

E-钙粘蛋白基因启动子区域单核苷酸多态性(-347G→GA)对大肠癌患者E-钙粘蛋白表达的影响

戴伟杰,王 琼,杨晓钟*

(南京医科大学附属淮安第一医院消化科,江苏 淮安 223300)

[摘要] 目的:探讨 E-钙粘蛋白基因(CDH1)启动子区域-347G→GA 单核苷酸基因多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)和散发大肠癌(colorectal cancer, CRC)人群 E-钙粘蛋白表达的联系。方法:以江苏地区大肠癌患者群为研究对象,同时建立无肿瘤家族史以及其他遗传性疾病的正常对照组,进行病例对照研究,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)行目的基因的多态性测定,同时行正常结肠组织和不同基因型的大肠癌组织 E-钙粘蛋白的免疫组化测定。结果:正常对照组和结肠癌组的目的基因型分布频率并无统计学差异($P > 0.05$),结肠癌组织 E-钙粘蛋白表达量明显低于正常结肠组织($P < 0.05$)。50 例正常结肠组织中 GA 基因型和 G 基因型的 E-钙粘蛋白表达无统计学差异($P > 0.05$);48 例结肠癌组织中,GA 基因型 E-钙粘蛋白表达量则明显低于 G 基因型($P < 0.05$)。结论:CDH1 启动子区域-347G→GA 单核苷酸基因多态性并不增加大肠癌的发病风险,但在肿瘤发生后可能影响其预后。

[关键词] E-钙粘蛋白;大肠癌;多态性;基因型

[中图分类号] R735.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)08-1094-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130813

Association between CDH1 promoter polymorphism (-347G →GA) and E-cadherin expression in sporadic colorectal cancer

Dai Weijie, Wang Qiong, Yang Xiaozhong*

(Department of Gastroenterology, Huai'an First People's Hospital Affiliated to NJMU, Huai'an 223300, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the association of -347G→GA polymorphism located in the CDH1 gene promoter region with the expression of E-cadherin in sporadic colorectal cancer (CRC). **Methods:** The case-control study was designed, based on the population of colorectal cancer in China and healthy normal controls who have no tumor or inherited disease history. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to genotype the variant, and immunohistochemical staining was performed to measure the expression of E-cadherin in different allele cases among the CRC patients and normal controls. **Results:** There was no significant difference in the genotype frequencies of the polymorphism between normal controls and CRC patients ($P > 0.05$), there was no significant difference in E-cadherin expression for the GA-allele and G-allele in normal controls ($P > 0.05$), E-cadherin expression was lower for the GA-allele than for the G-allele in CRC patients ($P < 0.05$), which was no significant difference in normal controls ($P > 0.05$). **Conclusion:** The -347G→GA promoter polymorphism of CDH1 gene play no role in the etiology of CRC independently, but may be a prognostic factor during the progression of CRC.

[Key words] E-cadherin; colorectal cancer; polymorphism; genotype

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(8): 1094-1098]

大量研究表明 E-钙粘蛋白基因(CDH1)与肿瘤的发生发展存在着密切的关系^[1-3],特别是与肿

瘤预后的关系是目前研究的热点,调控 CDH1 转录活性的启动子区域发现其存在多个单核苷酸基因多态性^[4],其中-347G→GA 被认为是一个功能基因多态性^[5],其 GA 基因型可能会减低 CDH1 的转录活性,而这一特性可能只是存在于肿瘤发生之后,因而能影响肿瘤的预后。本研究主要探索

[基金项目] 江苏省六大人才高峰项目(07-B-026)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: xz_yang1023@yahoo.com

CDH1 -347G→GA 基因多态性与散发大肠癌 E 钙粘蛋白的表达以及对大肠癌预后的影响。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究共包括 360 例散发性大肠癌患者和 321 例正常对照,均为淮安市第一人民医院 2008~2011 年间住院患者,病例和对照组均无大肠癌家族史,前者需有明确的病理诊断和准确的肿瘤分期,后者要求无基础性疾病史,主要为外伤患者和产妇,入组前均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 基因多态性测定

按美国 Promega 公司 DNA 提取试剂盒使用说明从病例和对照组全血中提取 DNA,水化后储存于-80℃冰箱待用。CDH1 基因的启动子区域-347G→GA 基因型分析采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术 (PCR-RFLP)。上下游引物分别为 5'-GCCCC-GACTTGTCTCTCTAC-3' 和 5'-GGCCACAGCCAATC-AGCA-3',每 50 μl PCR 反应体系中含 TaKaRa *Taq* (5 U/μl) 0.25 μl、模板 DNA 2 μl、10 × PCR Buffer 5 μl、dNTP 4 μl、MgCl₂ 3 μl、上下游引物各 1 μl、灭菌蒸馏水 34 μl。反应设定为 35 个循环,每循环包括 94℃变性 1 min→61℃退火 1 min→72℃延伸 1 min。反应结束后取 5 μl 反应产物,加入 10×TBE 缓冲液 2 μl、1 μl *Ban* II (TaKaRa 公司,大连)、灭菌蒸馏水 12 μl,置于 37℃温箱中酶切 10 h。加入 10 × Loading Buffer 2 μl 终止酶切,取 10 μl 酶切反应产物在 3%琼脂糖凝胶上 100 V 电压电泳 30 min,紫外灯下观察电泳条带,判断多态性位点基因型(图 1)。

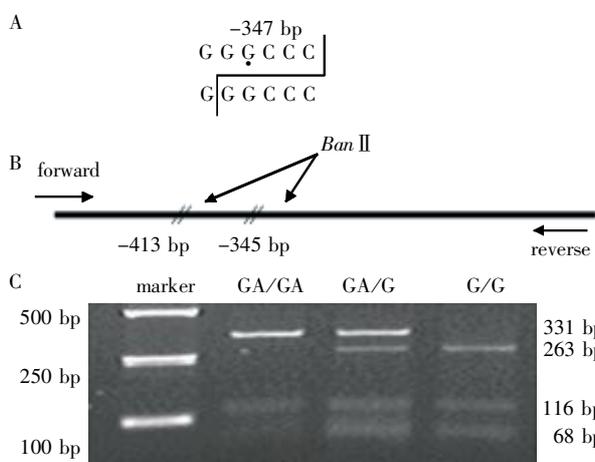


图 1 PCR-RFLP 方法检测启动子区域-347G→GA 基因型
Figure 1 Genotyping analysis of CDH1 -347G→GA polymorphism by PCR-RFLP

1.2.2 免疫组化

大肠癌组织主要来自外科手术患者,正常结肠组织主要来自门诊行结肠镜检查无异常的患者,共有 50 例正常结肠组织标本和 48 例大肠癌组织标本,收集组织的同时采集相应患者的静脉血 5 ml,行基因的多态性分析。

采用 SP 染色法,步骤如下:脱蜡和水化;PBS 洗 2~3 次各 5 min;3% H₂O₂ (80% 甲醇)滴加在 TMA 上,室温静置 10 min;PBS 洗 2~3 次各 5 min;抗原修复;PBS 洗 2~3 次各 5 min;滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min,甩去多余液体;滴加一抗 50 μl (Santa Cruz 公司,美国,1:150 稀释),室温静置 1 h 或 4℃过夜或 37℃ 1 h;4℃过夜后需在 37℃复温 45 min;PBS 洗 3 次每次 2 min;滴加二抗 45~50 μl,室温静置或 37℃ 1 h;二抗中可加入 0.05% 的 Tween-20;PBS 洗 3 次各 5 min;DAB 显色 5~10 min,在显微镜下掌握染色程度;PBS 或自来水冲洗 10 min;苏木精复染 2 min,盐酸酒精分化;自来水冲洗 10~15 min;脱水、透明、封片。

在 BX50F4 奥林巴斯显微镜下观察拍照,拍照时的放大倍数为 200 倍,每个组织切片随机拍摄 5 张图片用来分析。使用 IPP 软件对 E-钙粘蛋白的免疫组化图片进行定量分析。

1.3 统计学方法

病例组和对照组的基本临床特点用双侧 χ^2 检验和 *t* 检验比较,同时 *t* 检验也用来比较两组 E-钙粘蛋白表达量之间的差异,用 χ^2 检验来分析病例组和对照组之间不同基因型的频率分布,所有数据均使用 SPSS15.0 软件进行研究结果的统计分析, $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

大肠癌患者和正常对照的一些基本特点见表 1,两者在性别、年龄、吸烟史、饮酒史上无统计学差异,可看作为均衡可比。

在对照组中 GA/GA 和 GA/G 基因型所占比例为 42.4%,G/G 基因型所占比例为 57.6%,病例组中两者所占比例分别为 46.4%、53.6%,两者之间差异无统计学意义(表 2)。

本文对 48 例结肠癌组织标本和 50 例正常结肠组织标本进行了 E-钙粘蛋白的免疫组化测定(图 2),同时用 IPP 软件进行了定量分析,发现结肠癌组织 E-钙粘蛋白表达量明显低于正常结肠组织 ($P < 0.05$),同时还发现在 50 例正常结肠组织中 GA 基因

表1 病例组和对照组基本临床特点

Table 1 The clinical characteristics of the studied CRC patients and normal controls [n(%)]

性别	大肠癌患者	正常对照	P值
男	216(60.0)	203(63.2)	0.386 ¹
女	144(40.0)	118(36.8)	
年龄(岁)			
>60	218(60.5)	185(57.6)	0.191 ¹
≤60	112(39.5)	136(42.4)	
范围	24~85	15~81	
平均年龄	62.18±12.68	59.38±18.21	0.225 ²
吸烟史			
有	143(39.7)	112(34.9)	0.182 ¹
无	217(60.3)	193(60.1)	
饮酒史			
有	147(40.8)	128(39.9)	0.799 ¹
无	213(60.2)	193(60.1)	
总计	360	321	

1: 双侧 χ^2 检验; 2: 双侧 *t* 检验。

表2 CDH1 启动子区域-347G→GA 基因多态性在大肠癌患者和正常对照中的分布特点

Table 2 The distribution of the CDH1 -347G→GA polymorphism between CRC patients and normal controls [n(%)]

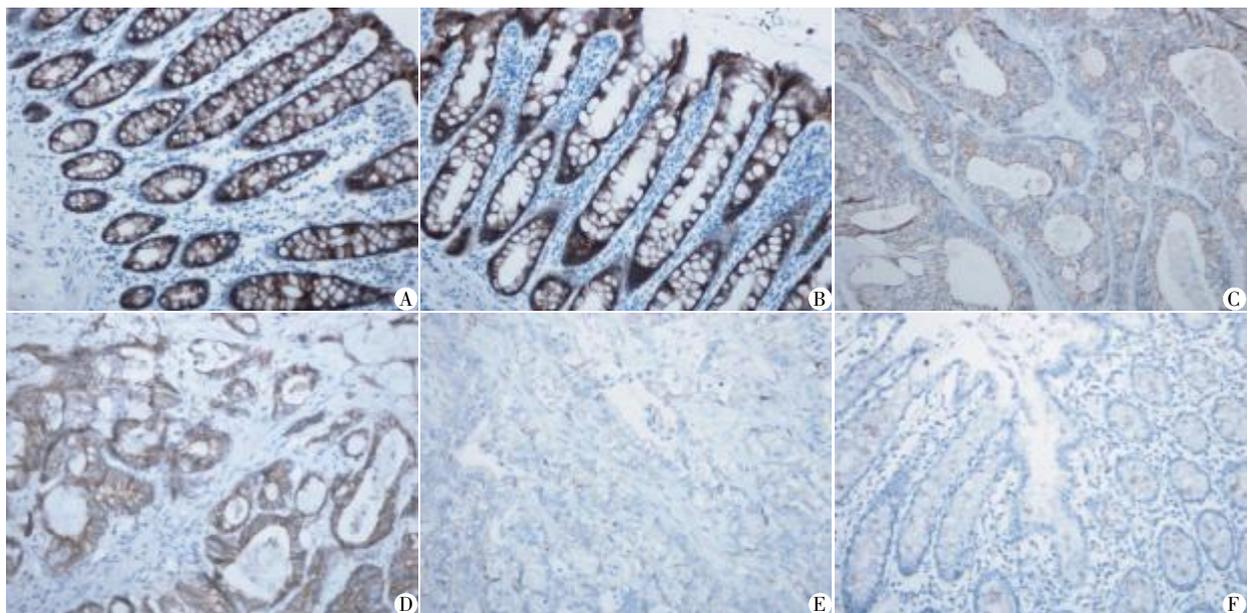
	GA-allele	G-allele	χ^2	P值
正常对照	136(42.4)	185(57.6)	1.109	0.316
大肠癌患者	167(46.4)	193(53.6)		

型和G基因型的E-钙粘蛋白表达无统计学差异($P > 0.05$),而在48例结肠癌组织中,GA基因型E-钙粘蛋白表达量则明显低于G基因型($P < 0.05$,图3)。

3 讨论

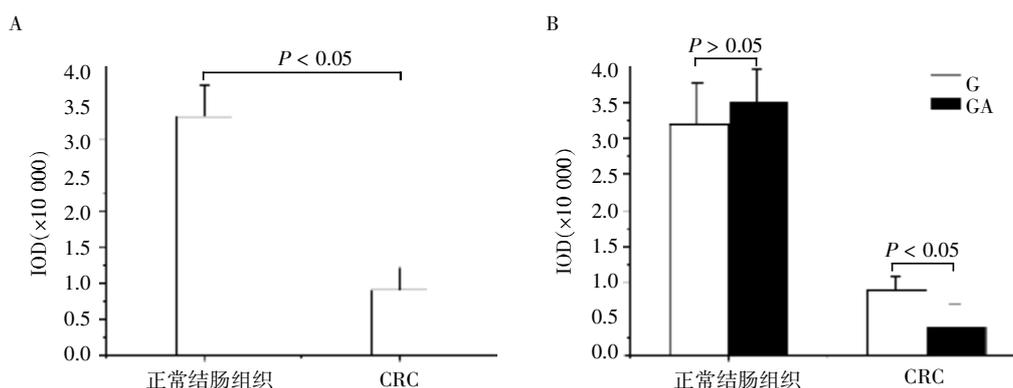
大肠癌高发于西方国家,但近年来亚洲地区大肠癌的发病率却不断攀升^[6],我国大肠癌发病率也已接近西方国家,而且具有年轻化趋势^[7]。然而大肠癌的病因学研究仍存在许多疑问,传统观点认为高脂饮食、摄入过多亚硝酸盐、吸烟和饮酒等环境因素因缺乏大样本的前瞻性研究被许多人所质疑^[8-9],越来越多的人将研究的目光转向遗传因素,包括后天的基因缺失、突变、甲基化和先天的各种基因型在人群中的分布差异这两方面^[10]。但后天的基因改变可能受某些环境因素的影响,而且很多问题并不能完全用基因的后天改变来解释^[11],因而某些特定的基因型在人群中的先天性分布差异和肿瘤易感性的研究成了肿瘤遗传病因学研究的新内容。

E-钙粘蛋白是分布于成熟组织上皮的跨膜糖蛋白,一方面通过胞外结构介导细胞间的连接,稳定细胞的组织结构^[1],另一方面胞内的 β -连环蛋白相结合调节细胞外信号向内的转导。其表达的减少不仅影响组织结构的稳定,还会使得胞内与之结合的 β -连环蛋白大量聚积,而 β -连环蛋白在胞内



A: E-钙粘蛋白在正常对照结肠组织(G/G基因型)中的表达; B: E-钙粘蛋白在正常对照结肠组织(GA/G基因型)中的表达; C: E-钙粘蛋白在中分化结肠癌组织(GA/G基因型)中的表达; D: E-钙粘蛋白在中分化结肠癌组织(G/G基因型)中的表达; E: E-钙粘蛋白在低分化结肠癌组织中的表达; F: 阴性对照。

图2 E-钙粘蛋白的免疫组化($\times 200$)Figure 2 Immunohistochemical stains for E-cadherin($\times 200$)



A: E-钙粘蛋白在正常结肠组织中表达明显高于结肠癌组织; B: 正常结肠组织中 GA 基因型和 G 基因型的 E-钙粘蛋白表达无统计学差异, 结肠癌组织中 GA 基因型的 E-钙粘蛋白表达低于 G 基因型。

图 3 E-钙粘蛋白在不同结肠组织中的表达

Figure 3 The expression of E-cadherin in normal colorectal tissue and CRC

的聚积被认为是肿瘤发生的 Wnt 信号通路中的主要事件之一^[12-13], 同时研究发现肿瘤上皮细胞中 E-钙粘蛋白表达较正常细胞有明显减少^[3], 故认为其减少与肿瘤的发生可能存在着一定的联系。E-钙粘蛋白表达减少的具体机制目前尚不得而知, 但已明确 CDH1 的启动子区域存在着多个单核苷酸基因多态性, 其中-347G→GA 被认为可能是一个功能基因多态性, 其 GA 基因型可能减低 CDH1 的转录活性, 从而减少 E-钙粘蛋白的表达, 因而考虑 CDH1 启动子区域-347G→GA 基因多态性可能与肿瘤的发生和发展存在着一定的联系。

已有相关文章报道了 CDH1 启动子区域-347G→GA 基因多态性与胃癌、食管癌、大肠癌之间的联系, 但研究结果并不一致^[14-20]。本研究的结果显示 GA 基因型在大肠癌患者总体中的比例和正常对照比较并无统计学差异, 也就是说 GA 基因型在本研究中并不增加大肠癌发病的风险。同时对正常结肠组织和结肠癌组织进行了免疫组化分析, 发现 GA 基因型和 G 基因型其 E-钙粘蛋白的表达在正常结肠组织之间并无差异, 然而在结肠癌组织中 GA 基因型其 E-钙粘蛋白的表达量明显低于 G 基因型, 提示-347G→GA 虽然与大肠癌的发生之间无确切联系, 但在肿瘤发生后其可能影响着 E-钙粘蛋白的表达, 进而影响大肠癌的发展和预后, 当然这还需要进一步的证据, 将选择特定的大肠癌细胞株进行体外培养, 通过 RNA 干扰来改变细胞的基因型, 然后观察肿瘤细胞的生物学特性。

肿瘤的发生发展并不是某个单一基因的改变所致, 而是由基因、环境、生活方式等多种因素综合所致^[21], 本研究提示 CDH1 启动子区域-347G→GA 基

因多态性并不增加大肠癌的发病风险, 但在肿瘤发生以后, 其 GA 基因型可能减少 E-钙粘蛋白的表达, 进而影响大肠癌的发生和预后。

[参考文献]

- [1] Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator [J]. Science, 1991, 251 (5000): 1451-1455
- [2] Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, et al. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma [J]. Nature, 1998, 392(6672): 190-193
- [3] Chen HC, Chu RY, Hsu PN, et al. Loss of E-cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinomas [J]. Cancer Lett, 2003, 201(1): 97-106
- [4] Nakamura A, Shimazaki T, Kaneko K, et al. Characterization of DNA polymorphisms in the E-cadherin gene (CDH1) promoter region [J]. Mutat Res, 2002, 502 (1-2): 19-24
- [5] Li LC, Chui RM, Sasaki M, et al. A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter alters transcriptional activities [J]. Cancer Res, 2000, 60(4): 873-876
- [6] WHO. World health statistics annual [R]. Geneva: WHO Databank, 2005
- [7] Zheng S, Cai SR. Colorectal cancer epidemiology and prevention study in china [J]. The Chinese-German J Clin Oncol, 2003, 2(16): 72-75
- [8] Flood A, Velie EM, Sinha R, et al. Meat, fat, and their subtypes as risk factors for colorectal cancer in a prospective cohort of women [J]. Am J Epidemiol, 2003, 158(1): 59-68
- [9] Alexander DD, Cushing CA, Lowe KA, et al. Meta-analysis of animal fat or animal protein intake and colorectal

cancer[J]. Am J Clin Nutr, 2009, 89(5): 1402-1409

[10] Marth G, Yeh R, Minton M, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the public domain: how useful are they? [J]. Nat Genet, 2001, 27(4): 371-372

[11] Garinis GA, Menounos PG, Spanakis NE, et al. Hypermethylation-associated transcriptional silencing of E-cadherin in primary sporadic colorectal carcinomas [J]. J Pathol, 2002, 198(4): 442-449

[12] Novak A, Hsu SC, Leung-hagesteijn C, et al. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(8): 4374-4379

[13] Pennisi E. How a growth control path takes a wrong turn to cancer [J]. Science, 1998, 281(5384): 1438-1441

[14] Shin Y, Kim IJ, Kang HC, et al. The E-cadherin -347G→GA promoter polymorphism and its effect on transcriptional regulation [J]. Carcinogenesis, 2004, 25(6): 895-899

[15] Shin Y, Kim IJ, Kang HC, et al. A functional polymorphism (-347G→GA) in the E-cadherin gene is associated with colorectal cancer [J]. Carcinogenesis, 2004, 25(11): 2173-2176

[16] 张秀凤, 王益民, 王 瑞; 等. E-钙粘蛋白基因多态性与食管癌、贲门癌的关系 [J]. 癌症, 2005, 24(5): 513-519

[17] Zhang B, Pan K, Liu Z, et al. Genetic polymorphisms of the E-cadherin promoter and risk of sporadic gastric carcinoma in Chinese populations [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(9): 2402-2408

[18] Li HC, Albert JM, Shinohara ET, et al. E-cadherin promoter polymorphisms are not associated with the aggressiveness of prostate cancer in Caucasian patients [J]. Urol Oncol, 2006, 24(6): 496-502

[19] Kiemene LA, Van HK, Bogaerts M, et al. Polymorphisms in the E-cadherin (CDH1) gene promoter and the risk of bladder cancer [J]. Eur J Cancer, 2006, 42(18): 3219-3227

[20] Li Y, Liang J, Kang S, et al. E-cadherin gene polymorphisms and haplotype associated with the occurrence of epithelial ovarian cancer in Chinese [J]. Gynecol Oncol, 2008, 108(2): 409-414

[21] Lee-chen GJ, Liu KP, Lai YC, et al. Significance of the tissue kallikrein promoter and transforming growth factor-beta1 polymorphisms with renal progression in children with vesicoureteral reflux [J]. Kidney Int, 2004, 65(4): 1467-1472

[收稿日期] 2012-11-11

我刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆
<http://jnmu.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
 审理情况。