

Fas-670 基因多态性与青海地区乳腺癌临床病理指标间的关系*

黄欣¹, 胡英^{1△}, 王秀娟¹, 金丽艳², 张二元²

(1. 青海大学医学院实验诊断教研室, 西宁 810001; 2. 青海大学附属医院乳甲外科, 西宁 810001)

摘要:目的 研究 Fas-670 基因多态性与青海地区乳腺癌临床病理指标的关系。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析方法,检测了 232 例青海女性乳腺癌患者 Fas-670 基因多态性,用 χ^2 检验分析其基因多态性与乳腺癌临床病理指标间的关系。结果 232 例乳腺癌中,Fas-670 基因多态频率分布:纯合野生型 AA 为 39.7%(92/232)、杂合型 AG 为 48.7%(113/232)、纯合突变型 GG 为 11.6%(27/232)。Fas-670 基因型与青海乳腺癌临床病理指标无相关性($P>0.05$)。结论 Fas-670 基因多态性与青海地区乳腺癌临床病理指标无联系。

关键词:乳腺癌;Fas-670;基因多态性;临床病理指标

中图分类号:R73

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)20-2617-03

The association between Fas-670 gene polymorphisms and clinic pathologic index of breast cancer in Qinghai district*

Huang Xin¹, Hu Ying^{1△}, Wang Xiujuan¹, Jin Liyan², Zhang Shuangyuan²

(1. Department of Laboratory Diagnosis, Medical College of Qinghai University, Xining, Qinghai 810001, China;

2. Department of Mammary Gland Thyroid Surgery, the Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining, Qinghai 810001, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between Fas-670 gene polymorphisms and the clinic pathologic index of breast cancer in Qinghai district. **Methods** The polymorphisms of Fas-670 gene were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms assay(PCR-RFLP) in 232 female breast cancer patients, χ^2 test was applied to assess the association between the polymorphisms of Fas-670 gene and breast cancer clinic pathologic index. **Results** In 232 breast cancer patients, the frequency of Fas-670 homozygous wild type(AA), heterozygous type(AG), homozygous mutant type(GG) were 39.7%(92/232), 48.7%(113/232), 11.6%(27/232) respectively. It was no statistical significance between Fas-670 gene polymorphisms and the clinic pathologic index of breast cancer in Qinghai district($P>0.05$). **Conclusion** The polymorphisms of Fas-670 gene is not associated with clinic pathologic index of breast cancer in Qinghai district.

Key words: breast neoplasms; Fas-670; gene polymorphisms; clinic pathologic index

Fas 基因属于肿瘤坏死因子受体超家族成员^[1],是调控细胞凋亡的重要因子之一,与肿瘤的发生、发展关系密切^[2]。Fas 基因启动子区 670 位点位于核转录元件 GAS 的结合位点(ATTCAGAAA)^[3],在该位点发生 GA→GG 的替换,可破坏转录因子 STAT1 的结合位点,影响 Fas 基因的表达,从而使死亡信号转导通路失调而致细胞癌变^[4]。在全球范围内乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一^[5-6]。本研究探讨凋亡基因 Fas-670 的基因多态性与乳腺癌临床病理指标的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 1 月至 2012 年 11 月青海大学附属医院收治的 330 例女性乳腺癌(均经组织病理学确诊)患者术前外周血 5 mL。患者术前均未经化、放疗。由于考虑到基因可能具有种族差异性剔除了非汉族患者资料,并剔除病理资料不全的患者资料后实际纳入研究 232 例。患者年龄 26~83 岁,中位年龄 47 岁。TNM 分期 I 期 14 例,II 期 128 例,III 期 62 例,IV 期 9 例,分期不明 19 例。

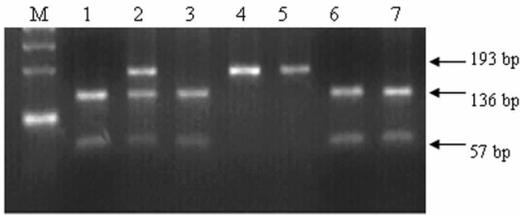
1.2 方法 采集乳腺癌患者术前肘静脉抗凝血标本(EDTA-Na₂ 抗凝)5 mL,用血液基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技北京有限公司)提取外周血 DNA,用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测 Fas-670(rs1800682)基因型。引物序列参照文献^[6]由上海捷瑞生物工程有限公司合成。上游引物 5'-ATA GCT GGG GCT ATG CGA TT-3',下游引物 5'-CAT TTG ACT GGG CTG TCC AT-3'。PCR 反应体系 25 μ L,含 100 ng 模板 DNA,10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ L,12.5 μ L 2 \times Taq PCR Master Mix(天根生化科技北京有限公司),加 ddH₂O 至 25 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火温度为 57 $^{\circ}$ C,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 最终延伸 10 min。PCR 产物片段大小为 193 bp;20 μ L PCR 产物用限制性核酸内切酶 ScrF I(纽英伦生物技术北京有限公司)于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 以上,酶切产物于 2.5% 琼脂糖凝胶(溴化乙锭染色)电泳(70 V,60 min),利用凝胶成像系统观察基因型。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计学处理。以

χ^2 检验分析 Fas-670 与青海地区乳腺癌临床指标的关系。检验方法均为双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因型分析 Fas-670 纯合野生型 AA 产生 1 个 193 bp 片段,纯合突变型 GG 有 1 个 ScrF I 酶切位点,产生 136 bp 和 57 bp 两个片段,杂合型 AG 产生 193、136 和 57 bp 3 个片段。见图 1。



M:100 bp ladder;1、3、6、7:纯合突变型 GG;2:杂合型 AG;4、5:纯合野生型 AA。

图 1 PCR-RFLP 检测 FAS-670 基因多态性

2.2 基因型分布 232 例乳腺癌中,Fas-670 基因多态频率分布:纯合野生型 AA 为 39.7%(92/232)、杂合型 AG 为 48.7%(113/232)、纯合突变型 GG 为 11.6%(27/232)。其 Fas-670 基因多态分布的频率分布符合群体遗传学 Hardy-Weinberg 平衡定律($\chi^2=0.757,P=0.384$)。

2.3 Fas-670 基因型与青海乳腺癌临床指标的关系 见表 1。

表 1 Fas-670 基因型与青海地区乳腺癌临床指标的关系[n(%)]

病理特征	n	FAS-670			P
		AA	AG	GG	
年龄(岁)					0.453
≤50	144	60(41.7)	70(48.6)	14(9.7)	
>50	88	32(36.4)	43(48.8)	13(14.8)	
月经状态					0.619
绝经前	138	54(39.2)	70(50.7)	14(10.1)	
绝经后	94	38(40.5)	43(45.7)	13(13.8)	
肿瘤大小(cm)					0.497
≤2	57	26(45.6)	26(45.6)	5(8.8)	
>2	156	58(37.2)	79(50.6)	19(12.2)	
淋巴结转移个数					0.263
阳性	93	41(44.1)	43(46.2)	9(9.7)	
阴性	89	29(32.6)	48(53.9)	12(13.5)	
TNM 分期					0.202
I+II	142	61(43.0)	68(47.8)	13(9.2)	
III+IV	71	23(32.4)	37(52.1)	11(15.5)	
ER 状态					0.768
阳性	76	29(38.2)	39(51.3)	8(10.5)	
阴性	55	21(38.2)	26(47.3)	8(14.5)	
PR 状态					0.974
阳性	62	23(37.1)	31(50.0)	8(12.9)	
阴性	67	26(38.8)	33(49.3)	8(11.9)	
HER2					0.377
阳性	87	31(35.6)	47(54.0)	9(10.4)	
阴性	30	13(43.3)	12(40.0)	5(16.7)	

3 讨论

细胞增殖与细胞凋亡之间的不平衡是肿瘤形成的基础,Fas 基因是调控细胞凋亡的重要因子之一。FasL 与细胞表面的 Fas 结合,即可诱导靶细胞凋亡,而 Fas/FasL 介导的肿瘤细胞免疫逃逸机制有:(1)肿瘤细胞表达 FasL,促进 Fas 高表达激活的 T 细胞凋亡,使肿瘤细胞产生免疫逃逸^[7],现已发现在乳腺癌、肺癌、肝癌、胃肠道肿瘤等多种肿瘤细胞高表达 FasL。在机体抗肿瘤免疫应答时,活化的肿瘤特异性 T 细胞 Fas 表达增多^[8]。(2)肿瘤细胞表面 Fas 表达缺失或下降,使肿瘤细胞凋亡受阻^[9],有研究表明乳腺癌 Fas 表达丢失和 FasL 过表达不仅参与了肿瘤的免疫逃逸和免疫耐受,还与肿瘤的浸润密切相关^[10]。(3)凋亡抑制基因(如 Bcl-2 等)出现高表达^[11]。

Fas 基因启动区存在的 Fas-670 多态位点由于影响 Fas 基因表达,在肿瘤的发生、发展中显得尤为重要。本研究主要探讨凋亡基因 Fas-670 基因多态性与青海地区乳腺癌临床病理指标的关系。

国内张柏林等^[12]对 840 例乳腺癌患者和 840 例健康人进行病例对照研究 Fas(-1377G/A 和-670A/G)和 FasL 基因(-844T/C 和 7896G/C)基因多态性对乳腺癌发病风险的影响,结果发现:携带 Fas-1377A/-670A 单体型者乳腺癌的发病风险高于携带 Fas-1377G/-670A 单体型者,但是携带 Fas-1377G/-670G 单体型者乳腺癌的发病风险则低于 Fas-1377G/-670A 单体型携带者,提示 Fas-FasL 系统的功能性遗传多态性可能与乳腺癌的发病风险增加有关。Hashemi 等^[13]对伊朗 134 例乳腺癌患者和 152 例健康女性进行 Fas-1377 G/A(rs2234767)和-670 A/G(rs1800682)基因多态性和乳腺癌的联系的研究,发现 Fas-1377 G/A(rs2234767)基因多态分布在这两组间并无显著不同,而 Fas-670 A/G(rs1800682)基因多态性与乳腺癌的风险有显著联系($P=0.019$)。

由于 Fas 基因多态性与肿瘤发病风险的关系存有争议,Zhang 等^[14]以 34 个已发表的病例对照研究为基础,对 11 461 例癌症患者和 12 708 例健康对照组用 Meta 法分析 Fas 两个基因多态性与肿瘤发病风险的关系,结果显示:Fas-1377AA 基因型比-1377GG 或 GA/GG 基因型有较高的肿瘤发病风险,而 Fas-670GG 基因型无影响。Knechtel 等^[15]对 216 例淋巴结阳性的乳腺癌妇女检测包括 Fas-1377 和 Fas-670 的 16 例基因多态性的影响,单因素分析发现 Fas-1377 基因多态性与无病生存率和总生存率显著相关,而 Fas-670 基因多态却与无病生存率和总生存率无关联。Crew 等^[16]在美国纽约研究 1 053 例乳腺癌患者和 1 102 例健康人 Fas 和 FasL 基因多态性与乳腺癌风险的关系发现,Fas-1377G/A、Fas-670G/A 和 FasL-844C/T 基因多态性与乳腺癌发病风险无显著联系,也没有数据显示基因多态性与年龄和雌激素水平等相关。本研究结果也未发现 Fas-670 基因多态性与青海地区女性乳腺癌患者的临床分期及肿瘤大小等临床病理指标有联系。

参考文献:

- [1] Behrmann I,Walczak H,Krammer PH. Structure of the human APO-1 gene[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(12): 3057-3062.

- [2] Muschen M, Warskulat U, Beckmann MW. Defining CD95 as a tumor suppressor gene[J]. *J Mol Med*, 2000, 78(6): 312-325.
- [3] Huang QR, Morris D, Manolios N. Identification and characterization of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas(CD95) gene[J]. *Molecul Immunol*, 1997, 34(8/9): 577-582.
- [4] Kanemitsu S, Ihara K, Saifuddin A, et al. A functional polymorphism in Fas(CD95/Apo-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus [J]. *J Rheumatol*, 2002, 29(6): 1183-1188.
- [5] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2): 74-108.
- [6] Sun T, Miao XP, Zhang XM, et al. Polymorphisms of death pathway genes Fas and FasL in esophageal squamous-cell carcinoma [J]. *J Nati Cancer Inst*, 2004, 96(13): 1030-1036.
- [7] Li SY, Yu B, An P, et al. Influence of FasL gene expression on hepatic metastasis of colorectal carcinoma [J]. *Hepat Pancreat Dis Int*, 2004, 3(2): 226-229.
- [8] Nomori H, Watanabe S, NaKajima T, et al. Histiocytes in nasopharyngeal carcinoma in relation to prognosis [J]. *Cancer*, 1986, 57(1): 100-105.
- [9] Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and Cancer [J]. *Oncogene*, 2004, 23(16): 2950-2966.
- [10] Ferreira LD, Pulawa LK, Jensen DR, et al. Overexpressing human lipoprotein lipase in mouse skeletal muscle is associated with insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2001, 50(5): 1064-1068.
- [11] Chang YC, Xu YH. Expression of Bcl-2 in habited Fas-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma BEL-7404 cells [J]. *Cell Res*, 2000, 10(3): 233-242.
- [12] 张柏林, 孙瞳, 刘海洁, 等. Fas 和 FasL 基因多态性增加乳腺癌发病风险 [J]. *中国医药导刊*, 2009, 11(12): 2096-2098.
- [13] Hashemi M, Fazaeli A, Ghavami S, et al. Functional polymorphisms of Fas and FasL gene and risk of breast cancer-pilot study of 134 cases [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53075.
- [14] Zhang ZZ, Xue HC, Gong WD, et al. Fas promoter polymorphisms and cancer risk; a meta-analysis based on 34 case-control studies [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(3): 487-493.
- [15] Knechtel G, Hofmann G, Gerger A, et al. Analysis of common germline polymorphisms as prognostic factors in patients with lymph node-positive breast cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(12): 1813-1819.
- [16] Crew KD, Gammon MD, Terry MB, et al. Genetic polymorphisms in the apoptosis-associated genes Fas and FasL and breast cancer risk [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(12): 2548-2551.

(收稿日期: 2014-03-08 修回日期: 2014-04-09)

(上接第 2616 页)

- [4] Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes [J]. *Neurochem Int*, 2009, 54(3/4): 253-263.
- [5] Pan W, Tu H, Kastin AJ. Differential BBB interactions of three ingestive peptides: obestatin, ghrelin, and adiponectin [J]. *Peptides*, 2006, 27(4): 911-916.
- [6] Dore-Duffy P, Wang S, Mehedi A, et al. Pericyte-mediated vasoconstriction underlies TBI-induced hypoperfusion [J]. *Neurol Res*, 2011, 33(2): 176-186.
- [7] Fisher M. Pericyte signaling in the neurovascular unit [J]. *Stroke*, 2009, 40(Suppl 3): S13-15.
- [8] Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches [J]. *Brain Res Rev*, 2010, 64(2): 328-363.
- [9] 谢英, 叶丽亚, 张小滨, 等. 血脑屏障体外实验模型的建立 [J]. *北京大学学报: 医学版*, 2004, 36(4): 435-438.
- [10] 冯洁, 叶丽亚, 张文健, 等. 人血脑屏障体外实验模型的建立及缺氧-复氧对其通透性的影响 [J]. *中国医药生物技术*, 2008, 3(2): 109-115.
- [11] Bertiaux-Vandaele N, Youmba SB, Belmonte L, et al. The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype [J]. *Am J Gastroenterol*, 2011, 106(12): 2165-2173.
- [12] Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, et al. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2007, 27(6): 687-694.
- [13] 鹿文葆, 秦伟伟, 张秋菊, 等. 脑微血管内皮细胞与周细胞共培养构建体外血脑屏障模型 [J]. *国际脑血管病杂志*, 2012, 20(5): 338-342.

(收稿日期: 2014-01-22 修回日期: 2014-03-06)