

基因多态性在结直肠癌发展中的重要性

SIGNIFICANCE OF GENE POLYMORPHISM IN DEVELOPMENT OF COLORECTAL CANCER

目的：测定 MTHFR (Ala222Val), XPD (Lis751Gln), XRCC1 (Arg194Trp), XRCC1 (Arg399Gln), XRCC1 (Arg208His), APE1 (Asp148Glu), hOGG1 (ser326Ces), P53 (Pro47Ser), VEGF (C654G), EGFR(A2073T), TNF(G308A), CHEK2 (Ile157Thr), MMP1 (1607 1G>2G), TIMP1(C53CT) 基因多态性在结直肠癌发生发展中的意思。

材料与方法。我们分析了 106 例在 Regional Clinical Oncology Center 梁赞地区的国家预算机构接受治疗的结肠直肠癌患者。所有患者采用静脉血白细胞 DNA 提取、聚合酶链反应 (PCR) 进行基因分型, 电泳检测结果。

结果：确诊时患者的年龄与任何被研究基因的多态性均无相关性 ($p > 0.05$)。TNF 基因多态性 (G308A) 与肿瘤分期有统计学意义：其主要纯合基因型 G/G 在 III-IV 期患者中更为常见 ($p=0.047$)。G / G TNF 等位基因 (G308A) 与 MMP1 基因纯合突变等位基因 (1607 1G/2G) 的存在, 与 III-IV 期诊断患者比例的增加有直接关系。两种多态性的结合在研究组中具有统计学差异 ($p=0.025$)。在 10 例 IV 期患者中, 有 8 例发现 VEGF 基因 (C654G) 中存在 G / G 多态性。这种突变的纯合子变异在 I 期 (37.5%)、II 期 (40%) 和 III 期 (37.5%) 患者中更少见 ($p = 0.0147$)。

结论。所研究的基因并不影响结肠直肠癌的年龄相关标准, 而且在男女患者中发现的频率是一样的, 无论年龄组。肿瘤的定位和分化程度也与所研究基因的多态性无关。TNF 基因 (G308A) 的 G / A 多态性应被认为是有助于降低肿瘤侵袭性的有利标准 ($p < 0.05$)。G/G 主要基因型的鉴定, 特别是结合 MMP1 基因纯合突变等位基因 (1607 1G/2G) 是不利因素 ($p < 0.05$)。G/G VEGF 纯合突变基因型 (C654G) 的存在与肿瘤快速进展和转移活性直接相关 ($p < 0.05$)。

关键词：基因多态性；结直肠癌；侵入性增长；转移

Aim. To determine the significance of polymorphism of MTHFR (Ala222Val), XPD (Lis751Gln), XRCC1 (Arg194Trp), XRCC1 (Arg399Gln), XRCC1 (Arg208His), APE1 (Asp148Glu), hOGG1 (ser326Ces), P53 (Pro47Ser), VEGF (C654G), EGFR(A2073T), TNF(G308A), CHEK2 (Ile157Thr), MMP1 (1607 1G>2G), TIMP1(C53CT) genes in development of colorectal cancer.

Materials and Methods. 106 Cases of colorectal cancer in patients who were on treatment in Ryazan Clinical Oncological Dispensary (Ryazan) were analyzed. Genotyping in all patients was performed using the method of isolation of DNA from leukocytes of venous blood with subsequent polymerase chain reaction (PCR) with electrophoretic detection of the result.

Results. No interrelation between the age of patients and polymorphism of any studied gene was recorded at the moment of verification of the diagnosis ($p > 0.05$). Statistically significant relationship was identified between polymorphism of TNF (G308A) gene and the stage of cancer: its homozygous major genotype G/G more commonly occurred in the group of patients with III-IV stage ($p=0.047$). In the presence of allele of G/G TNF (G308A) gene together with homozygous mutant allele of MMP1 (1607 1G/2G) gene, a direct relationship with increase in the number of patients diagnosed with III-IV stage was noted. This combination of two polymorphisms showed a statistically significant difference in the studied groups ($p=0.025$). In 8 out of 10 patients with IV stage, the presence of G/G polymorphism in VEGF (C654G) gene was noted. This mutant homozygous variant was much more rare in patents with I (37.5%), II (40%) or III stages (37.5%) ($p=0.0147$).

Conclusions. The studied genes do not influence the age of manifestation of colorectal cancer and occur at the same frequency in patients of both genders irrespective of the age group. Localization and the extent of differentiation of the tumor do not depend on polymorphism of the studied genes either. The presence of G/A polymorphism of *TNF* (G308A) gene should be considered a favorable criterion associated with lower aggressiveness of the tumor ($p < 0.05$), whereas identification of the major G/G genotype especially in combination with homozygous mutant allele of *MMP1* (1607 1G/2G) gene is an unfavorable factor ($p < 0.05$). The presence of G/G mutant genotype of *VEGF* (C654G) gene may directly correlate with rapid progression of tumor and with active metastatic spreading ($p < 0.05$).

Keywords: polymorphism of genes; colorectal cancer; invasive growth; metastatic spreading.

结直肠癌是俄罗斯大常见癌症第三名。每年有超过 60,000 名患者被诊断出结肠直肠癌。在我国，共有 35 万多人登记为该病理。

此外，这类患者的治疗结果仍然不令人满意，很大程度上是因为在诊断验证时忽视了这一过程。结肠直肠癌（III-IV 期）的发现较晚是由于缺乏筛查诊断程序，缺乏对这种病理的原因和危险因素的了解，以及疾病的直接病程，在某些情况下是非常快的。

现阶段在结直肠癌的治疗中，多采用手术、放疗、药物照射的联合或综合方法[1]。

癌症发生的特点，对治疗的反应可能很大程度上取决于患者的个体基因型，基因型编码了参与和预防癌变的各种机制[2,3]。在这方面，大量的科学工作都是为了确定基因多态性与病理过程[4,5]和各种肿瘤定位的关系[6,7]。

本研究旨在确定 MTHFR (Ala222Val)、XPD (Lis751Gln)、XRCC1 (Arg194Trp)、XRCC1 (Arg399Gln)、XRCC1 (Arg208His)、APE1 (Asp148Glu)、hOGG1 (ser326Gln, C326GES)、EGFR (A2073T)、TNF (G308A)、CHEK2 (Ile157Thr)、MMP1 (1607 1G> 2G)、TIMP1 (C53CT) 基因多态性在结直肠癌发生发展中的价值。

按照目标，评估了多态性的关系与患者的性别、年龄在疾病的发病，与肿瘤的定位过程中，与肿瘤的分化程度、阶段的疾病的深度入侵和转移性肿瘤的蔓延。

材料与amp;方法

这项研究是在 Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education of Ryazan State Medical University of the Ministry of Health of Russia 和 Rostov Regional Clinical Oncology Dispensary 国家预算机构的基础上进行的，并得到了当地伦理委员会的批准（15 年 11 月 6 日第 5 号方案）。这项研究使用了人们签署知情同意书后的数据。

对存在多态性的基因 MTHFR (Ala222Val)、XPD (Lis751Gln)、XRCC1 (Arg194Trp)、XRCC1 (Arg399Gln)、XRCC1 (Arg208His)、APE1 (Asp148Glu)、hOGG1 (P32) C654G)、EGFR (A2073T)、TNF (G308A)、CHEK2 (Ile157Thr)、MMP1 (1607 1G> 2G)、TIMP1 (C53CT)进行基因分型。

中央研究实验室的基因分型结果进行高等教育的联邦国家教育机构 Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov 俄罗斯联邦卫生部采用了从受试者静脉血白细胞中分离 DNA，随后 PCR 电泳检测结果为《SNP-EXPRESS》（Litekh 科研生产公司，俄罗斯）。

该研究包括 106 名已证实患有结直肠癌的患者。被检查患者的性别组成大致相等：58 名男性（55%）和 48 名女性（45%）。根据发病时的总年数，按年龄将患者分为 3 组。第一组患者的早期表现为 55 岁（平均 45.7 岁—24 人），第二组为 55 岁—65 岁（60.1—48 人），第三组为 65 岁以上（71.6 岁—43 人）。所有患者诊断时的平均年龄为 61.5 岁。

在所有患者中，76 例患者（72%）被诊断为结肠癌，30 例患者（28%）肿瘤定位于结肠其他部位。

100%的患者确诊。组织学上，所有肿瘤均以腺癌为代表，以中度分化为主（G-2，81%）。

疾病分期按照 TNM 国际分类第八版（2018 年）进行。从发病情况来看，I-II 期（无局部 I / y 转移病灶）患者比例为 45.3%（48 例），III 期患者比例也为 45.3%（48 例）。10 名患者（9.6%）在诊断时为 IV 期疾病。

使用 Excel 2007 软件包（MS，美国）、Statistica 10.0（Stat Soft Inc.，美国）和在线计算器哈代-温伯格定律（为 Hardy-Weinberg 平衡定律—<https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/>）对结果进行统计处理。独立组中定性特征频率差异的描述和比较采用 Pearson 的 χ^2 标准，用期望现象的数目从 5 到 9，用耶茨校正或 Fischer 的精确标准值小于 5。对该特征的预后意义进行评估，并确定在 95%置信区间的相对风险。在患者组中，还评估了哈代-温伯格定律（Hardy-Weinberg）的等位基因频率的偏差。在分析中， $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果与讨论

男性和女性在性别上无显著差异（ $p > 0.05$ ）。在寻找确诊时患者年龄与多态性之间的关系时，所研究的基因在入选组间均无统计学差异（ $p > 0.05$ ）。此外，各年龄组均维持哈代-温伯格定律（Hardy-Weinberg）平衡，表明等位基因频率在各年龄组分布的可靠性。

在根据肿瘤过程定位分析研究基因多态性时，差异无统计学意义（ $p > 0.05$ ），在评估研究基因多态性对肿瘤分化程度的影响时，差异无统计学意义（ $p > 0.05$ ）。

与诊断时的肿瘤进程的阶段的关系被评估。大多数多态性基因与生长期无直接关系（ $p > 0.05$ ）。统计上显著的关系被发现的多态性 TNF G308A 基因编码细胞因子肿瘤坏死因子：其纯合基因型主要 G / G 组更常见的新诊断阶段 III-IV 疾病患者（69%的患者）组患者相比，其诊断是在阶段 I-II（40%的受试者， $\chi^2 = 3.96$ ， $p = 0.047$ ，OR = 1.45 (1.0;2.03)，表 1）。

并分析了该基因的多态性与其它基因的关系。发现存在的 G/G TNF 等位基因（G308A），连同 MMP1 基因的纯合子突变等位基因（16071G/2G），有直接关系的增加患者的比例首次诊断阶段 III-IV。由这些基因编码的蛋白质在其生物学作用是相似的，并且在增强彼此的活性方面是相互关联的。这两种多态性的组合在被检查组中具有显著的统计学差异（ $\chi^2 = 5.04$ ， $p = 0.025$ ，相对风险= 1.85 [1.13;3.05]，表 1）。

尽管本研究纳入的 IV 期患者比例较小，但该组 10 例患者中有 8 例 VEGF 基因（C654G）存在 G/G 多态性。这种突变型纯合子变异在 I 期（37.5%）、II 期（40%）和 III 期（37.5%）患者中更少见（ $p = 0.0147$ ，相对风险= 5.42 [1.21;24.32]，表 2）。

通过对基因多态性发生频率的分析，并没有发现结直肠癌发病时年龄的差异。可以想象，癌症在更年轻的年龄发展有遗传的理由，但这没有在这项研究中显示。

肿瘤的定位和分化程度也与所研究基因的多态性无关。

多态基因 MTHFR (Ala222Val)、XPD (Lis751Gln)、XRCC1 (Arg194Trp)、XRCC1 (Arg399Gln)、XRCC1 (Arg208His)、APE1 (Asp148Glu)、P53 (Pro47Ser)、EGTr1 (A73)、TIM73 (TIM15) CH15 TIME、A73TR (TIM15) C53CT)对肿瘤更有侵袭性的生长和转移趋势无影响。

同时发现大纯合子 TNF (G308A) G/G 基因的携带与肿瘤高快速侵袭能力有直接关系，表现为疾病已处于 III-IV 期。至少一个 TNF 基因突变等位基因 (G308A) 的携带者可能对该细胞因子的功能减弱，其生物学效应也相应减弱。这些数据证实了已知的 TNF- α 细胞因子活性与肿瘤进展之间的关系，因为其能够增强细胞增殖，刺激新生血管生成，并增强其他炎症因子加速肿瘤生长[8]。由于肿瘤发生淋巴转移和远处转移需要较长的时间，因此鉴定一个特定基因的杂合状态 (G/A) 可能具有良好的预后价值。

我们还注意到，除了 TNF 基因型 (G308A) G/G 在患者体内存在突变型纯合等位基因 MMP1 (1607 2G/2G)，会导致肿瘤更有侵略性和更快的生长，所以这是一个不

利的预后标准。这可能是由于 TNF- α 细胞因子过度诱导 MMP1 基因编码的基质金属蛋白酶，进而导致了早期肿瘤转移[9]。

内皮血管生长因子 VEGF 的突变是肿瘤快速进展的一个显著的侵袭性危险因素。在我们的研究中，我们没有量化该基因在肿瘤细胞中的表达，但是，该等位基因（G/G）的突变基因型可能与血管生长增加和肿瘤快速进展有关。研究中包括的一小部分 IV 期肿瘤患者不允许我们明确地解释结果。但该基因突变在这一组中明显增加，需要进一步研究，并可能对这些患者的肿瘤组织进行额外的免疫组化检查。

结论

分析 MTHFR (Ala222Val)、XPD (Lis751Gln)、XRCC1 (Arg194Trp)、XRCC1 (Arg399Gln)、XRCC1 (Arg208His)、APE1 (Asp148Glu)、hOGG1 (ser3253C47)、POG (P3232CES)、EGFR (A2073T)、TNF (G308A)、CHEK2 (Ile157Thr)、MMP1 (1607 1G / 2G)、TIMP1 (C53CT)基因多态性在结直肠癌发生发展中的价值。

所研究的基因在两性中均有发现，且不影响大肠癌的年龄相关表现标准，以及肿瘤的定位和分化程度。

TNF 基因多态性（G308A）与肿瘤快速侵袭深部组织的倾向之间存在可靠的关系，表现为 III-IV 期疾病的检测。G/A 多态性的存在应被认为是有助于降低肿瘤侵袭性的有利标准（ $p < 0.05$ ）。G/G 主基因型的存在，特别是与 MMP1 基因纯合突变等位基因（1607 1G/2G）结合，是 III-IV 期新诊断结直肠癌患者最常见的不利因素（ $p < 0.05$ ）。

G/G VEGF 纯合突变基因型（C654G）的存在与肿瘤快速进展和转移活性直接相关。

加深对癌症本质的认识，了解某一患者未来的病程特点，将有助于提高患者的治疗效果，向个性化治疗过渡。

表格 1

TNF 和 MMP1 基因多态性与疾病分期的关系

基因型/等位基因	I-II 晚期	III-IV 晚期	χ^2, p	相对风险 [95% 置信区间]
TNF(G308A)				
G/G	18	33	3.96. $p=0.047$	1.45 [1.0; 2.03]
G/A	30	25		
A/A	0	0	-	-
GG	66	91	2.57. $p=0.11$	0.77 [0.57;1.04]
A	30	25		
TNF(G308A) + MMP1 (1607 2G/2G)				
G/G	3	16	5.04. $p=0.025$	1.85 [1.13; 3.05]
G/A	12	10		

表格 2

肿瘤过程的分期和 VEGF 基因多态性

基因型/等位基因	I-II 晚期	III-IV 晚期	p	相对风险 [95% 置信区间]
VEGF (C654G)				
C/C	10	1	$p=0.0147$	5.42 [1.21; 24.3]
C/G	49	1		
G/G	37	8		
C	69	3	$p=0.1$	2.9 [0.88; 9.62]
GG	123	17		