

江苏人群 MICA 基因多态性与乙型肝炎源性肝癌的相关性研究

苗祥宇, 徐丽, 刘红, 张硕伟, 吴情 (江苏省宿迁市人民医院感染科 223800)

【摘要】目的 探讨江苏人群主要组织相容性复合体-I 类链相关基因 A(MICA) 基因多态性分布情况及其与乙型肝炎源性肝癌的关系。**方法** 乙型肝炎源性肝癌组 161 例患者, 健康对照组 162 例健康体检者, 应用聚合酶链反应测序方法进行基因分型。比较各基因型等位基因频率分布及与乙型肝炎源性肝癌的关系。**结果** 受试者携带 GG 基因型比携带 AA 基因型患乙型肝炎源性肝癌的风险高[比值比(OR): 1.860, 95% 置信区间(95% CI): 1.009~3.428, $P=0.020$], 或至少携带 1 个 G 等位基因的受试者比携带 A 等位基因的受试者更易患乙型肝炎源性肝癌(OR: 1.412, 95% CI: 1.030~1.936, $P=0.046$)。GG 基因型患者血清 MICA 水平[(89.1±41.7) pg/mL]明显高于 AA 基因型[(18.2±9.5) pg/mL]和 AG 基因型[(35.8±17.4) pg/mL]。**结论** 江苏人群 MICA 基因多态性(rs2596542)与乙型肝炎源性肝癌相关。

【关键词】 肝癌; MHC-I 类链相关基因 A; 单核苷酸多态性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.18.021 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)18-2548-02

Association of MICA polymorphism with HBV-related hepatocellular carcinoma among Han population in Jiangsu MI-AO Xiang-yu, XU Li, LIU Hong, ZHANG Shuo-wei, WU Qing (Department of Infectious disease, Suqian People's Hospital, Suqian, Jiangsu 223800, China)

【Abstract】Objective To investigate the distribution of MICA polymorphism in Han population in Jiangsu, the correlation between MICA polymorphism and HBV-related hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** One hundred patients with HBV-related HCC were selected into HCC group ($n=161$), 162 healthy people were divided into control group. Genotyping was conducted by using polymerase chain reaction-sequencing, allele frequency distribution and its correlation with HBV-related hepatocellular carcinoma were compared between the two groups. **Results** Compared with objectives with AA homozygote genotype, objects with GG genotype had more risk with HCC(OR: 1.860, 95% CI: 1.009-3.428, $P=0.020$). Objects at least carrying one G allele had more risk with HCC than objectives carrying A allele(OR: 1.412, 95% CI: 1.030-1.936, $P=0.046$). In HCC patients, the GG genotype was associated with a significant higher serum levels of MICA compared to the AG or AA genotype. **Conclusion** The results suggested that MICA polymorphism was significant associated with HBV-related hepatocellular carcinoma among Han population in Jiangsu.

【Key words】 hepatocellular carcinoma; MICA; single nucleotide polymorphisms

全球范围内原发性肝细胞癌(HCC)发病率位居恶性肿瘤第 5 位, 约 55% 的病例发生在国内^[1]。多项研究已证实慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染是导致 HCC 的重要原因之一, 约有 10%~25% HBV 感染患者最终发展为 HCC^[2]。在国内, 90% 以上 HCC 患者伴有 HBV 感染^[3]。近年来, 越来越多的证据显示, 单核苷酸多态性(SNP)与肿瘤的遗传易感性相关^[4]。主要组织相容性复合体(MHC)-I 类链相关基因 A(MICA)编码一种应激诱导性配体, 主要与自然杀伤细胞(NK 细胞)活化型受体 NKG2D 特异性结合, 在 NK 细胞活化和免疫监视中发挥作用。研究发现, MICA 多态性与恶性肿瘤、感染性疾病以及自身免疫性疾病等的易感性有密切关系。本研究旨在探讨 MICA 基因多态性以及血清中可溶性 MICA 抗原含量与乙型肝炎源性 HCC 的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2009 年 9 月至 2013 年 6 月本院收治并经病理确诊的 HCC 患者 161 例纳入患者组, 所有患者均为首次

发病入院, 未经过放射、化学治疗的患者; 其中男 131 例, 女 30 例, 患者年龄 22~80 岁, 平均(47.2±12.5)岁; 所有患者乙型肝炎表面抗原(HBsAg)均为阳性。将同期无血缘关系、在本院体检健康者 162 例纳入健康对照组, 其中男 130 例, 女 32 例; 年龄 24~74 岁, 平均(45.6±11.8)岁。两组受试者性别、年龄等一般资料比较, 比较差异无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 基因组 DNA 提取采用 Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒(美国 Promega 公司), 操作严格按照说明书进行。分光光度计分析 DNA 浓度和纯度, 将浓度调整为 50 ng/μL。

1.2.2 基因分型 运用聚合酶链式反应(PCR)产物直接测序法对 MICA 基因多态性位点 rs2596542 进行基因分型。引物序列为: 上游 5'-TCG TCT CCC AAA GAA CAG CTA C-3', 下游 5'-CCA GTC TCT GGA GTC ACT GTC-3'。PCR 总反

应体系为 25 μ L, 含 DNA 模板 1 μ L, 2 \times PCR mix 12.5 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, DNA 聚合酶 0.5 μ L, 去离子水 9 μ L。PCR 预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 60 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 扩增产物片段为 492 bp。

1.2.3 血清 MICA 水平检测 采用酶联免疫吸附法 (ELISA)、人 MICA 检测试剂盒 (美国 Sigma-Aldrich 公司), 操作按照说明书进行操作。所有样品均设 3 个复孔, 设置酶标仪波长 450 nm, 读取吸光度值, 根据 MICA 标准品检测结果绘制标准曲线, 计算样品浓度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对数据进行处理及统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料采用百分率表示, 组间比较采用卡方检验。Logistic 回归分析法计算比值比 (OR) 及 95% 置信区间 (95% CI), 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 既往史与家族史比较 患者组中有吸烟史、饮酒史、HCC 家族史者明显高于健康对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 患者组和健康对照组的既往史与家族史比较 (n)

组别	吸烟史		饮酒史		HCC 家族史	
	有	无	有	无	有	无
患者组	98	63	93	68	13	148
健康对照组	75	87	73	89	2	160
<i>P</i>	0.010		0.026		0.003	

2.2 MICA 基因多态性与 HCC 风险 经 Hardy-Weinberg 平衡检验, 健康对照组和患者组 MICA 基因位点 rs2596542 基因型实际值与预测值比较, 均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($\chi^2 = 2.344, P = 0.125$ 和 $\chi^2 = 3.420, P = 0.064$)。患者组中 GG 基因型的分布频率为 23.6%, 明显高于健康对照组的 16.0%, 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。进一步分析发现, GG 基因型携带者 HCC 发病风险是 AA 基因型携带者的 1.860 倍 (OR = 1.860, 95% CI: 1.009~3.428)。携带 G 等位基因者 HCC 发病风险高于 A 等位基因携带者 (OR = 1.412, 95% CI: 1.030~1.936)。

表 2 rs2596542 基因型在患者组与健康对照组的分布 [n (%) 或 n]

组别	AA	AG	GG	A	G
患者组	55(34.2)	68(42.2)	38(23.6)	178	144
健康对照组	70(43.2)	66(40.7)	26(16.0)	206	118
<i>P</i>	0.616		0.048	0.037	

2.3 MICA 基因多态性与血清 MICA 水平 本研究采用 ELISA 方法对 HCC 患者和健康体检者血清 MICA 水平进行检测, 发现患者组 MICA 水平为 (55.1 \pm 21.3) pg/mL, 明显高于健康对照组的 (9.7 \pm 4.3) pg/mL, 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步分析 MICA 基因多态性与血清 MICA 水平的关系, 结果显示, GG 基因型患者血清 MICA 水平为 (89.1 \pm 41.7) pg/mL, 明显高于 AA 基因型的 (18.2 \pm 9.5) pg/

mL 和 AG 基因型的 (35.8 \pm 17.4) pg/mL, 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

MICA 基因是 MIC 基因家族的成员之一。MICA 是功能基因, 在人体正常组织细胞表达量极低^[5]。研究发现, MICA 基因在大多数上皮来源的原发性肿瘤, 如肝癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌等细胞上表达, 被认为与恶性转化有关^[6]。NK 细胞活化受体 NKG2D 可以识别表达在肿瘤细胞表面的 MICA/B。这些识别无须抗原处理和递呈, 并且无 MHC 限制性。MICA/B 与 NKG2D 结合刺激 NK 细胞的活化。膜 MICA 可上调效应细胞 NKG2D 的表达, 而膜 MICA 可被基质金属蛋白酶水解释放入血液。可溶性 MICA 的释放不仅降低肿瘤细胞表面 MICA 的表达, 降低肿瘤的免疫原性, 也能影响免疫效应细胞表面 NKG2D 的表达, 进而影响 NK 细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL 细胞) 抗肿瘤效应的发挥。张彩等^[7]的研究也表明, 可溶性 MICA 通过降低 NKG2D 的表达下调机体的抗肿瘤免疫效应。上述研究表明, NKG2D-MICA 的相互作用可有效调节 NK 细胞和 CTL 细胞的杀肿瘤作用。本研究发现, 乙型肝炎源性 HCC 患者血清 MICA 水平明显高于健康对照组 ($P < 0.05$), 说明可溶性 MICA 在肝癌发生中发挥重要作用, 这种作用与肿瘤免疫逃逸作用机制有关。

人类 MHC 基因域位于 6 号染色体短臂, 共含有 224 个基因座, 包含 MIC 家族 7 个成员的编码基因, 其中 MICA 位于经典 MHC-I 类基因域着丝粒的末端, 具有 6 个外显子, 由 5 个内含子隔开^[8]。Kumar 等^[9]发现 MICA 上游 4.7 kb 的变异位点与丙型肝炎病毒引起的 HCC 相关。Paulisally 等^[10]研究了 MICA 基因多态性与丙型肝炎源性肝癌的关系, 发现 SNP rs2596538 与丙型肝炎源性肝癌易感性相关。有研究发现, 另一个 MICA SNP 位点 rs2596542 与乙型肝炎源性 HCC 易感性相关, G 等位基因携带者 HCC 发病风险明显大于 A 等位基因携带者^[11]。本研究结果与 Kumar 等^[9]的研究类似, GG 基因型携带者比 AA 基因型携带者乙型肝炎源性 HCC 发病风险高; 或至少携带 1 个 G 等位基因者比携带 A 等位基因者更易患乙型肝炎源性 HCC。SNP rs2596538G 等位基因携带者血清 MICA 水平高于 A 等位基因携带者, rs2596542G 等位基因携带者高于 A 等位基因的携带者。本研究也发现, GG 基因型 HCC 患者血清 MICA 水平明显高于 AA 基因型和 AG 基因型患者 ($P < 0.05$)。回归分析结果显示, GG 基因型携带者比 AA 基因型携带者乙型肝炎源性 HCC 发病风险要高。上述研究结果表明, MICA 基因多态性可能通过提高可溶性 MICA 水平, 从而影响 HCC 易感性。

综上所述, 随着分子生物学、细胞生物学和人类基因组学、蛋白质组学等基础学科向癌症研究领域的延伸, HCC 分子诊断方法取得了长足的进展^[12]。MICA 基因多态性和血清 MICA 有可能成为乙型肝炎源性 HCC 的生物学标记。其在临床诊断中的作用有待进一步研究。

参考文献

[1] 覃彦平, 秦雪. 白介素-23R 基因多态性与肝癌易感性研究 [J]. 重庆医学, 2012, 41(30): 3138-3141.
 [2] Coffin CS, Fung SK, Ma MM. Management of chronic hepatitis B; Canadian Association for the (下转第 2552 页)

发现,冠状动脉粥样硬化斑块中存在免疫复合物、炎性细胞及补体,而正常动脉中无上述成分^[13-14]。IgE 为变态反应的介质,对血小板及血管平滑肌影响较大,可引起急性血管痉挛,与急性冠状动脉事件密切相关^[15]。

CHD 老年患者机体免疫功能的变化为 CHD 发病机制的深入研究开辟了新的领域。细胞免疫功能低下及体液免疫功能亢进与冠状动脉粥样硬化斑块的形成及破裂密切相关。对 CHD 老年患者进行免疫功能研究,在疾病防治方面有重要的临床意义。

参考文献

[1] 高阅春,何继强,姜腾勇,等. 冠心病患者冠状动脉病变严重程度与冠心病危险因素的相关分析[J]. 中国循环杂志,2012,27(3):178-180.

[2] 曾燕波,郑海斌. 冠心病患者血清中超敏 C 反应蛋白和 IL-18 的表达及相关性[J]. 浙江医学,2010,32(1):52-53.

[3] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会. 慢性稳定性心绞痛诊断和治疗指南[J]. 中华心血管病杂志,2007,35(3):195-206.

[4] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会. 不稳定性心绞痛和非 sT 段抬高心肌梗死诊断和诊疗指南[J]. 中华心血管病杂志,2007,35(4):295-304.

[5] 王秋风. 细胞间黏附分子-1 及白细胞介素-6 与冠心病的相关性研究[J]. 检验医学与临床,2011,8(21):2604-2606.

[6] 孙秀丽. 冠心病患者血浆炎性细胞因子及 P-选择素的临床价值[J]. 检验医学与临床,2010,7(24):2715-2718.

[7] 马晓娟,陈可冀,蒋跃斌. 冠心病免疫相关基因组学的初步研究[J]. 中国分子心脏病学杂志,2007,7(5):261-263.

[8] 李虹. 老年冠心病患者免疫功能探讨[J]. 人民军医,2007,50(12):742-745.

[9] 周厚成,蔡志雄,王晓青. 冠心病与炎症和免疫系统关系的临床研究[J]. 中国医师进修杂志,2006,29(7):17-21.

[10] 汤涌,陆治平,黄进. 早发冠心病患者淋巴细胞亚群分析[J]. 四川医学,2010,31(7):984-987.

[11] 原永明,严健,曹波,等. 老年人冠心病患者免疫反应的研究[J]. 检验医学,2011,26(12):874-876.

[12] Heller EA, Liu E, Tager AM, et al. Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells[J]. Circulation,2006,113(4):2301-2312.

[13] Kim HS, Cho KI. Association of carotid artery parameters of atherosclerosis in coronary artery disease[J]. J Cardiovasc Ultrasound,2013,21(2):72-80.

[14] 马江涛,庞新利,吴文苑. 脂蛋白残粒检测方法的评价及在冠心病中的初步应用[J]. 检验医学,2011,26(8):544-547.

[15] Fujioka Y, Ishikawa Y. Remnant lipoproteins as strongkey particles to atherogenesis[J]. J Atheroscler Thromb,2009,16(3):145-154.

[16] Tang YL, Yang YZ, Wand S, et al. Mast cell degranulator compound 48-80 promotes atherosclerotic plaque in apolipoprotein E knockout mice with perivascular common carotid collar placement[J]. Chin Med J(Engl),2009,122(3):319-325.

(收稿日期:2014-01-22 修回日期:2014-04-23)

(上接第 2549 页)

Study of the Liver consensus guidelines[J]. J Hepatol,2000,32(Suppl 1):89-97.

[3] Thakur V, Guptan RC, Kazim SN, et al. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent[J]. J Gastroenterol Hepatol,2002,17(2):165-170.

[4] Akkiz H, Bayram S, Bekar A, et al. Relationship between functional polymorphism in the Aurora A gene and susceptibility of hepatocellular carcinoma[J]. J Viral Hepatol,2010,17(9):668-674.

[5] Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, et al. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1994,91(14):6259-6263.

[6] 丁军颖,王润田. 人 MICA 基因多态性和表达特性与肿瘤的关系[J]. 现代免疫学,2007,27(2):165-168.

[7] 张彩,冯进波,王郡甫,等. 膜型分泌型 MICA 对 NK 细胞受体 NKG2D 的相反调节效应及其对 NK 细胞受体谱的影响[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2004,24(2):107-111.

[8] Shiina T, Tamiya G, Oka A, et al. Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1999,96(23):13282-13287.

[9] Kumar V, Kato N, Urabe Y, et al. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma[J]. Nat Genet,2011,43(5):455-458.

[10] Paulisally Hau Yi Lo, Yuji Urabe, Vinod Kumar, et al. Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk[J]. PloS one,2013,8(4):61279.

[11] Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, et al. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma [J]. PloS one,2012,7(9):44743.

[12] 董良仓,柴丽. 原发性肝癌的分子诊断[J]. 中国医学检验杂志,2011,12(3):134-135.

(收稿日期:2014-01-22 修回日期:2014-05-29)