

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.02.005

文章编号: 1005-8982(2016)02-0024-05

论著

细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 基因多态性与肝癌的易感性研究

崔伟丽¹, 李娜², 于君³, 亓玉琴⁴, 崔京远⁵

(山东省青岛市传染病医院 1.肝病五区, 2.肝病六区, 3.肝病九区, 山东 青岛 266033;
山东省青岛市市立医院 4.消化内一科, 5.普外科, 山东 青岛 266011)

摘要:目的 本研究旨在探讨细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(CTLA4)外显子 49 位点、启动子 1661 位点及 1722 位点单核苷酸多态性(SNP)与青岛地区人群乙肝肝癌的易感性。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测来自青岛地区人群肝癌患者 98 例、非肝癌乙肝病毒感染组 185 例、健康对照组 205 例 CTLA4 基因型分布。**结果** ①以健康人群为对照组 CTLA4 外显子 49 位点及启动子 1661 位点基因型频率分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 启动子 1722 位点基因型分布频率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), CTLA4+49 位点 AG、GG 基因型携带者、CTLA4-1661 位点 AG+GG 基因型携带者肝癌发病风险明显增高 (OR 值分别为 2.48、5.22 及 2.51)。②以非肝癌乙肝感染者为对照组, 49 位点 AG、GG 基因型、1661 位点 AG+GG 基因型显著增加肝癌的发生风险 (OR 值分别为 2.48、4.60 和 2.13)。③以所有非肝癌者对照, 49 位点 AG、GG 基因型、1661 位点 AG+GG 基因型显著增加肝癌的发生风险 (OR 值分别为 2.48、4.91 及 2.32)。**结论** CTLA4 外显子 49 位点、启动子 1661 位点基因多态性与肝癌易感性相关。

关键词: 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4; 单核苷酸多态性; 肝癌; HBV 感染

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Association of CTLA4 polymorphisms with susceptibility to hepatocellular carcinoma

Wei-li Cui¹, Na Li², Jun Yu³, Yu-qin Qi⁴, Jing-yuan Cui⁵

(1. The Fifth Ward of Hepatic Diseases, 2. The Sixth Ward of Hepatic Diseases, 3. The Ninth Ward of Hepatic Diseases, Qingdao Hospital of Infectious Diseases, Qingdao, Shandong 266033, China; 4. Department of Gastroenterology, 5. Department of General Surgery, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao, Shandong 266011, China)

Abstract: Objective To explore the correlation between several single-nucleotide polymorphism (SNP) loci on CTLA4 gene and the susceptibility to hepatocellular carcinoma in Qingdao area. **Methods** This case-control study included 98 patients diagnosed as hepatocellular carcinoma, 185 case with chronic hepatitis B and 205 healthy people. PCR-RFLP was used to study the genotype distribution of CTLA4 gene. **Results** The genotype frequency of CTLA4 +49 and -1661 loci showed significant difference between the hepatocellular carcinoma patients and the healthy people ($P < 0.05$). The frequency of distribution of CTLA4 -1722 locus had no significant difference between the hepatocellular carcinoma patients and the healthy people ($P > 0.05$). The additive odds ratio (OR) of genotypes AG and GG in CTLA4 +49 locus and genotype AG+GG in CTLA4 -1661

收稿日期: 2015-08-09

[通信作者] 崔京远, E-mail: cuijingyuan2121@163.com; Tel: 13605328268

• 24 •

locus for the risk of hepatocellular carcinoma was 2.48, 5.22 and 2.51 respectively. The frequency of genotypes AG and GG in *CTLA4*+49 locus and genotype AG+GG in *CTLA4*-1661 locus was higher in the hepatocellular carcinoma patients than in the chronic hepatitis B patients (OR = 2.48, 4.60 and 2.13 respectively). The frequency of genotypes AG and GG in *CTLA4*+49 locus and genotype AG+GG in *CTLA4*-1661 locus was higher in the hepatocellular carcinoma patients than in the non-HCC people (OR = 2.48, 4.91 and 2.32 respectively). **Conclusions** The single-nucleotide polymorphisms on *CTLA4*+49 *CTLA4*-1661 loci may play a landmark role in susceptibility to hepatocellular carcinoma.

Keywords: cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; single nucleotide polymorphism; hepatocellular carcinoma; hepatitis B virus infection

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生是多种因素共同作用的结果,病毒感染、环境因素、宿主的肿瘤易感性同时发挥着至关重要的作用,具体发病机制尚不明确。T 细胞的活化是机体抗肿瘤免疫的重要机制,细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA4)与 B7 结合后可抑制 T 细胞活化,从而降低机体的肿瘤免疫能力。研究发现,CTLA4 的基因多态性具有重要的生物学意义,尤其是位于外显子及启动子区域的基因多态性^[1],目前为止,关于 CTLA4 基因多态性与系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病的研究结论较为肯定,与糖尿病及甲状腺疾病的研究也较丰富,肿瘤方面,也有胃癌、肺癌及肾癌的相关报道,但目前尚无青岛地区肝癌与 CTLA4 基因多态性的相关报道。本研究旨在分析 CTLA4 外显子 49A/G、启动子 1661A/G 及 1722C/T 基因型在青岛地区肝癌、非肝癌乙肝感染者及健康人群中的分布,探讨 CTLA4 基因多态性与青岛地区人群乙肝肝癌的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2014 年 3 月-9 月青岛市传染病医院住院和门诊乙肝肝癌患者 98 例,非肝癌乙肝病毒感染者 185 例和健康对照组 205 例。采集每位研究对象空腹静脉血 2 ml。所有肝癌患者均依靠组织活检、CT 或磁共振检查结合实验室检查明确诊断,非肝癌乙肝病毒感染者血清 HBsAg 阳性均大于 6 个月,排除人类免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒感染、酒精性肝病、自身免疫性肝病及药物性肝病等。

1.2 外周血 DNA 提取

选用百泰克生物公司提供的 DNA 提取试剂盒提取外周血白细胞 DNA,置入 -20℃ 冰箱冷冻保存中备用。

1.3 聚合酶链(PCR)反应

PCR 引物序列由上海生工生物有限公司合成,引物序列为 49A/G:正向:5'-AATTGGGATTTAGGAGGACC-3' 反向:5'-AATACAGAGCCAGCCAAGCC-3',1661A/G 及 1722T/C:正向为 5'-CTAAGAGCATCCGCTTGACCT-3',反向引物为 5'-TTGGTGTGATGCACAGAAGCCTTTT-3'。扩增反应总体系为 10 μl。反应条件为:95℃ 预变性 5 min, 然后进行 35 个循环:94℃ 变性 30 s, 分别以 60、58 及 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 最后 72℃ 延伸 10 min, 扩增的 DNA 片段长度为分别为 641 和 486 bp。

1.4 聚合酶链反应-限制性片段长度多态法(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)检测 CTLA4+49A/G、-1722 及 -1661A/G 位点多态性

前两者采用限制性内切酶 BbvI, -1661 位采用内切酶 MseI 对扩增产物进行酶切,水浴 16~24 h, 取酶切产物 4 μl 上样于 2% 琼脂糖 120 V, 25 min 电泳分离,观察 DNA 条带。

1.5 DNA 序列分析

随机挑选 3 种不同的 PCR-RFLP 分型结果的标本,将 PCR 产物送上海生工公司进行直接测序予以确认。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析,用 χ^2 检验行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,各组之间的基因型差异以 χ^2 检验进行比较,基因多态性与胃癌发生的风险性以 OR 值(odds ratio)和 95% 置信区间(CI)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 遗传平衡检验

经 χ^2 检验,所选各组样本均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,具有群代表性。

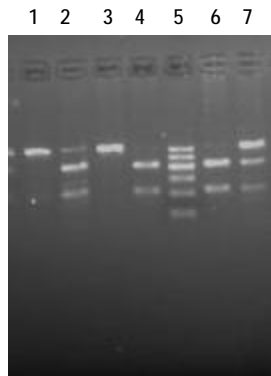
2.2 CTLA4 外显子 49A/G 基因型分布

肝癌组患者 AG 及 GG 基因型频率显著高于对照组、非肝癌乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染者及所有非 HCC 者($P < 0.05$)。携带 AG 基因型个体罹患肝癌的风险较携带 AA 者增加 2.48 倍,携带 GG 基因型个体罹患肝癌的风险较 AA 者增加 4.91 倍。见表 1 和图 1。

表 1 CTLA4+49A/G 基因多态性与肝癌易感性的关系

组别	AA	AG	GG
对照组	45 ¹⁾²⁾	96 ¹⁾²⁾	64 ¹⁾²⁾
非肝癌 HBV 感染组	39 ¹⁾³⁾	83 ¹⁾³⁾	63 ¹⁾³⁾
肝癌组	7 ¹⁾²⁾³⁾	37 ¹⁾²⁾³⁾	52 ¹⁾²⁾³⁾

注:1)肝癌组与所有非 HCC 组 AG 与 AA 比较, $\chi^2=4.64, P=0.031, OR=2.48(1.062-5.794)$, GG 与 AA 比较, $\chi^2=16.12, P=0.000, OR=4.91(2.130-11.334)$;2)肝癌组比对照组 AG 与 AA 比较, $\chi^2=4.25, P=0.04, OR=2.48(1.026-5.986)$, GG 与 AA 比较, $\chi^2=15.50, P=0.000, OR=5.22(2.174-12.547)$;3)肝癌组与非肝癌 HBV 感染组 AG 与 AA 比较, $\chi^2=4.16, P=0.041, OR=2.48(1.017-6.066)$, GG 与 AA 比较, $\chi^2=12.74, P=0.000, OR=4.60(1.899-11.136)$



1,3:AA 基因型(641 bp);2,7:AG 基因型(641 bp+221 bp+420 bp);4,6:GG 基因型(221 bp+420 bp);5:Marker 1

图 1 CTLA4 外显子 49 位点 PCR-RFLP 酶切电泳图

2.3 CTLA4 启动子 1661A/G 基因型分布

由于 AG 和 GG 基因型分布在各组的分布较少,本研究将 AG+GG 一同分析,肝癌组 AG+GG 基因型频率显著高于对照组、非肝癌 HBV 感染组及所有非 HCC 者($P=0.00, P=0.02$ 及 $P=0.00$),携带 AG+GG 基因型罹患肝癌的风险较携带 AA 者增加 2.32 倍。见表 2 和图 2。

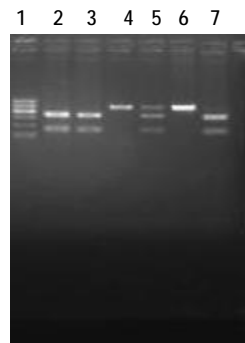
2.4 CTLA4 启动子 1722C/T 基因型分布

与肝癌组比较,对照组及非肝癌 HBV 感染者中各基因型携带频率的差异无统计学意义。见表 3 和图 3。

表 2 CTLA4-1661A/G 基因多态性与肝癌易感性的关系

组别	AA	AG+GG
对照组	181 ¹⁾²⁾	24 ¹⁾²⁾
非肝癌 HBV 感染组	160 ¹⁾³⁾	25 ¹⁾³⁾
肝癌组	72 ¹⁾²⁾³⁾	24 ¹⁾²⁾³⁾

注:1)肝癌组与所有非 HCC 组 AG+GG 与 AA 比较, $\chi^2=9.33, P=0.002, OR=2.32(1.338-4.023)$;2)肝癌组比对照组 AG+GG 与 AA 比较, $\chi^2=8.62, P=0.003, OR=2.51(1.341-4.712)$;3)肝癌组与非肝癌 HBV 感染组 AG+GG 与 AA 比较, $\chi^2=5.79, P=0.016, OR=2.13(1.141-3.987)$



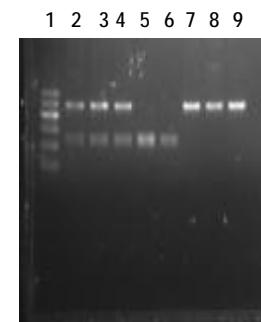
1:Marker 1,2,3,7:AA 基因型(333 bp+153 bp);4,6:GG 基因型(486 bp);5:AG 基因型(486 bp+333 bp+153 bp)

图 2 CTLA4 启动子 1661 位点 PCR-RFLP 酶切电泳图

表 3 CTLA4-1722C/T 基因多态性与肝癌易感性的关系

组别	TT	CC	CT
对照组	79 ¹⁾²⁾	96 ¹⁾²⁾	30 ¹⁾²⁾
非肝癌 HBV 感染组	62 ¹⁾³⁾	96 ¹⁾³⁾	27 ¹⁾³⁾
肝癌组	33 ¹⁾²⁾³⁾	56 ¹⁾²⁾³⁾	7 ¹⁾²⁾³⁾

注:1)肝癌组与所有非 HCC 组 CC 与 TT 比较, $\chi^2=0.80, P=0.80, OR=1.246(0.770-2.018)$, CT 与 TT 比较, $\chi^2=2.16, P=0.142, OR=4.91(2.130-11.334)$;2)肝癌组比对照组 CC 与 TT 比较, $\chi^2=1.57, P=0.210, OR=1.40(0.828-2.356)$, CT 与 TT 比较, $\chi^2=1.58, P=0.210, OR=0.56(0.223-1.398)$;3)肝癌组与非肝癌 HBV 感染组 CC 与 TT 比较, $\chi^2=0.11, P=0.737, OR=1.10(0.641-1.873)$, CT 与 TT 比较, $\chi^2=2.34, P=0.126, OR=0.49(0.192-1.238)$



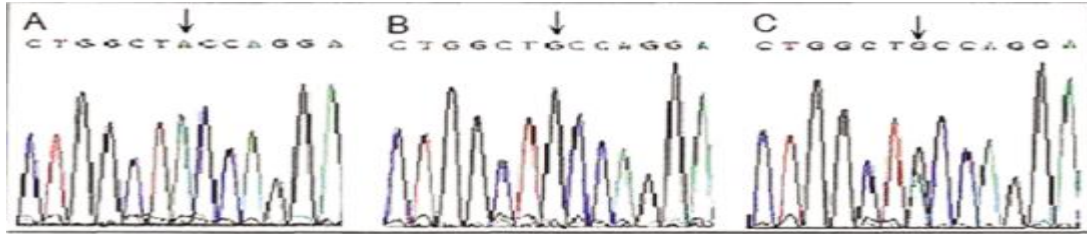
1:Marker1;2-4:CT 基因型(486 bp+257 bp+229 bp);5,6:CC 基因型(257 bp+229 bp);7-9:TT 基因型(486 bp)

图 3 CTLA4 启动子 1722 位点 PCR-RFLP 酶切电泳图

2.5 DNA 测序结果

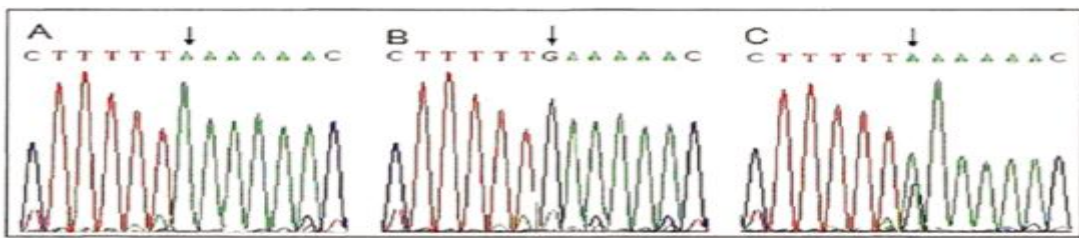
测序结果显示 *CTLA4* 基因杂合子为双峰,纯合

子为单峰。见图 4~6 所示。↓表示该位点的等位基因。



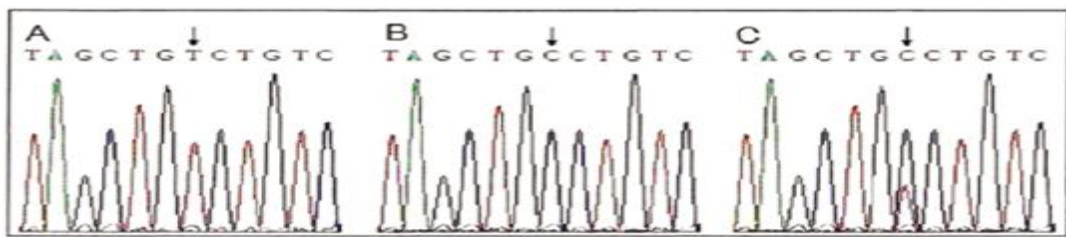
A:AA 基因型;B:GG 基因型;C:AG 基因型

图 4 *CTLA4*+49 位多态性测序结果



A:AA 基因型;B:GG 基因型;C:AG 基因型

图 5 *CTLA4*-1661 位多态性测序结果



A:TT 基因型;B:CC 基因型;C:TC 基因型

图 6 *CTLA4*-1722 位多态性测序结果

3 讨论

已有研究表明 *CTLA4* 可以下调 T 细胞的抗肿瘤免疫功能^[2]。*CTLA4* 通过介导不依赖 Fas 途径的 T 细胞凋亡、抑制 T 细胞分化、降低 IL2 转录等方式抑制 T 细胞增殖、细胞因子的产生及相关免疫反应^[3]，另，*CTLA4* 可直接使 T 细胞活化周期停留在 G₁ 或 G₀ 期，而不向 S 期进展，使细胞进展周期停滞，从而使 T 细胞的活化功能受到抑制^[4]，最终导致肿瘤或自身免疫性疾病的发生。

由于 *CTLA4* 对 T 淋巴细胞的负性调节作用，故降低 *CTLA4* 功能可增加 T 细胞的功能，增强机体的抗肿瘤免疫功能，即增加抗癌能力。而 *CTLA4* 基因多态性会影响 *CTLA4* 蛋白的表达，已有研究证实，当 *CTLA4* 外显子 1 第 49 位点为 A 基因型时，细胞

表达的 *CTLA4* 分子水平增高^[6]，其抑制功能增加。当外显子 49 位为 G 基因型，其抑制功能降低^[6]，T 细胞抗肿瘤功能增强。Kouki 等^[7]发现外显子 1 第 49 腺嘌呤替换为鸟嘌呤时，可导致第 17 位密码子编码丙氨酸与苏氨酸的转换，增加 *CTLA4* 的胞吞清除率及影响 *CTLA4* 运输到细胞表面，致使 *CTLA4* 生成减少或功能抑制。笔者研究发现，肝癌组患者 *CTLA4* 外显子 49 位 AG 及 GG 基因型分布频率显著高于对照组、非肝癌 HBV 感染组，从而证明携带 AG、GG 基因型人群罹患肝癌的风险比 AA 基因型者高，癌症发生风险分别增加了 2.48 及 5.22 倍，这与上述研究结论相一致。但也有不少研究证实^[8-9]外显子 49 位各基因型在对照组与结肠癌组的差异无统计学意义。发生这种现象的原因可能有：①人类肿瘤的发生发展受多个基因及环境因素协同作用。②由于人种、

地域及生活环境的差异,基因多态性的分布频率本身就存在差异。③与 *CTLA4* 基因可能与邻近基因存在连锁不平衡现象。④样本数量有限,实验方法及实验条件的差异,可能导致有的实验结果相关性未被发现。

由于 **AG** 和 **GG** 基因型分布在各组的分布较少,笔者将 **AG+GG** 一同分析,结果发现肝癌组 **AG+GG** 基因型频率显著高于对照组、非肝癌 **HBV** 感染组及与所有非 **HCC** 者比较,携带 **AG+GG** 基因型者罹患肝癌的风险比携带 **AA** 基因型高 2.32 倍(95% **CI** 1.338-4.023)。通过分析 109 例结肠癌患者及 190 例年龄和性别分布相平衡的正常人群 *CTLA4* 多个多态性位点(-1722T/C, -1661A/G, -318C/T 和 +49A/G),Hadinia 等^[10]没有发现各组的基因型分布频率的差异,但是却发现 **TACG** 单倍体型的分布频率在结肠癌患者中显著降低。本实验亦发现,各组在 1722 位点上个基因型的分布频率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

肝细胞癌是我国重要的恶性肿瘤,居城市男性恶性肿瘤发病率的第 3 位,在我国,乙型肝炎病毒慢性感染是 **HCC** 发生的主要原因,而肿瘤免疫学在癌症的发生、发展中所起的作用也越来越受到重视。本研究发现,*CTLA4* 基因启动子及外显子区域 49 及 1661 位点基因多态性与肝癌的发生相关,为肝癌的早期诊断及预防提供了分子水平上的理论基础,但关于性别、年龄、吸烟与否、肿瘤分级及门静脉癌栓形成等分层分析有待于进一步研究,与 **HBV** 感染是否存在交互作用也待于分析。

参 考 文 献:

- [1] Melanie S, Zhou XY, Jeffrey A. Bluestone the B7-independent isoform of *CTLA-4* functions to regulate autoimmune diabetes[J]. *J Immunol*, 2013, 190(3): 961-969.
- [2] Lucy SK, Walker, David M. Confusing signals: recent progress in *CTLA-4* biology[J]. *Trends Immunol*, 2015, 36(2): 63-70.
- [3] Hou TZ, Qureshi OS, Wang CJ, et al. A transendocytosis model of *CTLA-4* function predicts its suppressive behaviour on regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2015, 194(5): 2148-2159.
- [4] Peraino JS, Zhang HP, Li GY, et al. Molecular basis of cross-species reactivities of human versus porcine *CTLA-4*[J]. *Hum Immunol*, 2013, 74(7): 842-848.
- [5] AIFafdhli S. Overexpression and secretion of the soluble *CTLA-4* splice variant in various autoimmune diseases and in cases with overlapping autoimmunity[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2013, 17(4): 336-341.
- [6] Esposito L, Hunter K, Clark J, et al. Investigation of soluble and transmembrane *CTLA4* isoforms in serum and microvesicles [J]. *J Immunol*, 2014, 193(2): 889-900.
- [7] Kouki T, Gardine CA, Yanagawa T, et al. Relation of three polymorphisms of the *CTLA-4* gene in patients with Graves' disease[J]. *J Endocrinol Invest*, 2002, 25(3): 208-213.
- [8] Solerio E, Tappero G, Iannace L, et al. *CTLA4* gene polymorphism in Italian patients with colorectal adenoma and cancer[J]. *Dig Liver Dis*, 2005, 37(3): 170-175.
- [9] Dilmec F, Ozgonul A, Uzunkoy A, et al. Investigation of *CTLA-4* and *CD28* gene polymorphisms in a group of Turkish patients with colorectal cancer[J]. *Int J Immunogenet*, 2008, 35(4/5): 317-321.
- [10] Hadinia A, Hossieni SV, Erfani N, et al. *CTLA-4* gene promoter and exon 1 polymorphisms in Iranian patients with gastric and colorectal cancers[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(12): 2283-2287.

(张蕾 编辑)