

网络出版时间: 2019-8-12 17:31 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190812.1006.028.html>

Nemo 样激酶基因多态性与结直肠癌遗传易感相关性

周轶凡¹, 陈婷婷², 程筱雯¹

摘要 **目的** 探讨 Nemo 样激酶 (NLK) 基因与结直肠癌 (CRC) 遗传易感性之间的关系。**方法** 采用病例对照研究, 选取 55 例 CRC 患者和 50 例健康对照, 病例组和对照组按性别和年龄进行匹配。首先通过免疫组织化学评估 CRC 组织标本中 NLK 的表达情况, 随后通过高分辨率熔解曲线法 (HRM) 对 NLK 基因的单核苷酸多态性 (SNP) 位点 rs2125846 (A/G) 进行基因分型, 使用 Pearson χ^2 检验和非条件 Logistic 回归分析 rs2125846 多态性与 CRC 易感性之间的关系。**结果** CRC 组织中 NLK 的表达水平高于相应的癌旁组织。病例组中 rs2125846 AA、AG、GG 基因型的频率分别为 41.8%、58.2% 和 0%; 相应的在对照组中分别为 52.0%、36.0% 和 12.0%, 两组之间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 9.888$, $P = 0.0071$)。与 AA 基因型相比, 携带 AG 基因型患 CRC 的 OR = 2.01, 95% CI: 0.898 ~ 4.496, 携带 AG 基因型发生 CRC 的风险是 AA 基因型的 2.01 倍。携带 G 等位基因 (GG + AG) 的患者发生 CRC 的风险是 AA 基因型的 1.51 倍 (OR = 1.51, 95% CI: 0.697 ~ 3.259)。在病例组中未检测到 rs2125846 与年龄、CRC 主要发生部位及常见临床病理特征有统计学相关性。**结论** 本研究鉴定了位于人类 NLK 基因内含子内新的 CRC 易感位点 rs2125846。随后需要进一步扩大样本量 (包括扩大种族和地理覆盖范围) 及功能验证以确认 NLK 基因对 CRC 发生风险的影响。

关键词 结直肠癌; Nemo 样激酶; 基因多态性; 基因易感性
中图分类号 R 735.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)09-1467-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.028

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是全球最常见的癌症之一, 大约 35% 的 CRC 风险可归因于遗传因素^[1]。单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 构成了人类基因组 90% 以上的遗传变异, SNP 可导致细胞异常分化进而促进肿瘤发展, 在过去 10 年中, 已发现超过 60 个 SNP 位点与

CRC 相关^[2]。Nemo 样激酶 (Nemo like kinase, NLK) 是一种进化上保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是丝裂原活化蛋白激酶^[3], 有研究^[4-5]表明 NLK 在多种肿瘤组织中表达异常, 在肝癌和胆囊癌中高表达, 而在肺癌、乳腺癌和卵巢癌中则低表达^[6-8]。目前 NLK 与肿瘤的相关研究多集中在编码基因的细胞信号通路的研究, 尚未见关于 NLK 的 SNP 位点与 CRC 关系的文献。此前有研究^[9]进行了 1 000 多例样本和近 400 个有丝分裂激酶 SNP 位点分析后仅筛选出 1 个 SNP 位点与浸润性上皮性卵巢癌的风险相关, 即 NLK 基因的 rs2125846。故该实验拟通过病例-对照研究分析该 SNP 位点在人群中的分布特点, 探讨其与 CRC 发生风险的关系, 为高危人群的 CRC 防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 病例资料 本研究的所有受试者均来自安徽医科大学第一附属医院。病例对照研究中共纳入 55 例 CRC 病例和 50 例健康对照。所有病例均通过组织病理学诊断并排除术前进行放化疗或者合并糖尿病、肾病等自身免疫性疾病的患者。从健康体检者中随机选择与病例组年龄和性别相匹配的人群作为对照组。两组研究对象的一般资料比较差异无统计学意义, 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 将直径为 3 μm 厚的组织切片置于防脱载玻片, 然后进行免疫组化。首先修复抗原, 然后逐滴加入过氧化氢以阻断内源性过氧化物酶, 将该切片与多克隆抗 NLK 抗体在室温下以 1:200 的稀释度温育, 后滴加通用型二抗在室温孵育, 最后进行显色反应。

1.2.2 标本采集及 DNA 提取 采集病例组及健康对照的空腹静脉血。严格按照试剂盒 (购自上海百傲公司) 的说明书, 从外周血白细胞中提取 DNA, 使用 NanoDrop One/OneC 微量核酸蛋白浓度测定仪 (美国 Thermo 公司) 检测 DNA 含量, 测量吸光度 (absorbance, A) 值 A_{260} 和 A_{280} , 比率均在 1.8 ~ 2.0。

1.2.3 SNP 基因分型 该实验使用罗氏 (美国

2019-06-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81302150)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022² 安徽医科大学病理教研室, 合肥 230032

作者简介: 周轶凡, 女, 硕士研究生;

程筱雯, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wind-y135@sina.com

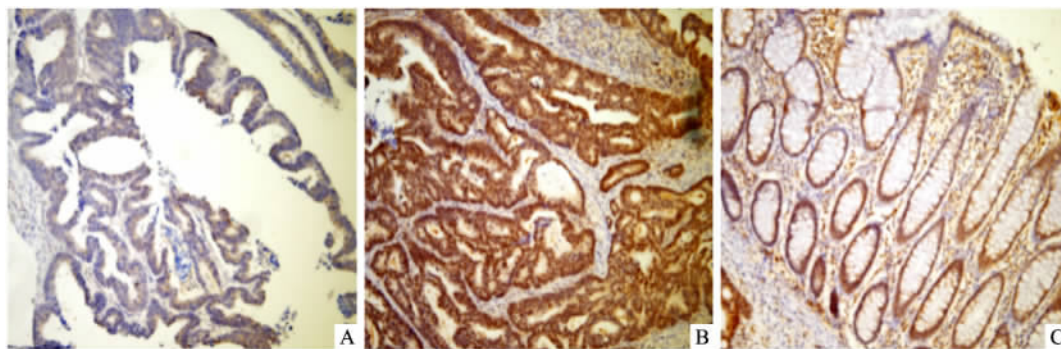


图1 CRC组织中NLK的表达情况 ×200

A: 空白对照; B: CRC组织; C: 癌旁组织

Roche公司) 高分辨率溶解曲线 (LightCycler® 480, high resolution melting master, HRM) 试剂盒进行实验, 使用机器为 Roche LightCycler96 荧光定量PCR仪。PCR在96孔板中以20 μl的体积进行, 包括40~60 ng DNA, 5 mol/L的每种引物, 1.6 μl MgCl₂, 6.2 μl水和10 μl 2×ResoLight Mix。按照以下反应条件进行: 95℃、10 min; 95℃、10 s, 45个循环; 58℃、15 s; 72℃、15 s。通过在65~98℃下以每1℃20次采集的速率获得HRM数据。

1.3 统计学处理 采用SPSS 20.0软件进行分析, 使用 χ^2 检验来比较病例组和对照组之间的基本情况。使用非条件Logistic回归模型分析不同遗传模型与CRC的关联, 并计算优势比 (adjusted odds ratio, OR) 和95%置信区间 (95% CI)。AA表示野生纯合基因型, AG表示杂合突变基因型, GG表示纯合突变基因型。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NLK在结直肠组织中的表达情况 免疫组化实验结果显示, CRC组织中NLK的表达水平高于相应的癌旁组织。见图1。

2.2 NLK基因SNP位点 rs2125846与CRC易感性的关联性 rs2125846多态性型别为AA、AG、GG, 在对照组中的分布符合Hardy-Weinberg遗传平衡 ($\chi^2 = 1.02, P > 0.05$)。病例组中AA、AG、GG的发生频率分别为41.8%、58.2%和0%; 在对照组中, 相应的数据分别为52.0%、36.0%和12.0%, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 9.888, P = 0.0071$), 即病例组与正常组之间NLK基因SNP位点 rs2125846多态性分布不同。在共显性模型中, 携带AG基因型患CRC的OR = 2.01, 95% CI: 0.898~4.496, 在10%的置信水平上显著, 携带AG基因型的CRC发

生风险是AA基因型的2.01倍。在隐性模型中, 与AA基因型相比, 携带G等位基因 (GG + AG) 的患者发生CRC的可能性是AA基因型的1.51倍 (OR = 1.51; 95% CI: 0.697~3.259)。见表1、2。

表1 NLK基因SNP位点 rs2125846 基因型分布与癌症发病风险的关系

基因型	病例组 (n=55)	对照组 (n=50)	χ^2 值	P 值
AA	23 (46.9)	26 (53.1)	9.888	0.0071
AG	32 (64.0)	18 (36.0)		
GG	0 (0.0)	6 (100.0)		

表2 病例组和对照组中NLK基因SNP位点 rs2125846 基因型 (A/G) 分布情况及非条件 Logistic 回归模型分析结果

基因型	正常组 [n(%)]	病例组 [n(%)]	OR 值 (95% CI)	P 值
共显性遗传模型				
AA	26 (53.1)	23 (46.9)	1	
AG	18 (36.0)	32 (64.0)	2.01 (0.898, 4.496)	0.089
GG	6 (100.0)	0 (0.0)		0.999
隐性遗传模型				
AA	26 (52.0)	23 (41.8)	1	
GGAG	24 (48.0)	32 (58.2)	1.51 (0.697, 3.259)	0.297
显性遗传模型				
GG	6 (12.0)	0 (0.0)	1	
AA/AG	44 (88.0)	55 (100.0)	0.000	0.999

2.3 NLK基因SNP位点 rs2125846多态性与CRC发病风险关联的分层分析 根据常见临床病理特征、患者年龄及CRC主要发生部位进一步对rs2125846多态性进行分层分析。在病例组中未检测到rs2125846多态性与病理特征、患者年龄及CRC主要发生部位有统计学相关性。见表3。

3 讨论

据全球癌症年报统计, 2018年发生超过180万

表3 NLK 基因 SNP 位点 rs2125846 多态性与 CRC 常见临床病理学特征及年龄、肿瘤发生部位的关联分析

指标	AA	AG	χ^2 值	P 值
肿瘤直径(cm)				
<5	20(87.0)	23(71.9)	1.784	0.182
≥5	3(13.0)	9(28.1)		
组织分化				
低	2(10.0)	2(6.7)	1	
高	0(0.0)	1(3.3)		
中	18(90.0)	27(90.0)		
组织分型				
浸润型	0(0.0)	2(7.1)	0.525	
溃疡	3(16.7)	2(7.1)		
溃疡浸润	13(72.2)	19(67.9)		
隆起型	2(11.1)	5(17.9)		
年龄(岁)				
<50	8(47.1)	9(52.9)	0.382	0.826
50~60	6(42.9)	8(57.1)		
>60	9(37.5)	15(62.5)		
肿瘤部位				
结肠	9(40.9)	13(59.1)	0.012	0.911
直肠	14(42.4)	19(57.6)		

例新发 CRC 和 CRC 导致死亡 881 000 例,占癌症病例和死亡人数的 1/10。总体而言,CRC 的发病率排名第 3,但死亡率排名第 2。在最近 10 年中,中国的 CRC 死亡率和发病率均有所增加^[10]。由于早期缺乏特异性和敏感性的分子标志物,许多临床患者在初步诊断时已被发现处于中晚期阶段^[11]。SNP 是一种常见的遗传变异,可导致不同的功能性产物而影响个体对疾病的易感性。因此,SNP 可被视为预测包括 CRC 在内的散发性肿瘤风险的生物标志物。在过去的 30 年中,较多 SNP 通过广泛的全基因组关联研究和候选基因关联研究,确认与 CRC 风险相关^[12]。由于 CRC 发生发展的机制复杂,新的 CRC 相关遗传变异区域有必要进一步探索,以期寻求更有效的分子标志物和药物作用靶点。越来越多数据表明 NLK 被认为是潜在的肿瘤抑制因子或致癌基因,NLK 的沉默或上调可以为肿瘤提供有效的治疗手段^[13]。本研究中,免疫组化实验结果显示 CRC 组织中 NLK 的表达水平高于癌旁组织,该结果与之前的文献结果一致,NLK 的过度表达与较差的临床病理参数相关,如晚期 TNM 分期、分化差、淋巴结和远处转移以及较高的 CRC 复发率^[14]。NLK 基因定位于人类染色体 17p12,包含多个 SNPs,其中 rs2125846 位于 NLK 基因的第 6 个内含子内(2364A/G),在 2 364 位点发生 A→G 的碱基替换。有研究^[15]表明一些内含子多态变体具有赋予疾病易感性的潜力,由于内含子含有多种功能元件,包括

内含子剪接增强子和沉默子,以及调节可变剪接的顺式作用 RNA 元件等,因此内含子区域的 SNP 对靶基因可能比迄今所认为的有更大的影响力。

本研究 NLK 基因的 SNP 位点 rs2125846 中,病例组中 AA、AG、GG 的发生频率分别为 41.8%、58.2% 和 0%;而在对照组中则相应为 52.0%、36.0% 和 12.0%,病例组与正常组之间 NLK-2364A/G 基因型分布显著不同($\chi^2 = 9.888, P = 0.0071$)。在共显性模型中,携带 AG 基因型患 CRC 的 $OR = 2.01, 95\% CI: 0.898 \sim 4.496$,在 10% 的置信水平上显著,携带 AG 基因型的 CRC 发生风险是 AA 基因型的 2.01 倍。在隐性模型中,与 AA 基因型相比,携带 G 等位基因(GG + AG)的患者发生 CRC 的可能性是 AA 基因型的 1.51 倍。rs2125846 多态性与 CRC 发病风险关联的分层分析中未检测到患者 NLK-2364A/G 与年龄、CRC 主要发生部位及常见临床病理特征有统计学相关性,考虑其可能的原因有两个:一是因为样本量偏少,二是本次研究涉及的 CRC 相关风险因素及常见临床病理特征偏少。接下来的实验将扩大样本量同时纳入更多的 CRC 相关风险因素及常见临床病理特征进行更进一步的分析,目前 SNP rs2125846 作用的具体机制尚不清楚,故后续实验也将进行该位点的功能验证。

总之,本研究在中国人群中鉴定了位于人类 NLK 基因内含子内的与 CRC 风险相关的新易感位点 rs2125846。随后需要进一步扩大样本量,扩大种族和地理覆盖范围及进行功能验证,以确认 NLK 基因对 CRC 发生风险的影响。

参考文献

- [1] Ma X, Zhang B, Zheng W. Genetic variants associated with colorectal cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence [J]. Gut, 2014, 63(2): 326-36.
- [2] Shen C, Yan T, Wang Z, et al. Variant of SNP rs1317082 at CCsln362 (RP11-362K14.5) creates a binding site for miR-4658 and diminishes the susceptibility to CRC [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(12): 1177.
- [3] Brott B K, Pinsky B A, Erikson R L. Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(3): 963-8.
- [4] Jung K H, Kim J K, Noh J H, et al. Targeted disruption of Nemo-like kinase inhibits tumor cell growth by simultaneous suppression of cyclin D1 and CDK2 in human hepatocellular carcinoma [J]. J Cell Biochem, 2010, 110(3): 687-96.

- [5] Li M, Zhang S, Wang Z, et al. Prognostic significance of nemo-like kinase (NLK) expression in patients with gallbladder cancer [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(6) : 3995 – 4000.
- [6] Lv L, Wan C, Chen B, et al. Nemo-like kinase (NLK) inhibits the progression of NSCLC *via* negatively modulating WNT signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2014. 115(1) : 81 – 92.
- [7] Huang Y, Jiang Y, Lu W, et al. Nemo-like kinase associated with proliferation and apoptosis by c-Myb degradation in breast cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7) : e69148.
- [8] Zhang Y, Peng C, Wu G, et al. Expression of NLK and its potential effect in ovarian cancer chemotherapy [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21(8) : 1380 – 7.
- [9] Stevens K N, Kelemen L E, Wang X, et al. Common variation in Nemo-like kinase is associated with risk of ovarian cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2012, 21(3) : 523 – 8.
- [10] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6) : 394 – 424.
- [11] Center M M, Jemal A, Smith R A, et al. Worldwide variations in colorectal cancer [J]. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59(6) : 366 – 78.
- [12] Wen J, Xu Q, Yuan Y. Single nucleotide polymorphisms and sporadic colorectal cancer susceptibility: a field synopsis and meta-analysis [J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 155.
- [13] Huang Y, Yang Y, He Y, et al. The emerging role of Nemo-like kinase (NLK) in the regulation of cancers [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(12) : 9147 – 52.
- [14] Zhang W, He J, Du Y, et al. Upregulation of nemo-like kinase is an independent prognostic factor in colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(29) : 8836 – 47.
- [15] Millar D S, Horan M, Chuzhanova N A, et al. Characterisation of a functional intronic polymorphism in the human growth hormone (GH1) gene [J]. *Hum Genomics*, 2010, 4(5) : 289 – 301.

Association of the Nemo-like kinase genetic polymorphism with risk of colorectal cancer

Zhou Yifan¹, Chen Tingting², Cheng Xiaowen¹

(¹Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression of Nemo-like kinase (NLK) in colorectal cancer (CRC) and the association of the NLK gene rs2125846 polymorphism with the susceptibility to CRC. **Methods** This case-control study enrolled 55 CRC cases and 50 controls in a Chinese population. Cases and controls were matched by gender and age. Expression of NLK in tissue specimens was assessed by immunohistochemistry. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were genotyped by high resolution melting (HRM) method. Pearson χ^2 test and Logistic regression were used for the association between SNPs and CRC. **Results** The expression level of NLK in cancer tissues was higher than that in adjacent tissues. The frequency of rs2125846 GG/AG/AA in the case group was 41.8%, 58.2%, and 0%, respectively; and 52.0%, 36.0%, and 12.0% in the control group, respectively. The difference between case and control group was statistically significant ($\chi^2 = 9.888$, $P = 0.0071$). Compared with the AA genotype, the GG/AG genotype increased the risk of colorectal cancer ($OR = 2.01$; 95% CI : 0.898 ~ 4.496). The AG genotype was 2.01 times more likely to develop cancer than the AA genotype. Cases carrying the G allele (GG + AG) were 1.51 times more likely to develop CRC than the AA genotype ($OR = 1.51$; 95% CI : 0.697 ~ 3.259). There was no statistically significant association between rs2125846 and age, major CRC sites, and common pathological features in the case group. **Conclusion** We identified a new susceptibility locus, rs2125846, for CRC risk located within intron of the human NLK gene in the Chinese population. Subsequent further functional verification and expanded racial and geographical coverage are needed to facilitate our understanding of this SNP in CRC.

Key words colorectal cancer; Nemo-like kinase; single nucleotide polymorphism; genetic susceptibility