

错配修复基因 hMLH1 错义突变 Val384Asp 与四种肿瘤遗传易感性的研究

张晓梅 李金田 朱明 吴晓柳 高萍 周平 王亚平

【摘要】 目的 了解中国人 hMLH1 基因 Val384Asp 错义突变在四种肿瘤中的存在状况。方法在中国汉族人群中分别提取 233 例大肠癌患者、273 例胃癌患者、111 例乳腺癌患者、90 例食管癌患者和 268 名健康人外周血细胞的基因组 DNA; 采用聚合酶链反应扩增 hMLH1 基因第 12 外显子的部分 DNA 片段(217 bp), 变性高效相色谱检测, DNA 测序验证, 比较分析 Val384Asp 基因型在四种肿瘤中的分布。结果 6.34% 正常人群携带 Val384Asp, 在大肠癌患者和胃癌患者中 Val384Asp 的检出率与正常人群相比差异有统计学意义($P < 0.05$), 尤其在 <45 岁的大肠癌患者和 <50 岁的胃癌患者中, Val384Asp 的检出率与正常人群相比差异有统计学意义($P < 0.01$), 而在乳腺癌患者和食管癌患者中 Val384Asp 的检出率与正常人的相同或相近。结论 Val384Asp 错义突变作为中国人 hMLH1 基因上的一个多态位点, 是大肠癌和胃癌遗传易感因素, 可作为中国人胃肠道肿瘤, 尤其是低龄胃肠道肿瘤高危人群筛选的候选指标。

【关键词】 胃肠道肿瘤; 食管肿瘤; 乳腺肿瘤; 基因

Study on the relationship between genetic polymorphism Val384Asp in hMLH1 gene and the risk of four different carcinomas ZHANG Xiao-mei, LI Jin-tian, ZHU Ming, WU Xiao-liu, GAO Ping, ZHOU Ping, WANG Ya-ping. Jiangsu Institute of Cancer Reserch, Nanjing 210009, China
Corresponding author: WANG Ya-ping, Email: wangyapn@jlonline.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the association of genetic polymorphism Val384Asp in hMLH1 gene with the risk of colorectal, gastric, esophageal and breast carcinomas. **Methods** A case-control study was taken to investigate the role of Val384Asp in hMLH1 gene in developing these four carcinomas. 233 colorectal, 273 gastric, 90 esophageal and 111 breast cancer patients were included, as well as 268 healthy individual served as controls. Peripheral white blood cell DNA was obtained from all subjects. hMLH1 gene Val384Asp was analysed using a PCR-based DHPLC while the existence of Val384Asp were verified by DNA sequencing. **Results** 6.34% of the healthy individuals were identified as Val384Asp carriers and significant differences existing between colorectal cancer patients or gastric cancer patients and controls, especially between young aged patients and controls. **Conclusion** Determination of Val384Asp in hMLH1 gene single nucleotide polymorphism seemed to be suitable for identifying individuals with increased risk of gastrointestinal cancer in the Chinese population.

【Key words】 Gastrointestinal neoplasms; Esophageal neoplasms; Breast neoplasms; Gene

遗传性非息肉型大肠癌 (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC) 是一种常染色体显性遗传性肿瘤, 其发病相关基因是错配修复基因。已知错配修复系统至少有 5 个基因组成, 但已检出的突变主要在 MSH2 和 MLH1 基因。存在错配修复基因遗传性突变的家族, 除大肠癌高发外,

子宫内膜癌、胃癌、乳腺癌、小细胞肺癌、淋巴细胞癌等的发病率也明显高于一般人群^[1-4]。在 HNPCC 家族检出的错配修复基因突变多为病理性突变, 但某些低度外显的突变或多态位点则可能参与散发性肿瘤的发生^[5-7]。我们首先在大肠癌患者的体细胞中发现了位于 hMLH1 基因第 1151 位碱基 T→A 的杂合型颠换, 导致其第 384 位编码氨基酸由缬氨酸 (Val) 突变为天冬氨酸 (Asp), 随后的研究结果表明, Val384Asp 作为东亚人 hMLH1 基因上的一个多态位点。但在我国发病年龄 <45 岁的大肠癌患者、具有癌症家族史的胃癌患者及其家属中, Val384Asp

基金项目:江苏省卫生厅重点研究项目资助(H9805);江苏省重点人才基金资助项目(RC2002070)

作者单位:210009 南京,江苏省肿瘤防治研究所分子生物学研究室

通讯作者:王亚平, Email: wangyapn@jlonline.com

突变的检出率明显高于正常对照,显示出 Val384Asp 的突变可在一定程度上影响 hMLH1 基因的功能^[8,9]。为进一步探明 hMLH1 基因 Val384Asp 的病因学作用,我们比较分析了 Val384Asp 基因型在大肠癌、胃癌、食道癌三种消化道肿瘤和乳腺肿瘤中的存在状况。

对象与方法

1. 研究样本:病例组共入选 707 例癌症患者,其中 233 例大肠癌患者,男 139 例、女 94 例,年龄 23~77 岁,平均年龄(52.85 ± 13.76)岁;273 例胃癌患者,男 188 例、女 85 例,年龄 28~79 岁,平均年龄(57.03 ± 10.08)岁;111 例乳腺癌患者,男 3 例、女 108 例,年龄 28~78 岁;90 例食管癌患者,男 51 例、女 39 例,年龄 40~78 岁,平均年龄(62.16 ± 8.69)岁。每例均取外周血样本,常规提取 DNA。癌症标本选自江苏省北部地区淮安、邳洲两地当年新发患者血样及在我医院标本库中随机选取的近年住院病例血样;对照组选自当地相同年龄组、性别配对、无癌症病史人群,各例之间无血缘关系。

2. 聚合酶链反应(PCR):引物序列:上游 5'-aca gac ttt gct acc agg act tg -3',下游 5'-tgt ctt atc ctc tgt gac aat gg-3'。扩增产物位于 hMLH1 基因第 12 外显子上游 4 位碱基至第 12 外显子内编码基因的第 1251 位碱基,长度 217 bp。25 μl PCR 反应体系,内含 50~100 ng 基因组 DNA,0.2 mmol/L dNTP,上下游引物各 0.5 μmol/L,2 U Taq DNA 聚合酶。PT-200 梯度扩增仪循环条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 20 s,57℃ 20 s,72℃ 30 s,35 个循环,72℃ 延长 10 min,94℃ 变性 4 min,按 0.1℃/s 的梯度下降温度至 25℃,4℃ 保存。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

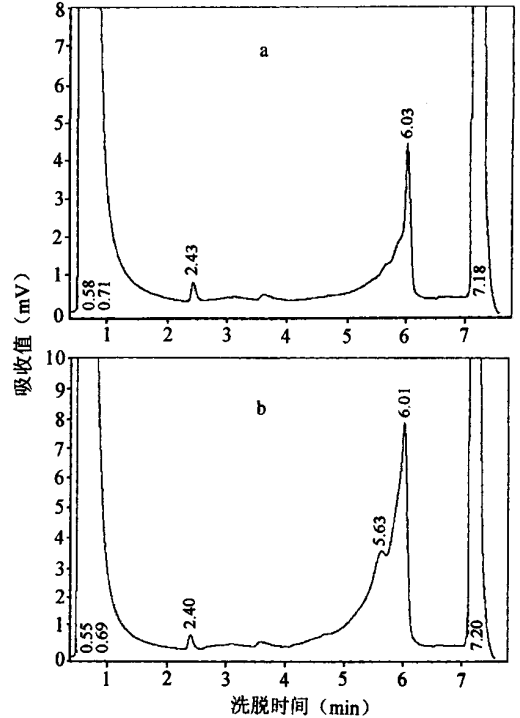
3. 变性高效液相色谱(DHPLC)分析:PCR 产物上样于核酸分析柱, DHPLC (WAVE 系统, Transgenomic)分析;单次进样量 58 μl,柱温 59.2℃,流动相为 0.1 mol/L N-三乙基乙酰胺(TEAA,分析纯)和不同浓度梯度的乙晴,流速 0.9 ml/min,260 nm 紫外检测。

4. DNA 序列分析:DHPLC 分析中出现特定异常带型病例的 PCR 产物直接测序。

5. 统计学分析:各组之间 hMLH1 基因 Val384Asp 基因型和等位基因型频率的比较,采用 Epi Info 6.0 软件, Mantel-Haenszel χ^2 检测和风险度分析。

结 果

1. DHPLC 和 DNA 序列分析:分析结果表明,268 名正常对照中 17 名出现特定的异常峰型,相同的峰型见于 27/233 例的大肠癌患者、33/273 的胃癌患者、7/111 的乳腺癌患者及 8/90 例的食道癌患者(图 1、表 1)。DNA 序列分析表明,这一异常峰型的出现是由于 hMLH1 基因第 1151 位碱基存在遗传性的碱基颠换(T→A)(杂合型),使得该碱基所处的第 384 位密码子发生缬氨酸(Val)到天冬氨酸(Asp)的错义突变(GTT→GAT, Val384Asp)。



a 图为突变型 DHPLC 图谱,与 b 图野生型 DHPLC 图谱相比,在 6.02 min 出现的主峰之前,5.66 min 处出现一提前异常洗脱峰

图1 hMLH1 基因第 12 外显子 DHPLC 图谱

表1 四种肿瘤患者组中 hMLH1 基因 Val384Asp 基因型频率与对照组的比较

组别	标本例数	Val384Asp 基因型		P 值	OR 值(95% CI)
		Val/Asp	Val/Val		
对照组	268	17(6.34)	251(93.66)		1.00
大肠癌患者	233	27(11.6)	206(88.4)	0.039*	1.94(0.98~3.83)
胃癌患者	273	33(12.1)	240(87.9)	0.021*	2.03(1.06~3.91)
食道癌患者	90	8(8.89)	82(91.11)	0.41	1.44(0.55~3.70)
乳腺癌患者	111	7(6.31)	104(95.69)	0.99	0.99(0.36~2.64)

* P < 0.05; 括号外数据为基因型例数,括号内数据为构成比(%)

2. 统计学分析结果:

(1) 各种肿瘤患者组和正常对照的均衡性检测:四

种肿瘤患者组及正常对照组经检测除乳腺癌组的性别组外,各组之间在性别、年龄分布上差异无统计学意义。各组 Val384Asp 基因型分布频率见表 1,经计算各组基因型个体数的观察值与理论值之间均无差异,表明该等位基因在各组的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡,各组样品具有群体代表性。

(2)四种肿瘤患者 Val384Asp 基因型频率与正常对照的比较:结果表明在大肠癌患者和胃癌患者中,Val384Asp 基因型频率都高于对照人群,两者差异存在统计学意义($P < 0.05$);在食道癌患者中,Val384Asp 基因型频率虽高于正常人群,但无统计学意义;而乳腺癌患者 Val384Asp 基因型频率与对照人群无差异。

(3)胃肠道肿瘤患者分组后的组间比较:比较以 45 岁分组的大肠癌和以 50 岁分组的胃癌患者中,低龄和非低龄之间 Val384Asp 基因型频率。结果显示胃肠道肿瘤患者分组后,低龄组 Val384Asp 基因型频率高于非低龄组,两者之间差异存在统计学意义($P < 0.05$)(表 2)。

表2 分组后胃肠道肿瘤患者 hMLH1 基因 Val384Asp 基因型频率的组间比较

组别	标本例数	Val384Asp 基因型		P 值	OR 值(95% CI)
		Val/Asp	Val/Val		
大肠癌患者					
<45 岁	63	12(19.1)	51(80.9)	0.036*	2.28(0.97~5.34)
≥45 岁	170	15(8.8)	155(91.2)		
胃癌患者					
<50 岁	60	12(20.0)	48(80.0)	0.040*	2.14(0.96~4.74)
≥50 岁	213	21(9.8)	192(90.2)		

* $P < 0.05$; 括号外数据为基因型例数,括号内数据为构成比(%)

(4)胃肠道肿瘤患者分组后与对照组 Val384Asp 等位基因频率的比较:以年龄为界,分组比较胃肠道肿瘤患者与对照组 Val384Asp 等位基因频率的差异。结果显示,在<45 岁的低龄大肠癌和<50 岁的低龄胃癌患者中,Val384Asp 等位基因频率与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$),而在≥45 岁的大肠癌和≥50 岁的胃癌患者中,Val384Asp 等位基因频率与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 3)。

讨 论

肿瘤的发生受到外界的环境、生活习惯、饮食结构等多种因素的影响,其中遗传因素在肿瘤的发生、

发展过程中,尤其在受遗传因素影响更大的低龄肿瘤患者中所发挥的作用日益得到重视,本文拟就此展开讨论。

表3 分组后胃肠道肿瘤患者 hMLH1 基因 Val384Asp 等位基因频率与正常对照的比较

组别	标本例数	等位基因频率		P 值	OR 值(95% CI)
		384Asp (%)	384Val (%)		
对照组	268	3.17	96.83		1.00
大肠癌患者					
<45 岁	63	9.52	90.48	0.0018*	3.21(1.40~7.33)
≥45 岁	170	4.41	95.59	0.3400	1.41(0.66~3.01)
胃癌患者					
<50 岁	60	10.00	90.00	0.0010*	3.39(1.47~7.75)
≥50 岁	213	4.93	95.07	0.1600	1.58(0.79~3.19)

* 考虑到个体基因型由遗传而来,在其生命过程中其基因型并不改变。因此作为基因型比较的对照组,可以忽略年龄因素,因此将肿瘤患者各组分别与合并对照进行比较, $P < 0.01$

DHPLC 是近年兴起的一项用于基因突变筛查的技术。在 PCR 反应后经变性复性过程产生的异源双链,如基因存在突变,则在其中形成错配的碱基。当处于一定的变性温度下时,此处错配的碱基附近的序列会优先发生解链,形成部分单链结构,在有离子对成分的缓冲液作用下,从结合柱上提前洗脱下来,在 DHPLC 图谱上形成一异常洗脱峰。比较各样品洗脱图谱的不同,即可筛选突变的基因。与传统的突变筛查技术如 RFLP、SSCP、CSGE 等技术相比,DHPLC 技术在检测范围,样品通量,自动化程度,重复性和敏感性等方面都有较大的改进,从而在基因筛查工作中具有更广泛的应用范围^[10-12]。

遗传物质的突变是导致肿瘤发生的主要原因,不同类型的 DNA 损伤是导致遗传物质突变的直接诱因,其中 DNA 双链分子碱基错配是导致遗传物质发生突变的主要 DNA 损伤类型之一。在体内存在的错配修复系统(DNA mismatch repair system, MMR)可特异性地修复错配的 DNA 分子,保证遗传物质的完整性和稳定性,避免遗传突变的产生。hMLH1 基因作为体内错配修复系统的重要组成部分,它的突变在主要引起大肠癌发病的同时,亦可使突变携带者多种其他肿瘤的发病率提高^[3,4]。

不同物种 hMLH1 基因序列对比显示,384 位的缬氨酸是位于基因相对可变区的一个保守位点,它的突变可能不会使基因的功能完全失活。但电中性的缬氨酸被带负电的天冬氨酸所取代导致的这种错义突变,可能会使基因产物的空间结构发生某种改

变,从而影响到基因的部分功能,使机体对环境的适应能力降低,患病的风险增大,成为条件致病因素^[13,14]。为明确 hMLH1 基因 Val384Asp 的病因学作用,我们扩大了检测范围和病例,比较分析了 Val384Asp 基因型在四种肿瘤中的存在状况。

在对照组人群中,我们检测到 Val384Asp 的存在,其等位基因频率约为 3%,即约 6% 的个体携带杂合型 Val384Asp。但在胃肠道肿瘤患者中 Val384Asp 的检出率与对照组人群之间差异存在统计学意义($P < 0.05$),尤其在 < 45 岁的低龄大肠癌和 < 50 岁的低龄胃癌患者中,Val384Asp 的检出率与对照组人群之间差异存在统计学意义($P < 0.01$);而在 ≥ 45 岁的大肠癌和 ≥ 50 岁的胃癌患者中,Val384Asp 的检出率与对照组人群相比无差异($P > 0.05$)。统计学分析还显示出在以 45 岁分组的大肠癌之间和以 50 岁分组的胃癌患者之间,Val384Asp 的基因型频率差异亦存在统计学意义($P < 0.05$)。

虽然受饮食结构、生活习惯等因素的影响,我国大肠癌总体发病率低于欧美发达国家,但我国大肠癌的流行病学具有一个非常显著的特点,即发病年龄较欧美人群提前,尤其是受遗传因素影响更大的低龄大肠癌比欧美多见。大量文献资料表明,国内大肠癌高发年龄为 40~55 岁,35 岁以下患者占 12%,而欧美发达国家高发年龄为 55~70 岁,35 岁以下患者在 6% 以下。已有资料显示错配修复系统突变携带者的大肠癌发病年龄提前,我们前期在样本量较大的德国人群中的研究未检出 Val384Asp 的突变^[8,9],结合目前的研究结果我们认为,存在于中国人中的 Val384Asp 突变可能在一定程度上影响到我国胃肠癌的发病年龄。

在食道癌患者中,Val384Asp 的突变率虽高于正常对照,但无统计学意义,而在乳腺癌患者中,其检出率与正常对照相比无差异。与内胚层起源的消化道细胞不同,乳腺细胞起源于间介中胚层。已知绝大多数的胃肠肿瘤属于腺癌,而食道癌多以鳞状上皮为主。细胞起源和类型的不同可能是在食道癌和乳腺癌患者中 Val384Asp 的突变率未见增高的原因。

Val384Asp 错义突变作为东亚人 hMLH1 基因上的一个多态位点,是中国人大肠癌和胃癌的一个

遗传易感因素,可成为中国人低龄胃肠道肿瘤高危人群筛选的候选指标。

参 考 文 献

- 1 Lucci-Cordisco E, Zito I, Gensini F, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and related conditions. *Am J Med Genet*, 2003, 122A:325-334.
- 2 de la Chapelle A, Peltomaki P. Genetics of hereditary colon cancer. *Annu Rev Genet*, 1995, 29:329-348.
- 3 Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the gene, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87:1114-1125.
- 4 Polato F, Broggin M. Microsatellite instability and genetic alterations in ovarian cancer. *Oncol Rep*, 2003, 10:859-866.
- 5 Vaish M, Mishra SK, Mandhani A, et al. Assessment of microsatellite instability in bladder and thyroid malignancies. *Teratog Carcinog Mutagen*, 2003 suppl 1:255-265.
- 6 Young J, Barker M, Fraser L, et al. Mutation searching in colorectal cancer studies: experience with a denaturing high-pressure liquid chromatography system for exon-by-exon scanning of tumour suppressor genes. *Pathology*, 2002, 34:529-533.
- 7 Nystrom-lahti M, Wu Y, Moisio AL, et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Mol Genet*, 1996, 5:763-769.
- 8 Wang YP, Friedl W, Lamberti C, et al. A novel missense mutation in the DNA mismatch repair gene hMLH1 present among East Asians but not among Europeans. *Hum Hered*, 1998, 48:87-91.
- 9 Wang YP, Friedl W, Proping P, et al. Val384Asp in hMLH1 gene in Chinese, Japanese and German and its etiological role in colorectal cancer. *Chin J Med Genet*, 1998, 15:263-266.
- 10 Su YN, Lee CN, Hung CC, et al. Rapid detection of beta-globin gene (HBB) mutations coupling heteroduplex and primer-extension analysis by DHPLC. *Hum Mutat*, 2003, 22:326-336.
- 11 Isidro G, Matos S, Goncalves V, et al. Novel MLH1 mutations and a novel MSH2 polymorphism identified by SSCP and DHPLC in Portuguese HNPCC families. *Hum Mutat*, 2003, 22:419-420.
- 12 Pan KF, Liu W, Lu YY, et al. High throughput detection of microsatellite instability by denaturing high-performance liquid chromatography. *Hum Mutat*, 2003, 22:388-394.
- 13 Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*, 1994, 368:258-261.
- 14 Han HJ, Maruyama M, Baba S, et al. Genomic structure of human mismatch repair gene, hMLH1, and its mutation analysis in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Hum Mol Genet*, 1995, 4:237-242.

(收稿日期:2003-11-06)

(本文编辑:尹廉)