

血小板源性生长因子 - D 基因多态性与大肠癌遗传易感性关系的研究

杨志伟 王燕锋 朱大勇 陈晓红 毛晓光 王燕颖

摘要 目的 探讨血小板源性生长因子 - D(PDGF - D)基因多态性与大肠癌发病的关系。方法 选择 88 例大肠癌组织和 50 例正常大肠组织为研究对象,应用聚合酶链反应 - 限制性片段长度多态性(PCR - RFLP) 技术进行检测 PDGF - D - 858A/C 和 +3166C/G 位点的基因型。**结果** PDGF - D 基因 - 858A/C 位点多态性在大肠癌组和正常组的分布差异无统计学意义($P > 0.05$),而 PDGF - D 基因 +3166C/G 多态性在两组人群中的分布差异有统计学意义($P < 0.05$),通过 Logistic 回归分析发现 PDGF - D 基因 +3166C/G 位点中,携带 G 等位基因的基因型(CG + GG)可增加总体大肠癌发病风险,未发现 - 858A/C 位点与大肠癌的发生显著相关。PDGF - D 基因 - 858A/C 和 +3166C/G 两个位点之间存在连锁不平衡。利用这 2 个位点构建单体型,发现单体型 CG 在大肠癌组中的频率显著高于对照组中的频率($OR = 3.2, 95\% CI: 1.3 \sim 8.3, P < 0.05$)。**结论** PDGF - D + 3166C/G 位点基因多态性与大肠癌发病有关,其中 +3166 G 等位基因可能是大肠癌的遗传易感基因,PDGF - D 基因 CG 单体型是大肠癌发病的危险因素。

关键词 血小板源性生长因子 - D 基因多态性 单体型 大肠癌

[中图分类号] R735.3 [文献标识码] A

Study on Association of Platelet - derived Growth Factor - D Gene Polymorphism with Genetic Susceptibility to Colorectal Cancer. Yang Zhiwei, Wang Yanfeng, Zhu Dayong, et al. Department of General Surgery, People's Hospital of Heilongjiang Province, Heilongjiang 150001, China

Abstract Objective To explore the relationship between platelet - derived growth factor - D(PDGF - D) genetic polymorphisms and the risk of colorectal cancer. **Methods** Eighty - eight cases of colorectal cancer tissues and fifty cases of normal colorectal tissues were investigated for detecting the PDGF - D - 858A/C and +3166C/G genotype by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphisms (PCR - RFLP) techniques. **Results** The distributions of PDGF - D gene - 858A/C polymorphism was not significant different between case of colorectal cancer and control group($P > 0.05$),but the PDGF - D gene +3166C/G polymorphism was significant different($P < 0.05$). Logistic regression analysis was performed to identify that as compared with the +3166C/G genotype,the +3166G carriers (CG + GG) had a increased risk of colorectal cancers. There was no significant relationship between - 858 genotype and colorectal cancer. PDGF - D - 858A/C and +3166C/G polymorphisms existed linkage disequilibrium. Advance analysis showed that the frequency of CG haplotype(- 858/+3166) was significantly higher in colorectal cancer group than in normal group($OR = 3.2; 95\% CI: 1.3 \sim 8.3; P = 0.015$). **Conclusion** PDGF - D gene +3166C/G polymorphism is associate with colorectal cancer, +3166 G allele is an important genetic susceptibility gene for colorectal cancer. CG haplotype is an independent risk factor to colorectal cancer.

Key words Platelet - derived growth factor - D; Gene polymorphism; Haplotype; Colorectal cancer

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,其发病过程从黏膜增生到腺瘤癌变、浸润呈阶段性发展,易感基因在其复杂的发病过程中起着重要作用。血小板源性生长因子 - D(platelet - derived growth factor D,PDGF - D)是近年来发现的 PDGF 家族新成员,作为原癌

基因 C - sis 的表达产物,具有促进肿瘤血管生成、增殖及增强侵袭力等作用^[1,2]。有报道发现 PDGF - D 在多种肿瘤中呈过表达,如胃癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌等^[3,4]。目前有关 PDGF - D 基因多态性与大肠癌的发病是否存在关联尚未见报道,本研究旨在探讨 PDGF - D(- 858A/C 和 +3166C/G)基因多态性与大肠癌遗传易感性之间的关系。

材料与方法

1. 标本来源:收集笔者医院 2011 年 6 月 ~ 2013 年 12 月

基金项目:黑龙江省卫生厅科研项目(2011 - 663)

作者单位:150001 哈尔滨,黑龙江省医院普外二科(杨志伟、朱大勇、陈晓红、王燕颖),药剂科(王燕锋),消化科(王燕颖)

通讯作者:杨志伟,电子信箱:zhaoliangyan2003@163.com

手术切除大肠癌石蜡标本 88 例,其中男性 50 例,女性 38 例,患者平均年龄 58.71 ± 11 岁,全部患者术前均未接受放化疗;采用同期住院手术的非大肠恶性肿瘤患者 50 例作为正常对照组,男性 31 例,女性 19 例,患者年龄 31 ~ 82 岁,平均年龄 56.72 ± 15.00 岁。

2. 主要试剂:组织 DNA 提取试剂盒及与 PCR 相关的试剂购自北京天根生化科技有限公司;限制性内切酶: Hinf I、BsmA I 均购自美国 NEB 公司。

3. 石蜡包埋组织 DNA 提取:按试剂盒说明进行 DNA 提取。

4. 引物设计与合成:引物通过 Primer Premier 5.0 软件进行设计,Oligo 6.0 软件进行检测,由中国奥科生物公司合成。PDGF - D - 858A/C 位点上游引物序列为 5' - GCCTCTTC-CTATGGACTGTGA - 3';下游引物序列为 5' - GGGATGTGGG-GACAGGGA - 3'; + 3166C/G 位点上游引物序列为 5' - GC-CACATTTAGCCATTCT - 3';下游引物序列为 5' - TGTTGG-GATGAAGAAAGG - 3'。扩增片段长度分别为 317bp、320bp。

5. 基因型判定方法:采用聚合酶链反应 - 限制性片段长度多态性(PCR - RFLP)检测:首先用引物进行 PCR 扩增,扩增片段长度 - 858 位点为 317bp, + 3166 位点为 320bp。- 858A/C位点为 AA 基因型时可被 Hinf I 酶切为 263bp、54bp 两个条带;为 CC 基因型时被酶切为 317bp 单个条带;为 AC 基因型时被酶切为 317bp、263bp 和 54bp 3 个片段,在琼脂糖胶上呈现的是 317bp 和 263bp 大小的两个条带(图 1)。+ 3166C/G位点为 CC 基因型时可被 BsmA I 酶切为 320bp 单个条带;为 GG 基因型时被酶切为 128bp、192bp 两个条带;为 CG 基因型时被酶切为 320bp、192bp 和 128bp 3 个条带(图 2)。

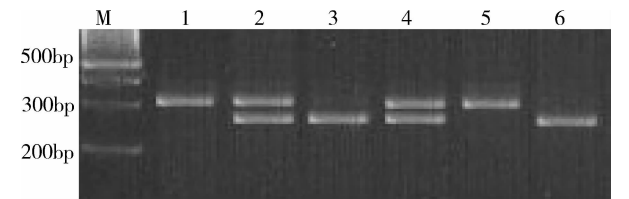


图 1 -858A/C 基因 PCR 扩增产物经 Hinf I 限制酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果

1、5. CC 基因型;3、6. AA 基因型;2、4. AC 基因型;M. DNA 分子质量标准

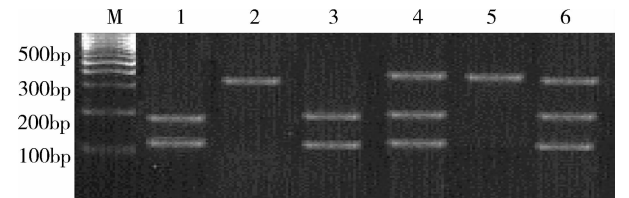


图 2 +3166C/G 基因 PCR 扩增产物经 Hinf I 限制酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果

2、5. CC 基因型;1、3. GG 基因型;4、6. CG 基因型;M. DNA 分子质量标准

6. 统计学方法:所有数据应用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理。采用基因计数法计算等位基因频率;等位基因频率和基因型频率分布差异,每个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)位点的单位点关联分析均采用 χ^2 检验;利用多因素 Logistic 回归分析评价大肠癌的相关危险因素,计算调整后的相对危险度和 95% 可信区间;采用 Phase 2.0 软件估计每种单体的频率,并计算正常组和大肠癌组中单体型频率的整体差异,采用 χ^2 检验比较每个单体型频率在正常组和大肠癌组的分布是否有统计学差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. PDGF - D - 858A/C 和 + 3166C/G 基因多态性与大肠癌的相关性:经 χ^2 检验,PDGF - D 基因的 2 个位点 - 858A/C 和 + 3166C/G 的基因型频率在大肠癌组和正常组的分布均符合 Hardy - Weinberg 平衡($P > 0.05$)。2 个位点的基因型频率以及等位基因频率在大肠癌组和正常组的分布见表 1、表 2。结果显示,PDGF - D 基因 - 858 位点 A/C 的基因型频率和等位基因频率在两组中差异无统计学意义($P > 0.05$), + 3166 位点 GG 基因型频率大肠癌组为 25.0%,正常组为 12.0%,G 等位基因频率在大肠癌组为 40.9%,正常组为 24.0%,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 大肠癌组和正常组 PDGF - D 基因 - 858 位点 A/C 多态性分布

组别	n	基因型[n(%)]*			等位基因频率(%)*	
		AA	AC	CC	A	C
正常组	50	6(12.0)	21(42.0)	23(46.0)	33.0	67.0
大肠癌组	88	9(10.2)	37(42.1)	42(47.7)	31.3	68.7

与大肠癌组比较,* P 均 > 0.05

表 2 大肠癌组和正常组 PDGF - D 基因 + 3166 位点 C/G 多态性分布

组别	n	基因型[n(%)]			等位基因频率(%)	
		CC	CG	GG [△]	C	G [△]
正常组	50	32(64.0)	12(24.0)	6(12.0)	76.0	24.0
大肠癌组	88	47(53.4)	19(21.6)	22(25.0)	59.1	40.9

与大肠癌组比较,[△] $P < 0.05$

在 Logistic 回归分析中,以大肠癌为因变量,通过调整年龄、吸烟、饮酒、血脂、血糖、大肠癌家族史等传统的大肠癌发病危险因素后得到了 PDGF - D 基因 SNPs 和大肠癌患病风险之间的关系(表 3)。结果发现 + 3166C/G 位点 C 基因型与大肠癌患病风险呈负相关性(OR = 0.227,95% CI:0.137 ~ 0.751)。与 CC

基因型相比,携带 G 等位基因的基因型(CG + GG)可增加总体大肠癌发病风险。未发现 -858A/C 与大肠癌的发生显著相关。

表 3 Logistic 回归分析 -858A/C 和 +3166C/G

位点与大肠癌的相关性

分析因素	OR (95% CI)	P
年龄	1.047 (1.001 ~ 1.069)	0.044
吸烟	1.098 (0.740 ~ 1.663)	0.830
饮酒	1.014 (0.824 ~ 1.035)	0.881
血糖	1.128 (0.915 ~ 1.369)	0.335
甘油三酯	0.951 (0.863 ~ 1.275)	0.464
大肠癌家族史	1.582 (1.373 ~ 1.844)	0.026
-858A/C, CCvsAC + AA	3.710 (0.857 ~ 5.284)	0.061
+3166C/G, CCvsCG + GG	0.227 (0.137 ~ 0.751)	0.038

2. 大肠癌组与正常组 PDGF - D 基因的连锁不平衡和单体型分析:通过计算 PDGF - D 基因 -858A/C 和 +3166C/G 两个位点之间的连锁不平衡程度,发现这两个位点之间存在连锁不平衡($D' = 0.756$)。利用 2 个位点构建单体型,以野生单体型 CC(-858/+3166)为参照,利用 χ^2 检验比较每种单体型在两组之间的频率差异(表 4)。结果显示单体型 CG 在大肠癌组中的频率显著高于正常组中的频率($OR = 3.2$, $95\% CI: 1.3 \sim 8.3$, $P < 0.05$),提示 CG 单体型是大肠癌的危险因素。

表 4 PDGF - D 基因各单体型(-858/+3166)的危险度比较

单体型	大肠癌组 (n = 88)	对照组 (n = 50)	大肠癌组 vs 对照组 OR (95% CI)	P
CC	36	29	1	
CG	28	7	3.2 (1.3 ~ 8.3)	0.015
AC	22	10	1.8 (0.7 ~ 4.3)	0.209
AG	2	4	0.4 (0.1 ~ 2.3)	0.304

讨 论

大肠癌的发生、发展是一个复杂的演进过程,基因多态性是决定个体易感性和临床转归的一个重要因素^[5]。SNPs 是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异引起的 DNA 序列多态性,是人类最常见的一种可遗传变异,占有已知多态性类型的 90% 以上^[6]。通常由单个碱基的转换所引起,也可由碱基的缺失、插入、或框移突变所致^[7]。SNPs 作为第 3 代遗传标记,对肿瘤的发生、个体化治疗及早期诊治具有积极作用。

PDGF 是重要的血管内皮生长因子成员之一,与

PDGF 受体特异性结合后促进血管内皮细胞增殖与分化^[8]。其家族包括 PDGF - A、B、C 和 D4 个成员,均由二硫键链接的同源或异源二聚体组成。其中 PDGF - D 基因是在进行 EST 数据库比对寻找新的 VEGF 同源体时无意间发现的,PDGF - D 链在 CUB 结构域和 PDGF 结构域大约有 42% 相似序列,但在铰链区很少有相似比^[9,10]。人类编码 PDGF - D 的基因位于 11q22.3 ~ 23.2 染色体上^[11]。PDGF - D 由 370 个氨基酸组成,相对分子质量约为 40.2kDa。以酶原形式分泌的 PDGF - D 蛋白无活性,在纤溶蛋白酶等多种蛋白酶的水解作用下,将其铰链区 N 末端 CUB 结构和 C 末端生长因子结构分离开来,形成同源二聚体 PDGF - DD 后再与特异性受体 PDGFR - β 结合,导致受体磷酸化激活而发挥效应,并参与 PI_3K 、NF - κB 、Akt 及 Noth 等多种信号通路来调控细胞的增殖、迁移、侵袭和血管形成,在肿瘤的发生发展过程中起重要作用^[12]。

关于 PDGF - D 基因多态性与大肠癌的关系尚未见文献报道,为进一步明确 PDGF - D 基因多态性是否与大肠癌的发生相关,本研究以大肠癌和正常大肠黏膜组织为研究对象,通过病例对照方法研究了 PDGF - D 基因 -858A/C 和 +3166C/G 多态性位点与大肠癌的关系。结果发现,PDGF - D 基因 -858A/C 位点的基因型频率和等位基因频率在大肠癌组和正常组中差异无统计学意义。大肠癌组中 +3166C/G 位点的 GG 基因型频率和 G 等位基因频率显著高于正常组。PDGF - D +3166 位点 C 基因型与大肠癌患病风险呈负相关,与 CC 基因型相比,携带 G 等位基因的基因型(CG + GG)可增加总体大肠癌发病风险,而 -858 位点的基因型与大肠癌的发生无显著相关。PDGF - D 基因中单体型 CG 在大肠癌组中的频率显著高于正常组,表明单体型 CG 是大肠癌的危险因素,它可使大肠癌的患病风险增加 3.2 倍。研究结果提示 PDGF - D 基因 +3166C/G 多态性和 CG 单体型与大肠癌的发病具有相关性,其中 +3166 位点 G 等位基因可能是大肠癌的遗传易感基因。

本项研究为进一步深入研究 PDGF - D 基因多态性与大肠癌的关系提供了理论依据。本研究结果有利于大肠癌的早期诊断,有助于筛选和保护大肠癌易感人群,利用其基因多态性对不同个体采取有效的干预措施。

参考文献

- 1 Wang Z, Kong D, Banerjee S, et al. D - regulation of platelet - de-

- rived growth factor - D inhibits cell growth and angiogenesis through inactivation of Notch - 1 and nuclear factor - kappaB signaling [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (23):11377 - 11385
- 2 Wang Z, Ahmad A, Li Y, *et al.* Emerging roles of PDGF - D signaling pathway in tumor development and progression [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1806(1):122 - 130
- 3 Ustach CV, Huang W, Conley - LaComb MK, *et al.* A novel signaling axis of matrip tase / PDGF - D / β - PDGFR in human prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9631 - 9640
- 4 Ahmad A, Wang Z, Kong D, *et al.* Platelet - derived growth factor - D contributes to aggressiveness of breast cancer cells by up - regulating Notch and NF - κ B signaling pathways [J]. *Breast Cancer Res treat*, 2011, 126(1):15 - 25
- 5 Demant P. The genetic factors in cancer development and their implications for cancer prevention and detection [J]. *Radiat Res*, 2005, 164(4 Pt 2): 462 - 466
- 6 Carlson CS, Newman TL, Nickerson DA. SNPing in the human genome[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5(1):78 - 85
- 7 Kwok PY. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2001,2: 235 - 258
- 8 Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products from five dimeric isoforms [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15(4): 197 - 204
- 9 Hamada T, Ui - Tei K, Imaki J, *et al.* Molecular cloning of SCDGF - B, a novel growth factors homologous to SCDGF/PDGF - C/fallotein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280(3):733 - 737
- 10 Floege J, Eitner F, Alpers CE. A new look at platelet - derived growth factor in renal disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(1): 12 - 23
- 11 Uutela M, Lauran J, Bergsten E, *et al.* Chromosomal location, exon structure and vascular expression patterns of the human PDGF - C and PDGF - D genes[J]. *Circulation*, 2001, 103(18):2242 - 2247
- 12 Li M, Jendrossek V, Belka C. The role of PDGF in radiation oncology [J]. *Radiat Oncol*, 2007, 2: 5

(收稿日期:2014 - 03 - 16)

(修回日期:2014 - 04 - 02)

不同阶段全身运动质量评估对高危新生儿神经发育结局的早期预测价值的研究

冯军坛 阮毅燕 梁晓竹

摘 要 目的 研究不同阶段全身运动 (general movements, GMs) 质量评估对高危新生儿神经发育结局的早期预测价值。**方法** 110 例高危新生儿入组,所有病例在出生到纠正胎龄 <40 周、纠正胎龄 $\geq$ 40 周至 <49 周内、纠正胎龄 $\geq$ 49 周至 <60 周内各进行 1~2 次 GMs 质量评估;在年龄为 1 岁时,对所有病例判断是否为脑瘫,剩余病例则采用 Gesell 发育量表进行神经发育评估,将结果分为正常及精神运动发育迟缓;计算阳性预测值、阴性预测值、敏感度及特异性。**结果** 预测脑瘫时,单调运动 (poor repertoire, PR)、痉挛 - 同步 (cramped - synchronized, CS)、不安运动缺乏 (absent fidgety movement, F-) 的阳性预测值分别为 2.9%、50%、75%,阴性预测值分别为 96%、98.1%、99%,敏感度分别为 25%、50%、75%,特异性分别为 68.9%、98.1%、99%。预测精神运动发育迟缓时 PR、CS、F- 阳性预测值分别为 64.7%、25%、25%,阴性预测值分别为 93.4%、75.5%、75.5%,敏感度分别为 81.5%、3.8%、3.7%,特异性分别为 85.5%、96.4%、96.4%。**结论** GMs 质量评估表现为 CS 和 F- 时高度预测脑瘫,其中 F- 的预测价值最高。在预测精神运动发育迟缓上,GMs 质量评估为 PR 时预测价值最高。

关键词 全身运动质量评估 高危新生儿 神经发育结局 预测价值

[中图分类号] R72

[文献标识码] A

Study of Early Predictive Value of Qualitative Assessment of Different Phase of General Movements for High Risk Neonatal Neurodevelopmental Outcome. Feng Juntan, Ruan Yiyan, Liang Xiaozhu. Department of Pediatric, Guangxi Women and Children Health Hospital, Guangxi 530003, China

Abstract Objective To study the early predictive value of qualitative assessment of different phase of general movements for risk neonatal neurodevelopmental outcome. **Methods** Totally 110 high risk newborns were analyzed. All the patient underwent the qualitative assessment of general movements one or two times during the age between after birth. to corrected gestational age 40 weeks, the corrected gestational age between 40 weeks to 49 weeks and 49 weeks to 60 weeks. To determine if they had cerebral palsy at age of 1 year old, the

基金项目:广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题 (Z2012200, Z2008199)

作者单位:530003 南宁,广西壮族自治区妇幼保健院儿科一区