

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.062.html>

## 三阴性乳腺癌与非三阴性乳腺癌 COMT、APOE 基因多态性的差异性研究

李文 甘辰 张博 程怀东

**摘要** 目的 探讨三阴性乳腺癌(TNBC)与非三阴性乳腺癌(NTNBC)患者 COMT、APOE 基因多态性的差异,从而解释化疗后认知障碍发生。方法 对 60 例 TNBC 和 60 例 NTN-BC 化疗后的患者进行 COMT(rs165599、rs4680、rs737865), APOE(rs429358、rs7412)5 个单核苷酸多态性(SNP)位点的等位基因频率、基因型频率检测。结果 单位点分析结果表明与 NTNBC 相比, TNBC 在 COMT(rs737865)位点上的等位基因分布( $P=0.013$ ), 基因型分布( $P=0.010$ )方面差异有统计学意义,而在 APOE(rs429358、rs7412)方面两组差异无统计学意义。结论 提示 TNBC 患者 COMT 基因的多态性可能是其化疗后认知障碍发生的易感性因子。

**关键词** COMT; APOE; 基因多态性; 化疗; 乳腺癌

**中图分类号** R 737.9

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2017)02-0277-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.029

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer,

TNBC)指雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和 HER2/neu 均无表达的乳腺癌<sup>[1]</sup>,约占整个乳腺癌患者的 12%~17%,其侵袭性强、易出现淋巴结转移,预后较差<sup>[2]</sup>,化疗是其重要的治疗方法之一。化疗相关性认知功能障碍(chemotherapy-induced cognitive impairment, CICI)是癌症患者在化疗中或化疗后出现的记忆、注意、执行功能及信息加工速度等方面的认知功能的损害<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>显示 COMT、APOE 基因多态性与认知功能障碍的发生有关,而也有研究<sup>[5-6]</sup>显示 COMT、APOE 基因的多态性与乳腺癌 CICI 有关。研究<sup>[7]</sup>显示乳腺癌 CICI 与 ER 和 PR 的表达有关,且 ER 和 PR 阴性患者在总体认知功能及记忆方面损害较 ER 和 PR 阳性患者显著。更有 Meta 分析提示乳腺癌 CICI 具有显著的异质性<sup>[8]</sup>, TNBC 在 COMT 与 APOE 基因多态性方面是否存在差异,目前尚不清楚。该研究以 60 例 TNBC 和 60 例非三阴乳腺癌<sup>[9]</sup>(non triple-negative breast cancer, NTNBC)患者为研究对象,分别对其进行 COMT、APOE 基因多态性检测,探讨两组 COMT、APOE 基因多态性是否存在差异。

2016-10-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81372487)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院肿瘤科,合肥 230601

作者简介:李文,男,硕士研究生;

程怀东,男,副教授,博士,副主任医师,硕士生导师,责任

作者, E-mail: chd1975ay@126.com

(TED) in patients undergoing living donor renal transplant surgery. **Methods** 100 patients undergoing living donor renal transplant surgery, ASA III ~ IV, were randomly divided into routine fluid therapy group (group CVP) and goal-directed fluid therapy group monitored with TED (group TED) using random digits table. Hemodynamic parameters of two groups were recorded before anesthesia ( $T_0$ ), 10 minutes after induction of anesthesia ( $T_1$ ), before opening of renal artery ( $T_2$ ), 15 minutes after opening renal artery ( $T_3$ ) and the end of surgery ( $T_4$ ). The amount of bleeding, infusion fluid and operative time were recorded. Urea nitrogen, creatinine, urine outputs were recorded before surgery and on days 1, 2, 4, 10 and at 1 and 3 months after surgery. **Results** The MAP of both groups at  $T_3$  were lower than before anesthesia ( $P < 0.01$ ), the CVP of group TED was higher than group CVP at the point of  $T_2$ ,  $T_3$  and  $T_4$  ( $P < 0.05$ ). The amount of intraoperative fluid given in group TED was lower than in group CVP ( $P < 0.01$ ). Side-effects like postoperative dyspnoea and tissue edema were higher in group CVP. The postoperative graft function was comparable. **Conclusion** TED-guided intraoperative fluid therapy achieve the same rate of immediate graft function as CVP-guided fluid therapy but use a significantly less amount of fluid. The incidence of postoperative complications related to fluid overload is also reduced.

**Key words** transesophageal Doppler; goal-directed fluid therapy; renal transplant; stroke volume

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 2013年1月~2015年12月在安徽医科大学第二附属医院肿瘤中心接受化疗的患者,包括60例TNBC和60例NTNBC。本研究经安徽医科大学第二附属医院伦理委员会批准,流行病学调查资料收集及血液样本采集均经患者本人知情同意,遵守伦理学的各项规定。纳入标准:①免疫组化、病理诊断结果所确诊的TNBC和NTNBC;②接受术后标准周期化疗的乳腺癌患者;③无性别、年龄及病理类型的限制。排除标准:①手术前已经接受过各种化疗、放疗、内分泌治疗等各种辅助治疗;②晚期恶病质或有远处转移者;③患者本身伴有明显的焦虑、抑郁、妄想及其他精神症状者;④服用相关改善认知功能的药物;⑤临床确诊痴呆;⑥其他可以导致认知功能障碍的躯体和精神疾患。TNBC 60例,女,年龄25~76(49.45±10.93)岁,受教育程度(9.93±3.15)年,卡氏(KPS)评分(82.83±7.61)分。病理类型,浸润性非特殊癌55例(91.7%),浸润性特殊癌2例,非浸润癌3例。NTNBC 60例,女,年龄25~79(49.91±10.53)岁,受教育程度(9.95±10.53)年,KPS评分(82.50±7.95)分。病理类型,浸润性特殊癌58例(96.7%),早期浸润癌1例,非浸润癌1例。两组患者一般资料差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),无可比性。

**1.2 主要试剂与仪器** 引物(上海生工公司);Hot-star Taq(德国Qiagen公司);PCR反应缓冲液、MgCl<sub>2</sub>(大连TaKaRa公司);dNTP(上海Generay Biotech公司);PCR Marker、Tag DNA ligase(上海New England Biolabs公司);琼脂糖(法国Biowest公司);SAP(美国Promega公司);EXO-I(美国Epicentre公司);HI-DI(美国ABI公司)等。QT-1漩涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司);Mini-41c微型离心机(珠海黑马医学仪器有限公司);凝胶成像仪(上海培清科技有限公司);FR-110紫外分析装置(上海复日科技有限公司);FR-250电泳仪(上海复日科技有限公司);多用途水平电泳槽(北京百晶生物科技有限公司);2720 Thermal Cycler、3730xl genetic analyze(美国ABI公司);Centrifuge5810R、微量加样器(德国Eppendorf公司);Milli-Q Academic(美国Millipore公司)等。

### 1.3 方法

**1.3.1 COMT、APOE 基因 SNP 位点的选择** 根据文献<sup>[10-11]</sup>报道,确定5个单核苷酸多态性(SNP)位

点,其中COMT(rs165599、rs4680、rs737865),APOE(rs429358、rs7412)。本研究旨在探讨中国汉族人群中这2个基因在不同分子分型乳腺癌认知障碍的差异。

**1.3.2 COMT、APOE 基因 SNP 位点基因分型** 用抗凝枸橼酸钠葡萄糖抗凝的采血管收集研究对象的外周静脉血3~5 ml,保存于-80℃冰箱中。采用上海天昊生物科技有限公司血液基因组 Qiagen 试剂盒抽提基因组 DNA。基因分型采用基于连接酶检测反应原理的基因分型方法,由上海天昊生物科技有限公司完成分型,该技术基本原理是采用连接酶连接反应的高特异性实现对 SNP 位点等位基因的识别,然后通过连接探针末段引入不同长度的非特异序列以及通过连接酶加接反应获得位点对应的不同长度连接产物,利用标记荧光的通用引物对连接产物进行 PCR 扩增,通过荧光毛细管电泳对扩增产物进行电泳分离,最后通过 GeneMapper 4.1(美国 Applied Biosystems 公司)来分析电泳图谱来获取各个 SNP 位点的基因型。分型成功率 99.17%。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,组间各位点等位基因频率、基因型频率、病理类型等分类变量采用  $\chi^2$  检验进行分析,对于年龄等连续性变量采用 Student's *t* 检验进行分析;应用 Haploview 软件(<http://www.broad.mit.edu/personal/jcbarret/haploview/>)进行拟和度  $\chi^2$  检验分析各 SNP 位点在 TNBC 和 NTNBC 组中基因型频率的分布是否符合哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HEW)。以非条件 Logistic 回归法计算比值比(odds ratio, OR)和 95% 可信区间(95% confidence interval, 95% CI);所有的统计检验为双侧概率检验。

## 2 结果

**2.1 COMT、APOE 基因位点信息及分析** 本研究中全部 SNP 位点的基本信息,包括 SNP ID、染色体位置、最小等位基因频率、基因分型成功率等见表 1。所有位点在两组中的等位基因频率分布符合 HWE 平衡,均  $P>0.05$ ,说明所选的人群各 SNP 位点基因频率分布来自随机婚配的大群体,没有近亲婚配、人口迁移等因素对群体遗传学特征的干扰,具有代表性。在单位点分析中,显示 rs737865 位点的等位基因分布在 TNBC 和 NTNBC 组中差异有统计学意义( $P=0.013$ )。

**2.2 COMT、APOE 基因型分布** 进一步显示 rs737865 位点的基因型分布在 TNBC 和 NTNBC 组中差异有统计学意义( $P=0.010$ ),基于非条件

表1 COMT、APOE 基因位点信息及分析结果

SNP ID	碱基类型	基因	染色体上 位置	MAF			分型成功率 (%)	P(HWE) 值	P 值
				最小等位基因	本实验频率	数据库			
rs737865	A/G	COMT	19930121	G	0.262	0.294	99.17	1.000	0.013
rs4680	G/A	COMT	19951271	A	0.238	0.288	99.17	1.000	0.880
rs165599	G/A	COMT	19956781	A	0.450	0.482*	99.17	0.536	0.069
rs429358	C/T	APOE	45411941	C	0.097	0.088	99.17	0.923	0.811
rs7412	C/T	APOE	45412079	T	0.100	0.090	99.17	0.558	0.667

MAF: 最小等位基因频率, 来自 HapMap-HCB、1000Genomes 数据库; \* 该位点在 Hapmap 数据库中无此位点, 相关数据为 1000Genomes 中的信息

表2 COMT、APOE 基因型分布

SNP	基因型	TNBC (n = 60)	NTNBC (n = 60)	P <sup>a</sup> 值	非条件 Logistic 回归			
					OR (95% CI)	P <sup>b</sup> 值	校正 OR(95% CI)	P <sup>c</sup> 值
rs4680	A/A	3	4	0.920	1 (reference)	-	-	-
	G/A	22	21		1.397 (0.279 ~ 7.002)	0.684	1.064 (0.199 ~ 5.689)	0.942
	G/G	35	35		1.333 (0.278 ~ 6.400)	0.719	1.064 (0.209 ~ 5.411)	0.940
rs165599	A/A	14	8	0.167	1 (reference)	-	-	-
	G/A	33	31		0.608 (0.224 ~ 1.649)	0.329	0.587 (0.212 ~ 1.626)	0.305
	G/G	13	21		0.354 (0.117 ~ 1.074)	0.067	0.340 (0.109 ~ 1.062)	0.063
rs737865	A/A	28	37	0.010	1 (reference)	-	-	-
	A/G	24	23		1.379 (0.649 ~ 2.930)	0.403	2.186 (1.152 ~ 4.145)	0.017
	G/G	8	0		-	-	NA	NA
rs429358	C/T	9	10	0.803	1 (reference)	-	-	-
	T/T	51	50		1.133 (0.425 ~ 3.024)	0.803	1.203 (0.425 ~ 3.400)	0.728
	C/C	-	-		-	-	NA	NA
rs7412	C/C	49	47	0.648	1 (reference)	-	-	-
	C/T	11	13		0.812 (0.331 ~ 1.991)	0.648	0.800 (0.302 ~ 2.114)	0.652
	T/T	-	-		-	-	NA	NA

P<sup>a</sup>: 两组中各 SNP 位点基因型频率分布  $\chi^2$  检验的 P 值; P<sup>b</sup>: 未校正的非条件逻辑回归分析 P 值; P<sup>c</sup>: 经年龄、教育程度、KPS、病理类型校正后的非条件逻辑回归 P 值

Logistic 回归分析后, 经过年龄、教育程度、KPS、病理类型校正后, 显示 rs737865 位点上 GA 基因型在两组间差异有统计学意义 (校正 OR = 2.186, 95% CI = 1.152 ~ 4.145, P = 0.017)。见表 2。

### 3 讨论

TNBC 是基于乳腺癌分子分型的一种特殊类型的乳腺癌。本研究显示与 NTNBC 相比, TNBC 在 COMT(rs737865) 位点上的等位基因分布和基因型分布方面差异有统计学意义。非条件 Logistics 回归分析, 经过年龄、教育程度、KPS、病理类型校正后, 结果显示 rs737865 位点上 GA 基因型在两组间存在显著差异, 而在 APOE(rs429358、rs7412) 方面两组差异无统计学意义。提示 COMT 基因表达的多态性在 TNBC 和 NTNBC 两组之间存在差异。

COMT(儿茶酚胺-氧位-甲基转移酶) 是一种在人体内广泛存在的酶, 参与体内儿茶酚胺类神经递质的分解代谢。研究<sup>[12]</sup> 显示 COMT 基因表达的多态性与轻度创伤后非语言性认知功能下降有关。研

究<sup>[5]</sup> 显示 COMT Val<sup>+</sup> 基因携带的乳腺癌化疗后的患者较 COMT Met 等位基因携带其额叶的多巴胺神经递质水平显著下降, 同时在注意、言语流畅性及信息加工速度等认知功能方面明显下降。本研究显示 TNBC 患者化疗后 COMT 表达与 NTNBC 患者存在差异, 提示不同分子分型乳腺癌 CICI 的差异可能与其 COMT(rs737865) 位点等位基因分布及基因型分布有关, COMT 可能是 TNBC 患者 CICI 发生的遗传易感因子。

APOE 是一种多态性蛋白, 参与脂蛋白的转化与代谢过程, 在神经损伤后的修复及神经的可塑性方面起着重要作用<sup>[13]</sup>。APOE  $\epsilon$ 4 与老年化认知功能下降、阿尔茨海默病患者的认知功能障碍有关<sup>[14-15]</sup>。研究<sup>[6]</sup> 显示具有 APOE  $\epsilon$ 4 基因型的乳腺癌患者在记忆、视觉学习等方面有明显的障碍。而本研究显示 TNBC 与 NTNBC 患者在 APOE(rs429358、rs7412) 方面两组差异无统计学意义, 提示不同分子分型乳腺癌 CICI 的差异可能与 APOE 基因多态性关系不大。

综上所述,本研究结果显示 TNBC 与 NTNBC 患者在 2 个与认知相关基因的多态性方面存在一定差异,为进一步阐述乳腺癌 CICI 发生的异质性提供了可能的遗传学证据,但尚需大样本的随访研究来进一步证实。

### 参考文献

- [1] Dent R, Trudeau M, Pritchard K I, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(15 Pt 1): 4429–34.
- [2] Williams N, Harris L. Triple-negative breast cancer in the post-genomic era [J]. *Oncology (Williston Park)*, 2013, 27(9): 859–60, 864.
- [3] Kanaskie M L, Loeb S J. The experience of cognitive change in women with breast cancer following chemotherapy [J]. *J Cancer Surviv*, 2015, 9(3): 375–87.
- [4] Dixon R A, DeCarlo C A, MacDonald S W, et al. APOE and COMT polymorphisms are complementary biomarkers of status, stability, and transitions in normal aging and early mild cognitive impairment [J]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6(10): 2411–8.
- [5] Small B J, Rawson K S, Walsh E, et al. Catechol-O-methyltransferase genotype modulates cancer treatment-related cognitive deficits in breast cancer survivors [J]. *Cancer*, 2011, 117(7): 1369–76.
- [6] Koleck T A, Bender C M, Sereika S M, et al. Apolipoprotein E genotype and cognitive function in postmenopausal women with early-stage breast cancer [J]. *Oncol Nurs Forum*, 2014, 41(6): E313–25.
- [7] 王尚虎,程怀东,李烦繁,等. ER、PR 的表达与乳腺癌患者化疗相关认知障碍的相关性研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(2): 206–8.
- [8] Jim H S, Phillips K M, Chait S, et al. Meta-analysis of cognitive functioning in breast cancer survivors previously treated with standard-dose chemotherapy [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(29): 3578–87.
- [9] 张慧明,宣立学,高纪东,等. 三阴性乳腺癌和非三阴性乳腺癌临床特征的比较 [J]. *中华外科杂志*, 2009, 47(7): 506–10.
- [10] Maria K, Charalampous T, Vassilakopoulou D, et al. Frequency distribution of COMT polymorphisms in greek patients with schizophrenia and controls: a study of SNPs rs737865, rs4680, and rs165599 [J]. *ISRN psychiatry* 2012, 2012: 651613.
- [11] McDonald B C, Conroy S K, Smith D J, et al. Frontal gray matter reduction after breast cancer chemotherapy and association with executive symptoms: a replication and extension study [J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 30 Suppl: S117–25.
- [12] Winkler E A, Yue J K, McAllister T W, et al. COMT Val 158 Met polymorphism is associated with nonverbal cognition following mild traumatic brain injury [J]. *Neurogenetics*, 2016, 17(1): 31–41.
- [13] Dongés B, Haupt L M, Lea R A, et al. Role of the apolipoprotein E and catechol-O-methyltransferase genes in prospective and retrospective memory traits [J]. *Gene*, 2012, 506(1): 135–40.
- [14] Song H, Long H, Zuo X, et al. APOE effects on default mode network in Chinese cognitive normal elderly: relationship with clinical cognitive performance [J]. *PLoS One*, 2014, 10(7): e0133179.
- [15] Tang X, Holland D, Dale A M, et al. APOE affects the volume and shape of the amygdala and the hippocampus in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: age matters [J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 47(3): 645–60.

## Differential research on COMT, APOE polymorphisms in triple-negative breast cancer and non-triple negative breast cancer patients

Li Wen, Gan Chen, Zhang Bo, et al

(Dept of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To investigate the differences of the COMT (catechol-O-methyltransferase) and APOE (apolipoprotein E) gene polymorphisms in triple-negative breast cancer (TNBC) and non-triple negative breast cancer (NTNBC) patients, so as to explain the occurrence chemotherapy-induced cognitive impairment in breast cancer patients. **Methods** 60 TNBC and 60 NTNBC patients after chemotherapy respectively underwent five SNP loci allele frequency and genotype frequency detection on COMT (rs165599, rs4680, rs737865), APOE (rs429358, rs7412). **Results** Compared with NTNBC survivors, there was a significant difference in TNBC on the COMT (rs737865) loci allele ( $P=0.013$ ) and genotype ( $P=0.010$ ), and in respect of APOE (rs429358, rs7412) was no statistically significant differences between the two groups. **Conclusion** It indicates that the COMT gene polymorphisms could be a susceptibility factor for cognitive dysfunction in TNBC survivors.

**Key words** COMT; APOE; gene polymorphism; chemotherapy; breast cancer