

# 表皮生长因子基因多态性与结直肠癌发生及其临床病理特征之间的关系

虞小芳 翁萌炜

**摘要** 目的 研究表皮生长因子(EGF)G61A多态性和结直肠癌发生及其临床病理特征之间的关系。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测了218例结直肠癌患者和200例健康体检者EGF61位点基因型,分析基因型和等位基因频率在两组间分布差异及其和肿瘤临床特点之间的关系。结果 EGF61位点GG基因型和G等位基因在结直肠癌患者和健康体检者中分布分别为56.4%、51.0%和76.6%、73.3%,在两组间分布均无显著性差异( $P>0.05$ )。但GG基因型和G等位基因均和C和D期肿瘤(Duke分期)、伴远端转移有关( $P<0.05$ )。结论 EGF G61A多态性和结直肠癌发生无关,但GG基因型可能与更晚的临床分期及易发生远端转移相关。

**关键词** 表皮生长因子 多态性 结直肠癌

**Association Between Epidermal Growth Factor (EGF) G61A Polymorphism and the Susceptibility as well as Clinicopathological Characteristics of Colorectal Cancer.** Yu Xiaofang, Weng Mengwei. Department of Laboratory Medicine, Hangzhou Red Cross Hospital, Zhejiang 310003, China

**Abstract Objective** To study the relationship between epidermal growth factor (EGF) G61A polymorphism and the susceptibility as well as clinicopathological characteristics of colorectal cancer (CRC). **Methods** EGF G61A polymorphism was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) among 218 CRC patients and 200 health subjects. The pathological data were obtained by reviewing of patients' hospitalized documentation. Statistical software SPSS 11.0 (SPSS, Inc.) was used to analyze these data. **Results** The distribution frequencies of GG genotype and G allele were 56.4%, 51.0% and 76.6%, 73.3% in CRC patients and health controls, respectively. The distribution frequencies had no significant difference ( $P>0.05$ ). But the patients with GG genotype or G allele were related to Duke C or D stage and the occurrence of distant metastasis. **Conclusion** EGF G61A polymorphism showed no susceptible to CRC, but GG genotype and G allele probably were close related to clinical progression of CRC patients.

**Key words** Epidermal growth factor; Polymorphism; Colorectal cancer

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)是一种强烈的促有丝分裂因子,能刺激多种组织细胞分裂和增生,并能促进肿瘤细胞浸润和转移。研究表明,结直肠癌(colorectal cancer, CRC)组织EGF表达明显高于癌旁组织,提示EGF可能在CRC发生、发展中扮演重要作用<sup>[1]</sup>。后来的研究发现,EGF基因5'端非编码区存在一个可影响EGF水平的多态性位点(G61A),并报道其可能和皮肤黑色素瘤及食管癌有相关性<sup>[2,3]</sup>。但是,目前国内外关于该多态性和CRC的关联研究还存在很大争议<sup>[4-6]</sup>。因此,本研究通过检测EGF G61A多态性在CRC患者和健康人群中分布情况,并分析肿瘤患者的临床病理特点,以进一步明确其与CRC发生及其临床进展之间的关系。

## 材料与方法

1. 研究对象:浙江大学邵逸夫医院以及杭州市第一人民医院普通外科2006年5月~2010年5月间收治的218例结直肠癌患者,其中男性143例,女性75例;年龄 $63.4 \pm 28.6$ 岁。所有病例均经病理学诊断为结直肠癌。对照组为200例健康体检者,其中男性140例,女性60例,年龄 $61.8 \pm 26.5$ 岁。结直肠癌临床分期根据Duke法分A、B、C、D期,病理分级根据世界卫生组织(WHO)的标准。患者的临床资料摘自住院病历。

2. 标本采集:抽取患者和健康体检者外周静脉血2ml, EDTA-K<sub>3</sub>抗凝,用于提取基因组DNA,采用全血基因组DNA提取试剂盒(北京天根生物技术有限公司)进行操作,提取后-80℃保存备用。

3. EGF G61A位点多态性分析:应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测该位点基因型<sup>[7]</sup>。(1)PCR扩增:引物序列为:上游5'-TGCTACTAAAG-GAAAGGAGGT-3',下游5'-TTCACAGAGTTTAACAGCCC-

3'(上海生物工程有限公司合成)。PCR 反应总体积为 25 $\mu$ l (试剂购于 TaKaRa 生物工程有限公司),其中 10  $\times$  缓冲液 (Mg<sup>2+</sup> plus) 2. 5 $\mu$ l,2. 5mmol/L dNTPs 2 $\mu$ l,上游、下游引物 (10 $\mu$ mol/L) 各 0. 5 $\mu$ l,模板 DNA 2 $\mu$ l,Taq DNA 聚合酶 (5U/ $\mu$ l) 0. 25 $\mu$ l。PCR 的反应条件为:94 $^{\circ}$ C 3min;94 $^{\circ}$ C 30s、51 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 30s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。取 10 $\mu$ l 扩增产物经含溴化乙锭 (EB) 的 1% 琼脂糖电泳 (美国 BIO - RAD 电泳仪),在凝胶成像仪 (美国 BIO - RAD) 下观察目的条带,扩增片段大小为 242bp。(2) RFLP:取 PCR 扩增产物 15 $\mu$ l,用 10 U 限制性内切酶 Alu I (Takara 生物工程有限公司) 于 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜。反应终止后,产物经含 EB 的 3% 琼脂糖凝胶电泳,以 DL - 2000 DNA 片段长度为参考,在凝胶成像仪下判断结果。根据酶切片段的情况,基因型有 3 种,GG (193 bp、34bp 和 15bp)、GA (193 bp、102bp、91bp、34bp 和 15bp) 和 AA (102bp、91bp、34bp 和 15bp)。

4. 统计学方法:Hardy - Weinberg 平衡吻合度用  $\chi^2$  检验。病例组和对照组间性别、年龄以及基因型和等位基因频率比较采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确概率法。统计学分析均以  $\alpha = 0. 05$  为水准进行双侧检验,以  $P < 0. 05$  为统计学有显著性差

异。所有数据统计均使用软件 SPSS 11.0 (SPSS, Inc. )。

结 果

1. EGF G61A 位点基因型和等位基因频率分布: EGF G61A 位点各基因型 RFLP 检测典型结果见图 1。其基因型和等位基因频率分布见表 1,两者分布均符合 Hardy - Weinberg 平衡。EGF G61A 位点基因型和等位基因频率在健康对照和 CRC 患者组中分布均无显著性差异 ( $P > 0. 05$ )。

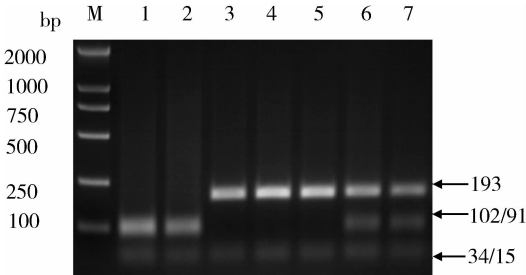


图 1 EGF G61A 多态性 PCR - RFLP 电泳结果  
M: DL2000;DNA marker; 1,2: AA 纯合子;  
3 - 5: GG 纯合子;6,7: GA 杂合子

表 1 EGF G61A 位点基因型和等位基因频率在健康对照和 CRC 患者组中分布 [n (%) ]

| 组别               | EGF 基因型     |            |          | 等位基因        |             |
|------------------|-------------|------------|----------|-------------|-------------|
|                  | GG          | GA         | AA       | G           | A           |
| 健康对照 (n = 200)   | 102 (51. 0) | 89 (44. 5) | 9 (4. 5) | 293 (73. 3) | 107 (26. 7) |
| CRC 患者 (n = 218) | 123 (56. 4) | 88 (40. 4) | 7 (3. 2) | 334 (76. 6) | 102 (23. 4) |
| $\chi^2$         |             | 1. 44      |          | 1. 25       |             |
| P                |             | 0. 42      |          | 0. 18       |             |

2. EGF G61A 位点基因型和等位基因频率分布与肿瘤患者临床病理特征的关系:由表 2 可见,EGF G61A 基因型和等位基因频率分布和结直肠癌位置、

病理分级、淋巴结转移无关 ( $P > 0. 05$ );但 GG 基因型和 G 等位基因均和 C 和 D 期肿瘤 (Duke 分期)、伴远端转移有关 ( $P < 0. 05$ )。

表 2 CRC 患者中 EGF G61A 基因型、等位基因分布和患者临床病理特点间的关系 [n (%) ]

| 临床病理特征  | n   | 基因型        |            |          | $\chi^2$ | P     | 等位基因        |            | $\chi^2$ | P     |
|---------|-----|------------|------------|----------|----------|-------|-------------|------------|----------|-------|
|         |     | GG         | GA         | AA       |          |       | G           | A          |          |       |
| 肿瘤位置    |     |            |            |          |          |       |             |            |          |       |
| 结肠      | 95  | 51 (53. 7) | 42 (44. 2) | 2 (2. 1) | 1. 48    | 0. 48 | 144 (75. 8) | 46 (24. 2) | 0. 13    | 0. 72 |
| 直肠      | 123 | 72 (58. 5) | 46 (37. 4) | 5 (4. 1) |          |       | 190 (77. 2) | 56 (22. 8) |          |       |
| 病理分级    |     |            |            |          |          |       |             |            |          |       |
| I       | 32  | 17 (53. 1) | 13 (40. 6) | 2 (6. 3) |          |       | 47 (73. 4)  | 17 (26. 6) | 0. 57    | 0. 75 |
| II      | 143 | 82 (57. 3) | 58 (40. 6) | 3 (2. 1) | 1. 85    | 0. 76 | 222 (77. 6) | 64 (22. 4) |          |       |
| III     | 43  | 24 (55. 8) | 17 (39. 5) | 2 (4. 7) |          |       | 65 (75. 6)  | 21 (24. 4) |          |       |
| Duke 分期 |     |            |            |          |          |       |             |            |          |       |
| A + B   | 139 | 68 (48. 9) | 66 (47. 5) | 5 (3. 6) | 8. 81    | 0. 01 | 202 (72. 7) | 76 (27. 3) | 6. 66    | 0. 01 |
| C + D   | 79  | 55 (69. 6) | 22 (27. 8) | 2 (2. 6) |          |       | 132 (83. 5) | 26 (16. 6) |          |       |
| 淋巴结转移   |     |            |            |          |          |       |             |            |          |       |
| 无       | 89  | 48 (53. 9) | 38 (42. 7) | 3 (3. 4) | 0. 38    | 0. 83 | 134 (75. 3) | 44 (24. 7) | 0. 29    | 0. 59 |
| 有       | 129 | 75 (58. 1) | 50 (38. 8) | 4 (3. 1) |          |       | 200 (77. 5) | 58 (22. 5) |          |       |
| 远端转移    |     |            |            |          |          |       |             |            |          |       |
| 无       | 140 | 70 (50. 0) | 65 (46. 4) | 5 (3. 6) | 6. 58    | 0. 04 | 205 (73. 2) | 75 (26. 8) | 5. 02    | 0. 03 |
| 有       | 78  | 53 (67. 9) | 23 (29. 5) | 2 (2. 6) |          |       | 129 (82. 7) | 27 (17. 3) |          |       |

## 讨 论

在 EGF G61A 多态性和消化道肿瘤的关联研究<sup>[3]</sup>中,已发现其与胃癌、食管癌的发生、发展相关,其中白种人 GG 基因型患食管癌的风险约是野生型的 2 倍;日本人 GG 基因型患胃癌风险明显高于 GA 和 AA 基因型,而且 GG 基因型和胃癌恶性进展正相关,包括侵袭深度、淋巴结转移、肿瘤临床分期以及组织学分级。

在已有的 EGF G61A 多态性和 CRC 的关系探讨中,Wu 等<sup>[4]</sup>认为 EGF61 GG 基因型和 G 等位基因明显和 CRC 相关,但和肿瘤不同病理分期和病理分级无关。Kovar 等<sup>[5]</sup>研究发现 GG 基因型和 Duke 分期以及复发(肝转移)相关,而且只发生在 65 岁以下患者。在以中国人为对象的研究中,未发现 EGF61 G61A 多态性和 CRC 的发生以及肿瘤临床病理特征存在关联<sup>[6]</sup>。通过本研究,我们也未发现中国人 EGF G61A 多态性和 CRC 发生存在关联,同时也未发现和肿瘤位置、病理分级以及有无淋巴结转移相关,但是结果显示 GG 基因型和 G 等位基因与一些临床恶性进展正相关,包括 Duke 分期和远端转移。因此,本研究结果提示中国人 EGF G61A 多态性可能只涉及 CRC 临床进展。该方面的研究存在上述结论差异可能与研究对象的种族、样本大小以及统计学方法的运用等有关。

EGF 是一种促血管内皮细胞有丝分裂的因子,是肿瘤细胞分泌的血管形成因子中最重要的一种,同时具有增加血管通透性和引起细胞外基质改变的作用,

其作为一种参与肿瘤进展和转移的重要分子,在结直肠癌中同样存在过表达情况。EGF 和 EGFR 结合,引起细胞分裂和增生等一系列生化过程,如起调节作用的癌基因激活或抑癌基因失活,从而促进肿瘤细胞的生长及浸润能力,增强转移趋势。现已证明 EGF61 GG 基因型和血清及组织 EGF 高水平相关,高 EGF 水平势必能促进和增强肿瘤的浸润和转移能力<sup>[2,3]</sup>。这些阐述可能初步解释 EGF61 GG 基因型和 G 等位基因和更晚的临床分期及易发生远端转移相关。

## 参考文献

- 1 Messa C, Russo F, Caruso MG, *et al.* EGF, TGF- $\alpha$  and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. *Acta Oncol*, 1998, 37: 285-289
- 2 Shahbazi M, Pravica V, Nasreen N, *et al.* Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. *Lancet*, 2002, 359(9304): 397
- 3 Lanuti M, Liu G, Goodwin JM, *et al.* A functional epidermal growth factor (EGF) polymorphism, EGF Serum Levels, and esophageal adenocarcinoma risk and outcome. *Cancer Prevention and Susceptibility*, 2008, 14(10): 3216-3222
- 4 吴国洋, Cheese M, Hasenberg T, *et al.* EGF 基因多态性与结直肠癌的关系. *中华普通外科杂志*, 2005, 20(11): 738-739
- 5 Kovar FM, Thallinger C, Marsik CL, *et al.* The EGF 61A/G polymorphism - a predictive marker for recurrence of liver metastases from colorectal cancer. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 2009, 121(19-20): 638-643
- 6 陈越峰, 戚鹏, 阮灿平, 等. EGF + 61 基因多态性与结直肠癌的相关性研究. *实用癌症杂志*, 2009, 24(6): 551-554

(收稿:2010-07-26)

## 绝经前后女性急性心肌梗死患者 冠心病危险因素对比研究

朱 航 张 瑜 董 蔚 张华巍 王 浩 陈 思 章 明

**摘 要 目的** 探讨绝经前后女性急性心肌梗死患者冠心病危险因素的特点。**方法** 回顾性分析 2005 年 1 月~2010 年 1 月解放军总医院收治的女性急性心肌梗死患者共 246 例,根据是否绝经及绝经年限进行分组,对各组的冠心病危险因素进行对比分析。**结果** 绝经前组的平均体重指数、纤维蛋白原、总胆红素水平以及吸烟、低血红蛋白者比例与绝经后各组相比,差异均无统计学意义( $P \geq 0.05$ )。绝经前组、绝经 5 年内组、绝经 5~10 年组的高血压和糖尿病患者比例进行组间比较,差异无统计学意义。

作者单位:100853 北京,解放军总医院心血管内科(朱航、董蔚、张华巍、陈思、章明);300071 天津,南开大学医学院临床医学系(张瑜);100853 北京,解放军总医院南楼心血管一科(王浩)

通讯作者:董蔚,电子信箱:301dongw@sina.com