

• 论 著 •

252 例结直肠癌患者胸苷酸合成酶基因多态性分析

金晓波¹, 彭南求^{2△}

(1. 宁波市明州医院,浙江宁波 315104;2. 上海赛安生物医药科技有限公司,卫生部医药卫生科技发展研究中心肿瘤个体化治疗分子诊断技术研究基地,上海 201900)

摘要:目的 分析结直肠癌患者胸苷酸合成酶(TS)基因多态性,以期能为结直肠癌的个体化治疗提供指导。方法 采用 PCR 测序的方法分析 252 例结直肠癌患者 TS 基因多态性。结果 共检测了 252 例结直肠癌患者,其中男 137 例、女 115 例。男性患者 TS 基因型主要为 3RG/3RC(36.50%),其次是 2RC/3RC 和 3RG/3RG(各占 18.25%)。女性患者基因型主要是 3RG/3RC(36.52%),其次是 3RG/3RG(26.09%)。28 例年轻患者中,基因型主要为 3RG/3RC(42.86%),其次是 2RC/3RC(21.43%);84 例中年患者中,基因型主要为 3RG/3RC(45.24%),其次是 2RC/3RC(16.67%);115 例老年患者中,基因型主要为 3RG/3RC(36.52%),其次是 2RC/3RG(16.52%)。结论 结直肠癌患者 TS 基因多态性检测中发现的主要基因型为 3RG/3RC。

关键词:结直肠癌; 胸苷酸合成酶; 基因多态性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.03.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)03-0347-03

Polymorphism analysis of thymidylate synthase in 252 colorectal cancer patients

Jin Xiaobo¹, Peng Nangiu^{2△}

(1. Ningbo Mingzhou Hospital, Ningbo, Zhejiang 315104, China; 2. Shanghai Shines Pharmaceuticals Company Limited/Research Base of Molecular Diagnosis Technology for Tumor Personalized Therapy, Development Center for Medical Science and Technology, Ministry of Health, Shanghai 201900, China)

Abstract: Objective To analyze the polymorphism of thymidylate synthase(TS) in colorectal cancer patients, further more, to provide guidance for personalized therapy of colorectal cancer. **Methods** PCR direct sequencing was used to detect the polymorphism of TS in 252 patients with colorectal cancer. **Results** TS genotypes of 252 patients with colorectal cancer were detected totally, including 137 male and 115 female. 3RG/3RC accounted for the largest proportion in both male and female(36.50% and 36.52% respectively). In female, 2RC/3RC and 3RG/3RG both accounted for the second largest proportion(both 18.25%). While in female, 3RG/3RC accounted for the second largest proportion(26.09%). If patients were divided according to age groups, in youth patients(n=28), 3RG/3RC accounted for the largest proportion(42.86%), and the second was 2RC/3RG(21.43%). In the middle aged patients(n=84), 3RG/3RC(45.24%) and 2RC/3RC(16.67%) were the major genotypes. For old patients(n=115), the major genotypes were 3RG/3RC(36.52%) and 2RC/3RG(16.52%). **Conclusion** The polymorphism of TS are mainly 3RG/3RC in colorectal cancer patients.

Key words: colorectal cancer; thymidylate synthase; polymorphism

结直肠癌是常见的高危害消化道恶性肿瘤,发生率仅次于胃癌和食道癌。全球每年新发病例超过 100 万,年死亡数超过 50 万。中国每年新发病例已超过 17 万,死亡近 10 万。近二十年来结直肠癌的发病率在逐渐增加,同时,其发病年龄正趋向老龄化。一般而言,结直肠癌多在 60~70 岁发病,50 岁以下的患者所占比例不到 20%。中国患者的发病年龄多在 40~60 岁,中位发病年龄比欧美约提前 10 年,高峰在 50 岁左右,但 30 岁以下的结直肠癌患者也比欧美多见^[1-3]。胸苷酸合成酶(TS)参与 DNA 的合成,5-氟尿嘧啶(5-FU)主要通过抑制 TS 而发挥抗肿瘤的作用。TS 基因多态性造成 TS 蛋白表达和功能的差异,影响 5-FU 化疗有效性。TS 基因启动增强子区 5' 端的一个 28 bp 的序列可发生 2~3 次的重复(2R/3R)多态性,影响 TS 基因的转录水平。3R 将导致 TS 基因表达增加,TS 活性提高。2R 纯合子和 2R/3R 杂合子有临床生存期的显著提高,而 3R 纯合子无生存获益^[4]。在 3R/3R 情况下,如果第二个重复中的第 12 个碱基同时存在 G>C 的多态性,将使 TS 表达量降低至 2R 水平^[5],5-FU 的疗效较好^[6]。

本研究采用 PCR-测序法研究了 252 例中国人结直肠癌肿瘤血液标本中 TS 的基因多态性,同时比较了不同性别和年龄群体中 TS 基因突变频率的差异,以期能为 5-氟尿嘧啶的使用提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 标本来源 本研究使用的临床样本来自全国上百家三级医院,包括 252 例血液标本。所有参与本研究的结直肠癌患者或其家属均签署过授权给上海赛安生物医药科技有限公司进行 TS 基因检测的知情许可同意书。所有标本均为抽取 2 mL 外周血,置于 EDTA 抗凝管中,低温保存和运输。

1.2 仪器与试剂 实验使用的 Pfu 酶、dNTP 购自上海申博彩生物科技有限公司,DNA 提取试剂盒购自 Axygen Scientific 公司,所使用的 PCR 仪则购自杭州博日科技有限公司,离心机购自湘仪离心机仪器有限公司,PCR 产物序列测定由上海鼎安生物科技有限公司完成。

1.3 方法 基因组 DNA 的提取按照试剂盒说明书进行。TS 基因多态性检测采用 PCR 测序法,用 primer5 软件进行引物

设计,由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。检测步骤为:(1)PCR 扩增,正向引物:GTG GCT CCT GCG TTT CCC CC,反向引物:GCT CCG AGC CGG CCA CAG GCA TGG CGC GG,扩增产物片段大小为 242 bp。25 L 扩增体系包括 2.5 L 10×PCR 缓冲液 0.4 mol/L 的上、下游引物,0.25 μmol/L 的 dNTP,0.5 U Pfu 酶,100 ng DNA 模板。PCR 扩增程序为 95 ℃先变性 3 min,然后进行 45 个循环的扩增:95 ℃ 40 s,58 ℃ 20 s,70 ℃ 40 s,最后在 72 ℃延伸 5 min。(2)PCR 产物纯化测序,由上海鼎安生物科技有限公司完成。

2 结 果

2.1 PCR 产物测序结果 采用 PCR 的方法,检测 TS 基因多态性,其代表性结果见附图 1(见《国际检验医学杂志》网站主

页“论文附件”。

2.2 结直肠癌患者 TS 基因型分布 本研究共检测了 252 例结直肠癌患者,其中男 137 例、女 115 例。男性患者 TS 基因型主要为 3RG/3RC,占 36.50%,其次是 2RC/3RC 和 3RG/3RG,各占 18.25%;女性患者基因型也主要是 3RG/3RC,占 36.52%,其次是 3RG/3RG,占 26.09%;28 例年轻患者中,基因型主要为 3RG/3RC,占 42.86%,其次是 2RC/3RG,占 21.43%;84 例中年患者中,基因型主要为 3RG/3RC,占 45.24%,其次是 2RC/3RC,占 16.67%;115 例老年患者中,基因型主要为 3RG/3RC,占 36.52%,其次是 2RC/3RG,占 16.52%。2RC/2RG 是一种罕见的基因型,252 例患者中仅在女性老年患者中发现 1 例。见表 1。

表 1 不同性别、年龄结直肠癌患者的 TS 基因多态性

| 患者类型 | n | 基因型[n(%)] | | | | | | |
|-----------------|-----|-----------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 2RC/2RC | 2RC/2RG | 2RC/3RC | 2RC/3RG | 3RC/3RC | 3RG/3RC | 3RG/3RG |
| 性别 | | | | | | | | |
| 男 | 137 | 3(2.19) | 0(0.00) | 25(18.25) | 19(13.87) | 15(10.95) | 50(36.50) | 25(18.25) |
| 女 | 115 | 2(1.74) | 1(0.87) | 9(7.83) | 17(14.78) | 14(12.17) | 42(36.52) | 30(26.09) |
| 年龄 | | | | | | | | |
| 青年 ^a | 28 | 0(0.00) | 0(0.00) | 2(7.14) | 6(21.43) | 5(17.86) | 12(42.86) | 3(10.71) |
| 中年 ^b | 84 | 2(2.38) | 0(0.00) | 14(16.67) | 11(13.10) | 8(9.52) | 38(45.24) | 11(13.10) |
| 老年 ^c | 115 | 3(2.61) | 1(0.87) | 18(15.65) | 19(16.52) | 16(13.91) | 42(36.52) | 16(13.91) |

^a:25~<45岁; ^b:45~<60岁; ^c:60~90岁。

3 讨 论

TS 催化 dUMP 转变成 dTMP,它是胸苷酸唯一的从头合成途径^[7]。TS*3R 基因多态性在不同种族中的分布频率存在差异,肯尼亚人是 49%,高加索人是 55%,中国人是 82%^[8],土耳其人是 58%^[9]。有文献报道了在 3'UTR 发现了另外一个多态性 TS 1494del6 位点^[10],这个多态性在美国白人中的分布频率是 71%,在中国华北和华南的分布频率分别是 32.0% 和 30.9%^[11]。基因多态性存在种族差异,可能是由于遗传和生存环境的不同造成的。最新的研究表明,相比较于 3R 基因型,2R 基因型个体更容易罹患结直肠癌,而 TS 1494del6 则没有影响^[12]。Zhou 等^[13]的 Meta 分析也支持这个观点,2R/2R 基因型的亚洲人更容易罹患癌症,而对于高加索人来讲,这种基因型反而有保护作用。有研究发现,TS 1494del6 会导致 TS mRNA 表达水平的减少,这个多态性可能和 mRNA 的稳定性和翻译有关^[14-15],携带 ins 6 bp/ins 6 bp 基因型患者 TS mRNA 表达水平是纯合删除基因型(del 6 bp/del 6 bp)的 4 倍,而杂合基因型(del 6 bp/ins 6 bp)则位于中间。

Thomas 等^[16]在高加索人 TS 的第一个重复中发现了一个稀有的单核苷酸多态性(SNP),这个 SNP 在非裔美国人亚洲人中都没有被发现,它和 TS 的关系需要更多的研究来证明。他们还在 3RC 等位基因中发现了 6 bp 的插入,在高加索人和非裔美国人中的频率分别是 0.4% 和 1.3%,这个多态性最早是在日本人中发现的,出现频率是 0.6%^[17],至于 6 bp 的插入对 TS 功能的影响目前还不清楚。

TS 是广泛使用的化疗药 5-FU 的靶点。5-FU 治疗的致死率是 0.5%,引发 3-4 级毒性副反应的概率是 20%~30%^[18-22]。对这个药物相关的一些基因如 TS 多态性进行分析被认为可以有效地预测不良反应和治疗结果,Leconte

等^[23]研究发现,2R/2R、2R/3R、3R/3R 基因型患者发生 3~4 级毒性反应的概率分别是 43%、18%、3%,单倍型 2R/ins 6 bp 患者有严重的不良反应。因此,TS 基因型有可能可以作为基于 5-FU 化疗不良反应预测的指标,从而指导医生个体化用药。也有研究认为 TS 的基因多态性并不能预测 5-FU 治疗Ⅲ期结肠癌的疗效,然而,年龄会影响 TS 的基因多态性对生存的作用^[24]。

叶酸是一个重要的微量营养素分子,参与 DNA 的合成、甲基化和修复。TS 不仅在 DNA 复制和修复中提供需要的核苷酸方面发挥重要的作用,而且在叶酸代谢中也起着很重要的作用^[8,10,25]。Trinh 等^[26]研究发现,TS 3R/3R 基因型和血浆叶酸减少相关,而低叶酸水平则会增加罹患结直肠癌的风险^[27-28]。

参考文献

- [1] Zhao P, Dai M, Chen W, et al. Cancer trends in China[J]. Jpn J Clin Oncol, 2010, 40(4): 281-285.
- [2] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.
- [3] 杨玲,李连弟,陈育德,等.中国 2000 年及 2005 年恶性肿瘤发病死亡的估计与预测[J].中国卫生统计,2005,22(4):218-221.
- [4] Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, et al. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter May predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal Cancer[J]. J Clin Oncol, 2001, 19(6): 1779-1786.
- [5] Toffoli G, Cecchin E. Pharmacogenomics and stomach cancer[J]. Pharmacogenomics, 2004, 5(6): 627-641.
- [6] Marcuello E, Altés A, del Rio E, et al. Single nucleotide polymor-

- phism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal Cancer patients[J]. Int J Cancer, 2004, 112 (5):733-737.
- [7] Rustum YM, Harstrick A, Cao S, et al. Thymidylate synthase inhibitors in Cancer therapy: direct and indirect inhibitors[J]. J Clin Oncol, 1997, 15(1):389-400.
- [8] Marsh S, Collie-Duguid ES, Li T, et al. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations[J]. Genomics, 1999, 58(3):310-312.
- [9] Süzen HS, Yüce N, Güven G, et al. TYMS and DPYD polymorphisms in a Turkish population[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2005, 61 (12):881-885.
- [10] Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, et al. Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000, 9(12):1381-1385.
- [11] Zhai X, Gao J, Hu Z, et al. Polymorphisms in thymidylate synthase gene and susceptibility to breast Cancer in a Chinese population: a case-control analysis[J]. BMC Cancer, 2006, 6(1):138.
- [12] Gao CM, Ding JH, Li SP, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase gene and risk of colorectal Cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(8):4087-4091.
- [13] Zhou JY, Shi R, Yu HL, et al. The association between two polymorphisms in the TS gene and risk of Cancer: a systematic review and pooled analysis[J]. Int J Cancer, 2012, 131(9):2103-2116.
- [14] Lenz HJ, Zhang W, Zhahedy S, et al. A 6 base-pair deletion in the 3'UTR of the thymidylate synthase(TS) gene predicts TS mRNA expression in colorectal tumors[J]. Proc Am Assoc Cancer Res, 2002, 43(6):660.
- [15] Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, et al. A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels [J]. Pharmacogenetics, 2004, 14(5):319-327.
- [16] Thomas F, Hoskins JM, Dvorak A, et al. Detection of the G>C SNP and rare mutations in the 28-bp repeat of TYMS using gel-based capillary electrophoresis[J]. Pharmacogenomics, 2010, 11 (12):1751-1756.
- [17] Kim SR, Ozawa S, Saito Y, et al. Fourteen novel genetic variations and haplotype structures of the TYMS gene encoding human thymidylate synthase(TS)[J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2006, 21 (6):509-516.
- [18] de Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and flu-
- orouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal Cancer[J]. J Clin Oncol, 2000, 18(16):2938-2947.
- [19] de Gramont A, Bosset JF, Milan C, et al. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bi-monthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal Cancer: a French intergroup study[J]. J Clin Oncol, 1997, 15(2):808-815.
- [20] Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal Cancer: a multicentre randomised trial[J]. Lancet, 2000, 355(929):1041-1047.
- [21] Gamelin EC, Danquechin-Dorval EM, Dumesnil YF, et al. Relationship between 5-fluorouracil (5-FU) dose intensity and therapeutic response in patients with advanced colorectal Cancer receiving infusional therapy containing 5-FU[J]. Cancer, 1996, 77 (3):441-451.
- [22] van Kuilenburg AB, Meinsma R, van Gennip AH. Pyrimidine degradation defects and severe 5-fluorouracil toxicity[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2004, 23(8/9):1371-1375.
- [23] Lecomte T, Ferraz JM, Zinzindohoué F, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal Cancer patients receiving 5-fluorouracil-based chemotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(17):5880-5888.
- [24] Faria-Sarasqueta A, Gosens MJ, Moerland E, et al. TS gene polymorphisms are not good markers of response to 5-FU therapy in stage III colon cancer patients[J]. Anal Cell Pathol, 2010, 33(1): 1-11.
- [25] Horie N, Aiba H, Oguro K, et al. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase [J]. Cell Struct Funct, 1995, 20(3):191-197.
- [26] Trinh BN, Ong CN, Coetze GA, et al. Thymidylate synthase: a novel genetic determinant of plasma homocysteine and folate levels[J]. Hum Genet, 2002, 111(3):299-302.
- [27] Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, et al. Alcohol, low-methionine-low-folate diets, and risk of colon Cancer in men[J]. J Natl Cancer Inst, 1995, 87(4):265-273.
- [28] Kato I, Dnistri AM, Schwartz M, et al. Serum folate, homocysteine and colorectal Cancer risk in women: a nested case-control study[J]. Br J Cancer, 1999, 79(11/12):1917-1922.

(收稿日期:2014-11-08)

(上接第 346 页)

- 对巨大儿发生率及其他相关问题的影响[J]. 中华围产医学杂志, 2005, 8(1):9-12.
- [6] 姜百灵, 张方芳. 妊娠期糖尿病患者血糖水平与新生儿出生体重关系分析[J]. 中国医学创新, 2014, 7(2):61-62.
- [7] 赵海珍, 肖梅. 妊娠期糖代谢异常与妊娠结局相关性研究[J]. 河北医学, 2012, 18(3):388-390.
- [8] Anderberg E, Kallén K, Berntorp K. The impact of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcome comparing different cut-off criteria for abnormal glucose tolerance[J]. Acta Obstet Gynecol

Scand, 2010, 89(12):1532-1537.

- [9] 胡春艳. 未足月胎膜早破 100 例临床分析[J]. 中外医学研究, 2014, 12(4):141.
- [10] 刘云波, 李淑娟, 杨学军. 妊娠期糖尿病血糖控制水平对母婴结局的影响[J]. 实用医院临床杂志, 2012, 9(6):130-132.
- [11] 钟敏, 李毕华. 106 例未足月胎膜早破母儿结局的临床分析[J]. 中国医药导报, 2012, 9(25):32-34.

(收稿日期:2014-10-28)