

错配修复系统 hMSH2 基因 IVS12(-6)T>C 多态及饮食习惯 与结直肠癌的易感性*

顾大勇¹ 张晓梅² 宋 磊² 王德强² 李金田² 马国建² 陈森清² 周建农[△]

(南京医科大学附属江苏省肿瘤医院暨江苏省肿瘤研究所 江苏 南京 210029)

摘要 目的:研究江苏省结直肠癌发病与 hMSH2 基因 IVS12(-6)T>C 多态及饮食习惯的相关性。方法:对江苏省金坛、泰兴和淮安地区近 2 年来新发结直肠癌患者共计 108 例以及配对 180 例健康体检者的饮食等生活习惯因素进行调查,提取外周血 DNA,应用 PCR-DHPLC 和 DNA 序列分析的方法,采用病例对照研究结合现场收集的流行病学资料统计分 hMSH2 基因 IVS12(-6)T>C 与结直肠癌发病的关系。结果:hMSH2 基因 IVS12(-6)T>C 在家族性结直肠癌患者中检出率较高,且与散发性结直肠癌病例之间差异有统计学意义($P<0.05$),在喜食油炸和腌渍食物组,hMSH2 基因 IVS12(-6)T>C C 突变与正常人群之间也存在明显的统计学差异($P<0.05$)。结论:hMSH2 基因 IVS12(-6)T>C 突变,通过遗传性和后天获得性等多重因素影响,使得该突变的携带者有更高的结直肠癌发病风险。

关键词:结直肠癌;hMSH2 基因;基因多态性;IVS12(-6)T>C;饮食习惯

中图分类号:R735.35 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)02-274-04

Correlation of Colorectal Cancer with Mismatch Repair Gene hMSH2 IVS12(-6)T>C Polymorphism and Dietary Habits*

GU Da-yong¹, ZHANG Xiao-me², SONG Le², WANG De-qiang², LI Jin-tian², MA Guo-jian², CHEN Sen-qing², ZHOU Jian-nong[△]

(Jiangsu Institute of Cancer Research, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the etiological role of polymorphism IVS12 (-6)T>C in hMSH2 gene and dietary habits in colorectal cancer. **Methods:** A case-control study with epidemiological data has been taken on subjects selected from Jiangsu Jintan, Taixing and Huai'an, totally including 108 colorectal cancer patients and 180 healthy individual controls, genomic DNA was extracted from peripheral white cell of all subjects, the polymorphism was detected by a PCR based DHPLC analysis and verified by DNA sequencing. **Results:** More mutations were detected from hereditary colorectal cancer patients than sporadic patients, and significant difference existed ($P<0.05$). Significant difference also existed between more fried and pickled food intake and healthy individual controls ($P<0.05$). **Conclusion:** The genetic polymorphism IVS12 (-6)T>C in hMSH2 gene may play a role in the onset of colorectal cancer, through hereditary and acquired influential pathway, those carriers have higher risk of colorectal cancer.

Key words: Colorectal cancer; hMSH2 polymorphism; IVS12(-6)T>C; Dietary habits

Chinese Library Classification(CLC): R735.35 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)02-274-04

前言

错配修复(mismatch repair, MMR)机制是 DNA 损伤修复的重要机制之一,主要修复 DNA 合成过程中产生的碱基错配和插入/缺失环,从而维持整个基因组的稳定性^[1]。MMR 基因的突变已经被证实与结直肠癌密切相关,其中以 hMLH1 和 hMSH2 基因突变为主^[2]。hMSH2 的突变为 MMR 中最易检测的突变,其突变检出率为 21%~54%^[3],这种突变主要为单碱基的改变和由于碱基的缺失和插入引起的移码突变,导致下游提前出现终止密码,而使蛋白截断或功能缺失,进而增加细胞的自发突变频率,进而导致一系列相关靶基因,如涉及细胞生长、分化、凋亡及肿瘤转移的基因改变,最终导致肿瘤的发生或转移^[4]。Goessl 等研究发现在 hmsH2 基因中存在 IVS12(-6)T>C 多

态性,该多态位点位于第 12、13 外显子之间靠近 13 外显子的内含子区域,此多态位点位于剪接调控序列附近,可能引起 mRNA 剪接改变,从而增加淋巴瘤和结直肠癌的发病风险^[5,6]。结直肠癌是一种典型的生活方式相关癌,吸烟、饮酒、油炸和腌渍食物等的摄入,能明显的增加其发病风险^[7]。本研究以江苏省金坛、泰兴和淮安地区近 2 年来新发结直肠癌患者为研究对象,结合流行病学调查,采用病例对照研究该地区结直肠癌发病与生活方式及 hMSH2 基因 IVS12(-6)T>C 的相关性。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集江苏省金坛、泰兴和淮安地区近 2 年来新发结直肠癌患者共计 108 例,其中男性 76 例,女性 32 例,中位年龄 * 岁,

* 基金项目:江苏省自然科学基金(BK2007258)

作者简介:顾大勇,男,硕士研究生,电子邮箱:yongzhelu@163.com

△通讯作者:周建农,电子邮箱:zhoujiannong@163.com

(收稿日期:2010-08-17 接受日期:2010-09-13)

有明确家族史患者 31 例,散发性患者 77 例。另选配对 180 例健康体检者作为对照,其一级亲属中无明确癌症患者,且个体之间无可循的血缘关系,同时由经培训的调查员征得研究对象同意,当面询问病例组和对照组人口学以及吸烟、饮酒以及饮食习惯等资料。病例组与对照组在性别、年龄上的差异无显著性意义。每例患者和正常对照者均取外周静脉血,置乙二胺四乙酸抗凝管,分离白细胞层,用 QIAGEN 公司 QIAamp DNA 提取试剂盒按照公司提供的使用说明提取全血 DNA, -30℃ 低温冰箱保存备用。

1.2 PCR 引物及反应条件

hMSH2 基因 exon13 外显子引物:上游引物 5'CGCGAT-TAATCATCAGTG 3', 下游引物 5'GATAGAAATGTAT-GTCTCTGTCC3', 扩增 hMSH2 基因 exon13 外显子及其上游部分内含子基因起始序列和下游部分内含子序列,PCR 产物长度 353bp, 反应体系 25μl, 内含 50~100 ng 基因组 DNA, 0.2 mmol/L dNTP, 上下游引物各 0.5μmol/L, Taq DNA 聚合酶 2 U。PCR 条件:95℃ 预变性 5 min(95℃ 20 s, 57℃ 20 s, 72℃ 20 s, 35 个循环);72℃ 延伸 5 min;0.1℃/s 的梯度降温至 25℃。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.3 变性高效液相色谱 (Denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)分析(WAVE system, Transgenomic)

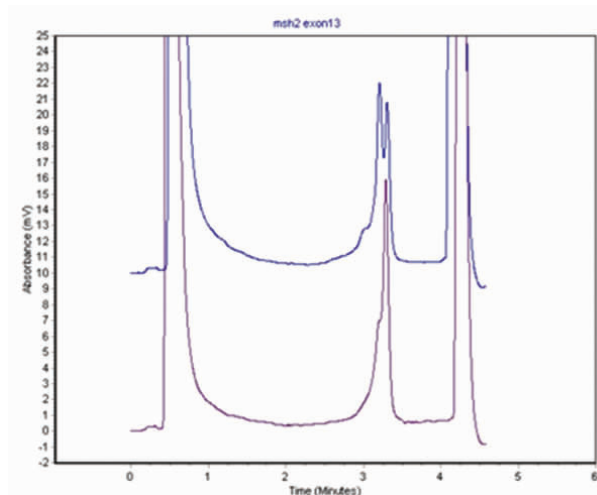


图 1 DHPLC 图谱:单峰正常洗脱峰,双峰为异常洗脱峰,与正常单峰相比,异常峰出现一提前洗脱峰,提示有突变

Figure 1 DHPLC result: compared to the normal single apex, double apices predicates mutation

2.2 统计学分析

结直肠癌病例组与正常人群之间,hMSH2 基因 IVS12(-6)

单次进样量 8μl,柱温 57℃,流动相为 0.1mol/L N-三乙基乙酰胺 (TEAA, 分析纯) 和不同浓度的乙腈,流速 0.9ml/min,260nm 紫外检测。

1.4 DNA 序列分析

DHPLC 分析中出现特定异常峰形的 PCR 产物,由北京六合华大基因公司(上海)测序。

1.5 统计学分析

各组之间 hMSH2 基因突变检出率差异的显著性检验及相对危险度 (odds ratio, OR) 值的计算采用 Epi Info 6.04b 软件, Mantel-Haenszel χ^2 检测分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异有显著性统计学意义。对生活习惯项目分层为吸烟(是与否)、饮酒(是与否)、油炸(是与否)和腌渍(是与否),其中吸烟者,每天至少一支,连续半年以上;饮酒者,每天至少一次,连续半年以上;油炸和腌渍者为超过 10 次/月^[8]。

2 结果

2.1 DHPLC 分析和 DNA 测序结果

在 57℃ 条件下,部分样品出现 2 个洗脱峰(正常单洗脱峰前出现 1 个洗脱峰),见图 1。经测序序列分析表明,单一洗脱峰的样本正常碱基 T,而出现 2 个洗脱峰的样本该位点存在遗传性碱基转换(T→C, IVS12(-6)T>C),见图 2。

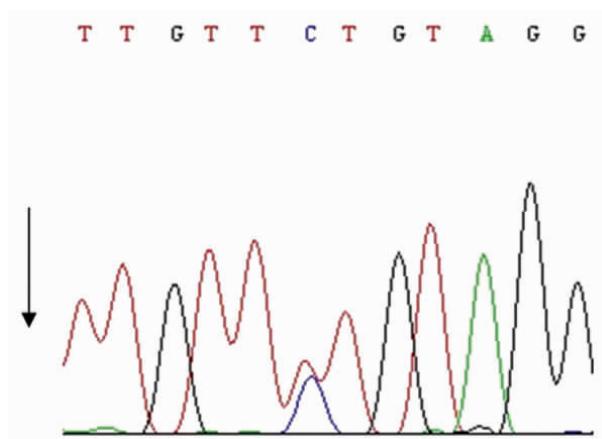


图 2 测序结果图显示箭头标志处为碱基 T→C 转换

Figure 2 DNA sequence: a heterozygous T/C exists

T>C 突变检出率差异并未发现有明显的统计学意义,但在病例组内,家族性和散发性病例之间,却有统计学差异($P < 0.05$, 见表 1),这表明在家族性结直肠癌患者中,IVS12_6T>C 突变率高,可能是一种遗传性的突变。

表 1 IVS12-6T>C 基因型在病例组及对照组中的频率分布

Table 1 hmsH2 IVS12(-6)T>C polymorphism in colorectal cancer patients and control group

基因型 Genotype	病例组(n=108) Cases group		对照组(n=180) Control group		P 值 P value	OR(95%CI) n
	n	%	n	%		
TT	56	51.9	112	62.2	1.00	
TC	39	36.1	58	32.2	0.521	1.19(0.70~2.02)
CC	13	12.0	10	5.6	0.071	2.33(0.90~6.15)
TC+CC	52	48.1	68	37.8	0.086	1.53(0.92~2.55)

hMSH2 基因 IVS12 (-6)T>C 多态在 <50 岁的低龄患者和男性患者差异有统计学意义($P<0.05$, 见表 2), 与正常人相比, 有统计学意义的差异存在($P<0.05$, 见表 3), 这表明, 该多态不

仅与遗传相关, 与年龄和性别也相关, 可能存在遗传之外的影响因素。

表 2 hMSH2 基因 IVS12(-6)T>C 多态在结直肠癌年龄、性别、吸烟、饮酒、油炸和腌渍食物亚组分布

Tab 2 Frequency distributions of selected variables in gastric cancer cases and controls

基本特征 Variables		病例组(n=108) Cases group		对照组(n=180) Control group		P 值 P value
		n	%	n	%	
年龄(岁) Age (yr)	<50	42	38.9	66	36.7	0.800
	≥ 50	66	61.1	114	63.3	
性别 Sex	男 Male	76	70.4	126	70.0	0.947
	女 Female	32	29.6	54	30.0	
吸烟 Smoking	否 Never	50	46.3	113	62.8	0.009
	是 Ever	58	53.7	67	37.2	
饮酒 Drinking	否 Never	57	52.8	128	71.1	0.003
	是 Ever	51	47.2	52	28.9	
油炸食品 Fried food *	≥ 10	64	59.3	70	38.9	0.001
	<10	44	40.7	110	61.1	
腌菜 Sauerkraut *	≥ 10	69	63.9	88	48.9	0.018
	<10	39	36.1	92	51.1	

* 十年前的消费量(次 / 月)

* Frequency-months of consumption for ten years ago

结直肠癌是一种生活方式相关癌, 吸烟、饮酒、油炸和腌渍食物等的摄入, 能明显的增加其发病风险, 通过分析后发现, 油炸和腌渍食物组, hMSH2 基因 IVS12(-6)T>C 多态与正常人

群之间存在明显的统计学差异($P<0.05$, 见表 3), 这意味着, 与生活密切相关的危险因素也对该突变的发生有影响。

表 3 IVS12-6T>C 基因型与环境暴露及混杂因素的综合分析

Tab 3 Comprehensive analysis of genotype and environmental exposure

分组 Groups		病例组人数 Cases number		对照人数 Controls number		P 值 P value	OR & (95%CI)	
		基因型 Genotype					基因型 Genotype	
		GG	GA+AA	GG	GA+AA			
年龄(岁) Age (yr)	<50	13	29	43	23	0.001	1.00	4.17(1.70~10.43)
	≥ 50	43	23	69	45	0.633	1.00	0.82(0.41~1.61)
性别 Sex	男 Male	32	44	75	51	0.020	1.00	2.02(1.09~3.76)
	女 Female	24	8	37	17	0.626	1.00	0.73(0.23~2.13)
吸烟 Smoking	是 Ever	33	25	41	26	0.716	1.00	1.19(0.55~2.60)
	否 Never	23	27	71	42	0.059	1.00	1.98(0.96~4.12)
饮酒 Drinking	是 Ever	28	23	34	18	0.318	1.00	1.55(0.65~3.71)
	否 Never	28	29	78	50	0.149	1.00	1.62(0.82~3.18)
油炸食品 fried food *	≥ 10	22	42	37	33	0.037	1.00	2.14(1.01~4.57)
	<10	34	10	75	35	0.328	1.00	0.63(0.25~1.50)
腌菜 sauerkraut*	≥ 10	31	38	57	31	0.015	1.00	2.25(1.13~4.52)
	<10	25	14	55	37	0.698	1.00	0.83(0.35~1.93)

* 十年前的消费量, 次 / 月, 分别以年龄、性别及各暴露因素校正

* Frequency-months of consumption for ten years ago, corrected by age, gender and the exposure factors

通过上述分析,本研究可以得出以下结论,hMSH2 基因 IVS12 (-6)T>C 多态,通过遗传性和后天获得性等多重因素影响,从而导致该突变的携带者有更高的结直肠癌发病风险。

3 讨论

大约 90%的遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC)以及一定比例的散发性结直肠癌的发生发展与 MMR 基因突变有关,且主要是 hMLH1 和 hMSH2 基因的突变。hms2 IVS12(-6)T>C 位于 msh2 第 12、13 外显子之间靠近 13 外显子的内含子区域,此多态位点的突变可引起线粒体 RNA 剪接改变,从而增加淋巴瘤和结直肠癌的发病风险^[5]。

结直肠癌是一种典型的生活方式相关癌,吸烟、饮酒、油炸、腌渍、高热量肉类过量摄入、膳食纤维摄入减少及维生素 D 等元素的缺乏等,都是结直肠癌发病的高危因素。本研究结果提示:油炸和腌渍食物的摄入,其结直肠癌的发病风险明显高于正常人群,虽然本研究未能明确吸烟和烟酒与结直肠癌发病的明显相关性,但越来越多的流行病学研究已经将吸烟和饮酒归为结直肠癌发病的高危因素^[7]。

与正常人相比,携有 hMSH2 基因基因突变的人,更易患结直肠癌,且性别之间有差异,见于 80%的男性和 40%的女性。本研究发现 hMSH2 基因 IVS12 (-6)T>C 在结直肠癌患者中突变检出率男性高于女性,差别有统计学意义,与之一致^[2]。此外,有家族史、小于 50 岁的低龄结直肠癌患者中,hms2 IVS12(-6)T>C 检出率也高于相应对照组,这表明该突变不仅与遗传相关,与年龄和性别也相关,可能存在遗传之外的影响因素。结合流行病学调查研究发现,油炸和腌渍食物组,hMSH2 基因 IVS12(-6)T>C 多态与正常人群之间存在明显的统计学差异,这意味着,与生活方式密切相关的危险因素也对该突变的发生有影响。结直肠癌病例组与正常人群之间,hMSH2 基因 IVS12 (-6)T>C 多态检出率差异并未发现有明显的统计学意义,这表明 IVS12(-6)T>C 本身的改变并不能增加结直肠癌的遗传易感性,但是环境因素对这些因素对结直肠癌的易感性起放大作用,导致该突变的携带者有更高的结直肠癌发病风险。因此,依据 Knudson 的致癌 "二次打击学说",可以认为 hMSH2 基因 IVS12(-6)T>C 多态与结直肠癌的发病有相关性。

本研究建立在以人群为基础的病例对照研究上,质量严格控制,并引入基因-环境相互作用的影响,为 hMSH2 基因 IVS12 (-6)T>C 多态与结直肠癌关系的评价提供了有价值的线索,并分析该多态位点在家族性、低龄结直肠癌遗传背景中的作用,为江苏省家族性、低龄结直肠癌的预防和高危个体的筛选提供可能的依据

参考文献(References)

- [1] Ollila S, Dermadi BD, Jiricny J, et al. Mechanisms of pathogenicity in human MSH2 missense mutants. *Human Mutation*, 2008,29 (11): 1355-63
- [2] Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, et al. Mismatch Repair Genes hMLH1 and hMLH2 and Colorectal Cancer: A HuGe Review. *AM J Epidemiol*, 2002,156:885-902
- [3] 郑树. 结直肠肿瘤-基础与临床实践 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2006,140
Zheng Shu. *Colorectal cancer- Basic and clinical practice* [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2006,140
- [4] 宋伟庆,韩彩丽,等. 胃癌组织中环氧合酶-2 和 hMLH1 及 hMSH2 蛋白表达与微卫星不稳定的关系 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2005,27(11): 660-662
Song Wei-qing, Han Cai-li, et al. Expression of cyclooxygenase-2, hMLH1 and hMSH2 proteins, and their relationship with microsatellite instability in gastric carcinoma [J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2005, 27(11):660-662
- [5] C.Goesl, J.Plaschke, et al. An Intronic Germline Transition in the HNPCC Gene hMLH2 is Associated with Sporadic Colorectal Cancer, *Eur J Cancer*, 1997, 33(11):1869-1874
- [6] Ding DC, Huang RL, et al. Novel germline and somatic mutations of the msh2 gene in hnpcc. *Clinical Genetics*, 2007,71 (2) :190-192
- [7] 蔡三军. 结直肠癌肛管癌[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2005, 26-28
Cai San-jun. *Colorectal-anal cancer* [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2005, 26-28
- [8] 李苏平,丁建华,等. 江苏省泰兴地区胃癌、食管癌危险因素病例对照研究[J]. *中国肿瘤*, 2008,17(11):920-922
Li Su-ping, Ding Jian-hua, et al. A Case-Control Study of Risk Factors of Esophageal and Gastric Cancer in Taixing Area, Jiangsu Province[J]. *Bulletin of Chinese Cancer*, 2008,17(11):920-922