

# 食管癌易感性与 STK15 基因 Phe31Ile 多态性的关联研究

王娜 王贵英 郭炜 董秀娟 李琰

**【摘要】目的** 研究 STK15 基因 Phe31Ile(91T→A)单核苷酸多态性(SNP)与河北省涉县人群食管鳞状细胞癌(ESCC)发病易感性的关系。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测了涉县 296 例 ESCC 患者和 302 例健康对照 STK15 Phe31Ile(91T→A)SNP 的基因型。**结果** 吸烟及上消化道肿瘤(UGIC)阳性家族史均能显著增加 ESCC 的患病风险(OR 值分别为 1.68 和 1.77, 95% CI 分别为 1.34~2.10 和 1.44~2.19)。STK15 Phe31Ile 三种基因型(Phe/Phe、Phe/Ile、Ile/Ile)频率在 ESCC 患者组中分别为 11.5%、34.8% 和 53.7%, 与健康对照组(11.9%、36.8% 和 51.3%)相比差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.35, P = 0.84$ )。以 Phe/Phe 基因型作参照, Phe/Ile 基因型及 Ile/Ile 基因型分别与其相比, 均未增加 ESCC 的发病风险(OR 值分别为 0.98 和 1.09, 95% CI 分别为 0.57~1.69 和 0.65~1.82)。根据性别、吸烟状况及上消化道肿瘤(UGIC)家族史进行分层分析, 也未发现病例组与对照组之间的差异有统计学意义。**结论** STK15 基因 Phe31Ile(91T→A) SNP 可能与河北涉县人群 ESCC 的患病风险无关。

**【关键词】** 食管鳞状细胞癌; 发病易感性; STK15 基因; 单核苷酸多态性

**Study on the association between STK15 Phe31Ile polymorphisms and esophageal squamous cell carcinoma**  
WANG Na, WANG Gui-ying, GUO Wei, DONG Xiu-juan, LI Yan. Division of Molecular Biology, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China  
Corresponding author: LI Yan, Email: lykx1962@yahoo.com.cn

**【Abstract】Objective** To study the relation between single nucleotide polymorphism(SNP) at the 91T→A(Phe31Ile) position of the STK15 gene and the susceptibility of esophageal squamous cell carcinoma(ESCC) in She county — a ESCC high incidence region in North China. **Methods** Polymerase-chain reaction(PCR)-restriction fragment length polymorphism(RFLP) analysis was used to detect the genotypes of STK15 Phe31Ile(91T→A) SNP, and the samples came from 296 ESCC patients and 302 healthy controls. **Results** The risk of ESCC significantly increased in the group which had been smoking or having a family history of upper gastrointestinal cancer(UGIC)(the OR = 1.68 and 1.77, 95% CI: 1.34-2.10 and 1.44-2.19, respectively). Rates of the three genotypes(Phe/Phe, Phe/Ile, Ile/Ile) of the STK15 Phe31Ile(91T→A) SNPs in ESCC patients were 11.5%, 34.8% and 53.7%, respectively, and were not significantly different from that in the healthy group(11.9%, 36.8% and 51.3%)( $\chi^2 = 0.35, P = 0.84$ ). When compared to Phe/Phe genotype, Phe/Ile and Ile/Ile of STK15 91T→A(Phe31Ile) did not show effect on the risk of ESCC according to the odds ratio results which were 0.98(95% CI: 0.57-1.69) and 1.09(0.65-1.82) respectively. STK15 91T→A(Phe31Ile) SNP also did not significantly influence on the development of ESCC even the samples were stratified by sex, smoking status and family history of upper gastrointestinal cancer. **Conclusion** The STK15 Phe31Ile(91T→A) polymorphisms seemed irrelevant with the risk of ESCC in She county.

**【Key words】** Esophageal squamous cell carcinoma; Gene susceptibility; STK15 gene; Single nucleotide polymorphism

人类 STK15 基因位于染色体 20q13.2, 被认为

是一种肿瘤易感基因, 其编码的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶是一种有丝分裂激酶, 参与哺乳动物细胞两极有丝分裂的纺锤体的形成和调节染色体的分离<sup>[1]</sup>, 它在细胞中过量表达将导致中心体扩增、染色体不稳定和细胞癌变<sup>[2,3]</sup>。STK15 基因第 3 外显子具有 91T→A 的单核苷酸多态性(SNP), 由此引起 31 位

基金项目: 河北省普通高等学校强势特色学科资助项目

作者单位: 050011 石家庄, 河北医科大学第四医院分子生物学室(王娜、郭炜、董秀娟、李琰), 外二科(王贵英)

通讯作者: 李琰, Email: lykx1962@yahoo.com.cn

密码子编码的氨基酸产生由苯丙氨酸(Phe)→异亮氨酸(Ile)的改变,STK15 基因的多态性可能与多种肿瘤的遗传易感性有关<sup>[4-6]</sup>。Miao 等<sup>[4]</sup>已对中国医学科学院肿瘤医院 ESCC 患者的 STK15 基因多态性进行了研究,本文拟通过食管癌高发区人群对该结果进行验证。涉县位于河北省南部的太行山脉,食管癌的发病率和死亡率均较高。本研究应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法,通过病例对照研究探讨 STK15 基因 Phe/Ile 多态性与涉县人群食管癌发病风险的关系。

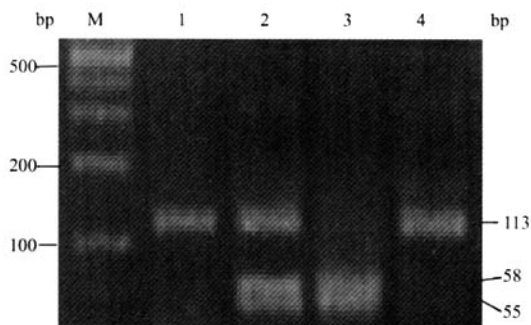
### 材料与方 法

1. 研究对象:本研究包括经组织学证实的食管鳞状细胞癌(ESCC)患者 296 例,同时以 302 例健康个体作为对照。ESCC 患者是 2001-2003 年间在涉县食管癌普查人群中经内镜检查且为组织病理学证实的食管癌患者,健康对照为已证实无上消化道肿瘤及癌前病变的个体,与病例组为同一居住地、同一普查人群,且在年龄、性别上与病例组相匹配。ESCC 患者及健康对照个体的性别、年龄、吸烟状况及家族史的情况均在采血后由经过专业训练的调查员询问获得,在调查过程中尽可能减少选择偏倚和信息偏倚。如在选择对象时,尽可能采用随机抽样原则;从调查表设计上,尽可能做到简单易懂,便于回忆,以控制回忆偏倚;收集调查信息时,变量要有客观指标,减少调查偏倚;在资料的处理过程中,注意病例与对照两组的均衡性,并采用各因素的 logistic 回归模型对可能的混杂变量进行处理,以尽可能控制混杂偏倚。吸烟个体定义为过去或目前吸烟 $\geq 5$ 支/d,持续至少 2 年以上者。将有 1 名一级亲属或 2 名以上二级亲属患有食管癌/贲门癌/胃癌的个体定义为具有上消化道肿瘤(UGIC)家族史。其中有 23 例(其中 ESCC 患者 20 例,健康对照个体 3 例)未获得吸烟资料,有 85 例(其中 ESCC 患者 52 例,健康对照个体 33 例)未获得家族史资料。

2. DNA 提取:抽取患者及对照个体静脉血 5 ml,以枸橼酸钠抗凝,采用 Miller 等<sup>[7]</sup>的蛋白酶 K-氯化钠盐析法提取白细胞 DNA。

3. STK15 基因分型:采用 PCR-RFLP 进行 STK15 Phe31Ile 基因型检测。扩增 STK15 基因 Phe31Ile 多态性位点的上游引物序列为 5'-TTC CAT TCT AGG CTA CAG CTC CA-3',下游引物序列为 5'-CAA GAC CCG CTG AGC CTG-3',扩增片

段为 113 bp。PCR 反应体系为 20  $\mu$ l,其中模板 DNA 100 ng,10 $\times$  PCR buffer 2.0  $\mu$ l,MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L, Taq-DNA-聚合酶 2 U,dNTPs 200  $\mu$ mol/L 和上、下游引物各 200 nmol/L。阴性对照用蒸馏水代替模板 DNA。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性后,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,62 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环后,72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min。用 5 U Apo I 对 PCR 产物进行酶切,50 $^{\circ}$ C 水浴消化过夜。酶切产物用 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离。Phe/Phe 基因型为 113 bp,Ile/Ile 基因型为 58 bp 和 55 bp,Phe/Ile 基因型为 113 bp,58 bp 和 55 bp(图 1)。基因分型结束后,随机抽取 10% 的样本进行重复分型。



注:1:Phe/Phe 基因型;2:Phe/Ile 基因型;3:Ile/Ile 基因型;4:PCR 产物;M:100 bp DNA 标记

图1 STK15 Phe31Ile 位点(Apo I 酶切)琼脂糖凝胶电泳

4. 统计学分析:病例及对照组的性别构成、吸烟及 UGIC 家族史状况,SNP 基因型及等位基因型分布比较采用  $\chi^2$  检验,年龄比较采用 *t* 检验。应用非条件 logistic 回归模型计算 OR 值和 95% CI。统计分析应用 SPSS 11.5 软件。

### 结 果

1. 研究对象基本情况:ESCC 患者组的性别、年龄构成与健康对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。ESCC 患者组吸烟者所占比例为 42.4%,明显高于健康对照组( $\chi^2 = 8.89, P = 0.003$ );UGIC 家族史的阳性率在 ESCC 患者组和健康对照组中分别为 60.7% 和 46.5%,差异有统计学意义( $\chi^2 = 10.34, P = 0.001$ ),因此,吸烟及 UGIC 家族史均能显著增加 ESCC 的患病风险(OR 值分别为 1.68 和 1.77,95% CI 分别为 1.34~2.10 和 1.44~2.19),见表 1。

2. 等位基因及基因型频率比较:STK15 Phe31Ile 三种基因型(Phe/Phe、Phe/Ile、Ile/Ile)频率在 ESCC 患者组中分别为 11.5%、34.8% 和 53.7%,

与健康对照组(11.9%、36.8%和51.3%)相比差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.35, P = 0.84$ );ESCC 患者组 Phe 和 Ile 等位基因频率为28.9%和71.1%,与健康对照组(30.3%和69.7%)相比差异亦无统计学意义( $\chi^2 = 0.29, P = 0.59$ ),见表 1。

表1 ESCC 患者及健康对照的人口学特性及 STK15 基因型、等位基因频率分布

特 征	对照组	ESCC 组	$\chi^2$ 值	P 值
性别			0.13	0.723
男	202(66.9)	202(68.2)		
女	100(33.1)	94(31.8)		
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )	58.8 $\pm$ 7.9	59.8 $\pm$ 9.7	1.42 <sup>a</sup>	0.157
吸烟状态			8.89	0.003
缺失数据	3(1.0)	20(6.8)		
可用数据	299(99.0)	76(93.2)		
吸烟者	91(30.4)	117(42.4)		
不吸烟者	208(69.6)	159(57.6)		
OR 值(95% CI)	1.68(1.34~2.10)			
UGIC 家族史			10.34	0.001
缺失数据	33(10.9)	52(17.6)		
可用数据	269(89.1)	244(82.4)		
阳性	125(46.5)	148(60.7)		
阴性	144(53.5)	96(39.3)		
OR 值(95% CI)	1.77(1.44~2.19)			
等位基因型			0.29	0.593
Phe	183(30.3)	171(28.9)		
Ile	421(69.7)	421(71.1)		

注:括号外数据为例数,括号内数据为构成比(%);<sup>a</sup>t 值

以 Phe/Phe 基因型作参照,Phe/Ile 基因型及 Ile/Ile 基因型分别与其相比,均未增加 ESCC 的发病风险,OR 值分别为 0.98(0.57~1.69)和 1.09(0.65~1.82),经年龄、性别、吸烟状况及 UGIC 家族史校正 OR 值分别为 0.85(0.45~1.60)和 0.97(0.53~1.76)。多因素分析未发现吸烟状况与 UGIC 家族史之间存在交互作用。根据性别、吸烟状况及 UGIC 家族史进行分层分析,也未发现病例组与对照组之间存在差异(表 2)。

### 讨 论

人类 STK15 基因位于染色体 20q13.2,被认为是一种肿瘤易感基因,其编码的蛋白含 403 个氨基酸,相对分子质量( $M_r$ )约为  $46 \times 10^3$ 。在裸鼠的肿瘤诱发实验中,哺乳动物细胞 STK15 的异常表达导致中心体扩增、染色体不稳定和细胞癌变,表明 STK15 在肿瘤形成过程中起重要作用<sup>[8]</sup>。中心体是哺乳动物细胞中决定微管形成的一种细胞器,它能够影响细胞结构和染色体分离的精确性,而染色

体不稳定和异常则在肿瘤发生和获得恶性表型方面起关键作用<sup>[9-11]</sup>。

表2 STK15 基因多态性与 ESCC 发病风险

组别	基因型(%)			OR 值(95% CI)
	Phe/Phe	Phe/Ile	Ile/Ile	
整体				
对照组	36(11.9)	111(36.8)	155(51.3)	0.98(0.57~1.69) <sup>a</sup>
ESCC 组	34(11.5)	103(34.8)	159(53.7)	1.09(0.65~1.82) <sup>b</sup>
男性				
对照组	24(11.9)	75(37.1)	103(51.0)	0.95(0.49~1.83) <sup>a</sup>
ESCC 组	23(11.4)	68(33.6)	111(55.0)	1.13(0.60~2.12) <sup>b</sup>
女性				
对照组	12(12.0)	36(36.0)	52(52.0)	1.06(0.41~2.72) <sup>a</sup>
ESCC 组	11(11.7)	35(37.2)	48(51.1)	1.01(0.41~2.50) <sup>b</sup>
不吸烟者				
对照组	23(11.1)	80(38.5)	105(50.5)	1.37(0.64~2.92) <sup>a</sup>
ESCC 组	13(8.2)	62(39.0)	84(52.8)	1.41(0.68~2.96) <sup>b</sup>
吸烟者				
对照组	12(13.2)	31(34.1)	48(52.7)	0.90(0.37~2.17) <sup>a</sup>
ESCC 组	16(13.7)	37(31.6)	64(54.7)	1.00(0.43~2.31) <sup>b</sup>
UGIC 家族史阴性者				
对照组	14(9.7)	59(41.0)	71(49.3)	0.47(0.20~1.11) <sup>a</sup>
ESCC 组	15(15.6)	30(31.7)	51(53.1)	0.67(0.30~1.51) <sup>b</sup>
UGIC 家族史阳性者				
对照组	13(10.4)	43(34.4)	69(55.2)	1.21(0.51~2.88) <sup>a</sup>
ESCC 组	13(8.8)	52(35.1)	83(56.1)	1.20(0.52~2.67) <sup>b</sup>
整体(无缺失数据)				
对照组	27(10.1)	102(38.0)	139(51.9)	0.85(0.45~1.60) <sup>c</sup>
ESCC 组	27(11.2)	81(33.8)	132(55.0)	0.97(0.53~1.76) <sup>d</sup>

注:<sup>a, b</sup>相对于 Phe/Phe 基因型,Phe/Ile 基因型(<sup>a</sup>)与 Ile/Ile 基因型(<sup>b</sup>)的 OR 值及 95% CI; <sup>c, d</sup>以 Phe/Phe 基因型为参照,经性别、年龄、吸烟状况和 UGIC 家族史校正的 Phe/Ile 基因型(<sup>c</sup>)与 Ile/Ile 基因型(<sup>d</sup>)的 OR 值及 95% CI

研究表明 STK15 在很多人类癌症中出现基因扩增和过度表达。在原发乳腺癌和多种肿瘤细胞系中,约有 12% 出现 STK15 基因扩增。而在未发现基因扩增的肿瘤细胞系中,也出现了 STK15 的高表达的现象<sup>[8]</sup>。STK15 的过度表达破坏了有丝分裂的进行,导致胞浆分离失败,从而产生异倍体和细胞恶性转化<sup>[8,12]</sup>。将 STK15 转染的 NIH-3T3 细胞注射给裸鼠时引起了肿瘤,表明 STK15 和肿瘤的发生有关<sup>[8,13]</sup>。

STK15 基因外显子 3 中有 3 种非同义 SNP,即:91T→A、169G→A 和 311C→T。最近研究发现,91T→A 与人类肿瘤遗传易感性相关,91T→A Ile 纯合子能增加卵巢癌的患病风险<sup>[14]</sup>。Ewart-Toland 等<sup>[5]</sup>应用 TaqMan 探针技术进行 SNP 检测和荧光定量 PCR 分析已经证实,在结肠癌患者杂合子携带者中,STK15 Ile 等位基因比 Phe 等位基因扩增更

常见。研究还发现,在结肠癌患者中,Phe/Ile 杂合子携带者比 Phe/Phe 纯合子携带者的染色体出现更多的异倍体。他们认为,Ile 等位基因缺乏结合 UBE2N 的能力,而 Phe 异构体则能够在染色体复制期结合或定位于染色体上。尽管这种相互作用导致 STK15 的活化或失活、降解的机制尚不太清楚,但已证实 Ile 等位基因过表达能导致细胞生长和恶性转化。

本研究结果显示:STK15 T91A Phe/Phe、Phe/Ile 和 Ile/Ile 基因型在涉县正常人分布频率分别为 11.9%、36.8% 和 51.3%,这与 Miao 等<sup>[4]</sup>的报道(13.8%、48.2% 和 38.0%)结果不同( $\chi^2 = 15.40$ ,  $P < 0.001$ ),而与陈立等<sup>[15]</sup>的报道(8.81%、45.08% 和 46.11%)结果相似( $\chi^2 = 3.75$ ,  $P = 0.15$ ),但都表明 Ile/Ile 纯合型在正常人群中是常见基因型。本研究结果还显示:STK15 91T→A SNP 总体分布在 ESCC 和健康对照组中无差异;根据吸烟状况及 UGIC 家族史进行分层分析亦未发现差异有统计学意义。结果提示虽然此多态性可增加多种肿瘤的发病风险,但并未发现与河北涉县人群 ESCC 的易感性有关。这与 Miao 等<sup>[4]</sup>的研究不同。Miao 等<sup>[4]</sup>研究认为,相对于 Phe/Phe 基因型,Ile/Ile 更能增加 ESCC 的患病风险。结果的差异可能是标本来源不同造成的。Miao 等<sup>[4]</sup>所研究的 ESCC 患者为基于医院病例对照研究的散发患者,健康对照则来自北京地区;本课题所研究的病例和对照均来自河北省涉县食管癌高发区,为基于人群的病例对照研究。该结果亦提示,STK15 T91A 基因多态性可能在不同肿瘤类型或是不同人群中发挥不同作用。

本研究还显示:吸烟和 UGIC 阳性家族史显著增加 ESCC 的发病风险。因此,戒烟、注意生活习惯和定期进行体检对人群中 ESCC 的预防有重要意义。

本研究是基于人群的病例对照研究,样本量较大,且病例组与对照组在性别、年龄上匹配,基因分型清楚,10% 的样本重复吻合率达 100%,并符合 Hardy-Weinberg 平衡( $\chi^2 = 2.29$ ,  $P = 0.32$ ),结果较可靠。因此,尽管有报道 STK15 基因 91T→A 多态性与多种肿瘤的发病风险有关,但并未发现这种基因多态性与涉县人群 ESCC 的易感性有关。

## 参 考 文 献

- [1] Nigg EA. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(11): 815-825.
- [2] Miyoshi Y, Iwao K, Egawa C, et al. Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *Int J Cancer*, 2001, 92(3): 370-373.
- [3] Sen S, Zhou H, Zhang RD, et al. Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(17): 1320-1329.
- [4] Miao X, Sun T, Wang Y, et al. Functional STK15 Phe31Ile polymorphism is associated with the occurrence and advanced disease status of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 2004, 64(8): 2680-2683.
- [5] Ewart-Toland A, Briassoulis P, de Koning JP, et al. Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nat Genet*, 2003, 34(4): 403-412.
- [6] Sun T, Miao X, Wang J, et al. Functional Phe31Ile polymorphism in Aurora A and risk of breast carcinoma. *Carcinogenesis*, 2004, 25(11): 2225-2230.
- [7] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res*, 1988, 16(3): 1215.
- [8] Zhou H, Kuang J, Zhong L, et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet*, 1998, 20(2): 189-193.
- [9] Lingle WL, Salisbury JL. The role of the centrosome in the development of malignant tumors. *Curr Top Dev Biol*, 2000, 49: 313-329.
- [10] Pihan GA, Purohit A, Wallace J, et al. Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 2212-2219.
- [11] Shackney SE, Shankey TV. Common patterns of genetic evolution in human solid tumors. *Cytometry*, 1997, 29(1): 1-27.
- [12] Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(11): 842-854.
- [13] Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, et al. A homologue of drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J*, 1998, 17(11): 3052-3065.
- [14] Dicioccio RA, Song H, Waterfall C, et al. STK15 polymorphisms and association with risk of invasive ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13(10): 1589-1594.
- [15] 陈立, 敖雪, 任群, 等. 中国人群中 STK15 基因内两种非同义 SNP 的连锁不平衡和单体型分析. *遗传学报*, 2005, 32(4): 331-336.

(收稿日期: 2006-10-25)

(本文编辑: 张林东)