

FAT4 基因功能性单核苷酸多态性和中国江苏人群胃癌易感性相关

成建国^{1,2}, 朱 陈¹, 杜江波¹, 戴宁彬¹, 胡志斌^{1*}

(¹南京医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系, 江苏 南京 210029; ²吴中区角直镇人民医院普外科, 江苏 苏州 215127)

[摘要] 目的:探讨 FAT4 基因单核苷酸多态性与江苏人群胃癌遗传易感性的关系。方法:采用人群为基础的病例对照研究对来自江苏的 783 例经组织病理学确诊的胃癌新发病例和按照性别年龄匹配的 855 例健康对照,利用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)方法对 FAT4 基因上非同义氨基酸多态性位点进行基因分型,比较各位点不同基因型与胃癌发病风险的关系。结果:利用 Logistic 回归模型在相加模型中进行了分析的结果显示,在调整性别、年龄、吸烟和饮酒等因素后,携带 rs1039808 A 等位基因的个体胃癌发病风险显著低于携带野生纯合子(GG)的个体(OR = 0.74, 95%CI:0.62~0.88, P = 0.001)。分层分析显示,在各亚组间 rs1039808 不同基因型与胃癌发病风险的关联强度没有显著差异。结论:FAT4 基因单核苷酸多态性rs1039808 A 等位基因能显著降低胃癌发病风险。

[关键词] FAT4 基因;多态性;胃癌;遗传易感性

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)11-1638-05

doi:10.7655/NYDXBNS20131139

Nonsynonymous polymorphisms in FAT4 gene are associated with the risk of gastric cancer in a Jiangsu population

Cheng Jianguo^{1,2}, Zhu Chen¹, Du Jiangbo¹, Dai Ningbin¹, Hu Zhibin^{1*}

(¹Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, NJMU, Nanjing 210029; ² Department of General Surgery, People's Hospital of Luzhi, Suzhou 215127, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the association between nonsynonymous polymorphisms (rs1039808, rs12508222, rs1567047 and rs1014867) in FAT4 gene and the risk of gastric cancer. **Methods:** A case-control study of 783 gastric cancer cases and 855 controls was conducted in a Chinese population of Jiangsu Province using the TaqMan allelic discrimination assay on the ABI 7900 system. **Results:** We found that A allele of rs1039808 (Ala807Val) was significantly associated with a decreased risk of gastric cancer risk in additive model after adjusted by age, sex, smoking and drinking status (OR = 0.74, 95%CI:0.62~0.88, P = 0.001). Similar association strengths were shown between all subgroups for rs1039808 (P>0.05 for heterogeneity test). **Conclusion:** These findings indicate that the nonsynonymous variants rs1039808 (Ala807Val) of FAT4 may contribute to gastric cancer susceptibility in a Chinese population of Jiangsu Province.

[Key words] FAT4; polymorphism; gastric cancer; susceptibility

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(11): 1638-1642]

胃癌是全球发病率最高的癌症之一,2008 年全球新发胃癌病例 989 600 例,其发病率在全球排第

4 位。中国是胃癌的高发区,2008 年中国胃癌发病率在男性中达 41.3/10 万,女性中为 18.5/10 万,均高于世界水平^[1-2]。胃癌的形成是一个多阶段的过程,目前发现的危险因素有吸烟、饮酒和膳食营养状况等^[3]。幽门螺杆菌(HP)是胃癌已经明确的致病因素,被世界卫生组织和美国国立卫生研究院列为胃癌的首要致癌因子。据统计,全球有 40%~80%的人

[基金项目] 国家自然科学基金(81001276,81072380);江苏省自然科学基金(BK2008221)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:zhibin_hu@njmu.edu.cn

都是幽门螺杆菌携带者,但是其中仅有 3%的人最终会发生胃癌。因此,遗传因素可能在胃癌的发生中具有重要作用^[4-6]。

FAT 肿瘤抑制基因同源体 4(*FAT4*)是 Hippo 信号通路的一个关键调控因子。Hippo 信号通路是新发现的生长控制信号通路,能够限制细胞的生长增殖,诱导细胞凋亡,而且可能与肿瘤发生有关^[7-10]。研究发现 Hippo 信号通路在多种肿瘤中均有异常调控,并且在胃癌中也有研究证实^[11-12]。*FAT4* 基因在 Hippo 信号通路上游作为一种跨膜蛋白受体发挥生物学功能。*FAT4* 基因在多种组织中均有表达,并且可能在胃肠道发育过程中发挥重要作用^[13-15]。有外显子测序研究发现胃癌组织中存在大量 *FAT4* 基因的非同义突变^[16]。但是,目前还没有研究对位于 *FAT4* 基因上的遗传变异与胃癌发生的关系进行过探讨。

基于上述研究发现,在人群水平上对 *FAT4* 基因上遗传变异与胃癌的易感性进行关联研究,发现新的胃癌易感性标志物具有重要的生物学和公共卫生学意义。因此,本研究采用病例对照研究设计,应用实时荧光定量 PCR 技术,对 783 例江苏地区胃癌病例和年龄、性别匹配的 855 例健康对照 *FAT4* 基因 4 个非同义氨基酸改变的多态性位点进行检测,探讨 *FAT4* 基因 4 个非同义氨基酸突变多态性与中国江苏人群胃癌易感性的关联研究。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究中,783 例病例均来自于南京医科大学第一附属医院和苏北人民医院 2006~2010 年经过组织病理学确诊的胃癌患者。同时以年龄和性别作为匹配因素在南京市社区和常州农村地区人群选择无肿瘤病史的健康对照 855 例。对所有研究对象都使用统一设计的生活状况与健康调查表进行问卷面

访,调查内容包括:一般情况、吸烟、饮酒等其他信息。吸烟的定义为:每天至少吸烟 1 支持续 1 年以上者为吸烟者,否则为非吸烟者;凡每周至少饮酒 2 次持续 6 个月以上者定义为饮酒者,否则为非饮酒者。数据录入前核查调查表,查漏补缺;采用双轨录入数据,逻辑检查纠正后进行统计分析。调查后每个对象均采集静脉 EDTA 抗凝血 5 ml。

1.2 方法

1.2.1 *FAT4* 基因多态性位点的选择

多态性位点的选择均参照 dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) 和 HapMap database (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库。选择标准如下:①非同义氨基酸突变;②在中国人群中最小等位基因频率大于 0.05;③所选位点见没有高连锁不平衡 ($r^2 > 0.8$)。按照此标准有 4 个多态性位点满足要求,分别是:rs1039808 (Ala807Val)、rs12508222 (Asp2826Asn)、rs1567047 (Gly3524Asp) 和 rs1014867 (Pro4972Ser)。

1.2.2 DNA 提取和基因分型

外周血 DNA 提取采用传统酚氯仿抽提法,基因分型使用 ABI 7900HT 型荧光定量 PCR 仪进行基因分型,探针和引物详细信息见表 1。每块 384 孔反应平板中 5 μ l 反应体系,含有 MasterMix 2 μ l,正、反向引物各 0.25 μ l, TaqMan 探针各 0.125 μ l, DNA 样本 0.5 μ l, 双蒸水 1.25 μ l。采用高透光度盖膜覆盖反应板,短暂离心以去除气泡,装入 ABI7900 荧光定量 PCR 仪上进行分型检测。反应条件为 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 循环次数为 45 次。扩增循环结束后,读取扩增后荧光信号,运用 SDS2.0 软件进行基因型判读,将最终基因型数据导出后与基线信息合并为数据库用于后续分析。实验过程中,技术员对病例对照分组和基因型判读采用盲法。

1.3 统计学方法

表 1 *FAT4* 多态性位点探针引物基本信息

Table 1 The primers and probes of genotyping for *FAT4* polymorphisms

位点	引物	探针
rs1039808	sense 5'-GGTTGCCTACAGCTTTGTGCTT-3'	A allele FAM-TTGAGA ACGTGCTGCT-MGB
	antisense 5'-CCTTTCTGATCCCCAGTAGTAATGA-3'	G allele HEX-TGAGAACGTGGCGCT-MGB
rs12508222	sense 5'-CGGTCTGTATCTTCCCTATTTAAAGG-3'	C allele FAM-TTATGACAATATCCCC-MGB
	antisense 5'-TGCAAGTCTTCCATTTACAATTAATCC-3'	T allele HEX-TTATGACAATATTCCTGTGC-MGB
rs1567047	sense 5'-CCTTGATTTGGAGGGAGATCAG-3'	G allele FAM-CATCACCAAAGTGCCT-MGB
	antisense 5'-GGAGAAGTCATGGAAAACAAACG-3'	A allele HEX-TCATCACCAAAGTGTCT-MGB
rs1014867	sense 5'-AGCAAATGAAGAAGGCAAAGCT-3'	C allele FAM-AACTAAACCACTCCCCA-MGB
	antisense 5'-GTGCCAGTACATAAACTTCACACATACT-3'	T allele HEX-AACTAAACCACTCTCCA-MGB

所有数据分析均使用统计软件 Stata10.0 (Stata, College Station, TX)。病例组和对照组的人口学数据、基因型和等位基因频数分布比较采用 χ^2 检验。FAT4 基因各多态性位点不同基因型与胃癌发病风险之间的关系, 采用 Logistic 回归计算 OR 值和其 95% 可信区间。用拟合优度 χ^2 检验比较对照人群的实测基因型频率和理论频率, 检测人群 Hardy-Weinberg 平衡情况。采用基于 χ^2 的 Q 检验进行亚组间异质性检验^[17]。

2 结果

2.1 研究对象的一般特征

参与本研究的所有受试者一般情况见表 2。病例组和对照组间的年龄、性别、吸烟和饮酒情况分布均没有统计学差异。各多态性位点 rs1039808、rs12508222、rs1567047 和 rs1014867 的基因分型成功率分别为 96.78%、99.30%、98.02% 和 99.86%。

2.2 FAT4 基因多态性位点分型结果

各位点基因型分布情况详见表 3。对照组中所有位点均符合 Hardy-Weinberg 平衡(rs1039808: $P = 0.550$; rs12508222: $P = 0.994$; rs1567047: $P = 0.317$; rs1014867: $P = 0.087$)。为了探讨各位点与胃癌发病风险的关系, 本研究利用 Logistic 回归模型在相加

表 2 胃癌病例和对照的一般特征

因素	病例组 (n=855)	对照组 (n=783)	P
年龄 (岁)			0.576
< 60	340(43.4)	383(44.8)	
≥60	443(56.6)	472(55.2)	
性别			0.378
男	579(74.0)	616(72.1)	
女	204(26.0)	239(27.9)	
吸烟情况			0.586
非吸烟者	396(54.5)	454(53.1)	
吸烟者	331(45.5)	401(46.9)	
饮酒情况			0.115
非饮酒者	515(70.9)	575(67.3)	
饮酒者	211(29.1)	280(32.7)	

模型中进行了分析, 结果显示携带 rs1039808 A 等位基因的个体胃癌发病风险要显著低于携带野生纯合子(GG)的个体(OR = 0.74, 95%CI: 0.62~0.88, $P = 0.001$)。而本研究未发现 rs12508222、rs1567047 和 rs1014867 多态位点与胃癌发病风险存在统计学关联。

为了进一步探讨不同亚组间 rs1039808 多态与胃癌发病风险的关联情况, 分别以年龄、性别、吸烟

表 3 FAT4 基因多态性位点的基因型分布与胃癌发病风险

多态性位置(氨基酸改变)	基因型	病例组	对照组	OR (95% CI)	P 值
外显子 1(Ala807Val)	rs1039808	n=744	n=814		
	GG	463(62.2)	449(55.2)	1.00	
	GA	257(34.5)	845(38.8)	0.80(0.65~0.99)	0.044
	AA	24(3.2)	49(6.0)	0.40(0.23~0.70)	0.001
	相加模型			0.74(0.62~0.88)	0.001
外显子 9(Asp2826Asn)	rs12508222	n=2 131	n=2, 250		
	GG	1 572(73.8)	1 665(74.0)	1.00	
	GA	519(24.4)	541(24.0)	0.99(0.78~1.26)	0.964
	AA	40(1.9)	44(2.0)	1.39(0.68~2.87)	0.361
	相加模型			1.04(0.85~1.28)	0.665
外显子 9(Gly3524Asp)	rs1567047	n=775	n=831		
	CC	256(33.0)	287(34.5)	1.00	
	CT	382(49.3)	424(51.0)	1.02(0.82~1.27)	0.835
	TT	137(17.7)	120(14.5)	1.29(0.95~1.75)	0.101
	相加模型			1.11(0.96~1.29)	0.160
外显子 17(Pro4972Ser)	rs1014867	n=765	n=853		
	CC	654(85.5)	706(82.8)	1.00	
	CT	107(14.0)	137(16.1)	0.83(0.62~1.10)	0.185
	TT	4(0.5)	10(1.2)	0.47(0.14~1.51)	0.205
	相加模型			0.80(0.62~1.03)	0.080

调整年龄、性别、吸烟和饮酒状态后的 Logistic 回归模型。

和饮酒 4 个因素进行了分层分析。结果显示, rs1039808 多态位点与胃癌发病风险在年龄、性别、吸烟和饮酒 4 个因素不同亚组间显著性水平经异质性检验均没有达到显著水平, 异质性检验的 *P* 值分

别为 0.379、0.154、0.067 和 0.948(表 4)。

3 讨论

本研究采用人群为基础的病例对照设计, 在

表 4 多态性位点 rs1039808 与胃癌发病风险的分层分析

Table 4 Stratified analyses of associations between rs1039808 and gastric cancer risk

因素	rs1039808(GG/GA/AA) ^a		OR (95% CI) ^b	<i>P</i> 值	<i>P</i> 值
	病例组	对照组			
年龄 (岁)					
< 60	207/108/9	204/142/25	0.67(0.51~0.89)	0.005	
≥60	256/149/15	245/174/15	0.79(0.62~1.00)	0.047	0.379
性别					
男	333/197/19	336/218/31	0.86(0.70~1.05)	0.114	
女	130/60/5	113/98/18	0.63(0.40~0.85)	0.002	0.154
吸烟情况					
非吸烟者	237/134/7	223/174/28	0.63(0.49~0.81)	0.001	
吸烟者	190/109/12	226/142/21	0.88(0.68~1.13)	0.324	0.067
饮酒情况					
非饮酒者	299/180/15	292/217/35	0.74(0.60~0.91)	0.005	
饮酒者	127/63/4	157/99/14	0.75(0.53~1.05)	0.098	0.948

a:野生纯合子/杂合子/突变纯合子;b:调整年龄、性别、吸烟和饮酒状态后的 logistic 回归模型;c:异质性检验(基于 $\chi^2 Q$ 检验)。

783 例胃癌病例和 855 例健康对照中对 *FAT4* 基因的功能性多态位点与胃癌发病风险进行了关联分析。本研究发现, rs1039808 A 等位基因能显著降低胃癌发病风险。迄今为止, 本研究是第一篇关于 *FAT4* 基因单核苷酸多态性与胃癌易感性研究的报道。

越来越多研究, 包括组织表达研究、动物模型研究和外显子测序研究表明, *FAT4* 基因可能是一种重要的肿瘤抑制基因。该基因主要是作为平面细胞极性调节通路(planar cell polarity, PCP)的上游调控子, 通过抑制组织稳态调节蛋白的异常调节发挥其抑癌功能^[8, 16, 18-20]。此外, 还有研究显示, *FAT4* 基因是 Hippo 信号通路的重要成员。Hippo 通路不仅对细胞接触抑制和组织器官大小发挥重要调控作用, 而且对肿瘤发生过程有重要影响^[7-9], *FAT4* 基因可能通过影响 Hippo 信号通路的正常调控进而发挥对肿瘤发生的影响。本研究从人群水平为 *FAT4* 基因与胃癌发生发展之间的关系提供了遗传学的证据, 同时也进一步证明 *FAT4* 基因在肿瘤发生过程中的重要作用。

单核苷酸多态性位点 rs1039808 位于 *FAT4* 基因的第 1 外显子, 并且能引起该基因第 807 密码子丙氨酸到缬氨酸的改变。生物体内发生的非同义突变大多数属于有害突变, 只有少数是中性或有利突变^[21], 本研究发现的 rs1039808 对于胃癌发病

风险是保护因素, 目前该位点的变异影响胃癌发生的确切机制还没有研究报道。但是, 一种可能的解释是该位点所引起的氨基酸改变可能会影响其配体受体的特异性和亲和力, 从而引起 PCP 信号通路和 Hippo 信号通路的异常调控, 最终影响到胃癌的发生。但是, 这种判断还缺乏实验研究的证实, 所以需要在今后的功能学实验研究中进行验证。

本研究还有一些局限性, 例如, 仅对 *FAT4* 基因的非同义氨基酸突变的多态位点进行了研究而没有对 5'和 3'非翻译区的潜在功能性位点进行研究。而这些位点也可能对胃癌发生具有生物学作用。此外, 本研究只对 783 个病例和 855 个对照进行了分型, 样本量相对较小, 而且, 本研究的发现没有在其他独立的样本中进行验证, 因此还需要其他大样本独立的研究对本研究的结果进行验证。

综上所述, 本研究以人群为基础的病例对照设计, 首次发现 *FAT4* 基因非同义氨基酸突变 rs1039808 能够影响胃癌发生风险。但是这一发现还需要在今后的功能研究中来阐明该发现的潜在生物学机制。

[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] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. GLOBOCAN 2008, Cancer incidence and mortality worldwide; IARC Cancer Base

- No. 10[EB/OL]. [2010-12-12]. <http://globocan.iarc.fr>.
- [3] Sasazuki S, Sasaki S, Tsugane S. Cigarette smoking, alcohol consumption and subsequent gastric cancer risk by subsite and histologic type [J]. *Int J Cancer*, 2002, 101(6):560-566
- [4] Peek RM, Jr, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(1):28-37
- [5] Stellman SD, Wang QS. Cancer mortality in Chinese immigrants to New York City. Comparison with Chinese in Tianjin and with United States-born whites [J]. *Cancer*, 1994, 73(4):1270-1275
- [6] Gomez SL, Le GM, Clarke CA, et al. Cancer incidence patterns in Koreans in the US and in Kangwha, South Korea [J]. *Cancer Causes Control*, 2003, 14(2):167-174
- [7] Harvey K, Tapon N. The Salvador-Warts-Hippo pathway-emerging tumour-suppressor network [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(3):182-191
- [8] Pan D. Hippo signaling in organ size control [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(8):886-897
- [9] Zeng Q, Hong WJ. The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(3):188-192
- [10] Cho E, Feng Y, Rauskolb C, et al. Delineation of a Fat tumor suppressor pathway [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(10):1142-1150
- [11] Bao Y, Hata Y, Ikeda M, et al. Mammalian Hippo pathway: from development to cancer and beyond [J]. *J Biochem*, 2011, 149(4):361-379
- [12] Lam-Himlin DM, Daniels JA, Gayyed MF, et al. The hippo pathway in human upper gastrointestinal dysplasia and carcinoma: a novel oncogenic pathway [J]. *Int J Gastrointest Cancer*, 2006, 37(4):103-109
- [13] Willecke M, Hamaratoglu F, Kango-Singh M, et al. The fat cadherin acts through the hippo tumor-suppressor pathway to regulate tissue size [J]. *Curr Biol*, 2006, 16(21):2090-2100
- [14] Saburi S, Hester I, Fischer E, et al. Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(8):1110-1115
- [15] Mao Y, Mulvaney J, Zakaria S, et al. Characterization of a Dchs1 mutant mouse reveals requirements for Dchs1-Fat4 signaling during mammalian development [J]. *Development*, 2011, 138(5):947-957
- [16] Zang ZJ, Cutcutache I, Poon SL, et al. Exome sequencing of gastric adenocarcinoma identifies recurrent somatic mutations in cell adhesion and chromatin remodeling genes [J]. *Nat Genet*, 2012, 44(5):570-574
- [17] Higgins JP, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis [J]. *Stat Med*, 2002, 21(11):1539-1558
- [18] Simons M, Mlodzik M. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease [J]. *Annu Rev Genet*, 2008, 42:517-540
- [19] Strutt D. The planar polarity pathway [J]. *Curr Biol*, 2008, 18(19):R898-R902
- [20] Nikolaev SI, Rimoldi D, Iseli C, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma [J]. *Nat Genet*, 2011, 44(2):133-139
- [21] 李 易. 基因进化的同义与非同义替代计算及统计检验的比较分析 [J]. *化学与生物学研究*, 2006, 25(6):1-7

[收稿日期] 2013-05-16