

CD44 基因 rs13347 位点多态性与乳腺癌发生及转移的相关性研究*

杨 阳¹, 黄 鑫¹, 向 尹¹, 崔智威¹, 高林波²

(1. 乐山市人民医院检验科, 四川乐山 614000; 2. 四川大学华西第二医院, 四川成都 610041)

摘要:目的 通过探讨肿瘤相关基因 CD44 的基因多态性与乳腺癌发生的关系, 发现乳腺癌致病基因或者遗传易感基因, 为乳腺癌的基因筛查、诊断、治疗提供理论依据和技术支持。方法 收集乳腺癌患者 265 例及健康女性样本 290 例, 使用多重聚合酶链反应(PCR)扩增和二代测序技术对 CD44 rs11607862、rs13347、rs7116432、rs8193 等 4 个位点进行基因多态性分析。对其中 235 例患者的肿瘤大小、是否转移进行结果比较。结果 未发现该 4 个位点在乳腺癌患者中的表达与健康人有显著差异。但是在对肿瘤患者的分析中发现, rs13347 位点 GG 基因型患者较 CC/CG 型患者, 淋巴结转移率更低。结论 CD44 的 rs13347 位点与乳腺癌的转移有一定相关性, rs11607862、rs7116432、rs8193 等 3 个位点基因多态性与乳腺癌的发生、发展相关度还需要更多的临床样本及资料进一步研究。

关键词: CD44; 乳腺癌; 基因多态性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.10.017

中图法分类号: R730.2

文章编号: 1673-4130(2018)10-1220-04

文献标识码: A

Association of CD44 gene rs13347 polymorphism with occurrence and metastasis of breast cancer*

YANG Yang¹, HUANG Xin¹, XIANG Yin¹, CUI Zhiwei¹, GAO Linbo²

(1. Department of Clinical Laboratory, Leshan People's Hospital, Leshan, Sichuan 614000, China;

2. The Second Hospital of West China Hospital of, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 614000, China)

Abstract: Objective By exploring the relationship between the gene polymorphism of tumor related gene CD44 and the occurrence of breast cancer, the pathogenic gene or genetic predisposing gene of breast cancer was studied so as to provide theoretical basis and technical support for the screening, diagnosis and treatment of breast cancer. **Methods** Samples from 265 cases of breast cancer and 290 healthy female were collected. Multiple polymerase chain reaction (PCR) amplification and two generation sequencing were used to analyze the genetic polymorphism of 4 loci of CD44 rs11607862, rs13347, rs7116432 and rs8193. The size and metastasis of 235 patients were compared. **Results** There was no significant difference in the expression of four sites/loci in breast cancer patients. However, in the analysis of cancer patients, the GG genotype of rs13347 locus was lower than that of CC/CG type, and the lymph node metastasis rate was lower. **Conclusion** There is a certain correlation between the rs13347 loci of CD44 and the metastasis of breast cancer. The correlation between the genetic polymorphisms of 3 loci of rs11607862, rs7116432 and rs8193 and the development of breast cancer needs more clinical samples and further research.

Key words: CD44 gene; breast cancer; genetic polymorphism

每年中国乳腺癌新发数量和死亡数量分别约占全世界的 12.2% 和 9.6%^[1]。由于延误诊断, 致使晚期乳腺癌患者增多。我国医疗资源不足, 民众缺乏乳腺癌的知识, 也导致了我国乳腺癌生存率不高^[2]。根据中国国家肿瘤登记中心的数据, 乳腺癌是城市女性最常见的癌症, 是农村女性第四大常见癌症。只有通

过更好、更便捷的方法, 对乳腺癌进行早期诊断、早期治疗才能提高生存率, 提高生活质量。

AL-HAJJ 等^[3]通过对人类乳腺癌原发灶和转移灶的分析, 率先分离纯化出乳腺癌干细胞(BRCa-IC)。这种干细胞只占肿瘤细胞的 2% 左右, 以 CD44⁺CD24^{-/low} 为特异性表面标志物。它们对化疗或放疗

* 基金项目: 乐山市科技局重点项目(15ZDYJ0034)。

作者简介: 杨阳, 女, 主治医师, 主要从事临床检验研究。

本文引用格式: 杨阳, 黄鑫, 向尹, 等. CD44 基因 rs13347 位点多态性与乳腺癌发生及转移的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39

具有抵抗性,并可再次形成肿瘤,因而可能是肿瘤复发的根源。近年研究表明,CD44 基因多态性与肺癌、膀胱移行上皮细胞癌等多种肿瘤的发生、发展密切相关^[4-5]。在针对乳腺癌的研究中,WRIGHT 等^[6]的研究指出乳腺癌组织中的 CD44 具有肿瘤干细胞的特质,而 JIANG 等^[7]的研究显示,CD44 rs13347C>T 基因多态性可能会通过增加 CD44 的表达而影响乳腺癌的发展和预后。

本文对 CD44 基因的 4 个位点 rs13347、rs11607862、rs7116432、rs8193 多态性进行分析,探讨其与乳腺癌易感性的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究人群选取 2013—2015 年在乐山市人民医院住院的乳腺癌患者 265 例(病例组)及 2015 年 6—9 月该院健康女性体检者 290 例(对照组)。病例组纳入及排除标准:(1)女性;(2)经病理确诊为乳腺浸润性导管癌;(3)确诊乳腺癌时无其他部位原发性肿瘤;(4)无骨髓移植史。对照组均为健康体检女性,且排除有家族乳腺癌史。病例组平均年龄(51.89±10.05)岁,对照组平均年龄(42.19±11.95)岁,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 仪器与试剂 聚合酶链反应(PCR)扩增仪(PERKIN ELMER Gene Amp PCR System 9600, USA);高速台式离心机(HERMLE Z230MR, Germany);垂直电泳仪(DYY-III 28A,北京);Taq I 限制性内切酶(宝生物工程大连有限公司);Ion Torrent 测序仪(Thermo Fisher Scientific 公司,美国)。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 制备 使用试剂盒制备浓度 15~25 ng/ μL , A_{260}/A_{280} 比值为 1.5~1.8 的基因组 DNA。

1.3.2 多重 PCR 扩增 RNA 3'-UTR 端与转录后基因表达关系密切,因此通过参考文献^[7]及 HaploView 筛选出位于该区域的 4 个 TagSNP (rs13347、

rs11607862、rs7116432、rs8193)进行分析。PCR 扩增时通过对产物的 2 轮稀释作为下一轮模板,进行三重 PCR 扩增,得到较纯产物。

1.3.3 CD44 基因分型 采用 2% 琼脂糖进行电泳,电泳完成后切胶纯化,对纯化后产物进行测序,图 1 为 rs13347 C>T 突变。

1.4 统计学处理 采用 Handy-Weinberg 平衡分析评估对照组基因型频率分布状况。数据采用 SPSS13.0 处理,计数资料比较采用 χ^2 检验,比较病例组与对照组基因型分布差异,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

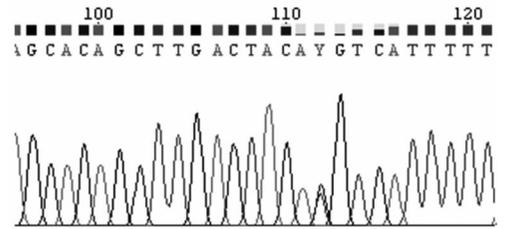


图 1 二代测序图(rs13347 C>T)

2 结果

计算相对风险度的比值比(OR)及 95% 可信区间(95% CI),见表 1。以肿瘤分期为依据将患者分为 2 组,分别进行基因型分布的比较,一组以浸润程度将 T1+T2 期患者人数与 T3+T4 期进行比较,另一组按淋巴结是否转移将 N0 期患者人数与 N1~3 期进行比较,结果见表 2。经统计比较,rs11607862、rs13347、rs7116432、rs8193 等 4 个位点的基因多态性在乳腺癌人群和健康人群中未观察到显著差异。分别比较不同肿瘤大小、不同淋巴转移情况下患者的基因型分布情况,可以看到 rs13347 位点的 TT 基因型患者淋巴转移量比 CT/CC 基因型患者淋巴转移量小,且差异具有统计学意义($P<0.05$),而携带 C 基因的患者远处转移人数较携带 G 基因患者多,但由于观察总人数过少,未进行统计学分析。其余 3 个位点差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 CD44 基因型频率分布

SNP 位点	基因型	对照组		病例组		OR(95%CI)	P
		人数(n)	占比(%)	人数(n)	占比(%)		
rs11607862	CC	99	34.10	89	34.10	1.00(参考值)	—
	CT	144	49.70	123	47.10	0.95(0.654~1.381)	0.789
	TT	47	16.20	49	18.80	1.16(0.709~1.897)	0.555
rs13347	CC	131	45.30	111	42.90	1.00(参考值)	—
	CT	132	45.70	116	44.80	1.037(0.727~1.479)	0.841
	TT	26	9.00	32	12.40	1.453(0.817~2.584)	0.203
rs7116432	AA	9	3.20	13	5.30	1.00(参考值)	—
	AG	82	29.00	73	29.80	0.616(0.249~1.526)	0.292
	GG	192	67.80	159	64.90	0.573(0.239~1.376)	0.208

续表 1 CD44 基因型频率分布

SNP 位点	基因型	对照组		病例组		OR(95%CI)	P
		人数(n)	占比(%)	人数(n)	占比(%)		
rs8193	CC	83	28.60	81	30.70	1.00(参考值)	—
	CT	148	51.00	124	47.00	0.859(0.582~1.266)	0.441
	TT	59	20.30	59	22.30	1.025(0.638~1.645)	0.92

注:—表示无数据

表 2 肿瘤分期与基因型分布(n)

SNP 位点	肿瘤分期	基因型			P	基因频率		P
		CC/AA	CT/AG	TT/GG		C/A	T/G	
rs11607862	T1+T2	65	89	41	—	219	171	—
	T3+T4	10	20	5	0.426	40	30	0.878
	N0	32	48	23	—	112	94	—
	N1	44	61	23	0.688	149	107	0.409
	M1	1	4	0	—	6	4	—
rs13347	T1+T2	87	85	22	—	259	129	—
	T3+T4	14	14	6	0.585	42	26	0.423
	N0	48	43	12	—	139	67	—
	N1	53	56	16	0.002	162	88	0.548
	M1	3	1	1	—	7	3	—
rs8193	T1+T2	60	88	48	—	208	184	—
	T3+T4	12	19	6	0.539	43	31	0.424
	N0	27	52	24	—	106	100	—
	N1	45	55	30	0.341	145	115	0.354
	M1	1	2	2	—	4	6	—
rs7116432	T1+T2	9	59	115	—	77	289	—
	T3+T4	1	9	23	0.726	11	55	0.417
	N0	4	32	64	—	40	160	—
	N1	6	36	74	0.916	48	184	0.859
	M1	0	3	2	—	3	7	—

注:—表示无数据

3 讨 论

2015 年中国国家癌症中心发表的数据显示,我国乳腺癌的发病率在近 10 年来一直呈现上升趋势^[8],其中女性患乳腺癌的风险很高,在大中型城市中,乳腺癌是女性患癌风险最高的肿瘤。医疗水平越高,筛查越早,肿瘤的病死率越低,因此,筛选高特异性的肿瘤风险指标对筛查早期肿瘤意义重大。

肿瘤干细胞是在肿瘤组织中具有自我更新能力并且能够产生该肿瘤中一系列异质性肿瘤细胞的细胞,不受外界调控的恶性增殖、多向分化。在肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌和胃癌等实体瘤中均发现具有特异性的肿瘤干细胞。AL-HAJJ 等^[3]通过对人类乳腺癌原发灶和转移灶的分析,分离纯化出“乳腺癌干细胞(BRCA-IC)”,以 CD44⁺CD24^{-/low}为特异性表

面标志物。CD44 是黏附因子家族中的一员,是介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质间黏附作用的膜表面糖蛋白,参与细胞的增殖、分化、黏附、迁移等过程,主要参与肿瘤细胞与宿主细胞和宿主基质的黏附,而异质性黏附在肿瘤细胞侵袭性转移中起促进作用。DAVID 等^[9]发现 CD44 可溶性蛋白能显著降低各种肿瘤的恶性活动,SHIRURE 等^[10]也发现 CD44 作为功能性 E-选择素配体的表达可能在乳腺癌转移中起重要作用。

随着研究的进一步深入,对 CD44 基因多态性的研究逐渐增多。基因多态性可能通过影响基因的转录、复制和修饰等改变基因的表达,从而改变其影响的分子蛋白的表达,进一步影响细胞的增殖与消亡。JIANG 等^[7]在对我国东南部女性研究中发现,CD44

rs13347 的 TT 基因型在乳腺癌患者中表达比对照组高,同时,乳腺癌患者的雌激素受体阳性比例超过健康对照人群,因此认为 rs13347 C>T 基因多态性可能会通过增加 CD44 的表达而影响乳腺癌的发展和预后。而在本研究中,笔者比较了健康人群和乳腺癌人群的 CD44 基因多态性,并未发现几个研究位点突变有导致患病风险的差异,说明 rs13347 基因突变对肿瘤的影响可能存在人群间差异,由于人群来源不同,在地域环境及饮食等多因素长期影响下,从而导致了基因突变的差异。从样本量来说,也可能是本研究样本量偏少,此次抽样不足以代表总体样本特征。

乳腺癌淋巴结转移受多种因素影响,包括肿瘤大小、内分泌治疗或化疗效果^[11]。段序梅等^[12]发现,CD44 作为一类跨膜糖蛋白,其分子变异体与癌细胞的浸润、转移密切相关。近年有研究提出,CD44 在已发生肝转移患者与未发生肝转移患者两组间的表达差异具有统计学意义^[13]。而本研究中,具有 rs13347 位点的 TT 基因型的患者,发生肿瘤淋巴结转移的人数明显少于 CT/CC 基因型患者,说明该突变在肿瘤的转移或复发上起作用。因此认为该基因位点与乳腺癌发病风险相关性不高,而是主要参与肿瘤的增殖与转移。与此类似,何彦丽等^[14]研究发现 CD44 表达与乳腺癌淋巴结转移及预后有关,刘朝荣等^[15]通过免疫组化/实时定量法研究发现 Survivin 及 CD44 基因表达随着乳腺癌严重程度增高逐渐增强,可能与乳腺癌的侵袭和转移密切相关。在对 CD44 其他基因位点的研究中,也有类似发现,WENG 等^[5]发现 CD44 SNPs 与膀胱移行上皮细胞癌的发生相关,rs187115 基因上携带至少 1 个 G 等位基因的患者比携带野生型等位基因者有更高的患癌风险,晚期患者如有该突变,可能比其他患者更易对化疗药物耐药,或可能导致晚期患者预后较差。周鑫等^[16]在对重庆地区女性研究中发现,CD44 基因 rs4756195 位点多态性与该地区汉族女性乳腺癌的发病风险相关,AG 和 GG 基因型是重庆地区汉族女性乳腺癌的易感基因型,此位点多态性与乳腺癌腋窝淋巴结转移、CD44 表达相关,提示携带 GG 基因型的乳腺癌患者可能预后不良。因此,接下来笔者拟考虑增加样本量,并进行相同位点的 miRNA 功能分析。

综上所述,CD44 基因多态性与乳腺癌的转移、预后具有一定的相关性,但其在参与肿瘤的发生中的作用机制仍需进一步的研究探讨。

参考文献

[1] FAN L, STRASSER-WEIPPL K, LI J J, et al. Breast

cancer in China[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): 279-289.

- [2] ZIEGLER R G, ANDERSON W F, GAIL M H. Increasing breast cancer incidence in china; the numbers add up [J]. *Natl Cancer Inst*, 2008, 100(19): 1339-1341.
- [3] AL-HAJJ M, WICHA M S, BENITO-HERNANDEZ A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3983-3988.
- [4] JOHANNES R K, ADAM Y B, DAVID M J, et al. Cancer Stem Cells in Lung Tumorigenesis[J]. *Ann Thoraci Surg*, 2010, 89(6): 2090-2095.
- [5] WENG W C, HUANG Y H, YANG S F, et al. Effect of CD44 gene polymorphisms on risk of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in Taiwan[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(5): 6971-6977.
- [6] WRIGHT M H, CALCAGNO A M, SALCIDO C D, et al. Breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics [J]. *Breast Cancer Research*, 2008, 10(1): 10-13.
- [7] JIANG L, DENG J, ZHU X, et al. CD44 rs13347 C>T polymorphism predicts breast cancer risk and prognosis in Chinese populations[J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(4): 105-117.
- [8] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [9] DAVID N, SHLOMO N, ITSHAK G, et al. CD44 in Cancer[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2002, 39(6): 527-579.
- [10] SHIRURE V S, LIU T, DELGADILLO L F, et al. CD44 variant isoforms expressed by breast cancer cells are functional E-selectin ligands under flow conditions [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 308(1): 68-78.
- [11] 刘新杰, 何文亮, 麦沛成. 乳腺癌腋窝淋巴结转移的临床意义[J]. *中国医师杂志*, 2003, 5(5): 715-716.
- [12] 段序梅, 范维珂. CD44、CD54 生物学特性与肿瘤转移的关系[J]. *中国检验医学与临床*, 2002, (1): 42-43.
- [13] 李宏帅. CD44、CD133 在大肠癌肝转移中的基础与临床 [J]. *中国继续医学教育*, 2017, 9(1): 70-72.
- [14] 何彦丽, 张雅洁, 顾莹莹, 等. CD44 表达与乳腺癌淋巴结转移及预后相关因素的关系[J]. *临床与实验病理学杂志*, 1999, 15(2): 107-109.
- [15] 刘朝荣, 杨绍英, 张志刚, 等. Survivin 及 CD44 在乳腺浸润性癌中的表达[J]. *宁夏医科大学学报*, 2017, 39(5): 573-575.
- [16] 周鑫, 吴诚义. CD44 基因多态性与乳腺癌遗传易感性及临床病理参数的关系[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2012, 43(6): 807-811.

(收稿日期: 2017-09-20 修回日期: 2017-11-10)