

中国人群 JAK2 多态性和胃癌风险相关性研究

刘东晓¹, 杨力^{1*}, 梁松¹, 徐琳琳², 王雪融²

(¹南京医科大学第一附属医院普外科, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学基础医学院药理学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨 JAK2 基因 rs1887427 多态性与胃癌风险的相关性。方法:本病例对照研究包括 168 例胃癌患者和 199 例非肿瘤患者,采用 PCR-RFLP 方法研究 JAK2 rs1887427 基因的多态性,并对该多态性与胃癌风险的相关性进行评估。结果:病例组和对照组野生基因型和突变基因型分布有显著差异($P = 0.027$)。相对野生基因型 AA 携带者,突变基因型(AG+GG)显著增加胃癌风险($P = 0.023$,校正 OR = 1.71,95%CI = 1.08~2.71)。而且,在分层分析中,增加的胃癌风险在低年龄组(年龄 ≤ 56 岁)、男性受试者和非吸烟者中有显著意义(P 值均 < 0.05)。结论:在中国人群中 JAK2 基因 rs1887427 多态性与胃癌风险增加相关。

[关键词] 胃癌; JAK2; 多态性; 基因型

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)06-800-05

The association between the Janus kinase 2 polymorphism and gastric cancer risk in a Chinese population

LIU Dong-xiao¹, YANG Li^{1*}, LIANG Song¹, XU Lin-lin², WANG Xue-rong²

(¹Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Pharmacology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the impact of the single nucleotide polymorphism (SNP) in Janus kinase 2 (JAK2) rs1887427 on gastric cancer risk. **Methods:** In this hospital-based, case-control study, the genotypes were identified by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism protocols. **Results:** The frequencies of the wild and variant genotypes in cases were significantly different from those of controls ($P = 0.027$). Compared with individuals with the wild genotype AA, subjects with the variant genotypes (AG + GG) had a significantly higher risk of gastric cancer ($P = 0.023$, adjusted OR = 1.71, 95% CI = 1.08-2.71). Moreover, in stratified analysis, the elevated gastric cancer risk was especially evident in younger individuals, males and nonsmokers ($P < 0.05$ for all). **Conclusion:** The JAK2 polymorphism is associated with an increased risk of gastric cancer in Chinese population.

[Key words] gastric cancer; Janus kinase 2 (JAK2); polymorphism; genotype

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 800-804]

胃癌是最常见的肿瘤之一,目前仍然在全球肿瘤死亡率中排第二位。我国每年新发胃癌患者约 40 万,死亡约 30 万,已成为肿瘤患者的主要死因^[1]。胃癌的发生发展是复杂的、多步骤、多因素参与的过程,是由基因易感性、环境因素和幽门螺杆菌感染相互作用的结果^[2]。尽管胃癌发生的精确分子机制尚不清楚,但是基因易感性在胃癌的发生过程中起

着重要的作用。

基因多态性是个体间差异和多样性的主要原因,单核苷酸多态性最近被认为是参与包括肿瘤在内的多种疾病发生发展的主要遗传因素^[3-4]。JAK2 是酪氨酸激酶家族中的一员,参与细胞因子受体信号通路,是 JAK/STAT 信号通路的重要组成部分,参与胃癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌等多种肿瘤的发生^[5-9]。Zhou 等^[6]研究发现,在胃癌患者中 JAK2 信号通路的过度激活可能与幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白 A(CagA)诱导的胃泌素的高表达有关。也有研究报道,JAK2 是一种癌基因,下调

[基金项目] 江苏省医学重点人才项目(RC2011059);江苏省“333 高层次人才培养工程”和“六大人才高峰”项目资助

*通讯作者, E-mail: pwkyangli@yahoo.com.cn

其表达可以明显抑制胃癌细胞的增殖^[10]。

JAK2 基因 rs1887427 位于 9p24.1 染色体上, 是 JAK2 基因上游启动子上的单核苷酸多态性位点, 可以明显地影响 JAK2 基因的表达。最近, 大量的证据显示, JAK2 的单核苷酸多态性与 Crohn's 病、恶性血液病以及头颈部肿瘤的遗传易感性有关^[11-13]。但目前 JAK2 rs1887427 单核苷酸多态性与胃癌遗传易感性关系的研究尚未见报道。因此, 本研究探索中国人人群中 JAK2 基因 rs1887427 的单核苷酸多态性与胃癌风险的相关性。

1 对象和方法

1.1 对象

本病例对照研究包括 168 例胃癌患者 (病例组) 和 199 例非肿瘤患者 (对照组), 所有的受试者均来自南京医科大学第一附属医院普外科 2009~2010 年诊治的患者。病例组和对照组按年龄 (5 岁以内) 和性别配对。胃癌患者均是新近从组织学上确诊为胃癌的住院患者, 除外继发和复发的肿瘤患者。对照组均是无恶性疾病和遗传病病史的患者。所有样本均为 5 ml 抗凝静脉血, 并立即放入 -20℃ 保存。

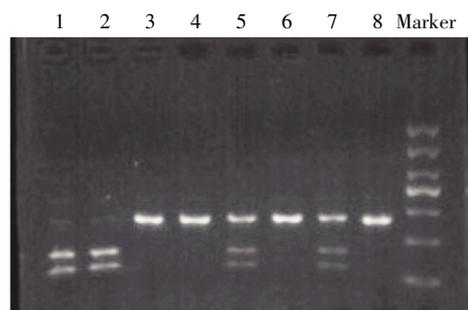
1.2 方法

1.2.1 DNA 提取和 PCR 扩增

采用全血基因组 DNA 提取试剂盒, 按照标准的方法从外周血白细胞中提取基因组 DNA。PCR 扩增的引物由 Invitrogen 上海公司合成。PCR 反应体系包括 10×PCR 缓冲液 2 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 1.4 μl, 2 mmol/L dNTP 1.4 μl, 1 U/μl Taq 聚合酶 1 μl, 模板 DNA 2 μl 和 5 μmol/L 上下游引物各 1 μl, 反应总体积为 20 μl。引物序列为: 上游引物: 5'-TGTGGATGGAAACCTAA-3'; 下游引物: 5'-AACTTCTACTCCTGCTTGG-3'。反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 循环 35 次, 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。

1.2.2 PCR-RFLP 检测基因型

PCR 产物的全长是 261 bp, 用限制性内切酶 *Bsu36I* (NEB 公司, 美国) 5 U 37℃ 消化 16 h, 然后用 3% 的琼脂糖凝胶电泳, 条带用凝胶成像分析系统观察并记录。野生型 AA 纯合子基因型有 1 个片段为 261 bp; 突变型 GG 纯合子基因型有 2 个片段, 分别为 151 和 110 bp; AG 杂合子基因型有 3 个片段, 分别为 261、151 和 110 bp (图 1)。



PCR 产物全长为 261 bp。1、2: GG 纯合子基因型酶切后有 2 条带, 分别为 151 和 110 bp; 3、4、6、8: AA 纯合子基因型酶切后有 1 条带, 为 261 bp; 5、7: AG 杂合子基因型酶切后有 3 条带, 分别为 261、151 和 110 bp。

图 1 JAK2 基因 rs1887427 多态性的酶切图片

Figure 1 Digestion of the PCR products of JAK2 rs1887427 by restriction enzymes

1.2.3 质量控制

随机抽取约 10% 的样本重复实验, 结果 100% 一致。所有的样本均以随机号编码, 所有分析均为盲法。同时, PCR 产物也被随机选择经直接测序鉴定。

1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS13.0 软件进行分析。P < 0.05 认为差异有统计学意义。用 Shapiro-Wilk 检验检测定量资料的正态性。呈正态分布的数据采用 Student's *t* 检验; 呈偏态分布的数据采用 Mann-Whitney 秩和检验。多类变量和 JAK2 基因型分布用 Pearson χ^2 检验。Hardy-Weinberg 平衡的检测用拟合优度 χ^2 检验。JAK2 多态性和胃癌风险的相关性用优势比 (OR) 和 95% 可信区间 (CI) 估计。

2 结果

2.1 研究对象的一般特征

受试者的基本情况见表 1。病例组和对照组在性别和年龄上均无统计学差异, 提示配对成功。并且两组在吸烟、居住地、高血压和糖尿病病史方面差异均无统计学意义。但是, 和对照组相比, 病例组患者体重明显减轻 ($P = 0.030$)。

2.2 JAK2 基因 rs1887427 位点的测序结果

PCR 产物测序结果见图 2, 测序结果都为单峰的是纯合基因型, 有双峰的是杂合基因型。JAK2 基因 rs1887427 位点 (箭头标注) 野生基因型为 A 可发生 SNP 突变为 G。AA 基因型为绿色单峰; AG 基因型为绿色和灰色重叠的双峰; GG 基因型为灰色单峰 (图 2)。

2.3 JAK2 基因型分布和胃癌风险评估

病例组和对照组的基因型分布都符合 Hardy-

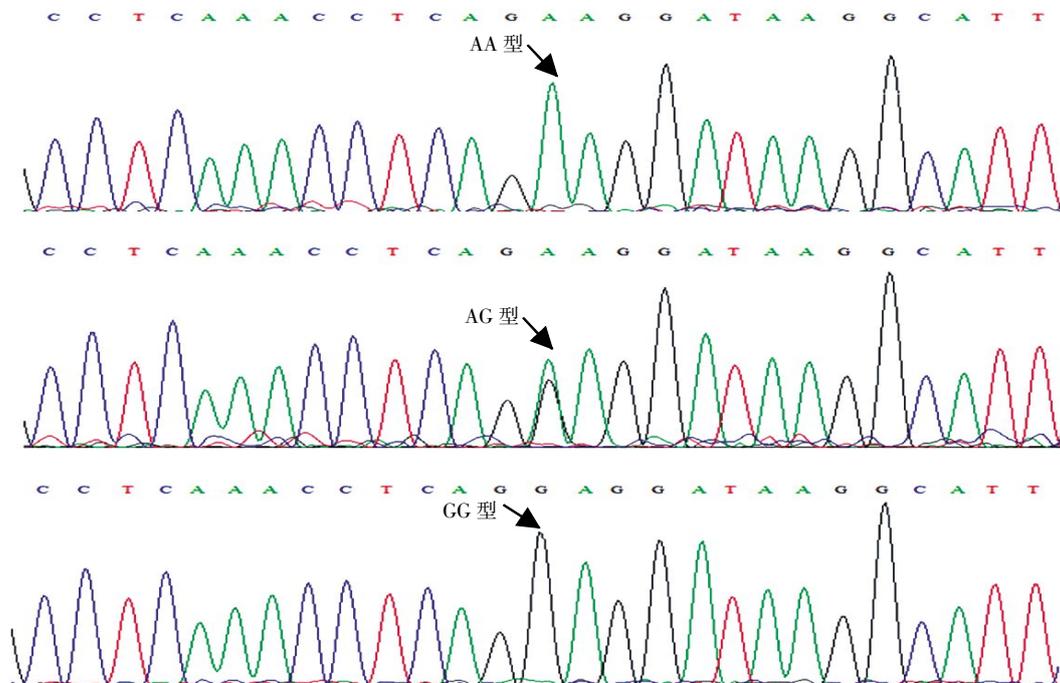
表1 研究对象的一般特征

Table 1 Demographic information of two groups

因素	病例组 (n=168)	对照组 (n=199)	P 值
男性	115(68.5)	130(65.3)	0.527
年龄(岁)*	57(49~65)	56(49~65)	0.715
体重(kg)*	60(55~68)	62(56~70)	0.030
高血压	41(24.4)	54(27.1)	0.552
糖尿病	13(7.7)	23(11.6)	0.220
吸烟	44(26.2)	39(19.6)	0.133
居住地			0.934
农村	86(51.2)	101(50.8)	
城市	82(48.8)	98(49.2)	

* :数据以中位数、百分位数表示, M(P_{25} - P_{75})。

Weinberg 平衡定律(病例组 $P = 0.258$; 对照组 $P = 0.534$), 表明没有遗传漂移或对特定 JAK2 基因型没有选择性优势。病例组和对照组野生基因型和突变基因型分布有显著差异($P = 0.027$)。病例组 G 等位基因频率高于对照组(19.3% vs 14.1%), 但差异无统计学意义($P = 0.056$)。与野生基因型 AA 相比, 在校正了年龄、性别、吸烟、居住地、高血压、糖尿病后, 变异基因型(AG+GG)增加 71%的患胃癌风险($P = 0.023$, 校正 OR=1.71, 95%CI=1.08~2.71, 表 2)。其中, AG 基因型的携带者患胃癌的风险增加了 78%($P = 0.018$, 校正 OR=1.78, 95%CI=1.10~2.87, 表 2), 而 GG 基因型的携带者增加患胃癌的风险无统计学意义。



JAK2 基因 rs1887427 位点的测序结果。箭头所示:绿色单峰为 AA 基因型的测序图,绿色和灰色重叠的双峰为 AG 基因型的测序图,灰色单峰为 GG 基因型的测序图。

图2 JAK2 rs1887427 位点 3 种不同基因型的测序图

Figure 2 Sequence chromatograms of JAK2 rs1887427 in the three different genotypes

2.4 JAK2 多态性和胃癌风险分层分析

本研究用对照组中位年龄(56岁)、性别、吸烟情况、居住地对受试者进行分层分析,进一步研究 JAK2 变异基因对胃癌风险的影响(表 3)。结果显示,变异基因型增加胃癌风险在低年龄组(年龄 ≤ 56 岁)有统计学意义($P = 0.019$, 校正 OR=2.09, 95%CI=1.13~3.88),而在高年龄组(年龄 >56 岁)无统计学意义。此外,该基因多态性与增加胃癌风险相关性在男性受试者中有统计学意义($P = 0.020$, 校正 OR=1.99, 95%CI=1.11~3.57),而在女性受试者中无

统计学意义。对吸烟因素分层分析显示,在非吸烟受试者中,携有变异基因型增加 96%的胃癌风险($P = 0.013$, 校正 OR=1.96, 95%CI=1.15~3.32),而在吸烟受试者中无统计学意义。对居住地因素分层分析,发现该多态性与胃癌风险无相关性。

3 讨论

本研究中,首次发现 JAK2 rs1887427 基因多态性在中国人群中可以明显增加患胃癌的风险。

JAK2 是 JAK/STAT 信号通路的重要组成部分,

表 2 JAK2 基因型分布和胃癌风险评估

	病例组(n = 168)	对照组(n = 199)	OR(95%CI)	P 值	校正 OR(95%CI)*	P 值
基因型						
AA	107(63.7)	148(74.4)	1.00		1.00	
AG	57(33.9)	46(23.1)	1.71(1.08~2.72)	0.022	1.78(1.10~2.87)	0.018
GG	4(2.4)	5(2.5)	1.11(0.29~4.22)	0.882	1.10(0.28~4.31)	0.894
AG + GG	61(36.3)	51(25.6)	1.65(1.06~2.59)	0.027	1.71(1.08~2.71)	0.023
等位基因						
A	271(80.7)	342(85.9)	1.47(0.99~2.17)	0.056		
G	65(19.3)	56(14.1)				
HWE	0.258	0.534				

* :以年龄、性别、吸烟状况、居住地、高血压病史、糖尿病病史校正。

表 3 JAK2 多态性和胃癌风险分层分析

因素	(AG+GG)/AA		OR(95%CI)	P 值	校正 OR(95%CI)*	P 值
	病例组	对照组				
年龄(岁)						
≤56	39(23.2)/44(26.2)	34(17.1)/70(35.2)	1.83(1.01~3.31)	0.047	2.09(1.13~3.88)	0.019
>56	22(13.1)/63(37.5)	17(8.5)/78(39.2)	1.60(0.78~3.27)	0.196	1.43(0.68~3.03)	0.351
性别						
女	18(10.7)/35(20.8)	21(10.6)/48(24.1)	1.18(0.55~2.53)	0.679	1.01(0.44~2.35)	0.982
男	43(25.6)/72(42.9)	30(15.1)/100(50.3)	1.99(1.14~3.47)	0.015	1.99(1.11~3.57)	0.020
吸烟状况						
吸烟者	14(8.3)/30(17.9)	12(6.0)/27(13.6)	1.05(0.41~2.66)	0.918	1.04(0.36~2.98)	0.948
非吸烟者	47(28.0)/77(45.8)	39(19.6)/121(60.8)	1.89(1.14~3.16)	0.014	1.96(1.15~3.32)	0.013
居住地						
农村	32(19.0)/54(32.1)	29(14.6)/72(36.2)	1.47(0.80~2.72)	0.218	1.52(0.79~2.91)	0.210
城市	29(17.3)/53(31.5)	22(11.1)/76(38.2)	1.89(0.98~3.64)	0.057	1.85(0.93~3.70)	0.082

* :以年龄、性别、吸烟状况、居住地、高血压病史、糖尿病病史校正。

活化的 JAKs 磷酸化受体上的酪氨酸位点与细胞质中的 STAT 单体 SH2 区域结合; 随后磷酸化的 STAT 与 SH2 结合形成二聚体而被激活。而且, JAK2 也可以参与激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 进而抑制细胞的凋亡和促进细胞的增殖^[14]。大量的研究报告, JAK2 的基因多态性参与多种疾病的发病过程。在头颈部肿瘤中, 携带 JAK2 rs1887427 变异基因型的患者, 13-cRA 化疗的预后不好; 而携带其野生基因型的患者, 13-cRA 化疗后的肿瘤再生和复发率减少了 76%^[13]。但是, 目前尚未见关于 JAK2 多态性和胃癌风险相关性的研究报告。

基于以上研究, 本文进行了这项以医院为基础的病例对照研究, 探讨 JAK2 rs1887427 多态性和胃癌风险的关系。本研究中对照组突变 G 等位基因的频率为 14.1%, 和 NCBI 数据库提供的亚洲人的频率(15.3%)相似, 表明本实验设计没有出现选择偏倚。通过基因型的风险评估, 发现变异基因型(AG+

GG)增加 71%的患胃癌风险。

在分层分析中, 发现此多态性增加胃癌风险在低年龄组(年龄≤56岁)有统计学意义, 而在高年龄组(年龄>56岁)中无统计学意义。年长者患胃癌的风险增加, 可能是由于其长期暴露于环境致癌物中, 随着年龄的增长, 致癌因素不断的积累, 最终导致胃癌发生^[15]。因此, 多态性增加胃癌的风险在低年龄组更明显, 这和本课题组先前的研究相一致^[15-16]。而且, 该多态性增加男性受试者患胃癌的风险, 而在女性受试者中增加患胃癌的风险无统计学意义。本文的结果和流行病学的调查研究相一致, Kelley 等^[17]指出, 在中国人人群中胃癌高发于男性, 非贲门癌的男女比例约为 2:1; 而贲门癌男女患者的比例达 4.1:1。也许男性荷尔蒙和基因易感性是导致这种现象的原因之一。本研究还观察到, 该多态性与非吸烟受试者的胃癌风险增加有显著相关性。可能是由于吸烟者长期暴露于烟草致癌物环境中, 掩盖了

多态性对胃癌风险的影响,所以变异基因型增加胃癌风险在非吸烟受试者中更有意义^[17]。幽门螺杆菌是胃癌的独立风险因素,由于对所有的受试者进行此项检查实际操作困难,因此本研究未对此因素进行评估。

本研究还存在一定的局限性。基于医院的病例对照研究,所有临床病理资料都来自问卷调查和病案,因此不能排除选择和回忆偏倚的可能。另外,本研究的样本量相对较小,把握度相对不高,检验的效能有限,但研究结果在一定程度上提示了JAK2基因多态性与胃癌风险的相关性。本研究病例组和对照组均符合Hardy-Weinberg平衡,后续可继续扩大样本量来加强研究的检验效能。

综上所述,本研究表明在中国人群中JAK2基因rs1887427多态性与增加胃癌风险相关。特别是在低年龄组(年龄≤56岁)、男性受试者和非吸烟受试者中,该多态性增加胃癌风险。但是,这些相关性还需要进一步的大样本研究和功能研究来证明。

[参考文献]

- [1] 施伟,王建,张梅玲,等. 1340例胃癌根治术后患者预后的多因素分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2011,31(9):1310-1315
- [2] Wu MS,Chen CJ,Lin JT. Host-environment interactions: their impact on progression from gastric inflammation to carcinogenesis and on development of new approaches to prevent and treat gastric cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2005,14(8):1878-1882
- [3] Chen J,Liu NN,Li JQ,et al. Association between ITGA2 C807T polymorphism and gastric cancer risk[J]. World J Gastroenterol,2011,17(23):2860-2866
- [4] 岳聪,王苗苗,王美林,等. miR-146a基因多态与卵巢癌易感性的关系:病例-对照研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2011,31(4):517-521
- [5] Constantinescu SN,Girardot M,Pecquet C. Mining for JAK-STAT mutations in cancer[J]. Trends Biochem Sci,2008,33(3):122-131
- [6] Zhou J,Xie Y,Zhao Y,et al. Human gastrin mRNA expression up-regulated by *Helicobacter pylori* CagA through MEK/ERK and JAK2-signaling pathways in gastric cancer cells[J]. Gastric Cancer,2011,14(4):322-331
- [7] Lakshmanan I,Ponnusamy MP,Das S,et al. MUC16 induced rapid G2/M transition via interactions with JAK2 for increased proliferation and anti-apoptosis in breast cancer cells[J]. Oncogene,2011,31(7):805-817
- [8] Yoon YK,Kim HP,Han SW,et al. KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to AKT or STAT3 activation:implication for combinatorial approach [J]. Mol Carcinog,2010,49(4):353-362
- [9] Shin DS,Kim HN,Shin KD,et al. Cryptotanshinone inhibits constitutive signal transducer and activator of transcription 3 function through blocking the dimerization in DU145 prostate cancer cells [J]. Cancer Res,2009,69(1):193-202
- [10] Ding L,Xu Y,Zhang W,et al. MiR-375 frequently down-regulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2[J]. Cell Res,2010,20(7):784-793
- [11] Zhong Y,Wu J,Ma R,et al. Association of Janus kinase 2(JAK2) polymorphisms with acute leukemia susceptibility[J]. Int J Lab Hematol,2011,34(3):248-253
- [12] Prager M,Buttner J,Haas V,et al. The JAK2 variant rs10758669 in Crohn's disease:altering the intestinal barrier as one mechanism of action [J]. Int J Colorectal Dis,2011,27(5):565-573
- [13] Lee JJ,Wu X,Hildebrandt MA,et al. Global assessment of genetic variation influencing response to retinoid chemoprevention in head and neck cancer patients [J]. Cancer Prev Res (Phila),2011,4(2):185-193
- [14] Santos FP,Verstovsek S. JAK2 inhibitors:what's the true therapeutic potential? [J]. Blood Rev,2011,25(2):53-63
- [15] Zhu H,Yang L,Zhou B,et al. Myeloperoxidase G-463A polymorphism and the risk of gastric cancer:a case-control study[J]. Carcinogenesis,2006,27(12):2491-2496
- [16] Gu H,Yang L,Sun Q,et al. Gly82Ser polymorphism of the receptor for advanced glycation end products is associated with an increased risk of gastric cancer in a Chinese population [J]. Clin Cancer Res,2008,14(11):3627-3632
- [17] Kelley JR,Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors[J]. J Clin Epidemiol,2003,56(1):1-9

[收稿日期] 2012-01-13