

CyclinA2 基因 5'-UTR 多态性与结直肠癌遗传易感性的关系

王琦¹, 黄俊^{1△}, 邱强¹, 黄明文¹, 周诚亮²

(1. 南昌大学第二附属医院胃肠外科, 南昌 330006; 2. 江西省奉新县中医院普外科, 奉新 330700)

摘要:目的 探讨 CyclinA2 基因 5'-UTR 区 rs769236 位点多态性与结直肠癌易感性的关系。方法 采用病例-对照研究, 收集 150 例结直肠癌患者及 150 例健康对照者, 以聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法(PCR-RFLP)检测 CyclinA2 基因 rs769236 位点单核苷酸多态性。rs769236 多态性与结直肠癌发病风险的关系采用非条件 logistic 回归分析。结果 与 rs769236 GG 野生基因型相比, rs769236 突变基因型(GA+AA)携带者罹患结直肠癌的风险显著增高(校正 OR=1.92, 95% CI=1.10~3.36)。结论 CyclinA2 基因 rs769236 多态性与 CRC 发病风险增高显著有关, 突变基因型(GA+AA)是人群罹患结直肠癌的独立危险因素。

关键词:结直肠癌; CyclinA2; 单核苷酸多态性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.01.022

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)01-0065-03

Association between CyclinA2 gene 5'-UTR polymorphism and genetic susceptibility of colorectal cancer

Wang Qi¹, Huang Jun^{1△}, Qiu Qiang¹, Huang Mingwen¹, Zhou Chengliang²

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University,

Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Department of General Surgery, the Fengxin County

Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fengxin, Jiangxi 330700, China)

Abstract: Objective To investigate the association between the rs769236 polymorphism at the 5'-UTR region of CyclinA2 gene and the susceptibility of colorectal cancer(CRC). **Methods** A case-control study was carried out on the Chinese Han population, the rs769236 polymorphism of CyclinA2 were analyzed by PCR restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) in 150 CRC cases and 150 healthy controls. The association between CRC risk and the SNP(rs769236) was estimated by an unconditional logistic regression model. **Results** Compared with GG wild genotype, variant genotypes(GA+AA) carriers had a significantly increased risk of CRC[adjusted odds ratio (OR)=1.92, 95% confidence interval(CI)=1.10-3.36]. **Conclusion** The current results suggested that the SNP(rs769236) of CyclinA2 is significantly associated with the increased risk of CRC, the variant genotypes(GA+AA) are the independent risk factors of CRC in Chinese Han population.

Key words: colorectal cancer; CyclinA2; single nucleotide polymorphisms

结直肠癌是一种常见的恶性肿瘤,其发病率在全球范围内占恶性肿瘤的第3位^[1],近年来,随着人民生活方式及饮食习惯的改变,我国已进入结直肠癌的高发地区行列,并以年均4%的增幅不断攀升,已经接近西方发达国家的水平^[2]。结直肠癌的发生、发展不仅与遗传和环境有关,而且也是一个多基因变化、多阶段发展的过程。近年来,随着对细胞分子生物学的不断研究,人们已逐步认识到,细胞周期的调控异常与肿瘤的发生有着密切的关系,细胞周期调节紊乱易使细胞异常增殖,一旦增殖和凋亡的平衡被打破,便导致了肿瘤的发生。细胞周期素 A2(CyclinA2)即通常所说的 CyclinA,在细胞周期进程中起正性调控作用。目前,国内外均有研究表明, CyclinA2 的高表达与结直肠癌的发生、发展有关^[3-4],但具体的分子机制还不清楚。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性,有研究表明,位于启动子区域的 SNP 通常对疾病的发生、发展会产生重大影响。最近国外有研究发现, CyclinA2 基因 5'-UTR 区 rs769236 位点 G>A 多态性与结直肠癌的易感性有关联^[5],但到目前为止,尚无关于 CyclinA2 rs769236 位点 G>A 多态性与结直肠癌发病风险的相关性的报道。本文将重点讨论 CyclinA2 基因 5'-UTR 区 rs769236 位

点 G>A 多态性与结直肠癌易感性之间的关系,为结直肠癌的早期诊断、治疗及判断预后提供新的思路 and 手段。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例组选自 2012 年 1~9 月在南昌大学第二附属医院确诊为结直肠癌的患者,共 150 例,排除家族性腺瘤性息肉病和遗传性结直肠癌;对照组为同一时期来本院健康体检的人群,均证实为身体健康,共 150 例。病例组和对照组无年龄、性别的限制,并证实均为无血缘关系的汉族人口;正常对照按年龄(±5 岁)、性别等方面与病例频数匹配。研究对象签署知情同意后,采用统一的流行病学调查问卷,收集整理结直肠癌组和健康对照组临床病理资料,记录年龄、性别、吸烟、饮酒、肿瘤家族史等情况。吸烟、饮酒史:参照国际惯例,既往吸烟累计少于 100 支烟者定义为不吸烟者,超过 100 支者为吸烟者;1 周至少饮酒 1 次、累计时间 1 年以上者定义为有饮酒史,没达到这一标准为不饮酒者。肿瘤家族史:一级亲属和/或二级亲属患有癌症者定义为有癌症家族史,否则就定义为无。分别抽取病例组和健康对照组清晨外周静脉血 2 mL, EDTA-Na 抗凝,用于 PCR 检测。

1.2 PCR-RFLP 技术检测 cyclinA2 基因型

1.2.1 DNA 提取 采用 DNA 提取试剂盒(北京全式金生物

技术公司),提取每份抗凝外周血的总 DNA,操作均按说明书进行,将提取好的 DNA 溶解于 pH8.0 TE 中,-20 ℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 PCR(PCR 试剂购自 Takara 公司)扩增含有 rs769236(G>A)位点的片段:上游引物 5'-CGC TCA CTA GGT GGC TCA G-3'和下游 5'-CCG AGG AGG TTG CGA AAG G-3'(南京金斯瑞生物科技有限公司合成)。PCR 反应在 20 μL 体系中进行,反应条件:95 ℃ 预变性 5 min,然后 95 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.3 PCR 产物凝胶回收 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,然后切胶回收,操作均按琼脂糖凝胶回收试剂盒(Promega 公司)说明书进行操作。

1.2.4 酶切反应 建立 20 μL 酶切反应体系,其中双蒸水 10 μL,缓冲液 2 μL,PCR 回收产物 7 μL,Bgl I 内切酶(Fermentas 公司)1 μL,37 ℃ 恒温 2 h,酶切产物以含溴化乙锭(EB)的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像系统成像。PCR 扩增片段为 342 bp,GG 基因型能被 Bgl I 内切酶酶切产生 2 个片段(259 bp,83 bp),杂合子 GA 基因型则产生 3 个片段(342 bp、259 bp 和 83 bp),AA 基因型只产生 1 个片段(342 bp)。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,采用 χ^2 检验比较结直肠癌组和对照组的人口学数据、基因型以及等位基因频数分布。以单因素和多因素 logistic 回归计算比值比(OR)及其 95% 可信区间(95%CI),分析各基因型与结直肠癌发病风险的关系。以拟合优度 χ^2 检验计算 SNP 位点各基因型在对照组中的分布是否符合哈迪-温伯格遗传平衡定律(HWE)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况比较 结直肠癌组和对照组比较,年龄、性别、吸烟、饮酒分布差异无统计学意义($P > 0.05$);有肿瘤家族史者在两组间分布差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 结直肠癌组和对照组一般情况的比较[n(%)]

变量	结直肠癌组	健康对照组	χ^2	P
年龄			0.053	0.817
≥60 岁	74(49.3)	72(48.0)		
<60 岁	76(50.7)	78(52.0)		
性别			0.926	0.336
男	100(66.7)	92(61.3)		
女	50(33.3)	58(38.7)		
吸烟史			0.912	0.340
是	60(40.0)	52(34.7)		
否	90(60.0)	98(65.3)		
饮酒史			3.647	0.056
是	64(42.7)	48(32.0)		
否	86(57.3)	102(68.0)		
肿瘤家族史			6.108	0.013
是	29(19.3)	14(9.3)		
否	121(80.7)	136(90.7)		

2.2 CyclinA2 基因多态性与结直肠癌易感性的关系 对照组中 CyclinA2 基因 rs769236(5'-UTR G>A)各基因型分布频率符合 HWE 定律($\chi^2 = 3.14, P = 0.08$)。Logistic 回归分析,rs769236G>A 突变基因型(GA+AA)者患结直肠癌的风险显著高于 rs769236GG 野生基因型的个体(校正 OR = 1.92,95%CI = 1.10~3.36),见表 2。

2.3 分层分析 按年龄、性别、吸烟、饮酒史和肿瘤家族史进一步分层分析,结果发现 CyclinA2 基因 rs769236 位点多态性与结直肠癌发病风险之间的关联在无肿瘤家族史中的作用更为明显(OR = 2.01,95%CI = 1.10~3.65, $P = 0.023$),其他组别中,差异无统计学意义,见表 3。

表 2 CyclinA2 基因多态性与结直肠癌发病风险[n(%)]

基因型	结直肠癌组	健康对照组	OR(95%CI)	校正 OR(95%CI)*
rs769236				
GG	28(18.7)	44(29.3)	1	1
GA	66(44.0)	84(56.0)	1.24(0.70~2.19)	1.36(0.74~2.49)
AA	56(37.3)	22(14.7)	4.00(2.02~7.93)	2.00(1.41~2.84)
GA+AA	122(81.3)	106(70.7)	1.81(1.05~3.11)	1.92(1.10~3.36)

*:校正年龄、性别、吸烟、饮酒史和肿瘤家族史。

表 3 rs769236 多态性与结直肠癌易感性的分层分析

变量	GG 基因型 病例/对照	GA+AA 基因型 病例/对照	校正 OR* (95%CI)	P
年龄(岁)				
≥60	15/21	59/51	1.74(0.77~3.93)	0.183
<60	13/23	63/55	2.10(0.96~4.62)	0.064
性别				
男	19/27	81/65	1.93(0.96~3.89)	0.066
女	9/17	41/41	1.90(0.73~4.89)	0.187
吸烟史				
是	9/13	19/31	2.14(0.79~5.80)	0.134
无	51/39	71/67	1.84(0.93~3.65)	0.080
饮酒史				
是	15/19	49/29	2.34(0.99~5.54)	0.054
无	13/25	73/77	1.74(0.82~3.68)	0.150
肿瘤家族史				
有	6/3	23/11	2.38(0.35~16.02)	0.373
无	22/41	99/95	2.01(1.10~3.65)	0.023

*:校正年龄、性别、吸烟、饮酒史和肿瘤家族史。

3 讨 论

结直肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其发生机制仍未完全阐明。目前研究发现,细胞周期的调控异常使一些正常细胞异常增殖并逃避机体免疫系统监视而异常存活在结直肠癌的发生和发展中可能起重要作用。细胞周期的运行主要是由细胞周期素(cyclin)、细胞周期素依赖性激酶(Cyclin-dependent kinase,CDK)和细胞周期素依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitor,CKI)所调控的。Cyclin 可时相性激活相应的 CDK,以 cyclin-CDK 复合物形式磷酸化一系列靶蛋白,调节细胞周期的运转;而 CKI 即可与 cyclin-CDK 复合物结合,也可与 CDK 单独结合而发挥抑制作用。CyclinA2 基因定位于人类染色体 4q27 上,编码产生含 432 个氨基酸的 CyclinA2 蛋白,于 G1 晚期开始合成,其含量在 S 期逐渐增加,并于 G₂/M 期达到高峰,在 M 中后期降解。CyclinA2 在细胞周期调控中起重要的作用,可分别与 CDK1 和 CDK2 结合,不仅可以促进细胞周期的转换(当与 CDK2 相结合时可促进 G₁/S 期检查点的转换,当与 CDK1 结合时则可促进 G₂/M 期检查点的转化),而且还具有调节 DNA 合成和促进细胞有丝分裂的双重作用^[6]。

CyclinA2 不仅在结直肠癌组织中表达明显上调,而且在

非小细胞肺癌、乳腺癌^[7]、胃癌^[8]、白血病等多种恶性肿瘤中也存在高表达,并与这些肿瘤的预后、分期及复发密切相关。CyclinA2 基因转录异常是 CyclinA2 在肿瘤组织中异常高表达的重要机制,有研究表明,位于基因启动子区域的 SNP 通常能影响基因的表达或酶的活性^[9]。最近一项韩国人群的病例对照研究发现,CyclinA2 基因 rs769236G>A 多态性位点位于转录起始点(+1G>A),+1A 变异等位基因通过改变核心启动子特异序列影响转录因子 TF II D 与核心启动子结合从而上调 CyclinA2 表达。他们还发现 AA 基因型可明显增加结直肠癌的发病风险(校正 OR=1.67,95%CI=1.12~2.49),并通过荧光素酶报告实验证实含有+1A 变异等位基因的启动子转录活性明显提高^[5]。与上述研究类似,作者研究也发现 CyclinA2 基因+1G>A 突变基因型(GA+AA)结直肠癌发病风险显著增高(校正 OR=1.92,95%CI=1.10~3.36),推测+1A 变异等位基因通过促进转录因子 TF II D 与核心启动子结合上调 CyclinA2 表达,促进细胞加速通过 G1/S 及 G2/M 期检查点导致细胞周期调控异常,细胞异常增殖,从而增加对结直肠癌的遗传易感性^[10]。但在胃癌及乳腺癌中 CyclinA2 基因+1G>A 多态性与肿瘤发病风险无明显相关^[5],这可能与不同肿瘤的致癌机制具有组织特异性或样本例数太少有关。另外通过分层分析还发现,相对于有肿瘤家族史者而言,无肿瘤家族史的组别中这种致病作用更为明显,这提示+1A 变异等位基因可能是一种致癌因素。

综上所述,CyclinA2 rs769236 突变基因型(GA+AA)是人群罹患结直肠癌的独立危险因素,可作为 CRC 发病风险的筛选指标。当然由于本研究的样本量偏小,可能存在一定的选择偏倚,作者将继续扩大样本量并在不同族群中进行抽样,进一步研究 CyclinA2 基因 rs769236 多态性位点在结直肠癌中发生、发展的具体作用机制,为结直肠癌的早期诊断、治疗及判断预后提供新的理论依据,为基因治疗提供新的靶点。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Melissa M, et al. Global cancer statistics [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Sung JJ, Lau JY, Goh KL, et al. Increasing incidence of colorectal cancer in Asia; implications for screening [J]. *The Lancet Oncology*, 2005, 6(11): 871-876.
- [3] Li JQ, Miki H, Wu F, et al. Cyclin A correlates with carcinogenesis and metastasis, and p27 (kip1) correlates with lymphatic invasion, in colorectal neoplasms [J]. *Hum Pathol*, 2002, 33(10): 1006-1015.
- [4] 吴佩, 闫竟一, 徐国祥, 等. 周期蛋白 A 在大肠癌中的表达及意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(6): 695-696.
- [5] Kim DH, Park SE, Kim M, et al. A Functional Single Nucleotide Polymorphism at the Promoter Region of Cyclin A2 is associated with increased risk of colon, liver, and lung cancers [J]. *Cancer*, 2011, 117(17): 4080-4091.
- [6] Bendris N, Lemmers B, Blanchard J-M. Cyclin A2 mutagenesis analysis: a new insight into CDK activation and cellular localization requirements [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22879.
- [7] Poikonen P, Sjöström J, Blomqvist C, et al. Cyclin A as a marker for prognosis and chemotherapy response in advanced breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(5): 515-519.
- [8] Mrena J, Wiksten JP, Kokkola A, et al. Prognostic significance of cyclin A in gastric cancer [J]. *International Journal of Cancer*, 2006, 119(8): 1897-1901.
- [9] Shen H, Wang L, Spitz MR, et al. A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(17): 4992-4995.
- [10] Shih HC, Shiozawa T, Kato K, et al. Immunohistochemical expression of cyclins, cyclin-dependent kinases, tumor-suppressor gene products, Ki-67, and sex steroid receptors in endometrial carcinoma: positive staining for cyclin A as a poor prognostic indicator [J]. *Human Pathology*, 2003, 34(5): 471-478.

- [1] Jemal A, Bray F, Melissa M, et al. Global cancer statistics [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Sung JJ, Lau JY, Goh KL, et al. Increasing incidence of colorectal cancer in Asia; implications for screening [J]. *The Lancet Oncology*, 2005, 6(11): 871-876.
- [3] Li JQ, Miki H, Wu F, et al. Cyclin A correlates with carcinogenesis and metastasis, and p27 (kip1) correlates with lymphatic invasion, in colorectal neoplasms [J]. *Hum Pathol*, 2002, 33(10): 1006-1015.
- [4] 吴佩, 闫竟一, 徐国祥, 等. 周期蛋白 A 在大肠癌中的表达及意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(6): 695-696.
- [5] Kim DH, Park SE, Kim M, et al. A Functional Single Nucleotide Polymorphism at the Promoter Region of Cyclin A2 is associated with increased risk of colon, liver, and lung cancers [J]. *Cancer*, 2011, 117(17): 4080-4091.
- [6] Bendris N, Lemmers B, Blanchard J-M. Cyclin A2 mutagenesis analysis: a new insight into CDK activation and cellular localization requirements [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22879.
- [7] Poikonen P, Sjöström J, Blomqvist C, et al. Cyclin A as a marker for prognosis and chemotherapy response in advanced breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(5): 515-519.
- [8] Mrena J, Wiksten JP, Kokkola A, et al. Prognostic significance of cyclin A in gastric cancer [J]. *International Journal of Cancer*, 2006, 119(8): 1897-1901.
- [9] Shen H, Wang L, Spitz MR, et al. A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(17): 4992-4995.
- [10] Shih HC, Shiozawa T, Kato K, et al. Immunohistochemical expression of cyclins, cyclin-dependent kinases, tumor-suppressor gene products, Ki-67, and sex steroid receptors in endometrial carcinoma: positive staining for cyclin A as a poor prognostic indicator [J]. *Human Pathology*, 2003, 34(5): 471-478.

(收稿日期: 2013-08-08 修回日期: 2013-09-22)

(上接第 63 页)

- [1] 床肺科杂志, 2010, 15(2): 168-171.
- [5] Molina R, Auge JM, Escudero JM, et al. Mucins CA 125, CA 19-9, CA15-3 and TAG-72-3 as tumor markers in patients with lung cancer: comparison with CYFRA 21-1, CEA, SCC and NSE [J]. *Tumor Biol*, 2008, 29(6): 371-380.
- [6] 陈钢, 袁应选, 李丽, 等. 非小细胞肺癌 GP 方案化疗前后肿瘤标志物变化临床意义分析 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2012, 11(5): 335-336.
- [7] 郭克锋, 李宗民, 常英英. NSCLC 放化疗前后血清 CEA、CA12-5、CYFRA21-1 变化及临床意义 [J]. *临床肺科杂志*, 2012, 17(10): 1852-1854.
- [8] 徐春华, 于力克, 张宇. 化疗对中晚期非小细胞肺癌患者淋巴细胞亚群的影响 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2011, 26(2): 150-153.
- [9] 莫军扬, 朱其一, 庄亚强, 等. 新辅助化疗对晚期乳腺癌患者 T 淋巴细胞亚群免疫功能的影响 [J]. *实用癌症杂志*, 2007, 22(5): 454-456.
- [10] 谢治军, 薛重重, 杨丽萍. 化疗后肿瘤免疫格局的改变及其意义的研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2011, 14(3): 320-322.
- [11] 黄香, 陈龙邦. 化疗药物的免疫调节作用 [J]. *医学研究生学报*, 2010, 23(1): 76-81.
- [12] 燕翔, 赵晓, 焦顺昌, 等. 晚期肺腺癌患者一线化疗后 T 淋巴细胞亚群变化及临床意义 [J]. *中国肺癌杂志*, 2012, 15(3): 164-171.
- [13] 罗君, 凌志强, 毛伟敏. 肺癌患者淋巴细胞亚群在外周血中的表达及其与预后的关系 [J]. *中国肺癌杂志*, 2011, 14(8): 669-673.
- [14] 张立, 黄静, 朱晓莉, 等. 分子标志物指导化疗药物选择的策略在晚期非小细胞肺癌化疗中的有效性及安全性评价 [J]. *中国癌症杂志*, 2011, 21(10): 794-798.

(收稿日期: 2013-08-30 修回日期: 2013-09-29)