

- 胞的研究[J]. 胃肠病学, 2008, 13 (7):403-405
- 15 Le RT, Llopis M, Lepage P, *et al.* Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice[J]. Gut, 2013, 62(12):1787-1794
- 16 Soza A, Riquelme A, González R, *et al.* Increased orocecal transit time in patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. Dig Dis Sci, 2005, 50(6):1136-1140
- 17 易国领, 姚瑶萍. 脂代谢与肠道菌群关系的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(6):991-994
- 18 田凤石, 刘勇. 代谢综合征与肠道菌群的研究进展[J]. 中华心血管病杂志, 2017, 45(8):726-729
- 19 Singh SP, Kar SK, Panigrahi MK, *et al.* Profile of patients with incidentally detected nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in coastal eastern India[J]. Tropical Gastroenterol, 2013, 34(3):144-152
- 20 周晓颖, 苏静, 张国新. 糖尿病胃肠动力障碍机制研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2013, 33(6):373-375
- 21 Olausson EA, Grundin H, Isaksson M, *et al.* Postprandial plasma glucose response and gastrointestinal symptom severity in patients with diabetic gastroparesis[J]. Diabetes Sci Technol, 2014, 8(4):881-888
- 22 李治全, 季锋, 韩新巍, 等. 胃食管反流病与高血压病的临床相关性研究[J]. 临床误诊误治, 2017, 30(7):53-56
- 23 Yuan HP, Li XP, Yang WR, *et al.* Inducible nitric oxide synthase in the duodenal mucosa is associated with mast cell degranulation in patients with functional dyspepsia[J]. Ann Clin Lab Sci, 2015, 45(5):522-527
- (收稿日期:2018-01-25)
(修回日期:2018-03-07)

CCND1 基因多态性与胃癌易感性的关系

高琳琳 宋 光

摘 要 **目的** 探讨 CCND1 基因 rs9344、rs7177、rs1944129 位点多态性与胃癌易感性的关系。**方法** 采用病例对照研究方法,选取中国黑龙江省 292 例汉族胃癌患者为病例组,同期进行健康体检的 298 例健康体检者为对照组,抽取两组患者外周静脉血,提取全血基因组 DNA,应用多重 PCR 技术扩增目的基因片段,采用 ABI3730XL 测序仪进行基因测序并分析基因型。**结果** 病例组与对照组相比,CCND1 基因 rs9344、rs7177、rs1944129 位点基因型分布差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** CCND1 基因 rs9344、rs7177、rs1944129 位点多态性与胃癌的发病风险无明显相关性。

关键词 CCND1 基因 基因多态性 胃癌

中图分类号 R573.9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.01.030

Relationship between CCND1 Gene Polymorphism and Gastric Cancer. Gao Linlin, Song Guang. First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang 150001, China.

Abstract Objective To investigate the relationship between CCND1 gene rs9344, rs7177 and rs1944129 polymorphisms and gastric cancer susceptibility. **Methods** Case-control study was used to select 292 Han patients with gastric cancer in Heilongjiang Province of China as the case group. 298 healthy checkers in the same period were selected as the control group. Peripheral venous blood was collected from both groups and whole blood DNA was extracted. The multiplex PCR technique was used to amplify the target gene fragments, and ABI 3730XL sequencer was used for gene sequencing and genotype analysis. **Results** There was no statistically significant difference in genotype distribution of CCND1 gene rs9344, rs7177 and rs1944129 between the case group and the control group ($P > 0.05$). **Conclusion** The CCND1 gene rs9344, rs7177 and rs1944129 polymorphisms are not significantly associated with the risk of gastric cancer.

Key words CCND1 gene; Gene polymorphism; Gastric cancer

胃癌是最常见的胃肠道恶性肿瘤之一,也是全球癌症死亡的第二大致死因素^[1]。据全国肿瘤登记中心统计数据显示,2015 年中国癌症新增 429.16 万例,死亡 281.42 万例,其中胃癌 67.91 万例,在各类癌症中占比 15.82%;因胃癌死亡 49.8 万例,在各类癌症

中占比 17.69%,居发生率和病死率的第 2 位^[2]。胃癌是一种多种病因的复杂疾病,其病因包括幽门螺杆菌感染、遗传因素和某些环境饮食因素,比如食用含有致癌硝酸盐的腌制食品、生活方式、烟草、乙醇等。在影响胃癌发病的多种因素中,遗传易感性仍然是当前研究的热点。遗传易感性的不同主要来自于基因的多态性,其中单核苷酸多态性(single nucleotide

polymorphism, SNP) 是最常见的变异。SNP 是决定人类疾病易感性的核心信息,它能够更加真实地体现不同人群个体之间的遗传差异,因此被认为是新一代的遗传标记。

肿瘤被认为是一种细胞周期性疾病,现已经证明细胞周期调控似乎在几种类型癌症的细胞增殖、分化和细胞凋亡中起关键作用,它可以影响线粒体代谢、通过 DNA 调节转录因子信号转导、染色体不稳定性的诱导等^[3]。CyclinD 家族(细胞周期蛋白)是细胞周期的正调节器,其中最重要的是细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1, CCND1)。CCND1 贯穿了整个细胞周期,调节了细胞周期不同阶段的进展,在细胞周期中起到特定作用。它通过与周期素依赖性蛋白激酶 4 或 6 (CDK4 或 CDK6) 结合形成复合体,并作为其调节亚基起作用,促进细胞从 G₁ 期进入 S 期,其活性是从 G₁ 向 S 期转变所必需的^[4]。编码 CCND1 的基因,即 CCND1 基因,被称为原癌基因,它作为有丝分裂的信号传感器,通常在肿瘤细胞中的数量上发生改变,其基因扩增和蛋白质过度表达使细胞周期缩短,从而导致肿瘤细胞自主无限性增殖^[5~7]。

CCND1 基因存在多态性位点,即具有单核苷酸多态性,其中研究最多的是在核苷酸 870(242 位密码子)处的 G/A 多态性。许多研究表明,CCND1 基因多态性与多种肿瘤有相关性,包括乳腺癌、结直肠癌等,但研究结果不尽相同,且与胃癌关系的研究较少^[8,9]。因此,本研究采用病例对照研究,选取 CCND1 基因 rs9344、rs7177、rs1944129 多态性位点,探讨其与胃癌发生、发展的关系,为将来胃癌的早期诊断、筛查及治疗提供线索。

对象与方法

1. 研究对象:收集 2016 年 10 月~2017 年 10 月期间在哈尔滨医科大学附属第三医院就诊的胃癌患者 292 例(病例组),所有患者均经临床和病理证实确诊为胃癌,均未进行过放疗和化疗,且为原发性胃癌,排除继发性或复发性肿瘤及其他恶性肿瘤。选取同期哈尔滨医科大学附属第一医院体检中心的健康体检者 298 例为对照组,既往均无肿瘤遗传病史,对照组与病例组患者的性别、年龄情况相匹配,两组人

群无血缘关系。

2. 方法:(1)血液基因组 DNA 提取:抽取研究对象外周静脉血 2ml,采用天根生物技术有限公司提供的血液基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,将提取的 DNA 于 -20℃ 冰箱保存。(2)PCR 扩增目的基因片段:根据 CCND1 基因组序列设计 CCND1 基因 rs9344、rs7177、rs1944129 位点 PCR 引物。rs9344 引物序列:上游引物:5' - GAACCTGAGGAGCCCCAA-CAAC - 3',下游引物:5' - GGCCTAGGTGTCTC-CCCCTGT - 3'。rs7177 引物序列:上游引物:5' - AG-GTGGACCTGGCTTGCACAC - 3',下游引物:5' - AAAA-CAACCAACAACAAGGAGAATGAA - 3'。rs1944129 引物序列:上游引物:5' - CCCCATTTGGCTCATGCTAATTC - 3',下游引物:5' - GATTTATGGGGCCCGGAGCTAT - 3'。PCR 反应体系(20μl)包含 1 × HotStarTaq buffer, 3.0mmol/L Mg²⁺, 0.3mmol/L dNTP, 1 U HotStarTaq polymerase (Qiagen Inc.), 1 μl 样本 DNA 和 1μl 多重 PCR 引物。PCR 扩增条件:95℃ 预变性 5min 后,95℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,循环 30 次,最后 72℃ 10min,4℃ 保温。进行多重 PCR 产物纯化,用连接酶连接扩增产物。(3)DNA 测序:取 0.5μl 稀释后的连接产物,采用 ABI3730XL 测序仪进行测序。

3. 统计学方法:采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。定量资料采用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,定性资料采用例数(百分比)描述。使用 Hardy - Weinberg 遗传平衡检验基因型频率的遗传平衡性。病例组与对照组的组间比较采用 χ^2 检验,并估计比值比(OR)及其 95% 置信区间(CI),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 两组一般资料比较:292 例胃癌患者中,其中男性 207 例,女性 85 例;298 例对照组人群中,其中男性 203 例,女性 95 例。病例组患者的平均年龄为 56.93 ± 10.19 岁,对照组人群平均年龄为 55.75 ± 11.14 岁。胃癌患者和对照组年龄和性别的比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),两组人群具有可比性,详见表 1。

表 1 两组一般资料比较

指标	对照组	病例组	t/χ^2	P	OR(95% CI)
年龄(岁)	55.75 ± 11.14	56.93 ± 10.19	-1.3500	0.1287	-
男性 n(%)	203(68.12)	207(70.89)	0.5336	0.4651	-
女性 n(%)	95(31.88)	85(29.11)	-	-	1.14(0.802 ~ 1.619)

2. *Hardy - Weinberg* 遗传平衡检验:经过 *Hardy - Weinberg* 遗传平衡检验,两组患者基因型的观察值和期望值比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$), CCND1

基因 rs1944129、rs7177、rs9344 位点基因型频率符合遗传平衡定律,所选样本具有代表性,详见表 2。

表 2 CCND1 基因 rs1944129、rs7177、rs9344 位点基因型 *Hardy - Weinberg* 遗传平衡检验

位点	病例组		χ^2	<i>P</i>	对照组		χ^2	<i>P</i>
	观察值	期望值			观察值	期望值		
rs1944129	15	11.72	1.44	>0.05	10	13.32	1.33	>0.05
	87	93.56			106	99.36		
	190	186.72			182	185.32		
rs7177	206	206.40	0.03	>0.05	218	218.20	0.01	>0.05
	79	78.19			74	73.59		
	7	7.40			6	6.20		
rs9344	90	86.58	0.65	>0.05	87	89.16	0.25	>0.05
	138	144.84			152	147.68		
	64	60.58			59	61.16		

3. CCND1 基因 rs1944129、rs7177、rs9344 多态性与胃癌易感性的关系:病例组和对照组 CCND1 基因 rs1944129、rs7177、rs9344 位点的基因型频率,详见表

3。结果显示,病例组与对照组比较,CCND1 基因 rs1944129、rs7177、rs9344 位点基因型分布比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 CCND1 基因 rs1944129、rs7177、rs9344 多态性与胃癌易感性的关系 [$n(\%)$]

位点	基因型	对照组	病例组	χ^2	<i>P</i>	OR(95% CI)
rs1944129	C/C	10(3.36)	15(5.14)	2.9818	0.2252	-
	C/T	106(35.57)	87(29.79)	-	-	1.828(0.782 ~ 4.271)
	T/T	182(61.07)	190(65.07)	-	-	1.437(0.629 ~ 3.281)
rs7177	A/A	218(73.15)	206(70.55)	0.5190	0.7714	-
	C/A	74(24.83)	79(27.05)	-	-	0.885(0.611 ~ 1.281)
	C/C	6(2.01)	7(2.40)	-	-	0.810(0.268 ~ 2.451)
rs9344	A/A	87(29.19)	90(30.82)	0.8690	0.6476	-
	G/A	152(51.01)	138(47.26)	-	-	1.139(0.784 ~ 1.656)
	G/G	59(19.80)	64(21.92)	-	-	0.954(0.602 ~ 1.511)

讨 论

胃癌是当今世界上最常见的危害全球人类健康的恶性肿瘤之一,当今社会经济和医疗水平逐步发展以及人类食物多样性大大增加,然而胃癌在全世界范围内发生率和病死率始终居高不下。胃癌的初期症状不甚明显,初期诊断率较低,多半患者自觉较重症状来医院就医时已经到了中期或晚期。胃癌的治疗手段包括手术治疗、化疗和放疗,虽然这些治疗措施显著提高了患者的生存率,但是预后仍较差,总体 5 年生存率仅为 30%^[10]。因此寻找到特异性生物标志物,可以帮助胃癌的早期诊断、筛查及药物靶向治疗等。目前有大量的研究证明遗传基因的多态性在胃癌的发生、发展进程中关联密切,其中 SNP 是能够作为新一代遗传学标记的突变形式。

CCND1 基因位于 11q13 染色体,包括 5 个外显子,4 个内含子,长约 15kb,编码细胞周期蛋白 D1^[11]。细胞周期蛋白 D1 是充当真核细胞周期的关键控制元件的蛋白质,它们的蛋白质水平在整个细胞周期中显著且周期性地改变。每个细胞周期蛋白表现出特征性表达和降解模式,这有助于有丝分裂事件的时间协调。细胞周期蛋白 D1 与 CDK4 或 6 结合,促进细胞从 G₁ 期向 S 期转化,其主要作用是能够磷酸化并灭活视网膜母细胞瘤蛋白(Rb 蛋白),因为 Rb 蛋白通过其抑制 E2F 转录活性的能力来抑制细胞周期进程^[5]。在 G₁ 期,细胞需要做出决定是否进入另一个分裂,或者退出细胞周期进入静止期(G₀)响应细胞外信号,细胞周期蛋白 D1 作为有丝分裂信号传感器,表现为对许多促有丝分裂信号的延迟早期反

应,迫使细胞从 G₀ 期进入增殖周期。除了 CDK 依赖的功能之外,现在积累的大量证据表明,细胞周期蛋白 D1 也可以作为类固醇激素受体如雌激素受体的转录辅因子,除了肿瘤的形成,细胞周期蛋白 D1 还可以通过恶性细胞与宿主环境之间的相互作用在侵袭性和转移表型中起关键作用^[11]。此外,细胞周期蛋白 D1 通常在血管生成和线粒体功能中起调节作用,这表明,细胞周期蛋白 D1 表达可能有助于肿瘤的侵袭性和转移潜能。

细胞周期蛋白 D1 在几种人类肿瘤中过度表达,其作用机制包括染色体易位、基因扩增和蛋白质水解的破坏等^[11]。现在已经在公共 SNP 数据库 (dbSNP) 中鉴定并分类了超过 250 个跨越 CCND1 的 SNP,其中 CCND1G870A(rs9344) 多态性位点在肿瘤中研究最多^[12]。CCND1 870G/A(rs9344) SNP 分为 GG 型、GA 型和 AA 型,可以调节调节 mRNA 的剪接频率,其产生 2 个转录物,A 等位基因产生转录物 b,G 等位基因产生转录物 a,转录物编码具有功能性细胞周期蛋白的蛋白质(氨基酸 55~161)。然而,转录物 b 缺少负责 CCND1 降解的 PEST 序列,这可能使转录物 b 编码的蛋白质比转录物 a 有更长的半衰期,因此具有 CCND1 870A 变体的个体更有可能绕过 G₁~S 细胞周期检查点,从而导致癌症细胞异常增殖^[13]。然而,也有研究表明 G 等位基因也可以产生转录物 b,A 等位基因也可以产生转录物 a,这说明 A 等位基因可能不是转录物 b 生产的普遍需要。

Kuo 等^[14]通过对 358 例胃癌患者与 358 例健康者的研究中发现,CCND1rs9344 位点多态性与胃癌风险相关,携带 AG 和 GG 基因型的受试者与 CCND1rs9344 上携带 AA 基因型的受试者相比具有较低的胃癌风险,因此 CCND1 rs9344 的 AG 和 GG 基因型可能是胃癌的早期发现和预测的保护性标志物。Kuo 等^[16]还调查了 CCND1G870A 基因型与个人吸烟状况对胃癌风险的相互作用,发现两者之间有协同作用,并可能增加台湾地区民众胃癌的风险。Tahara 等^[15]研究表明 CCND1 G870A 基因多态性与胃癌 CpG 岛启动子甲基化高风险相关联,这是第一份显示 CCND1 多态性与胃癌高甲基化状态之间潜在关联的报告。一项 Meta 分析评估了 CCND1rs9344 多态性与胃癌风险之间的关系,他们发现亚洲人群中 CCND1rs9344 多态性与胃癌发生之间无相关性,但可能增加高加索人的胃癌发病风险^[16]。这表明基因多态性可能存在地域差异,可能与人群种族及生活方式的

不同有关。

关于 CCND1 rs7177 位点多态性,有研究表明,它与肾癌、头颈部肿瘤等发病有关^[3,17]。Petkevicius 等^[18]探究了欧洲人 CCND1 rs7177 SNP 与胃癌风险之间的关系,未发现两者之间的相关性,这与本研究结果是一致的。对于 CCND1 rs1944129 位点,Xue 等^[3]证实了其多态性与肾癌相关,但其与胃癌易感性之间的关系未见有相关报道。本研究探讨了 CCND1 rs1944129 位点多态性与胃癌的关系,结果显示:病例组中 rs1944129 位点基因 CC 型、CT 型、TT 型出现的频率分别为 3.36%、35.57%、61.07%,对照组中基因型分别为 5.14%、29.79%、65.07%,两组基因型差异无统计学意义($P > 0.05$),研究结果表明 rs1944129 位点与胃癌的发生、发展可能无相关性。

本研究采用以医院为基础的病例对照研究,分析了 CCND1 基因 rs9344、rs7177、rs1944129 位点多态性与胃癌发病风险的关联。研究结果显示,CCND1 基因 rs9344、rs7177、rs1944129 位点多态性与胃癌的发病风险均无明显相关性($P > 0.05$)。其原因可能是本研究样本量较小,在选择研究对象时有许多限制,这可能使相关性的统计效力存在一定的局限性,而且不能完全排除可能与特定基因型相关的受试者选择偏倚的可能性。另外,基因与环境等多种因素的相互作用、种族地域差异、个体的遗传异质性等也可能是其影响因素。CCND1 基因多态性与胃癌易感性的关系尚需进一步验证,需要更大样本、大规模和精心设计的研究。

参考文献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90
- 2 Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132
- 3 Xue JX, Qin ZQ, Li X, *et al.* Genetic polymorphisms in cyclin D1 are associated with risk of renal cell cancer in the Chinese population[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46): 80889-80899
- 4 Lin JT, Li HY, Chang NS, *et al.* WWOX suppresses prostate cancer cell progression through cyclin D1-mediated cell cycle arrest in the G1 phase[J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(3): 408-416
- 5 Takahashiyanaga F, Sasaguri T, *et al.* GSK-3 β regulates cyclin D1 expression: A new target for chemotherapy[J]. *Cellular Signalling*, 2008, 20(3): 581-589
- 6 Chen XM, Zhao TS, Li L, *et al.* CCND1 G870A Polymorphism with altered Cyclin D1 transcripts expression is associated with the risk of glioma in a Chinese population[J]. *DNA Cell Biol*, 2012, 31(6): 1107-1113
- 7 Teixeira Mendes LS, Peters N, Attygalle AD, *et al.* Cyclin D1 overex-