

中国人群 HER2 基因 655 位密码子多态性与胃癌的关系

冯 丹 攸 璞 安 伟 柳伟伟 王雅杰

摘 要 **目的** 探讨 HER2 基因 Ile655Val 多态性在中国人群中的分布特点及其与胃癌的易感性、临床病理特征等方面的关系。**方法** 运用聚合酶链反应(PCR)和限制性片段长度多态性(RFLP)法检测 210 例胃癌患者和 278 例正常对照者 HER2 基因 655 位基因型,分析其与胃癌发病风险及临床病理分期之间的关系。**结果** 与 Ile/Ile 基因型相比,Val/Val 基因型患者发病风险 OR 值为 3.15(95% CI = 1.07 ~ 6.71);Ile/Val 基因型的发病风险 OR 值为 1.90(95% CI = 1.18 ~ 3.10)。携带 Val 等位基因者与 Ile 纯合子相比,进展期($T_2 \sim T_4$)病例分别为 55/98($P = 0.021$);淋巴结阳性($N_1 \sim N_3$)病例分别为 44/71($P = 0.019$);远处转移(M_1)病例分别为 23/31($P = 0.051$);低分化病例分别为 35/55($P = 0.002$)。**结论** HER-2 基因 Ile655Val 多态性与胃癌的易感性存在相关。与 Ile/Ile 基因型相比,Val/Val 基因型患者发病风险最高,Ile/Val 基因型的发病风险次之。Ile655Val 突变的病例,在病理学上显示出浸润深度深、多有淋巴结转移、低分化比例高的特点,与出现远处转移无明显相关性。

关键词 胃癌 HER2 单核苷酸多态性

Association Between HER2 Codon 655 Single Nucleotide Polymorphism and Gastric Cancer Cases in Chinese People. Feng Dan, You Pu, An Wei, Liu Weiwei, Wang Yajie. Department of Oncology, Changhai Hospital, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To investigate the association between Ile/Val single nucleotide polymorphism (SNP) of HER2 at codon 655 and the gastric cancer cases of Chinese people in susceptibilities and clinical pathological features. **Methods** The polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR - RFLP) method was used to analyze the genotypes of 210 gastric cancer patients and 278 healthy individuals. The association of this polymorphism with the risk and pathological characteristers of gastric cancer was explored. **Results** The OR of Val/Val genotype revealed a significantly enhanced risk of 3.15 (95% CI = 1.07 ~ 6.71) compared to Ile/Ile genotype. Ile/Val genotype showed an intermediate risk of 1.90 (95% CI = 1.18 ~ 3.10). Ile/Ile genotype vs Ile/Val or Val/Val genotype was 55 vs 98 in advanced cases ($P = 0.021$), 44vs71 in lymph node positive cases($P = 0.019$), 23vs31 in metastasis cases($P = 0.051$), 35 vs 55 in poorly deferation cases($P = 0.002$). **Conclusion** The Ile655Val polymorphism of the HER-2 gene was associated with the susceptibility to gastric cancer. Compared to those with Ile/Ile genotype, the individuals carrying Val genotype had a higher risk for developing gastric cancer. Val allele was associated with deeper tumor invasion, more lymph node metastasis and more poorly deferation. There was no significant correlation between Val allele and metastasis.

Key words Gastric cancer; HER2; Single nucleotide polymorphism

HER2/neu 是癌基因又称 c - erbB - 2 基因,定位于人染色体 17q21,与多种肿瘤发生发展相关^[1]。其跨膜转导域 655 位的 A→G 突变导致的 Ile655Val 突变,是 HER2 原癌基因与癌基因的区别之一^[2,3]。多数临床观察发现 HER2 阳性表达的胃癌转移性及侵袭性较强^[4]。已有报道表明,该位点多态性

(Ile655Val)与乳腺癌关系密切^[5]。本实验拟通过以我国人群 HER2 Ile655Val 多态性为切入点,探讨其在中国人群中的分布特点及其与胃癌的易感性、临床病理特征等方面的关系。

材料与方法

1. 临床血液标本:2006 年 11 月 ~ 2008 年 12 月间长海医院经手术后病理证实为胃癌的患者 210 例;其中男性 136 例(64.76%),女性 74 例(35.1%),平均年龄 54.72 ± 12.38 岁。正常健康志愿者 278 例;其中男性 170 例(61.15%),女性 108 例(38.85%),平均年龄 53.45 ± 12.81 岁。抽取外周静脉血 2ml,4℃ 保存,1 周内及时处理。研究对象均获知情同意,研究方案符合 1975 年赫尔辛基宣言的伦理纲要。

2. 全血 DNA 抽提:采用血液 DNA 抽提试剂盒(博光生物

基金项目:上海市重点学科资助项目(B905)

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院肿瘤科(冯丹、王雅杰);第二军医大学细胞生物教研室(攸璞);第二军医大学统计教研室(安伟、柳伟伟)

通讯作者:王雅杰,电子信箱:yajiewa0459@163.com

科技有限公司)按说明书操作,按步骤依次加入相应裂解液,从全血中分离出基因组 DNA,并依据实际情况做相应调整。每 300μl 全血抽提 DNA 得率约为 10μg。

3. PCR 反应及产物纯化:在包含研究位点长度 378bp 两侧设计引物:Forward:5′ - AAGCCTGTGGGTCACCCTTC - 3′; Reverse:5′ - ATCGTCTCGCTAGGTGTCAG - 3′。经条件优化后,选用 94℃ 变性 5min,94℃ (30s)、62℃ (30s)、72℃ (40s)、40 个循环,72℃ 延伸 12min。采用吸附柱式 PCR 产物回收试剂盒(博光生物)去除引物二聚体、缓冲体系、聚合酶、多余的引物及体系中的 dNTPs(图 1)。

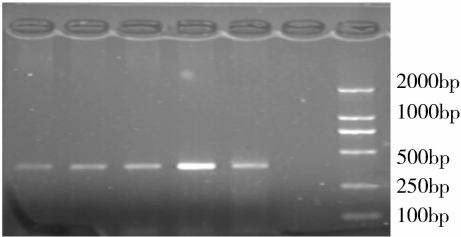


图 1 HER2 基因 655 位 PCR 扩增结果

4. RFLP 基因分型:酶切反应体系 20μl:10 × buffer 2μl, BsmAI 限制性内切酶 0.5μl,PCR 产物 17.5μl。55℃ 水浴 2h。110V 电压电泳 20min,凝胶成像系统分析记录结果。378bp 的目的基因片段经 BsmAI 限制性内切酶切割后分为 3 种基因型:纯合切开型 G/G (Val/Val),电泳图表现为 150bp 及 228bp 两条片段;纯合未切开型 A/A (Ile/Ile),电泳图表现为 378bp 一条片段;杂合型 A/G (Ile/Val):电泳图表现为 378bp、228bp 及 150bp 三条片段(图 2)。

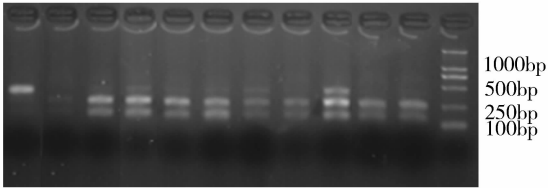


图 2 HER2 基因 655 位 RFLP 基因分型结果

5. 统计学分析:HER2 基因型分布在病例组与对照组之间的差异应用 Fisher 确切概率法进行检验。HER2 基因 655 位基因型与胃癌发病风险因素优势比及 95% 可信区间,采用 logistic 回归分析;所有 OR 值的计算均经过性别和年龄的校正。临床病理学特点及与 HER2 基因 655 位基因型的相关性分析采用 Pearson's χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。统计分析应用 SPSS13.0 软件。

结 果

1. 研究对象的 HER2 655 位基因型分布:胃癌患者 HER2 655 位基因型的分布与对照组存在差异。Val 等位基因频率分别为:病例组 0.183,对照组 0.104($P = 0.001$)。Ile/Val 型在胃癌患者中出现的频率为 0.2619,对照组中频率为 0.1655 ($P = 0.004$)。Val/Val 型在胃癌患者中的出现频率为 0.0524,对照组为 0.0216 ($P = 0.032$)。与 Ile/Ile 基因型相比,Val/Val 基因型患者发病风险 OR 值为 3.15(95% CI = 1.07 ~ 6.71);Ile/Val 基因型的发病风险 OR 值为 1.90(95% CI = 1.18 ~ 3.10)。具体见表 1。

表 1 研究对象的 HER2 655 位基因型分布 [n(%)]

项目	病例组 (n = 210)	对照组 (n = 278)	OR 值* (95% CI)	P
Ile/Ile 基因型	144 (68.57)	226 (81.29)	1	
Ile/Val 基因型	55 (26.19)	46 (16.55)	1.90 (1.18 ~ 3.10)	0.004
Val/Val 基因型	11 (5.24)	6 (2.16)	3.15 (1.07 ~ 6.71)	0.032
等位基因频率				
Ile	0.817	0.896		0.001
Val	0.183	0.104		

* 经过年龄、性别校正

2. HER2 基因型与临床病理特征之间的关系:对 HER2 基因型与胃癌患者临床病理学特征进行分析。依患者 TNM 分期进行合理合并后,结果显示:携带 Val 等位基因者与 Ile 纯合子相比,进展期 ($T_2 \sim T_4$) 病例分别为 55/98 (83.33% / 68.06%, $P = 0.021$);淋巴结阳性 ($N_1 \sim N_3$) 病例分别为 44/71 (66.67% / 49.31%, $P = 0.019$);远处转移 (M_1) 病例分别为 23/31 (34.85% / 21.53%, $P = 0.051$);低分化 (Poorly) 病

例分别为 35/55 (53.03% / 38.19%, $P = 0.002$)。具体见表 2。

讨 论

HER2/neu 通过多种信号转导途径,包括 Ras/Raf/MAPK 途径、PI₃K/Akt 途径、STAT 途径等,参与细胞增生、凋亡以及转移、浸润相关基因的调控^[6]。有研究显示,HER2 蛋白的跨膜转导域 655 位的 A→G 突变导致的 Ile655Val 突变,可以明显地导致类似

表 2 基因型与临床病理特征之间的关系 [$n(\%)$]

TNM 分期	Ile/Ile 基因型 ($n = 144$)	Ile/Val 或 Val/Val 基因型 ($n = 66$)	χ^2	P
T				
Tis or T ₁	46 (31.94)	11 (16.67)	5.34	0.021
T ₂ ~ T ₄	98 (68.06)	55 (83.33)		
N				
N ₀	73 (50.69)	22 (33.33)	5.51	0.019
N ₁ ~ N ₃	71 (49.31)	44 (66.67)		
M				
M ₀	113 (78.47)	43 (65.15)	4.20	0.051
M ₁	31 (21.53)	23 (34.85)		
病理分级				
中到高分化	89 (61.81)	21 (31.82)	9.62	0.002
低分化	55 (38.19)	35 (53.03)		

配体介导的受体及其酪氨酸激酶的活化。并且增强了自磷酸化、酪氨酸激酶活性、以及细胞的转化。可见该位点的突变在肿瘤细胞恶性转化过程中可能起到一定的作用^[7]。基于该原因,以及 HER2 在乳腺癌中的重要作用,多个研究已报道了 HER2 基因 655 位单核苷酸多态性(SNP)与乳腺癌的发病风险相关^[8]。由于近年来,HER2 基因与胃癌的研究逐渐增多,针对 HER2 单克隆抗体 Herceptin 应用于 HER2 阳性的晚期胃癌患者也显示出可喜的疗效,HER2 与胃癌的关系逐渐被人们所关注。本研究对我国胃癌患者 HER2 655 位单核苷酸多态性进行了初步探讨。发现 Val/Val 和 Ile/Val 基因型在胃癌患者中的出现频率显著高于对照组,提示该位点多态性与我国人群中胃癌易感性相关。进一步证实了 HER2 基因与胃癌的密切关系,并提供了一个可能的潜在检测和治疗的靶点。

在本研究中对 HER2 基因型与胃癌患者临床病理学特征进行分析。结果表明,该基因 Ile655Val 突变的病例,在病理学上显示出浸润深度深,多有淋巴结转移,低分化比例高的特点。这与大多数临床病理观察发现较一致。目前的观察结果普遍认为:HER2/neu 与肿瘤的大小、浆膜浸润程度和淋巴结转移有关。该基因在Ⅲ、Ⅳ期胃癌扩增率明显高于Ⅰ、Ⅱ期。HER2 过表达更多见于进展期胃癌、乳头状腺癌及伴肝转移胃癌,且转移淋巴结过表达阳性率显著高于胃癌原发灶^[9]。本研究提示该位点的单核苷酸多态性对于预测胃癌的临床病理特征也具有一定的意义。

但在远处转移病例中,该位点突变与否未能显示出统计学差别。提示该位点突变与胃癌远处转移无显著相关。但也可能由于以 TNM 分期进行分层后,有的分层中病例数过少,从而影响了统计效能。若能扩大病例数,可得到进一步详细的分层分析结果。该位点突变所导致的分子生物学影响也需进一步深入研究证实。

单核苷酸多态性的研究结果十分多样化。首先是由于人种差异所决定的;其次,不同人群所处的自然环境及社会环境对遗传因素在肿瘤发生过程中的影响也不容忽视。例如在我国人群中存在的胃癌早期诊断率低这一问题从某种程度上会影响到基因分型与临床病理分期之间的关系。因此,更多病例数、不同种族的关于 HER2 基因 655 位密码子多态性与胃癌的关系的研究结果是值得期待的。

参考文献

- 1 Cho HS, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science*, 2002, 297 (5585) :1330 - 1333
- 2 Nelson SE, Gould MN, *et al.* A case - control study of the HER2 Ile655Val polymorphism in relation to risk of invasive breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(3) : R357 - R364
- 3 Frank B, Hemminki K, *et al.* The rare ERBB2 variant Ile654Val is associated with an increased familial breast cancer risk. *Carcinogenesis*, 2005, 26(3) :643 - 647
- 4 Ameyaw MM, Tayeb M, *et al.* Ethnic variation in the HER - 2 codon 655 genetic polymorphism previously associated with breast cancer. *J Hum Genet*, 2002, 47(4) :172 - 175
- 5 Benusiglio PR, Lesueur F, *et al.* Common ERBB2 polymorphisms and risk of breast cancer in a white British population: a case - control study. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(2) :R204 - R209
- 6 Liu SQ, Yu JP, Yu HG, *et al.* Activation of Akt and ERK signalling pathways induced by etoposide confer chemoresistance in gastric cancer celia. *Dig Liver Dis*, 2006 38(5) :310 - 318
- 7 Kuraoka K, Matsumura S, *et al.* A single nucleotide polymorphism in the transmembrane domain coding region of HER - 2 is associated with development and malignant phenotype of gastric cancer. *Int J Cancer*. 2003, 107(4) :593 - 596
- 8 Xie D, Shu Xiao - Ou, Deng Z, *et al.* Population - based, case - control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, 2000, (92) :412 - 417
- 9 Ballestin C, Vicioso L, *et al.* HER2/neu overexpression/amplification in advanced gastric cancer (AGC) patients: Correlation with clinicopathological parameters. *J Clin Oncol*, 2007, 25 :15046

(收稿:2010-04-22)

(修回:2010-05-11)