



· 论 著 ·

膜辅助蛋白CD46 rs1970530遗传变异对肝癌发病风险的影响

徐珊珊¹, 宋琴琴¹, 仵红娇², 付 宁², 车玲玉², 金 敏¹, 刘 冲¹, 韩素桂³,张雪梅², 张 志¹

1. 华北理工大学附属唐山市工人医院肿瘤科, 河北 唐山 063000 ;

2. 华北理工大学生命科学学院, 河北 唐山 063210 ;

3. 华北理工大学附属唐山市人民医院核医学检验科, 河北 唐山 063000

[摘要] 背景与目的: 膜辅助蛋白CD46可保护宿主细胞免受补体依赖的细胞毒性作用, 研究表明, CD46可能作为肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 患者的潜在生物标志物。探讨CD46基因表达及启动子区遗传变异与HCC发病风险的关系。方法: 通过基因表达谱交互分析 (gene expression profiling interactive analysis, GEPIA) 在线网站分析HCC组织和正常肝组织CD46表达的差异; 2011—2015年在华北理工大学附属唐山市工人医院和河北理工大学附属唐山市人民医院经病理学检查确诊且未经放化疗的240例HCC患者作为病例组, 对照组为同时期入院体检的500名健康人群。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 法进行基因分型, 检测两组基因型频率和等位基因频率, 评估CD46 rs1970530遗传变异与HCC发病风险的关系。结果: CD46在HCC组织与正常组织中的表达差异有统计学意义 ($P<0.05$)。经非条件logistic回归分析发现, CD46 rs1970530至少携带一个G等位基因型在病例组及对照组之间差异有统计学意义 (OR=0.666, 95% CI: 0.448~0.990, $P<0.05$); 两组间等位基因G频率差异有统计学意义 (OR=0.689, 95% CI: 0.478~0.994, $P<0.05$)。分层分析结果显示, 至少携带一个G等位基因者可降低高龄组 (>60岁) ($P=0.048$) 和男性 ($P=0.023$) 人群的HCC发病风险, 在女性和低龄组 (≤ 60 岁) 中差异无统计学意义 ($P>0.05$)。按吸烟状态进行分层分析, rs1970530变异与HCC易感性无明显关联 ($P>0.05$)。结论: HCC中CD46基因高表达及CD46 rs1970530遗传变异影响HCC发病风险。

[关键词] 膜辅助蛋白CD46; 肝细胞癌; 单核苷酸多态性; 易感性

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2020.09.003

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2020)09-0656-05

Genetic variation in membrane cofactor protein CD46 rs1970530 affects the risk of hepatocellular carcinoma XU Shanshan¹, SONG Qinqin¹, WU Hongjiao², FU Ning², CHE Lingyu², JIN Min¹, LIU Chong¹, HAN Sugui³, ZHANG Xuemei², ZHANG Zhi¹ (1. Department of Oncology, Tangshan Gongren Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei Province, China; 2. College of Life Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, Hebei Province, China; 3. Nuclear Medicine Laboratory, Tangshan People's Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei Province, China)

Correspondence to: ZHANG Zhi E-mail: zhi1969@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** Membrane cofactor protein CD46 protects host cells from complement-dependent cytotoxicity and may be a potential molecular marker for hepatocellular carcinoma (HCC). This study aimed to investigate the correlation between the gene expression of CD46 with the genetic variation of CD46 promoter and the risk of HCC. **Methods:** The difference in CD46 expression between HCC tissues and normal liver tissues was analyzed by gene expression profiling interactive

基金项目: 国家自然科学基金 (81101483); 河北省自然科学基金重点项目 (H2017209233); 唐山市科技创新团队培养计划 (14130225B)。

通信作者: 张 志 E-mail: zhi1969@163.com

analysis (GEPIA) online website. From 2011 to 2015, 240 HCC patients were confirmed by pathological diagnosis in Tangshan Gongren Hospital, North China University of Science and Technology and Tangshan People's Hospital, North China University of Science and Technology, and 500 healthy people enrolled as the control group in the same period. Genotyping was performed using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) to detect genotype frequencies and allele frequencies between two groups. The relationship between the genetic variation of CD46 rs1970530 and the risk of HCC was evaluated.

Results: The expression of CD46 was significantly different between HCC tissues and normal tissues ($P < 0.05$). Unconditional logistic regression analysis indicated the difference in CD46 rs1970530 genotype carrying at least one G allele was statistically significant between the case group and the control group (OR=0.666, 95% CI: 0.448-0.990, $P < 0.05$), and there was also a significant difference in the frequency of the allele G (OR=0.689, 95% CI: 0.478-0.994, $P < 0.05$). The stratification analysis showed that CD46 rs1970530 genotype carrying at least one G allele could reduce the risk of HCC in the advanced age group (>60 years) ($P = 0.048$) and men ($P = 0.023$), however, there was no difference in women and younger age groups between the HCC and the healthy control (≤ 60 years) ($P > 0.05$). Smoking stratification analysis indicated that there was no significant correlation between rs1970530 mutation and HCC susceptibility ($P > 0.05$). **Conclusion:** The high gene expression of CD46 in HCC and the genetic variation of CD46 rs1970530 affect the risk of HCC.

[Key words] Membrane cofactor protein CD46; Hepatocellular carcinoma; Single nucleotide polymorphism; Susceptibility

中国是癌症高发国家, 全球约22%的新发癌症病例出现在中国, 肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 发病率居全国第4位, 严重威胁居民健康^[1]。HCC可归因于生活方式与环境致癌因素和遗传因素之间复杂的相互作用^[2]。单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 通过改变基因结构或表达量影响基因对机体的调控, 目前已确认SNP与HCC的发病风险密切相关^[3-4]。深入研究HCC的发生、发展机制, 对于HCC防控具有重要意义。膜辅助蛋白CD46通过血清因子 I 使补体成分C3b和C4b裂解失活, 保护宿主细胞免受补体依赖的细胞毒性 (complement-dependent cytotoxicity, CDC) 作用^[5]。研究^[6]发现, HCC HBx通过激活一系列信号转导通路上调CD46致HCC细胞免于CDC, 表明CD46可能作为HCC患者的潜在分子标志物。Bresin等^[7]研究发现, CD46基因多态性与非典型溶血性尿毒症综合征有关。目前关于CD46基因启动子区遗传变异与恶性肿瘤易感性关联的研究甚少, 因此本研究探讨CD46基因多态性对HCC发病风险的影响, 为HCC的早期筛查及免疫治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 基因表达谱交互分析 (gene expression profiling interactive analysis, GEPIA) 数据库

GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 在线网

站是一肿瘤表达谱数据的交互式web服务器, 能提供肿瘤和正常组织的差异表达分析及生存分析等多种分析模块, 包含33种癌症类型的9 736个肿瘤组织样本和8 587个正常组织样本^[8]。利用GEPIA对CD46在HCC癌组织及癌旁组织中的表达进行分析。

1.2 研究对象

选取2011—2015年在华北理工大学附属唐山市工人医院和华北理工大学附属唐山市人民医院经病理学检查确诊且未经放化疗的HCC患者240例作为病例组, 对照组为同时期入院体检的健康人群500名。所有研究对象均无血缘关系。以查阅病历资料和问卷调查的方法收集研究对象一般人口学资料及临床资料, 全部研究对象均签署知情同意书。本研究获得华北理工大学伦理委员会批准 (20190321)。

1.3 SNP位点选择

通过生物信息学方法对Ensembl数据库中CD46基因启动子区SNP进行数据挖掘, 筛选出影响基因转录翻译功能区域内的SNP, 且所筛选的SNP在中国人群次要等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) 大于0.05。最终筛选出的CD46 rs1970530遗传变异可影响CD46转录活性。

1.4 DNA提取和基因分型

收集研究对象的外周静脉血2 mL, 采用天根生化科技 (北京) 有限公司提供的DNA提取试剂盒 (DP318) 提取DNA。采用

聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 法进行 CD46 rs1970530 A>G 基因分型。上游引物为 5'-TTCTATGAACAAACAGCCCT-3', 下游引物为 5'-TCTGGCAGTTACCTTTGTGTG-3'。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 40 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 再 72 °C 延伸 3 min。得到 341 bp 的 PCR 产物。将 PCR 产物在 10 μL 体系中进行酶切, 置于 65 °C 水浴过夜。采用 2% 的琼脂凝胶电泳进行酶切产物分析, 根据片段大小进行基因分型。

1.5 统计学处理

本研究中所有变量均采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析。采用 χ^2 检验比较病例组和对照组中性别、年龄和吸烟状况的分布差异。由于对照组年龄中位数为 60 岁, 故以 60 岁为界分为两组。采用非条件 logistic 回归模型分析以 OR 及其 95% CI 来表示 CD46 rs1970530 变异与 HCC 发病相对危险度。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CD46 在 HCC 组织中表达显著上调

应用 GEPIA 工具对 CD46 在 HCC 组织 (369 例) 和癌旁组织 (50 例) 中的表达进行差异分析, CD46 在 HCC 组织中的表达较正常组织显著上调, 差异有统计学意义 (P<0.05, 图 1)。

2.2 基线临床资料

选取入组的基线临床资料见表 1。HCC 组共纳入 240 例患者, 男性 188 例, 女性 52 例, 高年龄组 (>60 岁) 102 例, 低年龄组 (≤60 岁) 138 例; 对照组共纳入 500 名健康体检者, 男性 374 例, 女性 126 例, 高年龄组 (>60 岁) 220 例, 低年龄组 (≤60 岁) 280 例。结果显示, 病例组与对照组中年龄、性别及吸烟状况差异无统计学意义 (P>0.05), 具有可比性。

2.3 CD46 rs1970530 遗传变异与 HCC 发病风险

CD46 rs1970530 基因型在 HCC 组及对照组中均符合 Hardy-Weinberg 平衡 (P>0.05), 具有

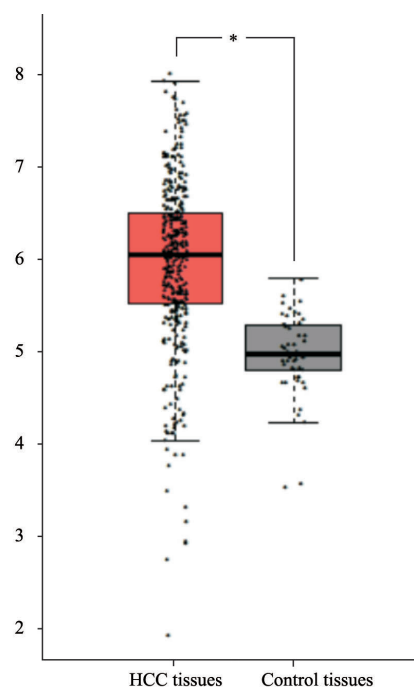


图 1 CD46 在 GEPIA 数据库 HCC 组织及对照组织中的差异表达
Fig. 1 The levels of CD46 in HCC and control tissues from GEPIA database were shown in the box plot image

*: P<0.05

群体代表性。结果显示, CD46 rs1970530 A>G 多态性分布与 HCC 的发病风险有关。以 AA 基因型为参照, 至少携带一个 G 等位基因者发生 HCC 的风险显著降低 (OR=0.666, 95% CI: 0.448~0.990, P<0.05); 以 A 等位基因为参照, 携带 G 等位基因者发生 HCC 的风险显著降低 (OR=0.689, 95% CI: 0.478~0.994, P<0.05, 表 2)。

表 1 研究对象的基本人口学特征

Tab. 1 Basic demographic characteristics of the study subjects

Item	HCC (n=240)	Control (n=500)	P value
			[n (%)]
Gender			0.293
Male	188 (78.3)	374 (74.8)	
Female	52 (21.6)	126 (25.2)	
Age/year			0.700
≤60	138 (57.5)	280 (56.0)	
>60	102 (42.5)	220 (44.0)	
Smoking status			0.069
Yes	87 (36.2)	148 (29.6)	
No	153 (63.8)	352 (70.4)	

表2 基因型分布和等位基因频率分布及显性模式下对发病风险的预测

Tab. 2 Genotype distribution and allele frequency distribution and prediction of risk of onset in dominant mode

Type	HCC (n=240)	Control (n=500)	OR (95% CI)	P value	[n (%)]
Dominant model					
AA	199 (82.9)	383 (76.6)			
AG+GG	41 (17.1)	117 (23.4)	0.666 (0.448-0.990)	0.045*	
A	437 (91.0)	876 (87.6)			
G	43 (9.0)	124 (12.4)	0.689 (0.478-0.994)	0.046*	

*: $P < 0.05$ was statistically significant after adjusting for age, gender and smoking status

2.4 CD46 rs1970530 A>G遗传变异与HCC发病风险的分层分析

分层结果见表3,按年龄分层分析,高年龄组(>60岁)中,CD46 rs1970530与HCC易感性有显著关联,至少携带一个G等位基因者较AA基因型携带者患HCC的风险显著降低(OR=0.789,95%CI:0.298~0.995,

$P < 0.05$)。经性别分层分析后,至少携带一个G等位基因者患HCC的风险低于AA基因型携带者(OR=0.596,95%CI:0.381~0.931, $P < 0.05$)。在女性、低年龄组(≤ 60 岁)中差异无统计学意义($P > 0.05$)。吸烟状态分层结果未发现CD46 rs1970530变异与HCC易感性有明显关联($P > 0.05$)。

表3 CD46 rs1970530A>G与HCC发病风险的分层分析

Tab. 3 Stratification analysis of CD46 rs1970530A>G and the risk of HCC

Variables	Genotype		AG+GG/AA OR (95% CI)	P value
	AA	AG+GG		
Gender				
Male	156/278	32/96	0.596 (0.381-0.931)	0.023*
Female	43/105	9/21	1.035 (0.438-2.447)	0.937
Age/year				
≤ 60	114/222	24/58	0.789 (0.465-1.339)	0.380
> 60	85/161	17/59	0.544 (0.298-0.995)	0.048*
Smoking status				
Yes	129/27	24/81	0.745 (0.388-1.428)	0.375
No	170/112	17/36	0.621 (0.376-1.027)	0.064

*: $P < 0.05$ was statistically significant after adjusting for age, gender and smoking status

3 讨 论

膜结合型补体调节蛋白(membrane-bound complement regulatory protein, mCRP)是在补体系统中发挥调节功能的一种负反馈因子,其作用在于避免补体系统过度激活。CD46作为mCRP家族中的重要一员,其高表达可抑制补体系统对肿瘤细胞的监测,导致肿瘤细胞免疫逃逸,也可通过直接抑制 $\gamma\delta$ T细胞分泌的干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),形成有利于肿瘤的微环境^[9-10]。

过表达的CD46已被证实与人类多种恶性肿瘤的发生、发展具有相关性,包括乳腺癌、结肠癌和多发性骨髓瘤等^[11-13]。本研究通过GEPIA数据库分析得出,在HCC组织中CD46表达上调,这与之前Lu等^[14]的研究结果一致,他们发现CD46在HCC患者血清中表达增加,表明CD46的异常表达可能在HCC的发生、发展过程中发挥重要作用。考虑到CD46在HCC中发挥的功能,我们测定CD46 rs1970530在HCC组及对照组中的基因型,结果显示,CD46 rs1970530基因分布与HCC的发病风险有关,至少携带一个G等位基

因者患HCC的发病风险降低, 目前尚未见其他CD46 rs1970530与恶性肿瘤易感性的研究报道。本课题组通过分析软件TRANSFAC预测发现, CD46 rs1970530A>G多态性影响转录因子Oct-1、NF-1、MCM1、SRF及Sp1的结合, 我们推测CD46 SNP影响转录因子结合上调CD46的表达导致肿瘤细胞免疫逃逸。经性别分层分析后, 发现至少携带一个G等位基因者与男性HCC的发病风险有关, 而与女性HCC无关, 这种性别差异可能是体脂成分及性激素水平不同所引起^[15]。在年龄分层分析中, 至少携带一个G等位基因者在高年龄组与HCC的发病风险相关, 提示高龄和CD46 rs1970530变异可能共同影响HCC的易感性。一项Meta分析^[16]显示, 吸烟者患HCC的风险是非吸烟者的1.6倍, 但本研究并未发现吸烟与CD46 rs1970530遗传变异的关系, 可能与所选研究对象的样本量较小有关。

另外, 还有一些基因遗传变异与HCC的发病风险有关。Wang等^[17]研究发现, 携带rs2494752 GG基因型的个体HCC患病风险增加。高慧等^[18]研究发现, TNFSF15-358T>C遗传变异影响HCC易感性, CC基因型携带者患HCC的风险增加。携带rs12979860 T/C的个体, 肝炎病毒相关HCC的发病风险较高^[19]。

综上所述, CD46 rs1970530遗传变异与HCC发病风险有关, 该位点有望成为判断HCC易感性的生物标志物, 从而为临床提供更多潜在预防及治疗策略。

[参 考 文 献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] VILLANUEVA A. Hepatocellular carcinoma [J]. N Engl J Med, 2019, 380(15): 1450-1462.
- [3] PARK M S, KIM S K, SHIN H P, et al. TXNDC5 gene polymorphism contributes to increased risk of hepatocellular carcinoma in the Korean male population [J]. Anticancer Res, 2013, 33(9): 3983-3987.
- [4] WU X, XIN Z, ZHANG W, et al. A missense polymorphism in ATF6 gene is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma probably by altering ATF6 level [J]. Int J Cancer, 2014, 135(1): 61-68.
- [5] GELLER A, YAN J. The role of membrane bound complement regulatory proteins in tumor development and cancer immunotherapy [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1074.
- [6] ZHANG S, SHAN C, CUI W, et al. Hepatitis B virus X protein protects hepatoma and hepatic cells from complement-dependent cytotoxicity by up-regulation of CD46 [J]. FEBS Lett, 2013, 587(6): 645-651.
- [7] BRESIN E, RURALI E, CAPRIOLI J, et al. Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype [J]. J Am Soc Nephrol, 2013, 24(3): 475-486.
- [8] TANG Z, LI C, KANG B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W98-W102.
- [9] TRUSCOTT S M, ABATE G, PRICE J D, et al. CD46 engagement on human CD4+ T cells produces T regulatory type 1-like regulation of antimycobacterial T cell responses [J]. Infect Immun, 2010, 78(12): 5295-5306.
- [10] FLEMING C, MORRISSEY S, CAI Y, et al. $\gamma\delta$ T cells: unexpected regulators of cancer development and progression [J]. Trends Cancer, 2017, 3(8): 561-570.
- [11] MACIEJCZYK A, SZELACHOWSKA J, SZYNGLAREWICZ B, et al. CD46 expression is an unfavorable prognostic factor in breast cancer cases [J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2011, 19(6): 540-546.
- [12] LIU Y, AICKELIN U, FEYEREISL J, et al. Wavelet feature extraction and genetic algorithm for biomarker detection in colorectal cancer data [J]. Knowl-Based Syst, 2013, 37: 502-514.
- [13] SHERBENOU D W, AFTAB B T, SU Y, et al. Antibody-drug conjugate targeting CD46 eliminates multiple myeloma cells [J]. J Clin Invest, 2016, 126(12): 4640.
- [14] LU Z, ZHANG C, CUI J, et al. Bioinformatic analysis of the membrane cofactor protein CD46 and microRNA expression in hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Rep, 2014, 31(2): 557-564.
- [15] TRAD D, BIBANI N, SABBAH M, et al. Known, new and emerging risk factors of hepatocellular carcinoma (review) [J]. Presse Med, 2017, 46(11): 1000-1007.
- [16] JULIUS B, DAVID V, ASHAM E H, et al. Hepatocellular carcinoma: a review [J]. J Hepatocell Carcinoma, 2016, 3: 41-53.
- [17] WANG Z H, FU H L, LI W. Association between AKT rs2494752 single nucleotide polymorphism and the risk of metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Lett, 2018, 16(3): 3699-3705.
- [18] 高慧, 仵红娇, 谢俞宁, 等. TXNDC5启动子区-358T>C遗传变异与肝癌发病风险的相关性研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(16): 1731-1734.
GAO H, WU H J, XIE Y N, et al. Association of TXNDC5 promoter-358T>C genetic variation and risk of liver cancer [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2019, 35(16): 1731-1734.
- [19] SUO G J, ZHAO Z X. Association of the interleukin-28B gene polymorphism with development of hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis: a Meta-analysis [J]. Genet Mol Res, 2013, 12(3): 3708-3717.