

Survivin基因启动子区-31C/G多态性与散发性结直肠癌遗传易感性的关系

黄俊¹, 汪建平^{1*}, 王磊¹, 刘焕亮², 魏宜胜¹, 黄美近¹, 陈典克², 傅新晖², 陈静²
(中山大学 1. 附属第六医院结直肠外科, 2. 胃肠病研究所, 广东 广州 510655)

摘要:【目的】探讨生存素 Survivin 基因启动子区-31C/G 单核苷酸多态性与中国华南地区散发性结直肠癌(CRC)遗传易感性的关系。【方法】采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法(PCR-RFLP)检测华南地区 711 例健康人和 702 例 CRC 的 Survivin 基因-31C/G 位点单核苷酸多态性。【结果】结直肠癌患者 CC 基因型的频率明显高于对照人群(36.35% vs. 26.2%, $\chi^2 = 17.89$, $P < 0.001$), 与 CC 基因型相比, CG、GG 基因型和等位基因 G 携带者的 CRC 发病风险分别显著下降至 0.61 倍(95% CI = 0.46 ~ 0.80, $P < 0.001$)、0.52 倍(95% CI = 0.38 ~ 0.71, $P < 0.001$)和 0.58 倍(95% CI = 0.45 ~ 0.74, $P < 0.001$)。【结论】Survivin 基因-31C/G 多态性与 CRC 发病风险有关, -31G 变异基因型是中国南方人群散发性结直肠癌独立保护因素。

关键词: 结直肠癌; Survivin 基因; 单核苷酸多态性

中图分类号: R735.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)01-0059-05

Association between Survivin Promoter-31C/G Polymorphism and Genetic Susceptibility to Sporadic Colorectal Cancer

HUANG Jun¹, WANG Jian-ping^{1*}, WANG Lei¹, LIU Huan-liang², WEI Yi-sheng¹, HUANG Mei-jin¹, CHEN Dian-ke², FU Xin-hui², CHEN Jing²
(1. Department of Colorectal Surgery, The Sixth Affiliated Hospital,
2. Gastrointestinal Institute, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the association between -31C/G polymorphism in the promoter of survivin gene and the susceptibility to sporadic colorectal cancer in southern Chinese population. 【Methods】 Survivin-31C/G genotypes were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 711 healthy controls and 702 CRC cases. 【Results】 The number of CRC patients carrying with CC genotype was much higher than those of controls (36.5% vs. 26.12%, $\chi^2 = 17.89$, $P < 0.001$). Compared with CC genotypes, CG, GG genotypes and G allele carriers had a significantly decreased risk of CRC, with the decrease being 0.61-fold (95% CI = 0.46-0.81, $P < 0.001$), 0.52-fold (95% CI = 0.38-0.71, $P < 0.001$) and 0.58-fold (95% CI = 0.45-0.74, $P < 0.001$), respectively. 【Conclusion】 Survivin gene -31C/G polymorphism is associated with sporadic CRC risk, the G variant genotype is the independent protective factors against sporadic CRC in southern Chinese population.

Key words: colorectal cancer; survivin gene; single nucleotide polymorphism

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(1):59-63]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的消化道恶性肿瘤之一,近年来,随着食物结构和生活方式的改变,我国的结直肠癌发病率和死亡

率呈逐年上升趋势。结直肠癌的形成和发展是一个多步骤、多阶段及多基因改变的过程,随着其发病机制研究的深入,细胞增殖和凋亡的失衡在结

收稿日期: 2009-07-14

基金项目: 国家自然科学基金(30872488)

作者简介: 黄俊, 博士生, 主治医师, E-mail: huangjun1995@163.com; * 通信作者: 汪建平, 教授, E-mail: wjp@mail.sysu.edu.cn

直肠癌发生发展中的作用日益受到关注。Survivin 是近年发现的凋亡抑制蛋白家族 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 的新成员,具有抑制细胞凋亡和调节细胞增殖的双重功能^[1]。目前认为 Survivin 在抑制细胞凋亡、调节细胞周期、促进细胞增殖及细胞转化等方面均发挥着重要作用从而促进了结直肠癌的细胞周期、促进细胞增殖及细胞转化等方面均发挥着重要作用从而促进了结直肠癌的发生发展^[2]。最近发现 Survivin 基因启动子区-31C/G 多态(起始密码子第一个核苷酸为 + 1)能下调 Survivin 的表达,进而影响肿瘤遗传易感性^[3]。到目前为止,尚无关于 Survivin-31C/G 多态性与中国人群 CRC 发病风险的相关性的研究报道。因此我们在多中心大样本基础上探讨 Survivin-31C/G 多态性与我国华南地区汉族人群结直肠癌发病风险的关系,这将有助于筛选 CRC 的高危人群,评估个体罹患 CRC 的风险,实现疾病的早期预防、早期控制和早期治疗。

1 材料与方法

1.1 研究对象

病例组选自 2002 年 7 月至 2008 年 12 月间在中山大学附属第六医院(中山大学附属胃肠肛门医院)、中山大学附属肿瘤医院、中山大学附属第一医院、广州医学院附属肿瘤医院、广东省人民医院和广州市番禺区人民医院就诊的 702 例结直肠癌患者,均经组织病理确诊,病例组对象纳入标准包括:广州及周边地区汉族;无血缘关系。剔除标准为家族性腺瘤性息肉病和遗传性非息肉性结直肠癌。对照组为同时期同一地区无血缘关系的健康体检人员,均为汉族,共 711 例,对照组与病例组按年龄(± 5 岁)和性别上相匹配。

1.2 Survivin 基因-31C/G 基因型鉴定

按常规蛋白酶 K 消化、苯酚/氯仿抽提、乙醇沉淀法(所用 DNA 提取试剂盒为 Qiagen, Valencia, CA)提取外周血白细胞基因组 DNA, pH8.0 TE 溶解, -20℃保存。Survivin-31C/G(refSNP ID: rs9904341)多态采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)进行基因分型。扩增包含-31C/G 位点在内的 151

bp 片段,上游引物序列为 5'-AAG AGG GCG TGC GCT CCC GAC A-3', 下游引物序列为 5'-GAG ATG CGG TGG TCC TTG AGA AA-3'(上海 Invitrogen 公司合成)。12- μ L PCR 反应体系中含: 2 \times GoTaq MasterMixs(Promega) 6 μ L, 1 μ L(100 ng/ μ L)基因组 DNA, 上、下游引物(5 μ mol/L)各 1 μ L, 3 μ L 双蒸水。PCR 反应的条件为: 94℃预变性 5 min, 然后 94℃变性 30 s, 62℃退火 45 s, 72℃延伸 15 s, 共 35 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。

PCR 扩增产物与限制性内切酶 MspI(New England BioLabs)于 37℃水浴过夜酶切, 酶切产物以含有溴化乙锭的 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离。CC 基因型产生 61、90 bp 两个片段, GG 基因型只有 1 个 151 bp 片段, 而杂合子 CG 则为 151、61、90 bp 3 个片段(图 1)。

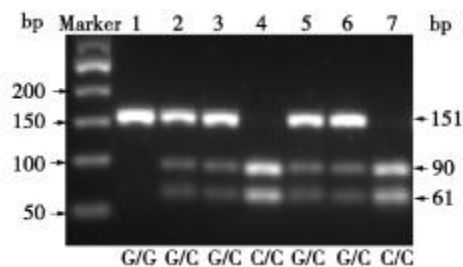


图 1 Survivin 基因-31C/G 酶切电泳图

Fig.1 Genotype of Survivin-31C/G polymorphism by PCR-RFLP

GG, GC, CC: three genotypes of the -31 site of survivin gene; Marker: 50 bp DNA marker

结果由两位不知道病例或对照组的试验者判断。对于每个位点,随机抽取 10%样本重复试验并测序验证,结果 100%一致。

1.3 统计分析

以拟合优度 χ^2 检验进行哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)检验;以 χ^2 检验明确分类变量(如基因分型)在病例和对照组的分布差异;通过拟合非条件 logistic 回归模型明确研究因素与 CRC 易感性的关系,以校正优势比(adjusted odds ratio, OR)及其 95%可信区间(95% confidence interval, 95% CI)表示患病风险。所有的统计检验均为双侧概率检验,以 $P < 0.05$ 为统计学显著性界限,数据采用 SPSS 13.0 处理。

2 结果

2.1 研究对象的一般情况

CRC 病例组与对照组比较,年龄、性别分布差异无统计学意义(P 值分别为 0.973,0.938)。现在吸烟者、现在饮酒者、高体质量指数者及有癌症家族史者在病例组的分布频率远高于对照组($P < 0.05$;表 1)。

2.2 Survivin 基因多态性分布与结直肠癌风险

对照组基因型分布频率符合哈迪-温伯格遗传平衡($\chi^2 = 0.62, P = 0.43$),结直肠癌患者-31C 等位基因及 CC 基因型频率显著高于对照组(58.0% vs. 50.4%, $\chi^2 = 16.24, P < 0.001$;36.5% vs. 26.2%, $\chi^2 = 17.89, P < 0.001$),logistic 多因素回归分析显示与 CC 基因型相比,CG、GG 基因型和等位基因 G 携带者(即 CG + GG 基因型)的 CRC 发病风险分别显著下降至 0.61 倍(95% CI = 0.46 ~ 0.80, $P < 0.001$)、0.52 倍(95% CI = 0.38 ~ 0.71, $P < 0.001$)和 0.58 倍(95% CI = 0.45 ~ 0.74, $P < 0.001$;表 2)。

2.3 Survivin 基因多态性与中国南方散发性结直肠癌相关性分层分析

我们进一步按年龄、性别、吸烟、饮酒、癌症家族史和体质量指数分成亚组,在各亚组中分层分析 Survivin 启动子基因型和散发性结直肠癌的关系。含有-31G 变异基因型(即 CG + GG)降低散发性结直肠癌患病风险的效应在年轻(≤ 60 岁)(adjusted OR = 0.54,95% CI = 0.38 ~ 0.78, $P = 0.001$),体质量指数 $< 23.9 \text{ kg/m}^2$ 者(adjusted OR = 0.54,95% CI = 0.40 ~ 0.75, $P < 0.001$)中更为明显。另外,在年龄、性别、吸烟及饮酒各亚组中,-31G 变异基因型和散发性结直肠癌风险降低都明显相关。但是,在有一级或二级亲属癌症家族史者($P = 0.256$)和体质量指数 $\geq 28.0 \text{ kg/m}^2$ 者($P = 0.680$)中,-31G 变异基因型的保护作用并无统计学意义(表 3)。

3 讨论

结直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其发生和发展机制尚未完全阐明。目前研究发现,细胞凋亡的抑制使一些突变或转化细胞逃避机体免疫

表 1 CRC 组与对照组多种混淆因素频率比较

Variables	CRC	Control	χ^2	$P^{1)}$
Age (years)				
≤ 60	340(48.4)	345(48.5)	0.001	0.973
> 60	362(51.6)	366(51.5)		
Sex				
Male	435(62.0)	442(62.6)	0.006	0.938
Female	267(38.0)	269(37.8)		
Smoking status				
Never	309(44.0)	394(55.4)	32.289	<0.001
Former	78(11.1)	102(14.3)		
Current	315(44.9)	215(30.3)		
Drinking status				
Never	305(43.4)	540(75.9)	175.175	<0.001
Former	25(3.6)	34(4.8)		
Current	372(53.0)	137(19.3)		
BMI (kg/m^2)				
≤ 23.9	388(55.3)	457(64.3)	12.082	0.002
24.0-27.9	244(34.7)	201(28.3)		
≥ 28.0	70(10.0)	53(7.4)		
Family history of cancer				
No	90(12.8)	64(9.0)	5.305	0.021
Yes	612(87.2)	647(91.0)		

1) P values for a two-sided χ^2 test

表 2 Survivin 启动子-31C/G 基因型和等位基因频数分布与散发性结直肠癌风险的关系

	CRC n (%)	Control n (%) ¹⁾	Adjusted OR (95% CI) ²⁾	$P^{2)}$
Genotype				
CC	256(36.5)	186(26.2)	1.00(ref.)	
CG	302(43.0)	345(48.5)	0.61(0.46 ~ 0.80)	<0.001
GG	144(20.5)	180(25.3)	0.52(0.38 ~ 0.71)	<0.001
CG + GG	446(63.5)	525(73.8)	0.58(0.45 ~ 0.74)	<0.001
Allele				
C	814(58.0)	717(50.4)	1.00(ref.)	
G	590(42.0)	705(49.6)	0.69(0.59 ~ 0.82)	<0.001

1) The observed genotype frequency among the control subjects was in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$) ($\chi^2 = 0.62, P = 0.43$); 2) ORs were adjusted in a logistic regression model that included age, sex, smoking status, alcohol consumption, family history of cancer and BMI.

表 3 以所先变量分层分析 Survivin-31C/G 基因型与散发性结直肠癌的关系

Table 3 Stratification analysis of the survivin-31C/G genotypes by selected in cases and controls

	CRC (<i>n</i>)		Control (<i>n</i>)		Adjusted OR (95%CI) ¹⁾ CG + GG vs. CC	<i>P</i> ¹⁾
	CC	CG + GG	CC	CG + GG		
Age (years)						
≤60	130	210	91	254	0.54(0.38 ~ 0.78)	0.001
>60	126	236	95	271	0.61(0.43 ~ 0.87)	0.007
Sex						
Male	155	280	118	324	0.60(0.43 ~ 0.85)	0.004
Female	101	166	68	201	0.55(0.38 ~ 0.81)	0.002
Smoking status						
Ever	139	254	81	236	0.63(0.42 ~ 0.93)	0.020
Never	117	192	105	289	0.58(0.41 ~ 0.80)	0.001
Drinking status						
Ever	143	254	45	126	0.59(0.39 ~ 0.90)	0.013
Never	113	192	141	399	0.61(0.42 ~ 0.81)	0.001
BMI(kg/m ²)						
<23.9	160	228	130	327	0.54(0.40 ~ 0.75)	<0.001
24.0 ~ 27.9	83	161	47	154	0.61(0.38 ~ 0.97)	0.035
≥28.0	13	57	9	44	0.68(0.24 ~ 1.96)	0.680
Family history of cancer						
Yes	23	67	17	47	0.69(0.36 ~ 1.31)	0.256
No	233	379	169	478	0.55(0.42 ~ 0.71)	<0.001

1) ORs were adjusted for age, sex, smoking status, alcohol consumption, family history of cancer and BMI in a logistic regression model.

系统的监视而异常存活、累积形成优势克隆在结直肠癌的发生和发展中可能有重要的地位^[4]。Survivin 是新近发现的一种凋亡抑制基因,其编码产生含 142 个氨基酸的蛋白。与凋亡抑制蛋白家族的其它成员相比,Survivin 蛋白结构非常独特,N 端仅含有一个杆状病毒 IAP 重复序列(baculovirus IAP repeat, BIR)结构域,在 C 端缺少锌指结构而代之以 α-螺旋结构^[5]。Caspase 级联激活并溶解蛋白质是细胞凋亡的核心机制,Survivin 蛋白通过干扰内源性凋亡信号通路上游启动因子 caspase-9 的活化及直接抑制内/外源凋亡信号通路下游共同的终末效应因子 caspase-3、caspase-7 而实现其抗凋亡作用^[6]。

3.1 Survivin-31G 变异基因型是中国南方人群散发性结直肠癌的独立保护因素

许多研究证实 Survivin 在人类绝大多数恶性肿瘤组织,包括结肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌和乳腺癌等表达明显上调,并与预后差、肿瘤进展及药物耐受相关^[7]。Survivin 基因转录异常是 Survivin 在肿瘤组织中异常高表达的主要机制,

Survivin 基因-31C/G 多态位于启动子区细胞周期依赖性元件(cell cycle dependent element,CDE)/细胞周期同源区(cell cycle homology region,CHR),-31G 变异等位基因通过改变 CDE/CHR 调控元件结合位点的特异序列增加阻遏蛋白与 CDE/CHR 元件结合从而降低 Survivin 的表达,进而影响肿瘤遗传易感性^[3,8]。目前关于 Survivin 基因-31C/G 多态性与肿瘤易感性的研究报道不多而且结果也不尽相同。Wang 等^[9]的研究认为在台湾人群中膀胱上皮癌患者 CC 基因型频率显著高于对照组(34.7% vs. 20.9%),与 GG 基因型相比,CC 基因型明显增加台湾人群膀胱上皮癌的发病风险(校正 OR = 4.0, 95% CI = 2.3 ~ 7.2)。一项希腊人群的病例对照研究发现 CC 基因型可显著增加罹患 CRC 的风险(校正 OR = 2.68, 95% CI = 1.77 ~ 4.07),CC 基因型携带者 Survivin mRNA 水平是 CG 或 GG 基因型携带者的 1.6 倍^[10]。与上述研究相似,我们通过多中心大样本的病例对照研究也发现 Survivin-31C/G 多态与中国人群 CRC 发病风险明显相关,-31G 变异基因型可以明显降低 CRC

的发病风险(校正 OR = 0.58, 95% CI = 0.45 ~ 0.74), 是中国南方罹患散发性结直肠癌的独立保护因素, 并且随着-31G 等位基因增加 CRC 患病风险更加降低, 有等位基因剂量效应, 其合理解释是-31G 变异等位基因下调 survivin 表达, 增加机体凋亡清除 DNA 受损变异细胞的能力, 从而降低对结直肠癌的遗传易感性。但在胃癌及宫颈癌中 Survivin 基因-31C/G 多态性与肿瘤发病风险无明显相关^[11-12], 这可能与不同肿瘤的致癌作用机制不同有关。

3.2 Survivin-31C/G 多态性与结直肠癌其它危险因素的关系

我们分层分析发现在年龄、性别、吸烟及饮酒各亚组中, -31G 变异基因型和散发性结直肠癌风险降低都明显相关, 但在有一级或二级癌症家族史者和体质量指数 $\geq 28.0 \text{ kg/m}^2$ 者中-31G 变异基因型与散发性结直肠癌患病风险无明显相关。因此我们认为有癌症家族史和肥胖可能影响-31G 变异基因型对结直肠癌的保护作用。这可能与有癌症家族史者的遗传背景有关, 而肥胖所引起的胰岛素抵抗、高胰岛素血症及胰岛素样生长因子增高已经被越来越多的研究所证实是诱发结直肠癌的重要环节^[13-14], 从而使这部分群体失去了-31G 等位基因的保护作用。

3.3 结论

本研究表明 Survivin-31G 变异基因型是中国南方人群罹患散发性结直肠癌的独立保护因素, 这种保护作用在年龄 ≤ 60 岁和体质量指数 $< 23.9 \text{ kg/m}^2$ 者更为明显, 可作为 CRC 发病风险的筛选指标。就目前我们所检索到的文献来看, 这是目前关于中国人群 Survivin 基因遗传变异与 CRC 易感性关系的首次报道。当然我们的发现还需要样本量更大的、最好是以人群为基础的病例对照研究去验证, 并有待于更深入的分子机制研究去证实。

参考文献:

- [1] Li F, Brattain MG. Role of the survivin gene in pathophysiology [J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(1): 1-11.
- [2] Watson AJ. An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006, 57(2): 107-121.
- [3] Jang JS, Kim KM, Kang KH, et al. Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2008, 60(1): 31-39.
- [4] Yang SY, Sales KM, Fuller B, et al. Apoptosis and colorectal cancer; implication for therapy [J]. *Trends Mol Med*, 2009, 15(5): 225-233.
- [5] Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer [J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8581-8589.
- [6] Sah NK, Khan Z, Khan GJ, et al. Structural, functional and therapeutic biology of survivin [J]. *Cancer Lett*, 2006, 244(2): 164-171.
- [7] Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy [J]. *Trends Mol Med*, 2001, 7(12): 542-547.
- [8] Xu Y, Fang F, Ludewig G, et al. A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells [J]. *DNA Cell Biol*, 2004, 23(9): 527-537.
- [9] Wang YH, Chiou HY, Lin CT, et al. Association between survivin gene promoter -31C/G polymorphism and urothelial carcinoma risk in Taiwanese population [J]. *Urology*, 2009, 73(3): 670-674.
- [10] Gazouli M, Tzanakis N, Rallis G, et al. Survivin-31C/G promoter polymorphism and sporadic colorectal cancer [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2009, 24(2): 145-150.
- [11] Yang L, Zhu H, Zhou B, et al. The association between the survivin C-31G polymorphism and gastric cancer risk in a chinese population [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(5): 1021-1028.
- [12] Borbély AA, Murvai M, Szarka K, et al. Survivin promoter polymorphism and cervical carcinogenesis [J]. *J Clin Pathol*, 2007, 60(3): 303-306.
- [13] Otani T, Iwasaki M, Sasazuki S, et al. Plasma C-peptide, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding proteins and risk of colorectal cancer in a nested case-control study: the Japan public health center-based prospective study [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(9): 2007-2012.
- [14] Giovannucci E. Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review [J]. *Am J Clin Nutr*, 2007, 86(3): s836-842.

(编辑 张恩健)

[2] Watson AJ. An overview of apoptosis and the prevention