

碱基切除修复通路基因XRCC1、hOGG1多态性与吸烟对肺癌患者生存的影响*

张 寰 周晓颖 张丽娜 钱碧云

摘要 目的:DNA损伤修复作为维持体内基因稳定性和修复DNA损伤的重要机制,在肿瘤的发生、发展、转归及预后中发挥重要作用,DNA损伤修复基因多态性通过影响DNA损伤修复能力进而影响肿瘤患者生存。本研究旨在探讨DNA损伤修复基因XRCC1、hOGG1多态性对肺癌患者生存的影响。方法:收集420例原发性非小细胞肺癌病例,采用TaqMan SNP技术检测肺癌患者外周血DNA XRCC1(rs25487)和hOGG1(rs1052133)多态性。采用Kaplan-Meier法分析生存情况,Log-rank法进行单因素检验,Cox回归用来计算调整混杂因素的风险比(Hazard Ratio, HR)。结果:患者临床特征和预后风险的分析显示,年龄 ≥ 60 岁和病理分期晚期(III/IV期)是影响肺癌预后的独立危险因素, P 值分别为 $1.000E-4$ 和 $3.828E-11$ 。DNA修复基因XRCC1和hOGG1多态性与肺癌患者生存情况的分析未见不同基因型的生存曲线的分布具有统计学差异。按照吸烟情况分层后,在轻度吸烟者(吸烟量 < 40 包/年)中,携带hOGG1突变型G等位基因较携带野生型C基因型生存率低($P=0.0213$),经Cox回归分析显示携带G等位基因的患者死亡风险为野生型的8.24倍。而在非吸烟者和重度吸烟者中未见多态性对患者生存的影响。结论:本研究首次发现碱基切除修复通路基因hOGG1 rs1052133多态性对肺癌患者生存存在一定影响,尤其是在轻度吸烟者中,携带突变型等位基因增大肺癌患者死亡风险,相关机制有待进一步大规模样本验证。

关键词 非小细胞肺癌 XRCC1 hOGG1 多态性 吸烟 预后

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.08.007

Effects of Base Excision Repair Pathway Gene XRCC1 hOGG1 Polymorphisms and Smoking on the Survival of Lung Cancer Patients

Huan ZHANG, Xiaoying ZHOU, Li'na ZHANG, Biyun QIAN

Correspondence to: Biyun QIAN, E-mail: qianbiyun@yahoo.com.cn

Department of Epidemiology and Biostatistics, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin Medical University, Ministry of Education, Tianjin 300060, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81071914)

Abstract Objective: Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in DNA repair genes are believed to be associated with the survival of lung cancer patients because of their effects on the DNA repair capacity. This work aimed to define the role of DNA repair gene SNPs in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients, and investigate the association of lung cancer survival with SNPs of x-ray repair cross-complementing group1 (XRCC1) and human 8-oxoguanine glycosylase1 (hOGG1). **Methods:** The Taqman SNP method was used to detect SNPs in XRCC1 (rs 25487) and hOGG1 (rs 1052133) genes, and evaluate their association with the overall survival of 420 Chinese patients with lung cancer. The association of lung cancer survival with genetic polymorphisms were evaluated by the Kaplan-Meier method and log-rank test. The Cox regression model was used to calculate the adjusted hazard ratio. **Results:** Advanced cancer stage and advanced age were independently associated with the overall survival of lung cancer patients ($P = 1.000E-4$ and $P = 3.828E-11$), respectively. XRCC1 and hOGG1 polymorphisms were not statistically associated with lung cancer survival in the total population studied. After stratification by smoking status and smoking amount, individuals with the hOGG1 mutant G genotype had a higher hazard ratio of death than those with the hOGG1 wild CC genotype in light smokers (log-rank $P = 0.0213$, HR = 8.24). However, no association was found in nonsmokers and heavy smokers. **Conclusion:** To our knowledge, this is the first study to reveal the prognostic roles of the hOGG1 G genotype in the survival of Chinese NSCLC patients and patients with different smoking statuses. The data indicated that the hOGG1 G genotype was associated with lung cancer survival in light smokers. Large and well-designed studies with diverse populations and functional evaluations are warranted to confirm these findings.

Keywords NSCLC(Non-small cell lung cancer); XRCC1 (X-ray repair cross-complementing group1); hOGG1 (Human 8-oxoguanine glycosylase1); Polymorphism; Smoking; Prognosis

作者单位:天津医科大学附属肿瘤医院流行病室,天津市肿瘤防治重点实验室(天津市300060)

*本文课题受国家自然科学基金(编号:81071914)资助

通信作者:钱碧云 qianbiyun@yahoo.com.cn

肺癌作为常见的恶性肿瘤,死亡率居全癌首位。全球每年死亡的肺癌患者男性95.1万例,女性42.7万例^[1]。虽然近年肺癌诊断水平与治疗手段明显使患者的生存得到了改善,但其5年生存率仍然不到15%^[2]。基于目前对肺癌发生发展机制的研究,患者确诊时的临床分期是决定肺癌患者生存的重要因素,但仍有研究指出临床分期相同的肿瘤患者的生存情况存在较大的差异。目前造成这种生存差异的原因还不明确,有学者推测个体对DNA损伤的修复能力(DNA repair capacity, DRC)差异可能是造成这种生存差异的原因,但相关机制尚未得到完全阐明。

人类细胞存在多种DNA修复途径以维护基因组的稳定性,其中碱基切除修复(base excision repair, BER)、核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)、错配修复(mismatch repair, MMR)、双链断裂修复(double-strand break repair, DSBR)及同源重组修复(homologous recombination repair, HRR)等是主要的修复途径。这些修复系统的遗传性及获得性缺陷,都会引起相应的DNA损伤修复功能降低和基因组稳定性降低。近期研究表明DNA损伤修复基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)会造成患者DRC的改变,进而通过增加基因组不稳定性 and 增加肿瘤细胞的侵袭性等机制影响患者生存^[3,4]。为进一步阐明DNA损伤修复基因SNP对非小细胞肺癌患者生存的作用,本研究分析了DNA损伤修复BER通路基因XRCC1和hOGG1多态性与非小细胞肺癌患者生存的关系。

1 材料与方法

1.1 病例选择及随访

病例选择从2008年1月至2009年6月在天津医科大学附属肿瘤医院入院手术切除病灶并由病理诊断确诊为原发非小细胞肺癌病例420例,排除临床转移、术前化疗或放疗的病例,所有患者均无亲属关系。全部研究对象签署知情同意后采集静脉血5 mL,采用EDTA抗凝。本研究对纳入的非小细胞肺癌病例,通过电话进行随访,随访的截止日期为2011年6月30日。病例的死亡信息来源于医院病例记录和电话随访。

1.2 流行病学调查

经患者知情同意后,由统一培训的调查员,采用统一的肺癌患者调查表,对研究对象进行问卷调查。问卷内容包括一般特征、既往史、肿瘤家族史,以及环境因素包括吸烟、饮酒、职业暴露,以及其他生活习惯;诊断时间、病理类型、临床分期,淋巴结转移情况等;治疗情况、手术、放疗、化疗情况等。本研究将每天至少吸一支烟,持续半年以上定义为吸烟

者,否则定义为非吸烟者。病例的组织学分型来全部源于对手术标本的病理诊断。

1.3 DNA提取及基因分型检测

本研究采用TKM法提取全血基因组DNA,基因分型采用美国ABI7500实时荧光定量PCR仪和TaqMan SNP基因分型试剂盒,按照TaqMan标准实验步骤操作进行试验(Applied, Biosystems Foster City, CA)。PCR反应体系总体积为5 μ L,包括2 \times TaqMan Universal PCR Master Mix 2.5 μ M; 1 μ M的上下游引物各0.35 μ L; 200nM荧光标记探针各0.05 μ L, 10 ng基因组DNA 1.0 μ L。PCR反应条件为预变性95 $^{\circ}$ C 10 min; 92 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min进行40个循环。按照Taqman基因分型操作步骤进行分析,对实验中不能由机器分型的样本重复检测,随机抽取10%进行质控,质控的结果同原检测结果呈现100%一致。

1.4 统计学分析

生存时间的计算方法为死亡的日期或是最后一次随访到的日期与确诊日期相差的周数。由其他因素造成死亡(非肺癌因素造成)的病例和失访病例归为截尾数据。对生存概率的估计采用Kaplan-Meier法,不同组间生存曲线的比较采用Log-rank检验; Cox比例风险模型用于计算风险比(Hazard Ratio, HR)及调整混杂因素后的HR。本研究所有统计分析应用SAS 9.1软件进行。

2 结果

2.1 病例的一般情况及生存影响因素

患者的平均年龄为60.43 \pm 9.20岁。420例患者的中位数年龄为60岁,年龄范围为23~83岁。中位随访时间为26.5个月(1~40个月)。420例患者中285例仍健在,129例死亡,6例失访。全部患者的1年生存率为84.97%,2年生存率为64.22%,3年生存率为62.28%。

患者的人口学和临床特征分布情况及其与患者生存的关系如表1所示,年龄 \geq 60岁或是病理分期为III/IV期的患者较年龄 $<$ 60岁或是病理分期I/II期患者死亡风险增大,HR分别为2.017和3.067,生存曲线分布具有统计学意义(Log-rank检验P值分别为1.000E-4和3.828E-11),如图1、图2所示。而不同吸烟情况、组织学类型和肿瘤家族史的患者的生存曲线差异不存在统计学上的意义。

2.2 基因多态性与患者生存的关系

420例患者2个SNP位点的基因型分布情况如表2所示,2个SNP的等位基因频率分布均符合Hardy-Weinberg平衡。基因型分布为XRCC1 rs25487 (Arg399Gln) GG, GA, AA基因型分别占52.62%、39.29%和8.10%; hOGG1 rs1052133 (Ser326Cys) CC, CG, GG基因型分别占15.00%、50.00%和35.00%。

本研究分析了BER通路的XRCC1 rs25487和hOGG1 rs1052133,2个位点的单核苷酸多态性与肺癌患者生存的关系,见表2。发现肺癌患者不同SNP基因型组间生存率差异没有统计学意义。XRCC1 rs25487携带GG基因型的患者的2年生存率为77.87%,GA基因型的2年生存率为69.62%,AA基因

型的2年生存率为72.92%。经Log-rank检验, P 值为0.20。三个基因型生存率之间的差别不存在统计学意义。hOGG1 rs1052133携带三种基因型的患者的2年生存率分别为85.35%,72.93%和71.07%,三种基因型的生存曲线的分布的差异不存在统计学意义($P=0.166$)。

表1 患者人口学和临床特征分布情况及其与患者生存的关系

Table 1 Distribution of patient characteristics and clinical features and their association with survival

变量	n(%)	死亡(n)/截尾(n)	2年生存率/%	P	HR(95%CI)	HR(95%CI)
年龄/岁						
<60	194(46.19)	42/152	82.15	1.000E-4	1.000	1.000
≥60	226(53.81)	87/139	67.41		2.017(1.395-2.915)	1.971(1.389-2.797) ^a
性别						
男性	285(67.86)	93/192	71.21	0.179	1.000	1.000
女性	135(32.14)	36/99	80.60		0.770(0.524-1.132)	0.763(0.519-1.121) ^b
组织学类型						
鳞状细胞癌	177(42.14)	57/120	71.59	0.089	1.000	1.000
腺癌	179(42.62)	47/132	79.70		0.788(0.535-1.159)	0.781(0.517-1.180) ^c
其他	64(15.24)	25/39	66.22		1.341(0.838-2.146)	1.406(0.868-2.276) ^c
临床分期						
早期(I/II)	263(62.62)	54/209	83.19	3.828E-11	1.000	1.000
晚期(III/IV)	157(37.38)	75/82	58.38		3.067(2.157-4.360)	3.159(2.215-4.504) ^c
肿瘤家族史						
无	342(81.43)	110/232	72.60	0.185	1.000	1.000
有	78(18.57)	19/59	81.43		0.722(0.444-1.175)	0.813(0.499-1.326) ^c
吸烟情况						
非吸烟	125(29.76)	36/89	79.59	0.599	1.000	1.000
吸烟	295(70.24)	93/202	72.01		1.108(0.754-1.628)	1.094(0.707-1.694) ^c

a:按性别调整;b:按年龄调整;c:按年龄、性别、组织学类型和临床分期调整

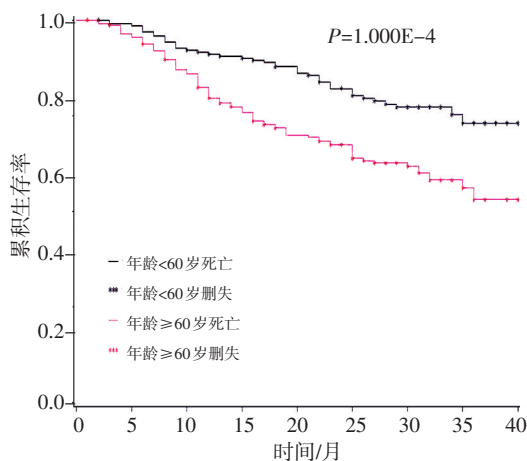


图1 不同年龄肺癌患者生存曲线

Figure 1 Kaplan-Meier curves for patients of different ages

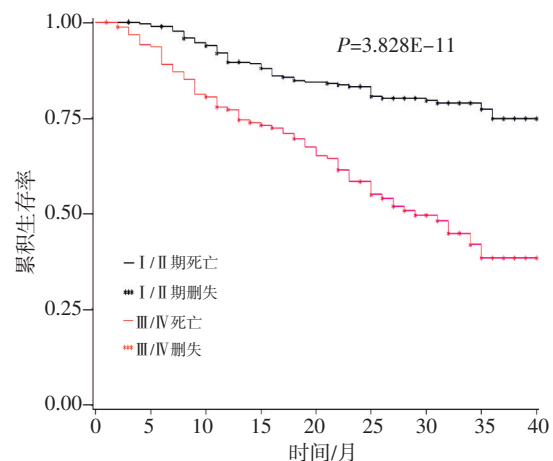


图2 不同临床分期肺癌患者生存曲线

Figure 2 Kaplan-Meier curves for patients with different cancer stages

表2 DNA损伤修复基因多态性与肺癌患者生存的关系

Table 2 Relationship of polymorphisms in DNA repair genes with survival of lung cancer patients

基因(rs)	基因型	n(%)	死亡(n)/截尾(n)	2年生存率(%)	P	HR(95%CI)	HR*(95%CI)
XRCC1 (rs25487)	GG	221(52.62)	61/160	77.87	0.200	1.000	1.000
	GA	165(39.29)	59/106	69.62		1.373(0.960-1.965)	1.333(0.929-1.913)
	AA	34(8.10)	9/25	72.92		1.032(0.512-2.077)	0.901(0.446-1.821)
	GA+AA	199(47.38)	68/131	70.12		1.316(0.931-1.859)	1.253(0.884-1.777)
hOGG1 (rs1052133)	CC	63(15.00)	14/49	85.35	0.166	1.000	1.000
	CG	210(50.00)	64/146	72.93		1.506(0.845-2.686)	1.447(0.811-2.583)
	GG	147(35.00)	51/96	71.07		1.751(0.969-3.165)	1.570(0.868-2.841)
	CG+GG	357(85.00)	115/242	72.21		1.606(0.922-2.797)	1.499(0.860-2.613)

a:按年龄、性别、组织学类型和临床分期调整

2.3 吸烟情况与基因多态性及生存的关系

随后按照吸烟情况分层,分析XRCC1和hOGG1的SNPs分别对不同吸烟情况的患者生存的影响。研究根据吸烟情况和吸烟量的中位数(40包/年)将患者分为非吸烟者、轻度吸烟者和重度吸烟者。经单因素Kaplan-Meier检验,轻度吸烟者中携带hOGG1突变的G基因型的个体较野生型CC基因型个体死亡风险增大(Log-rank $P=0.0213$)。见图3。而在非吸烟患者和重度吸烟者中未发现这种趋势。Cox模型分析发现在轻度吸烟者中携带hOGG1基因CG基因型的个体的其死亡风险是GG基因型个体的8.24倍。而XRCC1多态性在不同的吸烟情况分层中均未见对肺癌患者生存有影响,见表3。

进一步按照性别、组织学分型和临床分期进行分层分析,结果显示XRCC1和hOGG1的多态性在各亚组中未见对肺癌患者生存有影响。

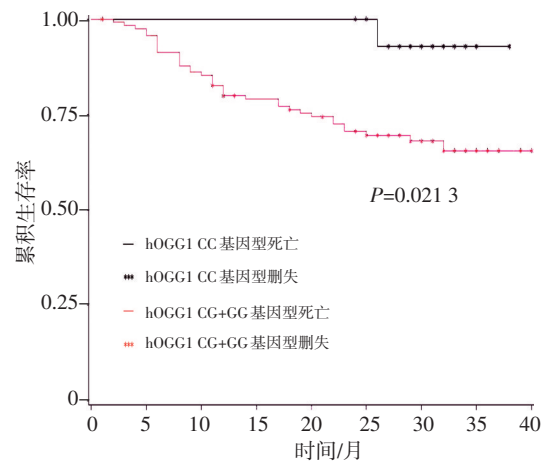


图3 轻度吸烟者中hOGG1 rs1052133不同基因型的生存曲线

Figure 3 Kaplan-Meier curves for patients with different hOGG1 genotypes in light smokers

表3 DNA损伤修复基因多态性在不同吸烟情况中与肺癌生存的关系

Table 3 DNA repair gene polymorphisms and survival of lung carcinomas in patients with different smoking statuses

基因(rs)	基因型	非吸烟者(n=125)		轻度吸烟者(n=135)		重度吸烟者(n=160)	
		n(%)	HR*(95%CI)	n(%)	HR*(95%CI)	n(%)	HR*(95%CI)
XRCC1 (rs25487)	GG	65(52.00)	1.000	67(49.63)	1.000	89(55.63)	1.000
	GA	47(37.60)	1.616(0.824-3.170)	57(42.22)	1.539(0.775-3.055)	61(38.13)	1.137(0.660-1.957)
	AA	13(10.40)	0.705(0.162-3.069)	11(8.15)	1.821(0.604-5.488)	10(6.25)	0.866(0.264-2.840)
	GA+AA	60(48.00)	1.431(0.741-2.762)	68(50.37)	1.584(0.821-3.054)	71(44.38)	1.097(0.649-1.856)
hOGG1 (rs1052133)	CC	15(12.00)	1.000	19(14.07)	1.000	29(18.13)	1.000
	CG	71(56.80)	1.566(0.464-5.279)	64(47.41)	8.240(1.111-61.128)	75(46.88)	0.844(0.399-1.783)
	GG	39(31.20)	1.989(0.565-6.998)	52(38.52)	6.096(0.802-46.335)	56(35.00)	1.297(0.620-2.713)
	CG+GG	110(88.00)	1.708(0.523-5.582)	116(85.93)	7.244(0.994-52.817)	131(81.88)	1.032(0.521-2.046)

a:按年龄、性别、组织学类型和临床分期调整

3 讨论

本研究分析了DNA损伤修复BER通路的两个SNPs(XRCC1 rs 25487和hOGG1 rs 1052133)对于非小细胞肺癌生存的影响及其在不同吸烟情况下对患者生存的作用。研究发现影响肺癌患者生存的宏观因素主要为确诊年龄和临床分期,年龄 ≥ 60 岁和临床分期为晚期(Ⅲ/Ⅳ期)的患者的死亡风险较年龄 < 60 岁和病理分级为早期(Ⅰ/Ⅱ期)的患者高。在总体人群中BER通路XRCC1基因和hOGG1基因多态性对生存未见有显著性的影响,但通过进一步分层分析发现,在不同吸烟情况的亚层中,携带不同等位基因的个体的生存存在差异。具体来说,轻度吸烟者携带hOGG1突变的G基因型的患者的生存率较野生纯合型相比生存率显著下降。

XRCC1和hOGG1属于主要修复氧化损伤、电离辐射及甲基化等导致的小片段DNA损伤的BER通路。XRCC1基因位于人染色体19q13.2,作用于一组DNA损伤修复蛋白,包括ADP核糖聚合酶,DNA连接酶3,DNA聚合酶 β 。XRCC1 Arg399Gln(rs25487)恰好位于XRCC1蛋白的ADP多聚酶的结合区,推测其可能与DNA蛋白复合物的装配相关,从而最终影响DRC^[5-6]。hOGG1基因位于人染色体3p26.2,并编码一种具有DNA糖苷酶和AP裂解酶活性的蛋白质。hOGG1主要修复8-羟基鸟嘌呤(8-OH-dG)引起的损伤,这种氧化损伤形成频率最高、致突变能力最强,与肿瘤的发生和发展有密切关系^[7]。

hOGG1基因密码子326位的多态性rs1052133倍受研究者重视,这个多态性位点位于外显子7属于非同义SNP,可以引起丝氨酸到半胱氨酸的改变。前期研究证实,hOGG1的多态性是多种癌症(肺癌,食管癌和大肠癌等)的易感因素^[8,9]。然而对于hOGG1多态性与癌症患者生存的研究尚处于起步阶段,少有相关报道。目前仅有一篇文章报道了hOGG1基因多态性和肺癌患者生存的关系,研究结果显示携带突变基因型较野生型基因型死亡的风险增大,但两种基因型的生存曲线的差异尚不存在统计学意义($P=0.098$)^[10]。

本研究首次发现了hOGG1基因多态性Ser326Cys对肺癌患者的生存的影响,尤其是在轻度吸烟的患者中,携带突变型等位基因增大肺癌患者的死亡风险。hOGG1基因多态性对肺癌患者生存的影响可能的机制为通过影响BER修复通路对DNA损伤的正常修复,造成DNA修复能力的下降,进而在肿瘤的发生发展中发挥作用。前期有研究报道,由突变型hOGG1基因编码的蛋白较野生型基因编码的蛋白DNA损伤修复的能力下降,进而突变型编码的蛋白

修复8-OH-dG的能力降低^[7]。加之携带hOGG1基因突变型的个体与携带野生型的个体相比,其8-OH-dG的含量显著增高^[10]。综上,hOGG1突变型的患者的8-OH-dG的含量升高,并且修复8-OH-dG等氧化损伤的能力下降,可能是造成突变型死亡风险增大的原因。

香烟的烟雾中已确认含有69种的致癌物(如多环芳烃等),进入体内后,能直接作用或经代谢活化后对机体造成损伤,以致引起DNA序列的改变,最终导致基因组不稳定性的增加。吸烟者的肺组织中8-OH-dG的含量是非吸烟者的近1.5倍^[11]。本研究发现在轻度吸烟者中携带hOGG1基因突变型等位基因将增大肺癌患者的死亡风险,而在重度吸烟的患者中未见hOGG1不同基因型间生存率的差异。造成这种吸烟程度差异SNP作用差异的机制可能为,大量香烟烟雾中致癌物质会造成8-OH-dG等氧化产物在hOGG1突变型个体体内的蓄积,进而使基因突变的频率上升。发生了基因突变后,突变对于患者生存的作用很可能掩盖了SNP对于生存的作用。

研究发现XRCC1多态性Gln399Gln和肺癌易感性存在显著影响^[12-13]。对于XRCC1多态性和肺癌患者生存的研究结果缺乏一致性。有研究显示携带突变型等位基因会增加肺癌患者的死亡风险^[14-16]。也有研究同本研究一致未发现XRCC1多态性对肺癌患者生存的影响。造成这种差异结论的因素十分复杂,有可能为研究对象的人种差异造成,相关机制有待进一步研究阐述。

目前,研究报道的同肺癌患者生存相关的分子生物学指标包括Ki-67,VEGF,P53和KRAS等,其对肺癌生存的影响的机制尚未得到完全的阐明。肺癌患者的预后是多方面因素共同作用的结果。

综上所述,本研究通过分子流行病学方法在研究中首次发现了轻度吸烟者中携带hOGG1突变G基因型的非小细胞肺癌患者较野生型C基因型携带者的死亡风险增高。研究结果有待进一步大规模多人种实验验证,BER通路hOGG1基因多态性对生存影响的分子机制还有待进一步研究阐明。

参考文献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global Cancer Statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- 2 Sant M, Allemani C, Santaquilani M, et al. EURO-CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary [J]. Eur J Cancer, 2009, 45(6): 931-991.
- 3 Nakamura H, Saji H, Idiris A, et al. Chromosomal instability detected by fluorescence in situ hybridization in surgical specimens of non-small cell lung cancer is associated with poor survival[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(6): 2294-2299.