

## PRRC2A 基因单核苷酸多态性与江苏省汉族女性 散发性乳腺癌易感性的相关性研究\*

潘琼<sup>①</sup> 金鑫<sup>①</sup> 张舒<sup>①</sup> 陈龙舟<sup>②</sup> 王金星<sup>②</sup> 宁颖<sup>①</sup>

**摘要** 目的:探讨主要组织相容性复合体内 PRRC2A 基因位点 chr6\_31697494 与江苏省汉族女性散发性乳腺癌易感性的相关性。方法:采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)基因分型技术,对214例乳腺癌患者(病例组)和212例健康对照者(对照组)的 PRRC2A 基因位点 chr6\_31697494 进行基因分型,用 $\chi^2$ 检验统计分析两组基因型和等位基因的频率,采用非条件 Logistic 回归分析,校正性别、年龄影响,计算比数比(OR)和95%可信区间(CI),评价多态性位点与乳腺癌遗传易感性的相关性。进一步将病例组按雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)免疫组织化学检测结果的不同进行分层分析。结果:位点 chr6\_31697494 基因型分布频率在病例-对照分析中差异无统计学意义( $P>0.05$ );但在 ER 阳性/阴性分组和 PR 阳性/阴性分组中差异有统计学意义( $P<0.05$ ),杂合基因型(chr6\_31697494,CT)和 ER 阳性及 PR 阳性乳腺癌均相关(OR=0.40,95%CI:0.33~0.47;OR=0.49,95%CI:0.43~0.57)。结论:PRRC2A 基因位点 chr6\_31697494 多态性与乳腺癌患病风险无明显相关性,但 CT 基因型与 ER 和 PR 阳性乳腺癌明显相关。

**关键词** PRRC2A 乳腺癌 单核苷酸多态性 易感性

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20130750

### Correlation between single nucleotide polymorphisms of PRRC2A and susceptibility to sporadic breast cancer among Han women in Jiangsu Province

Qiong PAN<sup>1</sup>, Xin JIN<sup>1</sup>, Shu ZhANG<sup>1</sup>, LongZhou CHEN<sup>2</sup>, JinXin WANG<sup>2</sup>, Ying NING<sup>1</sup>

Correspondence to: Ying NING; E-mail: rosening@163.com

<sup>1</sup>Laboratory of Medical Genetics, <sup>2</sup>Department of Breast Surgery, Huaian Maternal and Child Health Care Hospital, Huai'an 223002, China.

This work was supported by the Huai'an Municipal Special Funds for Development Project of Technological Innovation and Platform Construction (No. HAP201016).

**Abstract Objective:** To investigate the correlation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the PRRC2A gene with the susceptibility to sporadic breast cancer among Han women in Jiangsu Province, China. **Methods:** Using the genotyping technique of matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry, we analyzed the polymorphisms of an SNP (chr6\_31697494) in gene PRRC2A in 214 breast cancer patients and 212 healthy controls admitted to the Huaian Maternal and Child Health Care Hospital. The genotype frequencies were analyzed using a Chi-square test between the case and control groups. Unconditional logistic regression analysis for calculating the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) was conducted by analyzing the correlation between the susceptibility to breast cancer and genotypes. Additional analysis was then performed based on the immunohistochemical results of the estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR). **Results:** The genotype frequencies for chr6\_31697494 between the case and control groups were not significantly different ( $P>0.05$ ). Further analysis indicated that the genotype frequencies of the site were significantly different in the ER (+/-) groups or the PR (+/-) groups ( $P<0.05$ ). Heterozygous genotype (chr6\_31697494, CT) was related to the breast cancers with ER (+) and PR (+) (OR=0.40, 95%CI: 0.33-0.47; OR=0.49, 95% CI: 0.43-0.57, respectively). **Conclusion:** No significant difference was found between the polymorphism of chr6\_31697494 in the PRRC2A gene and the susceptibility to breast cancer among Han women in Jiangsu Province. The heterozygous genotypes were associated with breast cancer tissues with ER (+) and PR (+).

**Keywords:** PRRC2A, breast cancer, single nucleotide polymorphism, susceptibility

作者单位:①江苏省淮安市妇幼保健院临床遗传学产前诊断重点实验室(江苏省淮安市223002);②乳腺外科

\*本文课题受江苏省淮安市科技创新载体平台建设计划项目(编号:HAP201016)资助

通信作者:宁颖 rosening@163.com

乳腺癌是一个世界范围内严重危害妇女健康的恶性肿瘤,在女性恶性肿瘤中其发病率和死亡率均居首位<sup>[1]</sup>。我国乳腺癌的发病率低于西方国家,但是在2008年我国年龄在55~69岁妇女的乳腺癌发病率约为10~60/10万,预计在2021年增至100/10万<sup>[2-3]</sup>。因此,迫切需要找出引起中国女性乳腺癌发生的关键因素,采取有效措施以控制乳腺癌的发病率。主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)是位于脊椎动物6号染色体上一组紧密连锁的高度多态性的基因群,其基因产物不仅直接参与移植排斥反应和T细胞的分化发育,并在免疫应答的启动和免疫调节中发挥重要作用。人类的MHC又称人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA),定位于人类染色体6p21.31区域,可分为HLA-I、HLA-II和HLA-III 3个区域。HLA是首次发现与疾病有明确关系的抗原系统,其与许多系统疾病,特别是免疫系统疾病存在相关性,尤其是在参与免疫方面调节和应答方面<sup>[4-5]</sup>。近年来,已有大量文献研究HLA-I类和HLA-II类分子在补充细胞毒性T淋巴细胞对抗肿瘤抗原进行免疫应答的功能。然而,在中国女性乳腺癌人群中只有少量有关HLA-I和HLA-II分子的研究<sup>[6-8]</sup>。因此,有必要探讨在中国女性人群中,HLA-III类分子基因变异与乳腺癌易感性的关系。本研究选取HLA-III类分子区域内的PRRC2A基因单核苷酸多态性位点chr6\_31697494,通过病例对照研究,利用Sequenom MassArray平台iPLEX基因分型技术,对214例江苏汉族乳腺癌患者及212例健康对照女性进行基因分型,统计分析其多态性与乳腺癌相关性及相关激素ER和PR受体的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选择2010年1月至2012年5月在江苏省淮安市妇幼保健院经病理学确诊的乳腺癌患者血液标本214例设为病例组。同期健康体检女性212例设为对照组,无乳腺癌病史,无乳腺癌家族史和其它相关病史。两组均为中国汉族女性且相互间无血缘关系。所有患者均进行肿瘤组织雌激素(ER)和孕激素受体(PR)的病理学检查:ER阳性53例,ER阴性136例;PR阳性93例,PR阴性96例;其中25例未能同时检测雌激素和孕激素受体。本研究经过本院伦理委员会批准,所有受试对象均签署知情同意书。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA提取 抽取外周静脉血2 mL于EDTA-K2抗凝管中,经酚/氯仿法抽取白细胞中的基因组DNA,稀释至10 ng/ $\mu$ L。

1.2.2 基因分型 根据PRRC2A基因多态性位点,利用Assay Design 3.1(Sequenom公司,美国)软件设计扩增引物和单碱基延伸引物。应用基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)技术对样本进行基因分型。步骤如下:1)PCR扩增位点所在的DNA片段:提取纯化后的基因组DNA样品定量稀释,按设计顺序加1  $\mu$ L DNA样品于384孔板上,然后添加4  $\mu$ L PCR扩增体系,使反应物的终浓度如下:1 U Taq聚合酶,10 ng基因组DNA,各0.1  $\mu$ mol/L的PCR引物,500  $\mu$ mol/L dNTP。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C 2 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s进行45个循环,72 $^{\circ}$ C 5 min。2)虾碱性磷酸酶(SAP)反应:添加0.5 U的SAP除去未反应完的dNTP。反应条件为:37 $^{\circ}$ C 40 min,85 $^{\circ}$ C 5 min。3)单碱基延伸反应:向SAP反应体系再加0.11  $\mu$ mol/L延伸引物,500  $\mu$ mol/L ddNTP,0.5 U的Thermo sequenase DNA聚合酶。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 2 min,40个循环的94 $^{\circ}$ C 5 s,(52 $^{\circ}$ C 5 s,80 $^{\circ}$ C 5 s) $\times$ 5个循环,72 $^{\circ}$ C 3 min。4)脱盐,打质谱。反应产物用树脂脱盐后经自动点样仪点样于SpectroCHIP芯片,点制后的芯片用MassARRAY Analyzer Compac(Sequenom公司,美国)质谱仪自动检测,根据单碱基延伸的等位基因的分子量不同进行基因分型。对DNA样品进行质量控制,即保证基因分型成功率为95%以上。

### 1.3 统计学分析

对病例组和对照组基因型分布频率进行Hardy-Weinberg平衡检验,用在线分析工具SNPstats(<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>)对所选的位点进行相关统计。病例组样本按免疫组织化学检测结果中ER和PR状态分为阳性组和阴性组,再用SPSS 13.0对数据进行病例-对照以及激素受体状态相关性的统计学分析, $\chi^2$ 检验分析不同分组的基因型频率有无差异性,非条件Logistic回归计算比数比(OR)和95%可信区间(95%CI),由此评价该位点的多态性与乳腺癌的相关性。检验水准为双侧 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

本研究所选样本的平均年龄在病例组和对照组中分别为(48.32 $\pm$ 11.43)岁和(47.76 $\pm$ 10.85)岁,差异无统计学意义( $P=0.865$ ),表明两组样本年龄匹配。经检验,位点chr6\_31697494多态性分布符合Hardy-Weinberg平衡( $P>0.100$ )。chr6\_31697494位点在病例组和对照组中有CC和CT两种多态性(表1)。CC和CT两种基因型在病例组的分布频率分别为98.1%和1.9%,而在对照组分布频率分别为96.2%和

3.8%。经统计学分析在病例组和对照两组之间基因频率分布差异无统计学意义( $\chi^2=1.410, P=0.230$ )。

进一步根据肿瘤组织雌激素(ER)和孕激素受体(PR)阳性/阴性分组进行分析(表2),PRRC2A基因的chr6\_31697494在ER阴性和PR阴性组中CT基因型均为0,与乳腺癌有显著相关性,其OR值分别为0.40(95% CI=0.33~0.47,  $P=0.019$ )、0.49(95% CI=0.43~0.57,  $P=0.041$ )。

表1 PRRC2A基因chr6\_31697494位点在乳腺癌病例组和对照组中的情况 例(%)

Table 1 Results of PRRC2A chr6\_31697494 polymorphism in the breast cancer group and control group (n%)

Genotype	Case	Control	$\chi^2$	OR <sup>a</sup> (95%CI)	P <sup>b</sup>
C/C	210(98.1)	204(96.2)	1.41	1	0.23
C/T	4(1.9)	8(3.8)		2.06(0.61-6.94)	

Note: <sup>a</sup>OR rectification based on age and sex; <sup>b</sup>Statistical analysis with P value of online software SNPstats

表2 PRRC2A基因chr6\_31697494位点在乳腺癌ER阴性/阳性组中的情况 例(%)

Table 2 Results of PRRC2A chr6\_31697494 polymorphism in the breast cancer ER-positive/-negative groups (n%)

Pathology	Geno- typing	Geno- type	Positive (+)	Negative (-)	OR <sup>a</sup> (95%CI)	P <sup>b</sup>
ER	C/C		73(96)	111(100)	1	0.019
	C/T		3(4)	0(0)	0.40(0.33-0.47)	
PR	C/C		91(96.8)	93(100)	1	0.041
	C/T		3(3.2)	0(0)	0.49(0.43-0.57)	

Note: <sup>a</sup>OR rectification based on age and sex; <sup>b</sup>Statistical analysis with P value of online software SNPstats

### 3 讨论

在肿瘤的发生发展过程中,人体的免疫系统是一个重要的影响因素。约40%MHC区域基因编码的蛋白质参与免疫系统,包括HLA膜糖蛋白介导T细胞信号转导。MHC通过补充特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes)对抗肿瘤抗原,在抗肿瘤的免疫应答和免疫监视中起重要作用,表明MHC-Ⅲ类分子区域的遗传变异可能与恶性肿瘤相关<sup>[9]</sup>。已有对乳腺癌和HLA-Ⅰ类和HLA-Ⅱ类分子之间关系在不同种族和地区进行的研究,并尝试揭示MHC-Ⅲ类分子基因与乳腺癌之间的关系<sup>[6-8,10-15]</sup>。Mestiri等<sup>[16]</sup>研究发现Ⅲ类分子基因,TNF- $\alpha$ 和热休克蛋白hsp70-2的遗传变异,可能会增加乳腺癌患病的风险,可用于预测其临床结局。Jong等<sup>[17]</sup>对整个HLA-Ⅲ类分子进行了研究,认为HLA-Ⅲ类分子可能在中度风险乳腺癌家族中对患病易感性的增加发挥潜在作

用。位于HLA-Ⅲ类分子的PRRC2A(proline-rich coiled-coil 2A)基因编码卷曲螺旋富含脯氨酸的蛋白,其功能未知。已有研究表明该基因的单核苷酸多态性与肺癌和非霍奇金淋巴瘤相关<sup>[18-19]</sup>。

本研究发现PRRC2A基因多态性位点chr6\_31697494与乳腺癌的患病风险无显著相关性( $P>0.05$ ),而进一步分层分析发现chr6\_31697494位点的基因型在PR和ER受体的阳性、阴性两组之间分布差异均有统计学意义( $P>0.05$ ),与C/C基因型相比,携带C/T基因型者更倾向于ER(+)和PR(+)乳腺癌(OR=0.40, 95% CI: 0.33~0.47; OR=0.49, 95% CI: 0.43~0.57)。说明PRRC2A多态性位点chr6\_31697494与乳腺癌的易感性无相关性,可能是由于PRRC2A的基因多态性并未参与调节乳腺癌的免疫功能,或作为免疫调节基因其作用微弱。但是,chr6\_31697494与激素受体阳性(PR阳性和ER阳性)乳腺癌有一定关联性,其具体作用机制尚不清楚。临床上,ER、PR是乳腺癌判断预后和指导内分泌治疗的重要指标。ER、PR表达阳性的乳腺癌患者为激素敏感性患者,复发转移风险低,预后较好,且适于内分泌治疗。在乳腺癌被确诊后,ER或PR受体阴性患者的死亡风险高于受体阳性患者<sup>[20-21]</sup>,这说明激素受体阳性的临床预后较好。结果表明携带杂合基因型的个体一旦发病,其细胞分化较好,内分泌治疗有效率提高,预后较好,对乳腺癌指导内分泌治疗和预后信息具有重要指导意义。

本次研究样本量有限,且基因型在人群中的比例较小,对PRRC2A基因多态性与乳腺癌易感性进行了初步探讨。阐明PRRC2A基因多态性与乳腺癌易感性及其ER和PR状态的关联性,还需对不同地区人群进行多位点、大样本量的研究加以验证,并对遗传多态性与乳腺癌易感性相关性的作用机制作更进一步的深入研究。

#### 参考文献

- Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- Linos E, Spanos D, Rosner BA, et al. Effects of reproductive and demographic changes on breast cancer incidence in China: a modeling analysis[J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(19):1352-1360.
- Ziegler RG, Anderson WF, Gail MH. Increasing breast cancer incidence in China: the numbers add up[J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(19):1339-1341.
- Trowsdale J. The MHC, disease and selection[J]. Immunol Lett, 2011, 137(1-2):1-8.
- Tsai S, Santamaria P. MHC Class II Polymorphisms, Autoreactive T-Cells, and Autoimmunity[J]. Front Immunol, 2013, 4(10):321.
- 佟琳,杨学习,李粉霞,等.HLA-I基因单核苷酸多态性与中国南

- 方汉族女性乳腺癌易感性的相关性研究[J].中国免疫学杂志,2012,28(12):1096-1102.
- 7 黎佩怡,李粉霞,孙敏英,等.广东汉族女性TAP2基因单核苷酸多态性与散发性乳腺癌相关性研究[J].中国免疫学杂志,2011,27(11):997-1001.
- 8 孙敏英,黎佩怡,高洋,等.BTNL2基因多态性与广东汉族女性乳腺癌易感性的相关性研究[J].分子诊断与治疗杂志,2012,4(1):11-15.
- 9 Bhutia SK, Mallick SK, Maiti TK. Tumour escape mechanisms and their therapeutic implications in combination tumour therapy[J]. Cell Biol Int, 2010, 34(5):553-563.
- 10 Ghaderi A, Talei A, Gharesi-Fard B, et al. HLA-DRB1 alleles and the susceptibility of Iranian patients with breast cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2001, 7(1):39-41.
- 11 Lavado R, Benavides M, Villar E, et al. The HLA-B7 allele confers susceptibility to breast cancer in Spanish women[J]. Immunol Lett, 2005, 101(2):223-225.
- 12 Baccar Harrath A, Yacoubi Loueslati B, Troudi W, et al. HLA class II polymorphism: protective or risk factors to breast cancer in Tunisia[J]? Pathol Oncol Res, 2006, 12(2):79-81.
- 13 Cantú de León D, Pérez-Montiel D, Villavicencio V, et al. High resolution human leukocyte antigen (HLA) class I and class II allele typing in Mexican mestizo women with sporadic breast cancer: case-control study[J]. BMC Cancer, 2009, 9:48.
- 14 Gun FD, Ozturk OG, Polat A, et al. HLA class-II allele frequencies in Turkish breast cancer patients[J]. Med Oncol, 2012, 29(2):466-471.
- 15 Mahmoodi M, Nahvi H, Mahmoudi M, et al. HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies in female patients with early onset breast cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2012, 18(1):49-55.
- 16 Mestiri S, Bouaouina N, Ahmed SB, et al. Genetic variation in the tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma[J]. Cancer, 2001, 91(4):672-678.
- 17 de Jong MM, Nolte IM, de Vries EG, et al. The HLA class III subregion is responsible for an increased breast cancer risk[J]. Hum Mol Genet, 2003, 12(18):2311-2319.
- 18 Walsh KM, Gorlov IP, Hansen HM, et al. Fine-mapping of the 5p15.33, 6p22.1-p21.31, and 15q25.1 regions identifies functional and histology-specific lung cancer susceptibility loci in African-Americans [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013, 22(2):251-260.
- 19 Nieters A, Conde L, Slager SL, et al. PRRC2A and BCL2L1 gene variants influence risk of non-Hodgkin lymphoma: results from the InterLymph consortium[J]. Blood, 2012, 120(23):4645-4648.
- 20 Anderson WF, Chu KC, Chatterjee N, et al. Tumor variants by hormone receptor expression in white patients with node-negative breast cancer from the surveillance, epidemiology, and end results database[J]. J Clin Oncol, 2001, 19(1):18-27.
- 21 Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients[J]. Breast Cancer Res, 2007, 9(1):R6.

(2013-05-17 收稿)

(2013-11-08 修回)

(本文编辑:邢颖)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 关于参考文献书写和引用

参考文献以GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》为标准。本刊论著要求15~20条,综述20条以上。所列参考文献应是作者亲自阅读的文献资料,近3年文献比例达50%或以上,采用顺序编码制著录,依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字标出,排列于文后。

未发表的观察资料、会议资料、内部资料和个人通讯一般不用作参考文献。

作者三位以内时要全部列出,每个姓名中间加逗号;三位以上时,只著录前三位作者,后加“等”或et al.外文期刊缩写以美国国立医学图书馆编辑的《Index Medicus》格式为准(<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>);中文期刊用全名。参考文献必须由作者与原文核对无误。

文献书写格式如下:

1) 连续出版物:序号 作者.文题[J].刊名,年份,卷(期):起页-止页.

2) 书籍:序号 作者.书名[M].版次,出版地:出版者,年:起页-止页.