OPN基因启动区-156delG多态性与中国HBV相关肝细胞癌的易感性

时 红[1]，吴元凯，林国莉，李向永
（中山大学附属第三医院感染科，广东 广州 510630）

摘 要：【目的】研究骨桥蛋白(OPN)基因启动区多态性与乙型肝炎病毒相关肝细胞癌(HBV-HCC)遗传易感性的关系。【方法】225例确诊为HBV-HCC患者与200例年龄匹配的慢性乙型肝炎患者被纳入研究。OPN基因启动区3个多态性位点(-156delG/G，-443T/C和-616T/G)通过直接测序法确定基因型。【结果】HBV-HCC组-156 delG/delG基因型分布频率高于对照组(P = 0.003)。HCC组-156 delG等位基因频率显著增高(P < 0.001)。Logistic回归分析显示等位基因-156delG是HBV-HCC的易感因素(OR = 1.643，95% CI 1.249-2.161)。两组间-443T/C、-616T/G基因型分布和等位基因频率差异没有统计学意义。【结论】OPN基因启动区-156等位基因可能是中国人群HBV-HCC的易感因素。

关键词：骨桥蛋白；基因多态性；肝细胞癌；肝炎，乙型，慢性
中图分类号：R512.6；R735.7 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2017)05-0717-05

Osteopontin Promoter Polymorphism at Locus-156 is Associated with HCC in Patients with HBV Infection in Chinese Population

SHI Hong，WU Yuan-kai，LIN Guo-li，LI Xiang-yong
(Department of Infectious Disease，The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University，Guangzhou 510630，China)
Corresponding to：LI Xiang-yong E-mail：lxy2005123@126.com

Abstract：【Objective】To study the association between the polymorphisms in the promoter region of Osteopontin (OPN) with hepatitis B virus (HBV)-related HCC. 【Methods】A total of 225 cases diagnosed with hepatitis B virus (HBV)-related HCC and 200 age-matched patients with HBV infection without HCC were collected. Three polymorphisms (-156delG/G，-443T/C and -616T/G) in the Osteopontin promoter were genotyped using direct sequencing. 【Results】The frequency of -156delG/delG genotype in the HCC group was higher than that of in the control group (P = 0.003). There was a significantly increased frequency of the allele -156delG (P < 0.001) in HCC patients. Logistic regression analysis was performed to show an increase HCC risk associated with the delG variant genotype (OR1.64；95%CI 1.25 ~ 2.16). There were no differences between the groups in the genotype distributions and allele frequencies of SNP -443T/C and -616T/G.【Conclusion】Our findings suggest that allele -156delG in the Osteopontin promoter may be a marker for risk of HCC with HBV infection in Chinese Han population.

Key words：osteopontin；polymorphism；hepatocellular carcinoma；Hepatitis B，chronic
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci)，2017，38(5)：717-721]

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma，HCC)是我国常见的的恶性肿瘤之一，死亡率在恶性肿瘤中居第三位[1]。值得注意的是，我国的HCC患者占全球的一半以上[2]。在我国，乙型肝炎病毒是引起HCC最主要的原因。尽管临床治疗手段取得一些进展，HCC仍保持较高的死亡率。HBV相关肝细胞癌(HBV-HCC)不仅与病毒因素相关(如基因型，X蛋白)，也与个体遗传易感性有关，

收稿日期：2017-04-07
基金项目：广东省科技计划项目(20128031800069)
作者简介：时红，硕士研究生，主治医师，研究方向：病毒性肝炎，E-mail：18620647691@163.com；李向永，通信作者，E-mail：lxy2005123@126.com

如基因多态性[3-7]。骨桥蛋白(osteopontin,OPN),也被称为T细胞早期活化基因1或分泌磷蛋白1(secreted phosphoprotein 1,SPP1),是一种具有多种功能的分泌蛋白,如参与应激反应、炎症、伤口愈合和免疫反应[8]。越来越多的研究表明,OPN在多种类型的肿瘤进展和预后中扮演重要的角色,如肺癌,乳腺癌,胃癌,口腔癌和肝细胞癌[9-13]。既往的研究显示,OPN是HCC过表达基因之一,与HCC的早期复发、预后差以及转移相关[14-15]。OPN启动区多态性(-156delG/G,-443T/C和-616 T/G)可影响转录活性,在一些疾病的发生发展中扮演重要角色[16-17]。一项之前的研究发现OPN启动区-443基因多态性显著影响HCC的转移和预后[18]。然而,OPN启动区多态性与HBV相关HCC的遗传易感性尚不清楚。因此,本研究的目的是探索OPN启动区多态性在中国HBV相关HCC患者中的易感性。

1 材料与方法

1.1 对 象

分为HBV-HCC组和对照组。HBV-HCC组纳入225例患者为2014年7月至2016年6月在中山大学附属第三医院住院诊断的未经放疗、化疗的HBV-HCC患者。HBV-HCC的诊断依据:有组织病理的确诊依据或者甲胎蛋白(AFP)> 400 ng/mL加上至少一个影像学证据。总共200名年龄和性别匹配的慢性乙型肝炎和肝硬化患者作为对照组。标本收集均取得研究对象签字同意,并获得中山大学附属第三医院伦理委员会的批准。

1.2 基因多态性的检测

使用直接测序法检测OPN启动子的3个基因多态位点。全血标本来自肝癌患者和对照组纳入第一天禁食后。使用Omega全血DNA提取试剂盒提取DNA,所有DNA贮存于-70 ℃备用。采用高保真Pfu DNA聚合酶(Promega, WI)扩增696 bp的片段,包括-156delG/G(rs17524488),-443T/C(rs11730582)和-616T/G(rs2853744)。上下游引物序列为5′-TAGGTAGGCTGGGCGATTTG-3’和5’-AATGCTGCTGCAGACATCCT-3’。PCR反应条件为94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 50 s,共35个循环;72 ℃ 5 min。纯化的DNA产物送上海英骏生物科技有限公司测序(3730XL DNA测序仪,Applied Biosystems)。

1.3 统计学方法

所有数据使用SPSS 13.0统计软件分析。两组间人口资料学和临床数据比较,分类变量采用卡方检验,连续变量采用t检验。使用卡方检验或Fisher精确概率法分析等位基因频率和基因型分布差异。二元Logistic回归分析基因多态型与HCC的关联性。计量资料数据均以均数±标准差表示,$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 人口资料学

病例组和对照组患者人口资料学比较见表1。两组患者在年龄、性别、HBeAg状态以及肝硬化比例差异没有统计学意义。两组患者吸烟和饮酒比例是相似的。

表1 两组患者基线特征比较

Table 1 Distributions of Characteristics by Case-Controls Status

Variable	Patients with HBV-related HCC(n = 225)	Control (n = 200)	P
Gender(Male)	225(199)	200(183)	0.297
Age	47.5 ± 12.7	45.7 ± 9.6	0.103
HBeAg status			0.894
(+)	74	67	
(-)	151	133	
Cirrhosis	178	165	0.377
Smoking status			0.743
Yes	89	76	
No	136	124	
Drinking status			0.840
Yes	143	129	
No	82	71	

2.2 OPN基因多态性是HBV-HCC的易感因素

表2和表3显示的是HBV-HCC和对照组OPN启动区基因-156delG/G,-443T/C和-616T/G的基因型和等位基因频率。两组患者-443T/C和-616T/G基因分布和等位基因频率没有差异。在HCC组,-156基因型分布为15.6% G/G,42.2% G/delG和42.2% delG/delG;对照组的分布分别为27.5%, 42.5%和30%。HCC组有更高的delG/delG基因分布频率(P = 0.003)。HCC组-156delG等位基因频率显著高于对照组(51.2% *vs.* 63.3%,

表2　两组OPN启动区基因型频率分布及与HCC易感性的关系

Table 2　Genotype frequencies of OPN promoter in case and control and their association with risk of HCC

genotype	HCC n(%)	Control n(%)	χ^2	P	Odds Ratio (95%CI)	P
-156 genotype						
G/G	35(15.6)	55(27.5)			1ref	
G/delG	95(42.2)	85(42.5)	11.472	0.003	1.756(1.049-2.939)	0.032
DelG/delG	95(42.2)	60(30.0)			2.488(1.460-4,240)	0.001
-443 genotype						
T/T	106(47.1)	94(47.0)			1ref	
T/C	89(39.6)	75(37.5)	0.463	0.794	0.950(0.628-1.438)	0.809
C/C	30(13.3)	31(15.5)			1.165(0.657-2.068)	0.601
-616 genotype						
T/T	40(17.8)	35(17.5)			1ref	
T/G	96(42.7)	84(42.0)	0.039	0.981	1.000(0.583-1.716)	1.000
G/G	89(39.5)	81(40.5)			1.040(0.603-1.793)	0.887

CI indicates confidence interval. $P < 0.05$ is significant.

表3　两组OPN启动区等位基因频率分布及与HCC易感性的关系

Table 3　Allele frequencies of OPN promoter in case and control and their association with risk of HCC

Allele	HCC n(%)	Control n(%)	χ^2	P	Odds Ratio (95%CI)	P
-156 genotype						
G allele	165(36.7)	195(48.8)	12.664	<0.0001	1ref	
delG allele	285(63.3)	205(51.2)			1.643(1.249-2.161)	0.000
-443 genotype						
T allele	301(66.9)90	263(65.8)	0.123	0.726	1ref	
C allele	149(33.1)	137(34.2)			1.052(0.791-1.399)	0.726
-616 genotype						
T allele	176(39.1)	154(38.5)	0.033	0.855	1ref	
G allele	274(60.9)	246(61.5)			1.026(0.778-1.353)	0.855

CI indicates confidence interval. $P < 0.05$ is significant.

$P < 0.0001$)。Logistic回归分析OPN启动区基因多态性与HBV-HCC的相关性，结果显示等位基因-156delG是HBV-HCC的易感因素(OR=1.643, 95% CI 1.249-2.161)。

3　讨　论

OPN是一种整合素结合蛋白，在肺癌、乳腺癌以及大肠癌等多种癌组织中过表达[19-21]。OPN过表达与包膜浸润，静脉侵犯，淋巴结转移密切相关[22]。在肝细胞癌中，OPN过表达表明患者预后较差，潜在的预测癌细胞的扩散和转移[23]。此前的研究发现，OPN与细胞表面受体CD44结合可阻止细胞，以增强肝癌细胞的增殖[13]。

HCC的诊断通常发生在晚期，预后较差。临床迫切需要早期诊断的生物标记物以确保患者获得早期干预。有研究报道，OPN基因启动区-443SNP对OPN表达的调节和HCC进展起重要作用[18]。对包括早期HCC的诊断，OPN的敏感性优于AFP[18,24]。因此，OPN可被作为一种新的生物标记物用于早期HCC的诊断[25]。OPN基因启动区的SNPs已经被确认，且证实与一些疾病相关。因此我们推测OPN基因启动区的基因多态性可能影响其表达，并与HCC的发生相关。

在我们的研究中，采用直接测序法检测3个SNPs(-156delG/G，-443T/C和-616T/G)。结果显

示,HCC组中-156delG/delG基因型频率高于对照组。此前的研究发现,OPN基因启动区基因多态性影响基因表达和蛋白水平,最终导致疾病发生[26]。另外,OPN也被证实与HCC的增殖、进展和预后相关。因此可以合理的推测OPN启动区基因多态性可作为HCC的易感因素。这是首次研究报道OPN启动区基因多态性与中国HBV感染人群肝细胞癌的易感性。

OPN基因启动区-156位点多态性被证实与多种疾病易感性相关。Liu等[27]发现携带delG等位基因与钙尿石症相关(OR = 1.39)。我们的研究发现OPN启动区-156delG等位基因是HBV-HCC的易感因素。结果与泰国的一项研究类似,在HBV感染患者中,-156delG等位基因增加2倍发生HCC的风险。然而,该研究没有发现-156基因多态性对血清OPN水平的影响[15]。但另一项在小细胞肺癌的研究显示,-156 delG/delG等位基因的人群相比delG/G和G/G有更高浓度的血清OPN水平(P = 0.003)[28],支持-156delG在疾病发展中的作用。也有研究发现-156G等位基因与一些疾病相关[29-31]。G碱基在-156位点的插入产生一个额外Runx2结合区,而转录因子Runx2参与OPN的转录调节[32]。然而,G碱基缺失在疾病发展中的机制需进一步明确。对既往的研究分析发现,-156位点基因多态性与疾病的关系存在较大异质性。G碱基的插入或缺失均发现与疾病的易感性相关,需在更大规模人群中验证。

尽管最近的研究显示-443基因多态性与HCC进展和预后的相关性[18,33],我们的研究没有发现-443T/C和-616T/G与HBV-HCC的相关性。复杂的临床状态、人群、环境因素以及有限的样本量可能导致这一差异。另外,我们没有获得足够的血标本检测OPN的血浆浓度。因此,-156del/G基因多态性与OPN mRNA和血浆蛋白水平的关系需进一步研究。对照组人群中的多态性并没有符合Hardy Weinberg遗传平衡,需更具有代表性的样本来进行更深入的阐释-156delG与HCC的关系。本研究也尚未探讨OPN启动区其它的基因多态性如-1748 A/G和-66 T/G。

本研究首次报道OPN基因启动区基因多态性与中国HBV感染人群肝细胞癌的关系,显示OPN基因启动区-156等位基因是中国人群HBV-HCC的易感因素。

参考文献

[1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer, 2015,136(5), E359-E386

[2] Lai CL, Ratziu V, Yuen MF, et al. Viral hepatitis B [J]. Lancet, 2003, 362 (9401):2089-2094.

[3] Wong GL, Chan HL, Yiu KK, et al. Meta-analysis: The association of hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2013, 37(5):517-526.

[4] Zhang B, Han S, Feng B, et al. Hepatitis B virus X protein-mediated non-coding RNA aberrations in the development of human hepatocellular carcinoma [J]. Exp Mol Med, 2017, 49(2):e293

[5] Li Z, Li N, Li F, et al. Immune checkpoint proteins PD-1 and TIM-3 are both highly expressed in liver tissues and correlate with their gene polymorphisms in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma [J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(52):e5749.

[6] Li G, Zheng Z. Toll-like receptor 3 genetic variants and susceptibility to hepatocellular carcinoma and HBV-related hepatocellular carcinoma [J]. Tumour Biol, 2013, 34(3):1589-1594.

[7] Medhi S, Sarma MP, Asim M. Genetic variants of heat shock protein A1L2437 and A1B1267 as possible risk factors for hepatocellular carcinoma in India [J]. J Viral Hepatitis, 2013, 20(4): 141-147.

[8] Wu K, Nie Y, Guo C, et al. Molecular basis of therapeutic approaches to gastric cancer [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(1):37-41.

[9] Polat B, Wohlleben G, Katzer A, et al. Influence of osteopontin silencing on survival and migration of lung cancer cells [J]. Strahlenther Onkol, 2013, 189(1): 62-67.

[10] Huan JL, Xing L, Qin XJ, et al. Expression and clinical significance of osteopontin in calcified breast tissue [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(10): 5219-5223.

[11] Lin CN, Wang CJ, Chao YJ, et al. The significance of the co-existence of osteopontin and tumor-associated macrophages in gastric cancer progression [J]. BMC Cancer, 2015;15(3):128.

[12] Chiu YW, Tu HF, Wang IK, et al. The implication of osteopontin (OPN) expression and genetic polymorphisms of OPN promoter in oral carcinogenesis [J].

Oral Oncol，2010，46(4)：302-306.
[13] Duarte-Salles T，Misra S，Stepien M，et al. Circulating osteopontin and prediction of hepatocellular carcinoma development in a large European population [J]. Cancer Prev Res (Phila)，2016，9(9)：758-765.
[14] Tsai WC，Lee HS，Jin JS，et al. Association between osteopontin and EGFR expression with clinicopathological parameters in hepatocellular carcinoma [J]. Chin J Physiol，2012，55(6)：412-420.
[15] Chimparlee N，Chuaypen N，Khlaiphuengsin A，et al. Diagnostic and prognostic roles of serum osteopontin and osteopontin promoter polymorphisms in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma [J]. Asian Pac J Cancer Prev，2015，16(16)：7211-7217.
[16] Zhang R，Yang W，Li YC，et al. The OPN gene polymorphism confers the susceptibility and response to Ara-C based chemotherapy in Chinese AML patients [J]. Cell Physiol Biochem，2015，35(1)：175-183.
[17] Mi Y，Ren K，Dai F，et al. OPN gene polymorphisms，rs17524488 GG/G，rs11730582 T/C，and rs9138 C/A，and cancer risk in a Chinese population [J]. Sci Rep，2015，5：14164.
[18] Dong QZ，Zhang XF，Zhao Y，et al. Osteopontin promoter polymorphisms at locus -443 significantly affect the metastasis and prognosis of human hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology，2013，57(3)：1024-1034.
[19] Zhang T，Zhang DM，Zhao D，et al. Osteopontin expression is associated with platinum-based chemotherapy response and prognosis of patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. J BUON，2014，19(3)：742-748.
[20] Anborgh PH，Caria LB，Chambers AF，et al. Role of plasma osteopontin as a biomarker in locally advanced breast cancer [J]. Am J Transl Res，2015，7(4)：723-32.
[21] Wu XL，Lin KJ，Bai AP，et al. Osteopontin knockdown suppresses the growth and angiogenesis of colon cancer cells [J]. World J Gastroenterol，2014，20(30)：10440-10448.
[22] Wen Y，Jeong S，Xia Q，et al. Role of osteopontin in liver diseases [J]. Int J Biol Sci，2016，12(9)：1121-1128.
[23] Zhang CH，Xu GL，Jia WD，et al. Prognostic significance of osteopontin in hepatocellular carcinoma：A meta-analysis [J]. Int J Cancer，2012，130(11)：2685-2692.
[24] Shang S，Plymoth A，Ge S，et al. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology，2012，55(2)：483-490.
[25] Yang L，Rong W，Xiao T，et al. Secretory/releasing proteome-based identification of plasma biomarkers in HBV-associated hepatocellular carcinoma [J]. Sci China Life Sci，2013，56(7)：638-646.
[26] Schultz J，Lorenz P，Ibrahim SM，et al.. The functional -443 T/C osteopontin promoter polymorphism influences osteopontin gene expression in melanoma cells via binding of c-Myb transcription factor [J]. Mol Carcinog，2009，48(1)：14-23.
[27] Liu CC，Huang SP，Tsai LY，et al. The impact of osteopontin promoter polymorphisms on the risk of calcium urolithiasis [J]. Clin Chim Acta，2010，411(9/10)：739-743.
[28] Chang YS，Kim HJ，Chang J，et al. Elevated circulating level of osteopontin is associated with advanced disease state of non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer，2007，57(3)：373-380.
[29] Liu J，He C，Yuan Q，et al. Association between promoter polymorphisms of OPN gene and cancer risk：A meta-analysis [J]. Onco Targets Ther，2016，9(6)：87-97.
[30] Nakayama H，Nagai H，Matsumoto K，et al. Association between osteopontin promoter variants and diastolic dysfunction in hypertensive heart in the Japanese population [J]. Hypertens Res，2011，34(10)：1141-1146.
[31] Cheema BS，Iyengar S，Sharma R，et al. Association between osteopontin promoter gene polymorphisms and haplotypes with risk of diabetic nephropathy [J]. J Clin Med，2015，4(6)：1281-1292.
[32] Giacopelli F，Marciano R，Pistorio A，et al. Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity [J]. Physiol Genom，2004，20(1)：87-96.
[33] Zhao XQ，Ma HX，Su MS，et al. Osteopontin promoter polymorphisms at locus -443 are associated with metastasis and poor prognosis of human intrahepatic cholangiocarcinoma in Chinese population [J]. Int J Clin Exp Pathol，2014，7(10)：6914-6921.

（编辑　孙慧兰）