AB 为 44% 比 32%, 突变型 BB 为 36% 比 12%, 两组比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.83, P = 0.669$), 等位基因频率野生型 A 为 42% 比 72%, 突变型 B 为 58% 比 28%, 两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 0.75, P = 0.448$)。结论 胆囊癌的发生可能与 *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)* 和 *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* 基因型多态性具有某种关联。

关键词: 胆囊癌; 基因多态性; 基因型

Relevance between gene polymorphism of *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)*, *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* and gallbladder carcinoma

XIN Zanxi, BAO Changyu

Author Affiliation: Department of General Surgery, Chongqing Red Cross Hospital (People's Hospital of Jiangbei District), Chongqing 400020, China

Abstract: Objective To study the relevance between gene polymorphism of *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)*, *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* and gallbladder carcinoma. **Methods** Fifty gallbladder carcinoma patients who were treated in Department of General Surgery, Chongqing Red Cross Hospital from May 2014 to May 2016 were selected as gallbladder carcinoma group. *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)* and *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* gene polymorphism was detected by means of polymerase chain reaction. The differences of distribution and allele frequency of *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)* and *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* genotype between gallbladder carcinoma group and healthy volunteers in the control group were compared. **Results** Among 50 cases of gallbladder carcinoma patients and 50 healthy volunteers, *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)* wild CC genotype frequency was 54%, and 66%, respectively; heterozygous CT was 26%, and 26%, respectively; mutant TT was 20%, and 8%, respectively, and the difference between the two groups was statistically significant ($\chi^2 = 7.05, P = 0.028$). Wild-type C allele frequency was 67%, and 79%, respectively; mutant T was 33%, and 21%, respectively, and the difference between the two groups was statistically significant ($\chi^2 = 5.27, P = 0.026$). *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* wild AA genotype frequency was 20%, and 56%, respectively; heterozygous AB was 44%, and 32%, respectively; mutant BB was 36%, and 12%, respectively; there was no significant difference between the two groups ($\chi^2 = 0.83, P = 0.669$). Wild type A allele frequency was 42%, and 72%, respectively; mutant B allele frequency was 58%, and 28%, respectively; and the difference between the two groups was statistically significant ($\chi^2 = 0.75, P = 0.448$). **Conclusion** The occurrence of gallbladder carcinoma may be related to the genotype polymorphism of *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)* and *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)*.

Key words: Gallbladder carcinoma; Polymorphism; Genotype

胆囊癌在临床中较为少见,但恶性程度高。胆囊癌一般早期不易被发觉,并且容易发生转移,对化疗药物不敏感。因此,临床治疗胆囊癌的常见方法是手术治疗,早期手术能够明显提高病人预后,

但研究表明胆囊癌病人术后的生存率为 32% ~ 61%,并且复发率高^[1]。细胞内 DNA 损伤与核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)机制密切相关,NER 的能力可以明显改善肿瘤病人的预

后^[2]。研究发现骨肉瘤病人及正常人群(*ERCC*)基因 *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)* 和 *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* 在 NER 机制中具有重要功能。本次研究针对 *ERCC1* 和 *ERCC2* 基因多态性,探究其与胆囊癌病人预后的关系,旨在为同行提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择重庆市红十字会医院普外科 2014 年 5 月至 2016 年 5 月期间收治的 50 例胆囊癌病人为胆囊癌组,其中男性 32 例,女性 18 例,年龄范围为 45~68 岁,年龄为 (52.6 ± 4.2) 岁;另选择 50 例同期健康体检人员为对照组,其中男性 35 例,女性 15 例,年龄范围为 42~64 岁,年龄为 (49.3 ± 3.8) 岁。胆囊癌组与对照组在年龄和性别方面差异无统计学意义($t=0.323, P=0.754; \chi^2=0.534, P=0.764$),具有可比性。胆囊癌组病理类型:腺鳞癌 4 例、未分化癌 3 例、腺癌 36 例、鳞癌 7 例。胆囊癌 Nevin 分期:I 期 23 例,II 期 15 例,III 期 6 例,IV 期 6 例。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求,征得病人或其近亲属同意并签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 利用 QIAGEN 试剂盒(QIAamp DNA Blood MiniKit, USA, 批号 52304)提取肝素抗凝管内静脉血的 DNA。

1.2.2 引物合成 *ERCC1* 与 *ERCC2* 基因正向和反向的引物合成序列见表 1,引物由北京华博生物技术有限公司合成。

1.2.3 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增 预变性 95 ℃ 4 min、变性 95 ℃ 30 s、退火 56 ℃ 30 s、延伸 72 ℃ 30 s, 72 ℃ 末延伸 5 min; 共 35 个循环,重蒸水(ddH₂O) 17 μL, PCR 产物 10 μL; 水浴 37 ℃ 酶切 10 min, 然后取出立即置水浴 65 ℃ 灭活 5 min; 使用 2% 琼脂糖凝胶,电泳 45 min, 电压设置为 145 V。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件。计数资料用例(%)表示,各组间基因型和等位基因频率比较采用 Hardy-Weinberg 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因分型结果 在 *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)* 中,对照组 CC 型 33 例,CT 型 13 例,TT 型 4 例;胆囊癌组 CC 型 27 例,CT 型 13 例,TT 型 10

例。在 *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* 中,对照组 AA 型 28 例,AB 型 16 例,BB 型 6 例;胆囊癌组 AA 型 10 例,AB 型 22 例,BB 型 18 例。

2.2 ERCC 基因型在胆囊癌组与对照组的分布 由表 2 结果表明,两组的 *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)* 的基因型频率分布相比,差异有统计学意义($\chi^2=7.05, P=0.028$)。两组的 *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* 的基因型频率分布相比,差异无统计学意义($\chi^2=0.83, P=0.669$)。*ERCC1 Asn118Asn (rs11615)* 的胆囊癌组与对照组等位基因频率分布比较,差异有统计学意义($\chi^2=5.27, P=0.026$)。*ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* 的胆囊癌组与对照组等位基因型频率分布比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.75, P=0.448$),结果见表 3。

表 2 *ERCC1* 与 *ERCC2* 基因型频率分布/例(%)

组别	例数	<i>ERCC1 Asn118Asn (rs11615)</i>			<i>ERCC2 Lys751Gln (rs13181)</i>		
		CC	CT	TT	AA	AB	BB
对照组	50	33(66)	13(26)	4(8)	28(56)	16(32)	6(12)
胆囊癌组	50	27(54)	13(26)	10(20)	10(20)	22(44)	18(36)
χ^2 值		7.05			0.83		
P 值		0.028			0.669		

表 3 *ERCC1* 与 *ERCC2* 等位基因频率分布/个(%)

组别	例数	基因数/个	<i>ERCC1 Asn118Asn (rs11615)</i>		<i>ERCC2 Lys751Gln (rs13181)</i>	
			C	T	A	B
对照组	50	100	79(79)	21(21)	72(72)	28(28)
胆囊癌组	50	100	67(67)	33(33)	42(42)	58(58)
χ^2 值			5.27		0.75	
P 值			0.026		0.448	

2.3 ERCC1、ERCC2 多态性与胆囊癌的关系 分析两个基因的基因型与胆囊癌的关系时发现,*ERCC1* 的 T 与 C 等位基因比较,差异有统计学意义($\chi^2=6.31, P=0.004$),而 *ERCC1* 的 TT 与 CC 基因型比较,差异有统计学意义($\chi^2=5.82, P=0.032$)。*ERCC2* 的 AB 与 AA 基因型比较,差异有统计学意义($\chi^2=5.31, P=0.025$),见表 4。

3 讨论

核苷酸切除修复(NER)作为修复 DNA 的途径之一,可以为多重 DNA 损伤提供有效地修复帮助,同时也满足体现出高度多态性的 DNA 损伤修复需要^[3]。采用 NER 途径可以对 DNA、紫外线损伤起到高效地修复作用。但是研究也表明,借助该类途径进行治疗的病人,其体内的 *ERCC1* 和 *ERCC2* 基因

表 1 *ERCC1* 与 *ERCC2* 基因引物设计

单核苷酸多态性	正向引物	反向引物
<i>ERCC2 Lys751Gln (rs13181)</i>	CCGATATTGCGATGCCAGG	GGTTAGCCGATGCCCGG
<i>ERCC1 Asn118Asn (rs11615)</i>	CAGGTTCCGATTAGCGAAGA	CCGGTTAAGTACGTAAATA

表4 ERCC1 和 ERCC2 基因多态性与胆囊癌的关系

基因	胆囊癌组	对照组	OR 危险比 (95% 置信区间)	χ^2 值	P 值
<i>ERCC1 Asn118Asn (rs11615)</i>					
CC/例(%)	27(54)	33(66)	1.000 (对照)		
CT/例(%)	13(26)	13(26)	1.265 (0.617~2.594)	2.49	0.643
TT/例(%)	10(20)	4(8)	0.230 (0.063~0.834)	5.82	0.032
T 等位基因/ 个(%)	33(33)	21(21)	0.182 (0.054~0.607)	6.31	0.004
<i>ERCC2 Lys751Gln(rs13181)</i>					
AA/例(%)	10(20)	28(56)	1.000 (对照)		
AB/例(%)	22(44)	16(32)	5.391 (1.234~23.553)	5.31	0.025
BB/例(%)	18(36)	6(12)	2.144 (0.458~10.030)	1.67	0.505
B 等位基因/ 个(%)	58(58)	28(28)	3.931 (0.912~16.948)	2.32	0.083

多态性在某种程度上会影响 NER 相关功能的发挥^[4]。已有临床研究中,大多数围绕 *ERCC1* 基因展开的分析都是基于 118 位置 C 到 T 突变的这一层面^[5,6],比如,相关研究人员选取了一部分非小细胞肺癌病人,并对这些病人体内的 *ERCC1 Asn118Asn* 展开了相关分析,分析结果显示,部分体内检测出 CC 基因型的病人(54/109,50.4%)生存时间大多为 486 d 左右(95% *CI*:333~523),而变异型 CT(45/109,42.1%)或 TT(8/109,7.5%)生存时间则有了大幅度的缩小,时间多数为 281 d(95% *CI*:214~376),两者差异有统计学意义($P=0.0058$)^[5]。这直接说明了随着 DNA 复制和清除数量的持续增加,顺铂耐药性随之改变,*ERCC1* 和 *ERCC2* 水平也会发生变化。诸多资料都显示 NER 基因会影响消化道肿瘤^[7]、肺癌^[8]、口腔癌^[9]等病症的病发和后续演变,同时会对病人临床治疗效果、后续细胞修复产生影响作用。但是有关胆囊癌 NER 基因的探讨及相关文献却少之又少。

结合分析结果可知,*ERCC*、*ERCC1 Asn118Asn (rs11615)*、等位基因在分布上体现出一定的规律,且三种基因都指向胆囊癌这一病症。除此之外,*ERCC2 Lys751Gln AB* 也同其病发存在关联性。由此可以推断出 *ERCC* 的基因多态性可以在一定程度上判定胆囊癌的发生,是细胞癌变和扩散的警示之一。在本研究中,笔者只围绕 *ERCC1* 和 *ERCC2*、等位基因展开其同胆囊癌病变的研究。随着后续研究的深入,可以适当对样本数量加以丰富化。从肿瘤细胞层面来说,其体现出来的 DNA 修复水平较

高,这样一来便会直接导致癌细胞数量的迅速增长,从而弱化了药物的效用,不利于病人的治疗。所以,如何准确而高效地对癌细胞进行标记和检测控制,是评估和治疗胆囊癌期间需要加以重点考虑的问题。借助检测基因多态性的早期控制可以帮助医生更好地了解病人体内癌细胞的分布和增长情况,有助于病情的尽早控制。研究结果显示 *ERCC1* 和 *ERCC2* 这两个基因在一定程度上会影响胆囊癌的病发,主要两者体现的多态性。另外 *ERCC1 Asn118Asn (rs11615)* TT、等位基因 T 和 *ERCC2 Lys751Gln (rs13181)* AB 三者都会促使该癌症的病发,这一特征可以运用到临床检测胆囊癌方面,以此来缩短胆囊癌检测的时间跨度,为病人争取更多的治疗时间,提高治疗效果。

综上所述,胆囊癌病人肿瘤细胞中的 *ERCC1* 与 *ERCC2* 多态性与胆囊癌发生显著相关,检测其多态性对早期发现胆囊癌有一定价值。

参考文献

- [1] MISIAKOS E, TZEPI I, BROUNTZOS I, et al. Gallbladder perforation causing a subcutaneous abscess[J]. International Journal of Surgery Case Reports, 2014, 5(12):1088-1090.
- [2] SPIVAK G. Nucleotide excision repair in humans[J]. DNA Repair (Amst), 2015, 36:13-18.
- [3] LIU Y, WU XH, HU XQ, et al. Multiple repair pathways mediate cellular tolerance to resveratrol-induced DNA damage[J]. Toxicology in Vitro, 2017, 42:130-138.
- [4] XU Q, ZHANG ZF, SUN WX, et al. Haplotype analysis on relationship of ERCC2 and ERCC3 gene polymorphisms with osteosarcoma risk in Chinese young population[J]. Mamm Genome, 2017, 28(5/6):227-233.
- [5] RYU JS, HONG YC, HAN HS, et al. Association between polymorphisms of ERCC1 and XPD and survival in non-small-cell lung cancer patients treated with cisplatin combination chemotherapy[J]. Lung Cancer, 2004, 44(3):311-316.
- [6] IYODA A. A result of prospective biomarker trial on excision repair cross complementing group 1 (ERCC1) in advanced non-small-cell lung cancer; ERCC1 trial[J]. AME Med J, 2017:61.
- [7] HUANG MY, HUANG JJ, HUANG CM, et al. Relationship between expression of proteins ERCC1, ERCC2, and XRCC1 and clinical outcomes in patients with rectal cancer treated with FOLFOX-based preoperative chemoradiotherapy[J]. World J Surg, 2017, 41(11):2884-2897.
- [8] YANG YL, XIAN L. The association between the ERCC1/2 polymorphisms and the clinical outcomes of the platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC): a systematic review and meta-analysis[J]. Tumor Biol, 2014, 35(4):2905-2921.
- [9] AN HJ, JO H, JUNG CK, et al. Prognostic implication of ERCC1 protein expression in resected oropharynx and oral cavity cancer[J]. Pathology-Research and Practice, 2017, 213(8):949-955.

(收稿日期:2017-07-04,修回日期:2017-07-14)