

文章编号 1006-8147(2015)03-0208-04

论著

天津地区汉族人群 rs798766 单核苷酸多态性与膀胱尿路上皮癌发病风险相关性

乔志辉^{1,2}, 王仁杰³, 谢万青², 孙岩², 吴长利^{1,2}, 胡海龙^{1,2}

(1. 天津医科大学第二医院泌尿外科, 天津 300211; 2. 天津市泌尿外科研究所, 天津 300211; 3. 太原钢铁(集团)有限公司总医院泌尿外科, 太原 030003)

摘要 目的:探讨 rs798766 单核苷酸多态性与天津地区汉族人群膀胱尿路上皮癌发病风险的关系。方法:采用等位基因特异性 PCR 技术对 363 例膀胱尿路上皮癌患者(试验组)和 384 例对照人群(对照组)的基因型进行分型。结果:试验组 rs798766 T 等位基因频率为 15.3%, C 等位基因频率为 84.7%;对照组 T 等位基因频率为 10.5%, C 等位基因频率为 89.5%, 两组 T 等位基因频率分布存在明显的统计学差异($P=0.006$;校正 $OR=1.53$; 95% CI 为 1.13~2.08)。与基因型 C/C 相比, rs798766 (C/T+T/T)基因型明显增加膀胱尿路上皮癌的发病风险($P=0.006$;校正 $OR=1.61$; 95% CI 为 1.14~2.25);病理分层分析显示, rs798766 单核苷酸多态性与膀胱癌病理分期、分级无相关性。结论:Rs798766 T 等位基因明显增加天津地区汉族人群膀胱尿路上皮癌发病风险,可能是预测天津地区汉族人群膀胱癌发病风险的良好基因标记。

关键词 膀胱尿路上皮癌;单核苷酸多态性;全基因组关联研究;遗传易感性;天津

中图分类号 R737.14

文献标志码 A

Association between polymorphism of rs798766 and urothelial bladder cancer risk from Han population of Tianjin

QIAO Zhi-hui^{1,2}, WANG Ren-jie³, XIE Wan-qing², SUN Yan², WU Chang-li^{1,2}, HU Hai-long^{1,2}

(1. Department of Urology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; 2. Tianjin Institute of Urology, Tianjin 300211, China; 3. Department of Urology, General Hospital, Taiyuan Iron and Steel (Group) Co., LTD, Taiyuan, 030003)

Abstract Objective: To assess the association between single nucleotide polymorphism (SNP) of rs798766 with urothelial bladder cancer (UBC) risk in a case-control study from Han population of Tianjin. **Methods:** Genotypes were analyzed using a PCR amplification of specific alleles (PASA) method in 364 patients with UBC and 384 matched healthy controls. **Results:** The frequency of allele T in patients group was 15.3%, and allele C 84.7%. The frequency of allele T in controls group was 10.5%, and allele C 89.5%. There was a significant difference between the two groups ($P=0.006$, adjusted $OR=1.53$; 95% $CI=1.13-2.08$). Compared with the C/C genotype, rs798766 (C/T+T/T) genotypes could significantly increase the risk of UBC ($P=0.006$, adjusted $OR=1.61$; 95% $CI=1.14-2.25$). Stratification analysis of pathology showed that the association of rs798766 with tumor grade/stage for bladder cancer was not statistically significant. **Conclusion:** The results indicate that rs798766 T allele could significantly increase the risk of UBC, and may be used as a genetic marker to evaluate the susceptibility for UBC in Han population of Tianjin.

Key words urothelial bladder cancer; polymorphism; genome-wide association studies; genetic susceptibility; Tianjin

世界范围内,膀胱癌发病率位居常见恶性肿瘤的第9位^[1],2014年美国常见恶性肿瘤发病率排名中,膀胱癌位居第6位(新发病例72 570,死亡病例15 210)^[2]。膀胱癌发病率因国家和地区不同而不同,亚洲国家明显低于欧美国家^[3],根据1991-2005年的统计结果,膀胱癌的发病率在我国所有恶性肿瘤

中列第10位,且发病率呈逐年上升趋势^[4]。膀胱尿路上皮癌家庭聚集现象预示着基因突变在膀胱尿路上皮癌发生和发展中起着重要的作用^[5-7],特别是全基因组关联研究(Genome-wide association studies, GWAS)在欧洲人群中发现4号染色体短臂1区6带(4p16.3) rs798766 单核苷酸多态性与膀胱尿路上皮癌发病风险相关。本研究旨在探索 rs798766 单核苷酸多态性与天津地区汉族人群膀胱尿路上皮癌发病风险的关系,与膀胱尿路上皮癌病理分级、分期的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象及数据收集 2012年1月-2014年

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30700834),天津市自然科学基金资助项目(12ZCDZSY16600),天津市应用基础与前沿技术研究计划项目(14JCYBJC26300)

作者简介 乔志辉(1986-),男,硕士在读,研究方向:单核苷酸多态性与膀胱癌发病风险相关性研究;通信作者:胡海龙, E-mail: hhllove2004@163.com。

1月收集天津医科大学第二医院泌尿外科膀胱尿路上皮癌患者(均经病理学检验证实为尿路上皮癌)静脉血用于全基因组DNA提取,每名患者5 mL,共363例,以上操作均在告知患者试验目的、征得患者同意并签署知情同意书后进行。试验组排除标准:曾经患过癌症、未知原发灶的转移癌、曾经接受过化疗或放疗的患者。另外选取384名于2012年1月-2014年1月来本院体检经确认未罹患肿瘤的健康志愿者作为对照组,同样在签订知情同意书之后,每人抽取5 mL静脉血。对照组排除标准:未患有精神疾病、近未来接受过输血治疗的健康志愿者。吸烟时间超过1年者定义为吸烟人群,戒烟时间超过1年者定义为曾经吸烟人群。本研究获得天津医科大学医学伦理委员会批准。

1.2 病理分组 肿瘤病理分期根据国际抗癌联盟2009年第7版TNM分期法进行,分为非肌层浸润型膀胱尿路上皮癌(pTa-pT1)和肌层浸润型膀胱尿路上皮癌(pT2-pT4);肿瘤病理分级根据WHO 2004膀胱尿路上皮癌恶性程度分级系统进行,分为低度恶性潜能尿路上皮乳头状瘤(papillary urothelial neoplasm of low malignant potential, PUNLMP)、尿路上皮乳头状癌低级别、尿路上皮乳头状癌高级别,考虑到PUNLMP易复发、进展的病理特性^[8]且数量极少,将其归类到低级别组。

1.3 基因分型 采用等位基因特异性PCR技术^[9-11]对363例膀胱尿路上皮癌患者和384例对照人群的基因型进行分型。根据美国国立生物技术信息中心(National center for biotechnology information, NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)公布的基因序列,应用Primer Premier 5、Oligo 7.0软件针对rs798766设计引物,引物序列见表1。每个样品设立2个PCR检测管,分别加入1条特异性引物和1条共用引物用于检测正常和突变等位基因。为了提高PCR特异性,降低SNP分析的假阳性率,在两条特异性引物的3'端倒数第3位引入一个不匹配碱基^[12],凝胶电泳图见图1。选取10%的样品进行DNA测序分析,与基

表2 试验组和对照组基本临床特征

Tab 2 The basic clinical characteristics of cases and controls

组别	n	年龄/岁	性别/n(%)		吸烟情况/n(%)			肿瘤分级/n(%)		肿瘤分期/n(%)	
		$\bar{x} \pm s$	男	女	非吸烟	曾吸烟	现在吸烟	低级别*	高级别	NMIUBC	MIUBC
试验组	363	65.70±12.00	296(81.54)	67(18.46)	146(40.22)	114(31.41)	103(28.37)	137(37.74)	226(62.26)	274(75.48)	89(24.52)
对照组	384	64.60±12.50	305(79.43)	79(20.57)	232(60.42)	58(15.10)	94(24.48)	-	-	-	-
P		0.244		0.466		<0.001		-	-	-	-

低级别*:包括PUNLMP和尿路上皮乳头状癌低级别

NMIUBC:非肌层浸润性膀胱尿路上皮癌,包括pTa-pT1;MIUBC:肌层浸润性膀胱尿路上皮癌,包括pT2-pT4

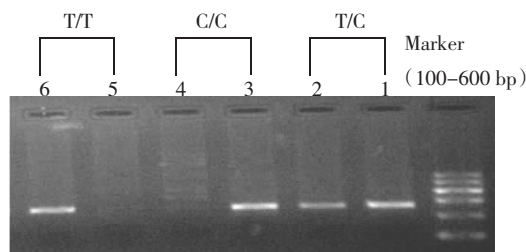
因特异性PCR基因分型结果一致,准确率达100%。

表1 rs798766 C/T等位基因分型引物序列

Tab 1 Primer sequence for genotyping assay for rs798766C/T

引物名称	引物序列	产物引物长度/bp
C等位基因正向特异性引物	5'-AATTAAAGTGCATTGCTAGGGAC-3'	274
T等位基因正向特异性引物	5'-AATTAAAGTGCATTGCTAGGGAT-3'	
反向公共引物	5'-GGAAACACACCTCCCCGA-3'	

粗体G:为提高PCR特异性,降低SNP分析的假阳性率,人为引入不匹配碱基;C和T:为待分型的突变碱基



第1、2电泳道表示PCR产物为C/T基因型;第3、4电泳道表示为C/C基因型;第5、6电泳道表示为T/T基因型

图1 rs798766 C/T等位基因分型凝胶电泳图

Fig 1 Agarose gel electrophoresis figure for genotyping assay for rs798766C/T

1.4 统计学分析 采用双侧 χ^2 检验或Student's *t*检验比较试验组和对照组一般人口学变量、吸烟危险因素。在对照人群中检测rs798766基因型分布的Hardy-Weinberg平衡,检验水准 $\alpha=0.05$ 。应用单因素和多因素非条件Logistic回归分析估计相对危险度(OR)及95%可信区间(CI)。用Q检验检测分层亚组ORs之间的异质性(低级别组vs高级别组, NMIUBC vs MIUBC), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。数据统计用计算机统计分析软件(SPSS 11.5)进行处理。

2 结果

2.1 研究对象基本资料 试验组和对照组性别、年龄构成无显著差异($P>0.05$)。试验组曾吸烟人数、现吸烟人数比例明显高于对照组,而不吸烟人数比例明显低于对照组($P<0.001$),提示吸烟为膀胱尿路上皮癌的危险因素。见表2。

2.2 rs798766 单核苷酸多态性与膀胱尿路上皮癌发病风险关系 rs798766 等位基因及基因型频率分布见表 3。rs798766 C/T 基因型分布在对照组中符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P>0.05$), 具有群体代表

性。考虑到 rs798766 T/T 基因型数量较少, 将 C/T 基因型与 T/T 基因型合并后分析, 与 C/C 基因型相比, 携带 T 等位基因的基因型(C/T + T/T 基因型)显著增加膀胱尿路上皮癌的发病风险($P=0.006$)。

表 3 rs798766 基因多态性基因型、等位基因频率分布以及膀胱癌发病风险的关系

Tab 3 Genotype and allele frequencies of the rs798766 polymorphism among cases and controls and their associations with risk of bladder cancer

组别	基因型/n(%)					
	C	T	C/C	C/T	T/T	C/T+T/T
试验组	615(84.71)	111(15.29)	260(71.63)	95(26.17)	8(2.20)	103(28.37)
对照组	687(89.45)	81(10.55)	308(80.21)	71(18.49)	5(1.30)	76(19.79)
P	—	0.006	—	0.010	0.267	0.006
OR(95% CI)*	—	1.53(1.13–2.08)	—	1.59(1.12–2.25)	1.90(0.61–5.86)	1.61(1.14–2.25)

OR(95% CI)*:经年龄、性别、吸烟情况校正

2.3 rs798766 单核苷酸多态性与膀胱尿路上皮癌病理的关系 根据膀胱尿路上皮癌病理分级、分期进行分层分析, 从多因素非条件 Logistic 回归分析数据来看, 似乎 rs798766 T 等位基因(C/T+T/T 基因型)明显增加了低级别、NMIUBC 发病风险(表 4)。然而各亚组 ORs 之间的异质性检测结果显示亚组间无明显统计学差异(低级别 vs 高级别, $P=0.335$; NMIUBC vs MIUBC, $P=0.333$), 表明 rs798766 单核苷酸多态性与膀胱癌病理分级、分期无相关性。

表 4 rs798766 基因多态性与膀胱癌病理的关系

Tab 4 Association between rs798766 polymorphism and progression of bladder cancer

组别	n	rs798766 基因型/n(%)		P	OR(95% CI)*		P ^b
		C/C	C/T+T/T		C/T+T/T vs C/C	C/C	
对照组	384	308(80.21)	76(19.79)		1.00(reference)		
试验组	363	260(71.63)	103(28.37)	0.006	1.61(1.14–2.25)		
肿瘤分级							
低级别组 *	137	93(67.88)	44(32.12)	0.004	1.92(1.24–2.97)	0.335	
高级别组	226	167(73.89)	59(26.11)	0.066	1.44(0.98–2.13)		
肿瘤分期							
NMIUBC	274	192(70.07)	82(29.93)	0.003	1.73(1.21–2.48)	0.333	
MIUBC	89	68(76.40)	21(23.60)	0.424	1.25(0.72–2.17)		

OR(95% CI)*:经年龄、性别、吸烟情况校正

低级别组 *: 包括 PUNLMP 和尿路上皮乳头状癌低级别

NMIUBC:非肌层浸润性膀胱尿路上皮癌, 包括 pTa–pT1; MIUBC:肌层浸润性膀胱尿路上皮癌, 包括 pT2–pT4

P^b:分层亚组 ORs 之间的异质性检验

3 讨论

Kiemeny 等^[13]在膀胱尿路上皮癌 GWAS 研究中发现 4 号染色体短臂 1 区 6 带 (4p16.3)rs798766 T 等位基因可以增加欧洲人群膀胱尿路上皮癌发病风险。王美林等^[3]在中国汉族人群中研究发现 rs798766 T 等位基因同样可以增加中国汉族人群膀

胱尿路上皮癌发病风险。本研究发现携带 T 等位基因的基因型(C/T + T/T 基因型)显著增加中国天津地区汉族人群膀胱尿路上皮癌的发病风险, 经性别、年龄、吸烟状况校正后 $OR=1.61$, $95\%CI=1.14–2.25$, 与王美林等在中国汉族人群中的研究结果相一致。此外, 王美林等^[3]还发现, rs798766 最小等位基因频率在不同种族人群中各不相同, 高加索人群对照组 rs798766 T 等位基因频率为 19.0%, 高于亚洲对照组人群(11.8%)。本研究对照组人群 rs798766 T 等位基因频率为 10.5%, 接近其研究结果(11.8%)。

rs798766 位于 TACC3 基因(编码翻译酸性卷曲螺旋蛋白 3)第 5 个内含子中, TACC3 是 TACC 家族成员之一, 此家族成员在调节细胞骨架微管运动中发挥重要作用^[13]。越来越多的研究发现 TACC3 基因表达失调可能与肿瘤有直接或间接地联系^[14]。有研究发现在胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、多发性骨髓瘤中 TACC3 基因表达上调^[15–17], 而且可能与淋巴瘤发病有关^[18–19]。HapMap 连锁不平衡(LD)分析发现 TACC3 与 TMEM129(编码跨膜蛋白 129 亚型 b)和 SLBP 基因(编码茎环(组蛋白)结合蛋白)连锁不平衡, 然而, 到目前为止, 很少有研究报道 TMEM129、SLBP 和 TACC3 基因与膀胱尿路上皮癌发病有关。FGFR3 基因(编码成纤维细胞生长因子受体 3)与 LD 区相邻, 靠近 TACC3 基因, 与 rs798766 相距 70 000 个碱基。FGFR3 基因与尿路上皮癌密切相关。研究发现低级别、非肌层浸润性膀胱尿路上皮癌患者中 FGFR3 基因突变非常常见^[20–21], 且预后比较好^[22–24], 84%膀胱尿路上皮癌患者存在 FGFR3 基因突变, 在 Ta 期尿路上皮癌患者中占 74%^[25]。Kiemeny 等^[13]研究发现 rs798766 单核苷酸多态性与低级别、非肌层浸润性膀胱尿路上皮癌发病风险有更显著的相关性。我们的研究结果与

Kiemeneyet 等研究不一致,本研究发现 rs798766 单核苷酸多态性与膀胱癌病理分期、分级无显著相关性;与王美林等^[3]在中国汉族人群中的研究结果相同。这种差异性可能与我们的研究样本量较少、地区种族不同有关。

最近有研究报道在膀胱尿路上皮癌组织和细胞系中发现了一种 TACC3-FGFR3 融合蛋白,此蛋白可以诱导有丝分裂发生错误,使丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路异常激活^[26]。因此我们有理由相信 rs798766 单核苷酸多态性可能通过 TACC3 和 FGFR3 基因来改变膀胱尿路上皮癌发病风险。

总之,本研究发现 rs798766 T 等位基因明显增加天津地区汉族人群膀胱尿路上皮癌发病风险,可能是未来预测天津地区汉族人群膀胱癌发病风险的良好基因标记。当然我们的研究也存在不足,如样本量较少、地区局限性,这导致我们在数据统计和分析的过程中存在一定的偏倚,需要进一步扩大样本量,在多中心、多种族人群中去证实我们的结论,进一步探索功能基因的精确定位。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69
- [2] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9
- [3] Wang M L, Chu H Y, Yan F, et al. Chromosome 4p16.3 variant modify bladder cancer risk in a Chinese population[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(6): 872
- [4] Yang L, Parkin D M, Li L D, et al. Estimation and projection of the National profile of cancer mortality in China:1991–2005[J]. Br J Cancer, 2004, 90(11): 2157
- [5] Murta-Nascimento C, Schmitz-Draeger B J, Zeegers M P, et al. Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death[J]. World J Urol, 2007, 25(3): 285
- [6] Aben K K, Baglietto L, Baffoe-Bonnie A, et al. Segregation analysis of urothelial cell carcinoma[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(10): 1428
- [7] Murta-Nascimento C, Silverman D T, Kogevinas M, et al. Risk of bladder cancer associated with family history of cancer: Do low-penetrance polymorphisms account for the increase in risk[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007, 16(8): 1595
- [8] Cheng L, MacLennan G T, Lopez-Beltran A. Histologic grading of urothelial carcinoma: a reappraisal[J]. Hum Pathol, 2012, 43(12): 2097
- [9] Okimoto R, Dodgson J B. Improved PCR amplification of multiple specific alleles (PAMSA) using internally mismatched primers[J]. Biotechniques, 1996, 21(1): 20
- [10] Newton C R, Graham A, Heptinstall L E, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(7): 2503
- [11] Bottema C D, Sarkar G, Cassady J D, et al. Polymerase chain reaction amplification of specific alleles: a general method of detection of mutations, polymorphisms, and haplotypes[J]. Methods Enzymol, 1993, 218: 388
- [12] Sommer S S, Groszbach A R, Bottema C D. PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes[J]. Biotechniques, 1992, 12(1): 82
- [13] Kiemeney L A, Sulem P, Besenbacher S A, et al. A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer[J]. Nat Genet, 2010, 42(5): U67
- [14] Ha G H, Kim J L, Breuer E. Transforming acidic coiled-coil proteins (TACCs) in human cancer[J]. Cancer Lett, 2013, 336(1): 24
- [15] Duncan C G, Killela P J, Payne C A, et al. Integrated genomic analyses identify ERFF1 and TACC3 as glioblastoma-targeted genes[J]. Oncotarget, 2010, 1(4): 265
- [16] Jung C K, Jung J H, Park G S, et al. Expression of transforming acidic coiled-coil containing protein 3 is a novel Independent prognostic marker in non-small cell lung cancer[J]. Pathol Int, 2006, 56(9): 503
- [17] Stewart J P, Thompson A, Santra M, et al. Correlation of TACC3, FGFR3, MMSET and p21 expression with the t (4;14)(p16.3;q32) in multiple myeloma[J]. Br J Haematol, 2004, 126(1): 72
- [18] Kang H N, Wilson C S, Harvey R C, et al. Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study[J]. Blood, 2012, 119(8): 1872
- [19] Chakraborty J, Okonta H, Bagalb H, et al. Retroviral gene insertion in breast milk mediated lymphomagenesis[J]. Virology, 2008, 377(1): 100
- [20] Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, et al. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas[J]. Nat Genet, 1999, 23(1): 18
- [21] Zuiverloon T C, van der Aa M N, van der Kwast T H, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation analysis on voided urine for surveillance of patients with Low-Grade Non-Muscle-Invasive bladder cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(11): 3011
- [22] Burger M, van der Aa M N, van Oers J M, et al. Prediction of progression of non-muscle-invasive bladder cancer by WHO 1973 and 2004 grading and by FGFR3 mutation status: a prospective study[J]. Eur Urol, 2008, 54(4): 835
- [23] Hernández S, López-Knowles E, Lloreta J, et al. Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in non muscle invasive urothelial bladder carcinomas[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(22): 3664
- [24] van Rhijn B W, Vis A N, van der Kwast T H, et al. Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(10): 1912
- [25] Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton M H, et al. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors[J]. J Pathol, 2001, 158(6): 1955
- [26] Williams S V, Hurst C D, Knowles M A. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer[J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(4): 795

(2014-11-04 收稿)