

CDH1 基因-160C/A 基因多态性与鼻咽癌发病风险的研究

邹小量,朱胜华,杨枝芳,莫 侨

(邵阳市中心医院耳鼻喉头颈外科,湖南 邵阳 422000)

摘要: **目的** 本研究探讨 CDH1 基因-160C/A 多态性在湖南汉族鼻咽癌人群中的分布及其与汉族鼻咽癌发病风险的相关性。**方法** 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)对 280 例湖南籍汉族鼻咽癌患者和 291 例湖南籍汉族非肿瘤对照组进行 CDH1 基因-160C/A SNP 检测。比较基因型分布和发病风险的关系。**结果** CDH1 基因-160C/A 多态的 CC、CA、AA 基因型在病例组中的分布频率分别为 156(55.7%),103(36.8%),21(7.5%);在对照组的分布频率分别为 178(61.2%),102(35.0%),11(3.8%);($\chi^2 = 0.597, P = 0.440$),符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$);两组间分布的差异无统计学意义($P > 0.05$)。AA 基因型显著性地提高鼻咽癌的发病危险($OR = 2.96; 95\% CI: 1.12 \sim 4.81$);携带 A 等位基因与鼻咽癌患者发生淋巴结转移有关联性($OR = 3.07; 95\% CI: 1.88 \sim 5.02$)。**结论** CDH1 基因-160C/A 多态性可能与汉族鼻咽癌发病的遗传易感性及鼻咽癌患者发生淋巴结转移密切相关。

关键词: 鼻咽癌; 上皮型钙黏蛋白; 基因多态性

中图分类号: R739.6 **文献标识码:** A

The Susceptibility of Nasopharyngeal Cancer and CDH1 Gene-160-C/A Gene Polymorphism

ZOU Xiaoliang, ZHU Shenghua, YANG Zhifang, et al

(Department of Otorhinolaryngology, The Central Hospital of Shaoyang, Shaoyang, Hunan 422000, China)

Abstract: **Objective** This study investigated the CDH1 gene-160C/A polymorphism in Hunan province, China Han population distribution of nasopharyngeal carcinoma and its relationship with Han Chinese in relevance of the risk of nasopharyngeal carcinoma incidence. **Methods** Application of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) of the 280 cases of nasopharyngeal carcinoma patients and 291 cases of Han non-cancerous group CDH1 gene-160C/A SNP detection. Comparison of genotype distribution and the relationship between the incidence of risk; risk OR and 95% CI application of non-conditional Logistic regression analysis and calculation. **Results** CDH1 gene-160C/A polymorphism of the CC, CA, AA genotype in case group in the distribution of frequencies of 156(55.7%), 103(36.8%), 21(7.5%); the distribution of frequencies in the control group were 178(61.2%), 102(35.0%), 11(3.8%);($\chi^2 = 0.597, P = 0.440$), consistent with Hardy-Weinberg equilibrium($P > 0.05$); the distribution between the two groups no statistically significant difference($P > 0.05$). AA genotype significantly increase the incidence of nasopharyngeal cancer risk($OR = 2.96; 95\% CI: 1.12 \sim 4.81$); carrying A allele was associated with lymph metastasis in patients with nasopharyngeal carcinoma correlation($OR = 3.07; 95\% CI: 1.88 \sim 5.02$). **Conclusion** CDH1 gene-160C/A polymorphism may be related to the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma in Han nationality and the genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in patients with lymph node metastasis.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma; E-cadherin; Polymorphisms

鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma, NPC)是头颈部恶性程度较高的肿瘤,是我国高发肿瘤之一,占头颈部肿瘤发病率首位。我国广东、广西是世界鼻咽癌最高发的地区之一,其他邻近区域也呈相对高发,我省也同属鼻咽癌高发地域,并与理化、环境、遗传特性密切相关。上皮钙黏蛋白(E-cadherin, E-钙粘蛋白)是钙黏蛋白家族中的主要成员,上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)的编码基因 CDH1 是重要的肿瘤抑制基因,其启动子区转录起始点上游 347 bp、163 bp、160 bp 处、编码区第 13 外显子处均存在单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。目前研究表明 CDH1 基因启动子区的 C-160A 单核苷酸多态性(SNP)与胃癌、食道癌、前列腺癌等肿瘤患病、转移、预后之间有密切的关系,但在鼻咽癌中尚无相关报道。本研究通过大样本筛查明确人鼻咽癌 CDH1 基因启动子区的-160C/A 遗传多态性;从分子水平明确病因、易感人群,建立人鼻咽癌早期诊断及预后评价分子体系,为鼻咽癌分子靶向治疗及提高患者生存率奠定基础。

1 材料与方法

1.1 临床资料

病例组为邵阳市中心医院及周边城市医院(南华大学附属南华医院、株洲市第一人民医院、娄底中心医院)2005 年 1 月至 2010 年 12 月期间就诊的 280 例汉族鼻咽癌患者,纳入标准:①三代以内均为湖南籍汉族;②鼻咽部活检病理诊断为鼻咽部低分化鳞状细胞癌;③均为初诊,未行放化疗及生物治疗。对照组均为来自湖南地区的同时期 291 例接受常规体检人群,健康对照组纳入标准:①三代以内均为湖南籍汉族;②无鼻咽癌在内的肿瘤家族病史及重大疾病史;③纤维鼻咽镜下检查未见鼻咽部异常。以上研究对象无直系亲属关系。实验经医院伦理委员会批准,签署知情同意书后由上述研究对象自愿捐 2 mL 静脉抗凝血。以上研究对象无直系亲属关系。实验经我院伦理委员会批准,签署知情同意书后由上述研究对象自愿捐 2 mL 静脉抗凝血。

1.2 标本采集

外周静脉抗凝血均采集到枸橼酸钠抗凝采血管中,采集后立即置于低温离心机,在 4℃ 下以 2500rpm 离心 5 min,分离有形成分及血浆,将上层血浆吸出后立即进行红细胞裂解获得有核细胞后保

存于 -80℃ 冰箱备用。

1.3 检查标本基因组 DNA 的质量

随机取出标本库中 12 个基因组 DNA,置于离心机中离心 1 min;配制电泳液,将电泳液点入加样孔中,100 V 下电泳 1.5 h,其电泳图见图 1,从图 1 可以看出基因库中的基因组 DNA 质量符合后续的 PCR 实验要求。

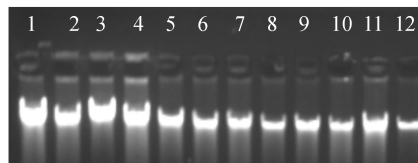


图 1 基因组 DNA 电泳图

1.4 PCR 反应

PCR 引物设计采用 Primerpremier 5.0 软件,参照 PubMed ref SNPID:rs 序列设计引物如下 上游引物 5'-CGCCCCGACTTGTCTCTCTAC-3';下游引物 5'-GGCCACAGCCAATCAGCA-3'设计大小为 450bp 的目的片段,将序列交给大连宝生物公司合成引物。实验过程完全按照试剂说明进行,依次进行梯度 PCR 反应,梯度 PCR 反应结束后,分别取出 5 μL 的 PCR 产物于 3% 琼脂糖凝胶电泳分析,而后按照同样的 PCR 反应条件进行反应扩增。

2.3 PCR-RELP 分析方法

经 PCR 扩增各个样本的 DNA 片段,将 PCR 产物加入酶切体系,混匀离心后,在 37℃ 恒温水浴中酶切过夜。酶切产物于 3% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,CDH1 基因的 PCR 扩增目的片段大小为 450bp,扩增产物经限制性核酸内切酶 Hinc II 消化后, A 等位基因可得到产物为 367bp 和 83bp 片段,而 C 等位基因仍保持为 450bp。最后置于 GeneGenius 全自动凝胶成像分析系统(美国 Syngene 公司)中观察并一一记录结果。

1.5 统计分析方法

采用 SPSS16.0 的统计软件。计算病例组与正常对照组的基因频率或基因型频率是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,以确定选择对象的随机性, $P < 0.05$, 认为不符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, $P > 0.05$, 则认为符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。多因素分析采用非条件 Logistic 回归,以比值比(Odds ratios, ORs)及其 95% 可信区间(Confidence intervals, CIs)表示相对危险度。所用的统计方法均为

双侧概率检验,以 $P < 0.05$ 作为有统计学差异的标准, $P < 0.001$ 作为有显著统计学差异的标准。

2 结 果

2.1 研究对象基本资料

280 例籍汉族鼻咽癌患者和 291 例籍汉族健康对照者间的性别、年龄构成比无统计学差异(P 值分别为 0.915、0.537),但其吸烟状况在两组之间有统计学差异($P < 0.05$)。病例组中颈淋巴结转移($N_1 + N_2 + N_3$)142 例,无转移(N_0)138 例。

2.2 基因分型结果

所有 DNA 标本均经 PCR-RFLP 方法成功进行了基因型分析,所有重复分型结果均与原结果相符。基因分型结果(见表 1),其中对照组中 CDH1 基因-160 位点 CC、CA、AA 基因型频率分别为 61.2%、35.0% 和 3.8% ($\chi^2 = 0.597, P = 0.440$),符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$)。NPC 患者组中 CDH1 基因-160 位点 CC、CA、AA 基因型频率分别为 55.7%、36.8% 和 7.5%。CDH1 基因-160C/A 基因

型分布在鼻咽癌患者组和对照组之间无显著性差异($P > 0.05$)。以 CC 基因型作为参照,应用非条件 logistic 回归分析结果经年龄、性别、吸烟校正后携带 AA、CA 基因型的 OR 值分别为 2.96(95% CI = 1.12 ~ 4.81)、1.28(95% CI = 0.86 ~ 1.74),携带 AA 基因型增加了鼻咽癌的患病风险。分层分析显示(见表 2):相对于 CDH1 基因-160 位点携带 CC 基因型,年龄大于 50 岁的人群携带 CA + AA 等位基因可显著增加其患鼻咽癌的风险,OR 值为 1.47(95% CI = 0.96 ~ 2.28)。根据吸烟与否、性别不同进行分层分析显示:CDH1 基因-160C/A SNP 与其患鼻咽癌的风险无相关性。

表 1 CDH1 160C→A 基因型在病例组和对照组中的分布(例,%)

基因型	病例组 (<i>n</i> = 280)	对照组 (<i>n</i> = 291)	OR(95% CI)
CC	156(55.7)	178(61.2)	1.00
CA	103(36.8)	102(35.0)	1.28(0.86 ~ 1.74)
AA	21(7.5)	11(3.8)	2.96(1.12 ~ 4.81)
CA + AA	124(44.3)	113(38.8)	1.53(0.90 ~ 1.88)

表 2 分层分析 CDH1-160C/A 基因多态性与鼻咽癌相关(例,%)

		病例组		对照组		OR(95% CI) *
		CC	CA + AA	CC	CA + AA	
性别	男	93(53.1)	82(46.9)	102(59.0)	71(41.0)	1.47(0.96 ~ 2.28)
	女	63(60.0)	42(40.0)	76(64.4)	42(35.6)	1.21(0.70 ~ 2.08)
年龄	≤50 岁	65(52.0)	60(48.0)	73(50.3)	72(49.7)	1.09(0.67 ~ 1.77)
	>50 岁	91(58.8)	64(41.2)	105(71.9)	41(28.1)	1.80(1.19 ~ 3.13)
吸烟者 *	有	93(49.5)	95(50.5)	71(54.2)	60(45.8)	1.21(0.77 ~ 1.89)
	无	63(68.5)	29(31.5)	107(66.9)	53(33.1)	0.93(0.54 ~ 1.61)
合计		156(55.7)	124(44.3)	178(61.2)	113(38.8)	

* 非条件 logistic 回归分析 OR 值均经年龄、性别、吸烟校正

2.3 CDH1 基因-160C/A SNP 与鼻咽癌患者淋巴结转移的关系

将有相关淋巴结资料记录的鼻咽癌患者 280 例进行分层分析,结果显示(见表 3):CDH1 基因-160C/A 各基因型在淋巴结阴性组和阳性组中的分布有显著性差异 $P < 0.05$,且携带 CA + AA 等位基因可显著增加鼻咽癌患者发生淋巴结转移的风险 OR 值为 3.07(95% CI = 1.88 ~ 5.02)。

3 讨 论

侵袭与转移是恶性肿瘤最主要的生物学标记,

也是导致恶性肿瘤患者发病和死亡的主要原因。肿瘤的侵袭、转移是个肿瘤细胞与宿主细胞间相互作用的连续主动过程,涉及面很广,需要经过一系列的严格步骤,其中细胞黏附是极其重要和关键的一个过程,而这一过程的发挥与包括钙黏附蛋白(E-cadherin)在内的蛋白密切相关。E-cadherin 是一类主要介导细胞间同质黏附的钙依赖性跨膜糖蛋白,其作用依赖于 Ca^{2+} ,至今已鉴定出分布于不同组织的钙黏蛋白 30 余种^[1],在正常上皮细胞之间,E-cadherin 能将正常细胞彼此粘附在一起,不能单独分离。当 E-cadherin 结构或功能异常时,其上皮结构不再完整,引起细胞间黏附的破坏,细胞间连接松

表 3 CDH1-160C/A 基因多态性与鼻咽癌淋巴结转移的关系(例,%)

基因型	淋巴转移阴性	淋巴转移阳性	P 值	OR(95% CI) *
CC	98 (69.0)	58 (42.0)		1.00
CA + AA	44 (31.0)	80 (58.0)	$P < 0.05$	3.07 (1.88 ~ 5.02)

* 非条件 logistic 回归分析 OR 值均经年龄、性别、吸烟校正

散,邻近细胞黏附作用降低,导致细胞的活动能力和活动范围增加,肿瘤细胞易于从原发灶分离,从而增强了肿瘤细胞通过血行及淋巴道转移的能力^[2]。大量资料显示,E-钙黏蛋白高表达与肿瘤侵袭转移潜力呈负相关,E-钙黏蛋白高表达的肿瘤细胞系往往不具备侵袭能力,不表达 E-钙黏蛋白的细胞系往往具有较高的侵袭能力^[3]。在鼻咽癌的研究中,国外学者发现 EGF 上皮生长因子能通过诱导 E-钙黏蛋白表达下降来促进淋巴结转移,同时研究发现淋巴结转移的鼻咽癌组织中 E-钙黏蛋白更少的定位于细胞膜,而更多移位到细胞质内,从而使其细胞粘附能力降低,达到促进转移的目的^[4]。

CDH1 基因 5' -端启动子区存在的单核苷酸多态性-160 (C/A) 可以下调基因的转录活性,从而导致蛋白表达水平下调,增加对上皮性肿瘤的易感性。已有研究报道 CDH1 基因多态性可能增加胃癌、大肠癌、前列腺癌等常见肿瘤患病的患病风险。Masterson 等^[1]报道 C-160A 多态性与散发性弥散型胃癌易感性增加有关。在大肠癌的研究中,CDH1 基因-160C/A 携带 AA 基因型与大肠癌的浸润进展密切相关,但与淋巴结转移无明显关联^[5]。国外学者发现 Deepa 等^[6]在研究上皮钙粘蛋白基因-160 (C/A) 多态性与美国白人男性和黑人男性前列腺癌易感性中发现,CDH1-160A 等位基因与白人男性前列腺癌的易感性增加有关。国内学者在 CDH1 基因-160C/A 多态性与膀胱移行细胞癌肿瘤复发关系的研究中发现,携带 A 等位基因的患者比携带 C 等位基因的患者有较高的复发倾向^[7]。

在本研究中,以 CC 基因型作为参照,应用非条件 logistic 回归分析结果经年龄、性别、吸烟校正后携带 AA、CA 基因型的 OR 值分别为 2.96 (95% CI = 1.12 ~ 4.81)、1.28 (95% CI = 0.86 ~ 1.74),表明携带 AA 基因型增加了鼻咽癌的患病风险。分层分析显示相对于 CDH1 基因-160 位点携带 CC 基因型,年龄大于 50 岁的人群携带 CA + AA 等位基因可显著增加其患鼻咽癌的风险,OR 值为 1.47 (95% CI = 0.96 ~ 2.28),因此对于年龄大于 50 岁的患者

而言,携带 A 等位基因即表明其患鼻咽癌的风险明显增高,若应用于临床中应加以重视,干预以及密切随访观察。同时我们的研究发现 CDH1 基因-160C/A 多态性与鼻咽癌发生淋巴结转移的风险有明显的相关性,其中 CA + AA 等位基因可显著增加鼻咽癌患者发生淋巴结转移的风险,这可能是因为 CDH1 基因-160C/A 多态性抑制了其基因的转录活性,从而使 E-cadherin 蛋白的表达下降,导致鼻咽癌细胞易于发生转移有关,而对于携带 A 等位基因型的患者更应该重视其淋巴结转移发生的可能性以及发生后的病情发展。国外也有一份研究发现 CDH1 基因-160C/A 多态性增加了突尼斯鼻咽癌患者发病风险,特别是年轻鼻咽癌患者的发病风险^[8]。梁军等^[9]在对卵巢癌组织的研究中发现 CDH1 基因多态性与其基因表达明显相关。但在鼻咽癌中 CDH1 基因-160C/A 多态性是否影响其基因的表达还需要在鼻咽癌组织中做进一步验证。目前体外实验 E-cadherin 的 cDNA 转染于高侵袭转移力、低分化的动物上皮肿瘤细胞,导致其侵袭转移力降低;高转移低表达 E-cadherin 的细胞在转染 E-cadherin cDNA 后成瘤性和转移性均受到抑制。E-cadherin 的表达水平及表达部位的检测有助于提高恶性肿瘤的检出率,并适当地给予一定的措施加以保护,恢复 E-cadherin 介导的黏附功能可能成为临床治疗或预防癌转移的有力手段。但是恶性肿瘤的分化程度、侵袭力、转移性是极其复杂的问题,要明确 E-cadherin 的调控机制、与 CDH1 基因基因多态性的关系以及其他肿瘤基因的协同关系、对肿瘤发生、治疗及预后的影响,还有待更多的实验加以验证和探索。

参考文献:

[1] Masterson J, O'Dea S. Posttranslational truncation of E-cadherin and significance for tumour progression [J]. Cells Tissues Organs, 2007, 185 (1-3): 175-179.

[2] Akdeniz O, Akduman D, Haksever M, et al. Relationships between clinical behavior of laryngeal squamous cell carcinomas and expression of VEGF, mmp-9 and e-cadherin [J]. (下转第 579 页)

(上接第 565 页)

Asian Pac J Cancer Prev, 2013; 14(9): 5301-5310.

- [3] Could Rothberg BE, Bracken MB. E-cadherin expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis [J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 100(2): 139-148.
- [4] Yip WK, Seow HF. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling by EGF downregulates membranous E-cadherin and β -catenin and enhances invasion in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Cancer Lett, 2012, 318(2): 162-172.
- [5] de Lima JM, de Souza LG, da Silva ID, et al. E-cadherin and metalloproteinase-1 and -7 polymorphisms in colorectal cancer [J]. Int J Biol Markers, 2009, 24(2): 99-106.
- [6] Pookot D, Li LC, Tabatabai ZL, et al. The e-cadherin-

160C/A polymorphism and prostate cancer risk in white and black american men [J]. J Urol, 2006, 176(2): 793-796.

- [7] 阮黎, 张旭, 马鑫, 等. 膀胱移行细胞癌与 E-钙粘连素基因启动子 C/A 单核苷酸多态性与肿瘤复发的关系 [J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(1): 9-11.
- [8] Ben Nasr H, Hamrita B, Batbout M, et al. A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter-160 C/A is associated with risk of nasopharyngeal cancer [J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(17-18): 1253-1257.
- [9] 梁军, 李琰, 王娜, 等. E-钙粘蛋白基因多态性与上皮性卵巢癌发病风险关系的研究 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2008, 25(2): 183-186.

(此文编辑: 秦旭平)