

# 热休克蛋白 70-hom 基因+2437T/C 多态性 与乳腺癌易感性的相关性研究\*

王媛媛, 艾克东, 寇建锋 (延安市人民医院心胸肿瘤外科, 陕西延安 716000)

**摘要:**目的 探讨陕西地区汉族人群中热休克蛋白(HSP)70-hom(+2437T/C)多态性与乳腺癌的相关性。方法 收集136例乳腺癌患者和150例健康体检人员的临床资料,采用聚合酶链反应-限制性内切酶分析(PCR-RFLP)法检测 HSP70-hom 基因+2437T/C 位点多态性。结果 HSP70-hom 基因+2437T/C 位点基因型和等位基因分布频率在病例组和对照组差异均具有统计学意义( $\chi^2=7.282, P=0.026$ ;  $\chi^2=6.586, P=0.010$ )。按照免疫组织化学分型,三阴性乳腺癌患者与对照组比较基因型分布频率差异具有统计学意义( $\chi^2=9.047, P=0.003$ );其他类型患者与对照组比较,基因型分布频率差异无统计学意义( $\chi^2=2.575, P=0.109$ )。结论 对于陕西地区汉族人,HSP70-hom 基因+2437T/C 多态性可能与乳腺癌遗传易感性相关,尤其是三阴性乳腺癌。

**关键词:**热休克蛋白 70;乳腺癌;单核苷酸多态性;遗传易感性

中图分类号:R737.9;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)06-125-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.06.036

## Association between Polymorphism of Heat Shock Protein 70-hom Gene +2437T/C and Susceptibility to Breast Cancer

WANG Yuan-yuan, AI Ke-dong, KOU Jian-feng

(Department of Thoracic Surgery, Yan'an People's Hospital, Shaanxi Yan'an 716000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the genetic association between Polymorphism of heat shock protein (HSP) 70-hom gene +2437T/C and susceptibility to breast cancer in the Han descent population of Shaanxi Province. **Methods** 136 patients with breast cancer and 150 healthy controls without breast cancer were recruited to participate in the study. Genotype was determined by Polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis for the polymorphism of the HSP70-hom gene +2437T/C. **Results** The distribution of HSP70-hom genotypes and allelotypes had significant difference between the patients with breast cancer and healthy controls ( $\chi^2=7.282, P=0.026$ ;  $\chi^2=6.586, P=0.010$ ). Stratified by immunohistochemistry, the distribution of HSP70-hom genotypes types had significant difference between the patients with triple negative breast cancer (TNBC) and healthy controls ( $\chi^2=9.047, P=0.003$ ). However, there was no significant difference of the distribution of HSP70-hom genotypes between the patients with non-TNBC and healthy controls ( $\chi^2=2.575, P=0.109$ ). **Conclusion** For Han descent population of Shaanxi Province, polymorphism of the HSP70-hom gene +2437T/C may associate with the risk of breast cancer, especially for TNBC.

**Keywords:** heat shock protein 70; breast cancer; single nucleotide polymorphism; susceptibility

乳腺癌已成为我国女性最常见癌症之一,目前认为其发病是遗传和环境因素交互影响的结果,是一种多因素、多阶段、多基因参与的疾病。近年来基因遗传因素在乳腺癌发病中的作用得到越来越多关注<sup>[1]</sup>。热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一类在哺乳动物中广泛存在的高度保守的热应激蛋白,HSP70 是其中重要成员,具有分子伴侣功能,可协同机体免疫,参与细胞凋亡。研究发现,HSP70 在多种肿瘤组织中高表达,且相继有研究结果证实 HSP70 高表达与乳腺癌发生、发展及预后情况均密切相关<sup>[2~4]</sup>。HSP70-hom 基因+2437T/C 多态性是一种非同义突变,可直接影响

HSP70 表达及活性,有研究表明该位点多态性与多种疾病易感性相关<sup>[5,6]</sup>。基于上述研究证据,本研究认为有理由推测 HSP70-hom 基因+2437T/C 多态性与乳腺癌遗传易感性相关。本研究比较136例乳腺癌患者和150例健康体检人员 HSP70-hom 基因+2437T/C 位点基因型和等位基因分布频率,探讨 HSP70-hom 基因+2437T/C 多态性与乳腺癌的关系,为临床工作提供参考。

### 1 材料与方法

1.1 研究对象 研究对象均为陕西地区汉族女性,选择2015年1月~2017年1月于我科住院治疗的乳腺癌患者作为病例组,均为新发肿瘤,所有

\* 作者简介:王媛媛(1981—),女,大学本科,主治医师,研究方向:乳腺肿瘤的临床治疗,E-mail:wangyuanyuan198112@163.com。

乳腺癌患者诊断均经病理检查证实,且排除转移性肿瘤可能,共收集 136 例患者,平均年龄  $50.3 \pm 9.6$  岁。从同期在我科治疗的非乳腺疾病患者中随机选择 150 例作为对照组,平均年龄  $48.5 \pm 10.2$  岁。两组患者年龄、绝经状况,差异均无统计学意义( $\chi^2 = 1.200, P = 0.273$ ;  $\chi^2 = 1.652, P = 0.199$ )。所有入组患者彼此无血缘关系。本研究通过本院伦理委员会审核批准,所有入组成员均充分知情同意。

1.2 主要试剂和仪器 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;PCR 仪及高速低温离心机均购自德国 Eppendorf 公司,垂直电泳槽购自北京六一仪器厂。

### 1.3 方法

1.3.1 临床资料收集:包括年龄、月经史、生产史、吸烟史等基本信息,病例组患者还需记录肿瘤转移扩散情况、肿瘤病理检查及免疫组织化学检查结果。

1.3.2 基因多态性检测:采集清晨空腹时外周静脉血用于实验室检查,留取部分样本采用 DNA 提取试剂盒提取全血基因组 DNA。采用聚合酶链反应-限制性内切酶分析(polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis, PCR-RFLP)法检测 HSP70-hom 基因 + 2437T/C 位点单核苷酸多态性。采用 Sequenom Mass ARRAY<sup>®</sup> Assay Design 3.1 软件(美国 Sequenom 公司)设计目的基因上、下引物序列,上游:5'-GGACAAGTCTGAGAAG-GTACAG-3';下游:5'-GTAACCTTAGATTTCAG-GTCTGG-3'。PCR 反应体系(25  $\mu$ l)包括:10 $\times$  Buffer 2.5 $\mu$ l,上、下游引物各 1  $\mu$ l,dNTP 混合物 2  $\mu$ l,TaqDNA 聚合酶 0.25  $\mu$ l,模板 DNA 1  $\mu$ l,不足部分由灭菌蒸馏水补足。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,然后按照变性 95 $^{\circ}$ C 20 s,退火 55 $^{\circ}$ C 45 s,延长 72 $^{\circ}$ C 50 s 的顺序循环 30 周期,最后 72 $^{\circ}$ C 延长 3 min。取 0.5  $\mu$ l 延伸产物使用限制性内切酶 Nco I 进行酶切,酶切体系(20  $\mu$ l)包括:PCR 产物 17  $\mu$ l,10 $\times$  Buffer 2 $\mu$ l 和内切酶 1  $\mu$ l,反应条件为 37 $^{\circ}$ C 16 h,然后 65 $^{\circ}$ C 下酶切 10 min 终止反应。最后取酶切产物进行电泳,紫外灯下观察并摄影。

表 2 HSP70-hom 基因 + 2437T/C 多态性与乳腺癌易感性的分层分析

项 目	对照组		病例组		$\chi^2$	P
	T/T	T/C+C/C	T/T	T/C+C/C		
病理类型	浸润性导管癌	103(68.7)	47(31.3)	59(55.7)	47(44.3)	4.522
	其他			15(50.0)	15(50.0)	3.858
免疫组织化学分型	三阴性乳腺癌	103(68.7)	47(31.3)	14(41.2)	20(58.8)	9.047
	其他			60(58.8)	42(41.2)	2.575

1.4 统计学分析 采用 SPSS19.0 统计软件分析处理,本研究计数资料结果以构成比(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。基因型分布采用 Hardy-Weinberg 平衡定律检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 结果判读及 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验

见图 1。HSP70-hom 基因 + 2437T/C 位点基因型包括 T/T, T/C 和 C/C 三种,本研究中两组 + 2437 位点基因型分布经检验均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡( $P > 0.05$ ),具有群体代表性。

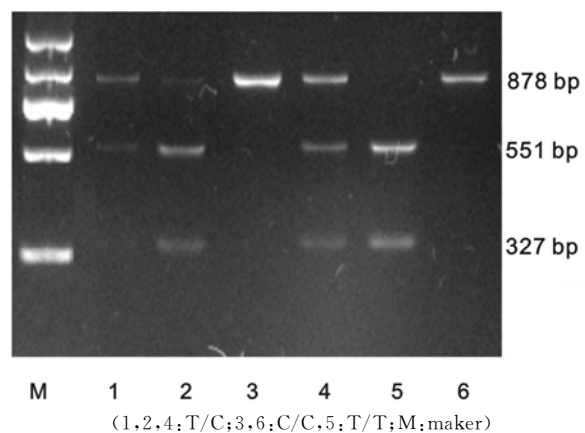


图 1 HSP70-hom 基因 + 2437T/C 位点 PCR-RFLP 电泳图

2.2 HSP70-hom 基因 + 2437T/C 多态性与乳腺癌易感性的关系 见表 1。病例组与对照组比较, HSP70-hom 基因 + 2437T/C 位点基因型和等位基因分布频率差异均具有统计学意义( $\chi^2 = 7.282, P = 0.026$ ;  $\chi^2 = 6.586, P = 0.010$ )。

表 1 HSP70-hom 基因 + 2437T/C 多态性与乳腺癌易感性的关系

基因型		对照组 (n=150)	病例组 (n=136)	$\chi^2$	P
基因型	T/T	103(68.7)	74(54.4)		
	T/C	45(30.0)	56(41.2)		
	C/C	2(1.3)	6(4.4)		
等位基因	T	251(83.7)	204(75.0)	6.586	0.010
	C	49(16.3)	68(25.0)		

### 2.3 分层分析 见表 2。

按照病理类型分层分析,浸润性导管癌患者和其他病理类型患者,与对照组比较,+2437T/C位点基因型分布频率差异均具有统计学意义( $\chi^2=4.522, P=0.033; \chi^2=3.858, P=0.049$ )。按照免疫组织化学分型,三阴性乳腺癌患者与对照组比较基因型分布频率差异具有统计学意义( $\chi^2=9.047, P=0.003$ );其他类型患者与对照组比较,基因型分布频率差异无统计学意义( $\chi^2=2.575, P=0.109$ )。

3 讨论 一般情况下,HSP70 最主要生物学功能是维持细胞在应激状态下的自身稳定。近年来,不断有研究证实 HSP70 与恶性肿瘤发生密切相关,在多种肿瘤组织中均发现 HSP70 表达显著高于瘤周组织,还有研究发现 HSP70 高表达可能与肿瘤恶性程度及手术后生存期密切相关<sup>[1~4,7~9]</sup>。研究认为 HSP70 参与肿瘤发生、发展过程的具体机制可能在于:一者,HSP70 自身具有强大的抗凋亡调节能力,可增强肿瘤细胞抗凋亡能力;再者,HSP70 可通过与 P53, C-myc 等癌基因/抑癌基因及其产物相互作用参与调节癌细胞增殖过程<sup>[10]</sup>。HSP70 与乳腺癌的相关性研究也得到了相似的结果,HSP70 与乳腺癌发生、发展及预后均密切相关<sup>[2]</sup>。

HSP70 基因由 HSP70-1, HSP70-2 和 HSP-hom 三个区域组成,均位于 6p21.3 人类主要组织相容性抗原Ⅲ类分子内,是一种遗传高度保守的基因。因此,目前所知的遗传多态性位点较少,HSP70-hom +2437T/C 位点是其中之一,存在 T→C 突变,可将 HSP70 肽链中的一个蛋氨酸替换为苏氨酸,进而直接影响 HSP70 表达及稳定性。近年来,国内外相继有研究发现+2437T/C 位点单核苷酸多态性与多种恶性肿瘤发生相关,包括肺癌<sup>[6]</sup>、鼻咽癌<sup>[5]</sup>、前列腺癌<sup>[11]</sup>、胃癌<sup>[9]</sup>等。Eachkoti 等<sup>[12]</sup>一项研究以克什米尔人为研究对象,共纳入 114 例乳腺癌患者和 90 例健康对照组人员,结果显示+2437 位点多态性与乳腺癌易感性相关。然而,笔者认为 HSP70 基因遗传具有高度保守的特性,不同种族人群多态性基因频率分布具有明显差异,如 Eachkoti 等<sup>[12]</sup>学者的研究中对照组突变纯合子基因型频率为 20%,而既往以中国汉族人为研究对象的研究中对照组突变纯合子基因型频率为 1%~5%<sup>[6,13,14]</sup>,本研究与既往中国人研究结果相似,对照组 CC 基因型频率为 1.3%,因此有必要在不同地区、不同种族人群中进一步开展研究以验证该位点基因多态性与乳腺癌遗传易感性的关系。

本研究观察 136 例乳腺癌患者与 150 例健康对照组成员 HSP70-hom 基因+2437T/C 多态性,结果显示病例组与对照组比较,+2437T/C 位点

基因型和等位基因分布频率差异均具有统计学意义,携带突变等位基因 C 可增加乳腺癌患病风险。进一步按照病理类型进行分层分析,病例组分为浸润性导管癌和其他类型两个亚组,与对照组比较,基因型分布频率差异均具有统计学意义,表明 HSP70-hom 基因+2437T/C 多态性可能与不同病理类型乳腺癌易感性均具有相关性。另外,按照免疫组织化学分型分层分析,结果显示 T/C+C/C 基因型与三阴性乳腺癌发病强相关,而非三阴性乳腺癌患者与对照组比较基因型分布频率差异无统计学意义。然而本研究三阴性乳腺癌患者纳入病例仅 34 例,期待后续大样本研究加以验证,其中具体机制也需要后续进一步研究。

综上所述,HSP70-hom 基因+2437T/C 多态性可能与乳腺癌易感性密切相关,但本研究纳入对象有限,期待更多相关研究结果验证。同时,HSP70 基因包括+2437T/C 等多个多态性位点,对于其他位点多态性与乳腺癌易感性的关系,以及各位点之间的相互关系尚不明确,也需要后续进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 乔雪峰,黄志平,张 宁,等. IL-18 基因启动子区-137G/C,-607G/T 2 个位点基因多态性与女性乳腺癌易感性 Meta 分析[J]. 现代检验医学杂志,2016,31(4):65-69,73.  
Qiao XF, Huang ZP, Zhang N, et al. Association analysis of IL-18 gene promoter region-137G/C,-607G/T polymorphisms and susceptibility to sporadic breast cancer: Meta-Analysis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(4): 65-69, 73.
- [2] Gunaldi M, Afsar CU, Okuturlar Y, et al. Elevated serum levels of heat shock protein 70 are associated with breast cancer[J]. Tohoku J Exp Med, 2015, 236(2):97-102.
- [3] Yue L, Xiang JY, Sun P, et al. Relationship between HSP70 and ERBB2 expression in breast cancer cell lines regarding drug resistance[J]. Anticancer Res, 2016, 36(3):1243-1249.
- [4] 黄自明,孙圣荣. 热休克蛋白 70 在乳腺癌中的表达及其对体外乳腺癌细胞株生物学功能的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(10):2440-2443.  
Huang ZM, Sun SR. Expression of heat shock protein 70 in breast cancer and its effect on the biological function of breast cancer cells in vitro[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2015, 32(10): 2440-2443.

- [5] Lakhanpal M, Singh LC, Rahman T, et al. Study of single nucleotide polymorphisms of tumour necrosis factors and HSP genes in nasopharyngeal carcinoma in North East India[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(1): 271-281.
- [6] 王玉珍, 吴逸明, 李伟辉, 等. 热休克蛋白 70-hom 基因+2437(T/C)位点基因多态性与肺癌的关系[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2010, 45(2): 219-222.
- Wang YZ, Wu YM, Li WH, et al. Heat shock protein 70-hom gene+2 437(T/C) polymorphism and susceptibility to lung cancer in Chinese Han population [J]. *Journal of Zhengzhou University (Medical Science)*, 2010, 45(2): 219-222.
- [7] Dutta SK, Girotra M, Singla M, et al. Serum HSP70: a novel biomarker for early detection of pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2012, 41(4): 530-534.
- [8] Narayanan NK, Narayanan BA, Bosland M, et al. Docosahexaenoic acid in combination with celecoxib modulates HSP70 and p53 proteins in prostate cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(7): 1586-1598.
- [9] Ferrer-Ferrer M, Malespín-Bendana W, Ramírez V, et al. Polymorphisms in genes coding for HSP-70 are associated with gastric cancer and duodenal ulcer in a population at high risk of gastric cancer in Costa Rica [J]. *Arch Med Res*, 2013, 44(6): 467-474.
- [10] Goloudina AR, Demidov ON, Garrido C. Inhibition of HSP70: A challenging anti-cancer strategy[J]. *Cancer Lett*, 2012, 325(2): 117-124.
- [11] Sfar S, Saad H, Mosbah F, et al. Synergistic effect and VEGF/HSP70-hom haplotype analysis: relationship to prostate cancer risk and clinical outcome [J]. *Hum Immunol*, 2010, 71(4): 377-382.
- [12] Eachkoti R, Qanoon HA, Koul PA, et al. Polymorphic analysis of MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2 AND HSP70-HOM) genes: their susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma cases of Kashmiri Population[J]. *Asian J Biomed Pharm Sci*, 2013, 3(25): 13-20.
- [13] Wang YP, Tang Z, Peng BK, et al. Heat shock protein 70 polymorphisms in Chinese patients with Graves' disease[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 18376-18383.
- [14] 徐锦雯, 赵丽萍, 朱春华, 等. 热休克蛋白 70-hom 基因多态性与儿童过敏性紫癜的相关性[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(8): 1075-1078.
- Xu JW, Zhao LP, Zhu CH, et al. HSP70-hom polymorphism and susceptibility to childhood Henoch-Schönlein purpura[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing(Natural Science)*, 2012, 32(8): 1075-1078.

收稿日期: 2017-08-31

修回日期: 2017-09-21