

# E-Cadherin (*CDH1*) 基因胚系突变与胃 癌风险的研究

# Association of the Germline Mutations of E-Cadherin Gene (*CDH1*) in Gastric Cancer

张元颖<sup>1</sup>/李金田<sup>1</sup>/朱 明<sup>1</sup>/张晓梅<sup>1</sup>/  
吴晓柳<sup>1</sup>/王亚平<sup>2,\*</sup>

(1. 江苏省肿瘤防治研究所, 江苏 南京 210009;  
2. 南京大学医学院, 江苏 南京 210093)

ZHANG Yuan-ying<sup>1</sup>, LI Jin-tian<sup>1</sup>, ZHU Ming<sup>1</sup>,  
ZHANG Xiao-mei<sup>1</sup>, WU Xiao-liu<sup>1</sup>, WANG Ya-ping<sup>2,\*</sup>

(1. *Jiangsu Institute of Cancer Research*; 2. *Medical College of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu, 210009, China*)

**【摘要】**背景与目的: 检测 *E-Cadherin* (*CDH1*) 基因在家族性胃癌中的突变情况以探讨 *CDH1* 基因胚系突变在家族性胃癌中的作用。方法: 采用聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR)、变性高效液相色谱分析 (Denaturing high-performance liquids chromatography, DHPLC) 和直接测序法对 *CDH1* 基因进行全基因筛查, 检查 80 名胃癌患者的 *CDH1* 基因突变情况, 其中 62 例有家族史。同时检测 80 例正常人 *CDH1* 基因, 进行分析比较。结果: 2.5% (2/80) 的胃癌患者检出 *CDH1* 基因错义突变 Thr340Ala (杂合型), 在 80 例正常人中未检出这一突变; 第 13 外显子上游 (内含子) 第 13 位碱基检出多态位点 IVS(13)-13T→C, 这一多态性存在于 12.5% (10/80) 的胃癌患者和 15.0% (12/80) 的正常对照, 两组差异无统计学意义; 23.8% (19/80) 的胃癌患者中检出同义突变 Asn751Asn, 相同的突变存在于 8.8% (7/80) 的正常对照。统计结果表明, 胃癌患者中 *CDH1* 基因 Asn751Asn 检出率高于正常人群 ( $P < 0.05$ ), 这种差异主要表现在高年龄组胃癌患者 ( $P < 0.01$ )。结论: *CDH1* 基因胚系突变在家族性胃癌中不是频发事件, 但多态位点 Asn751Asn 的存在可使携带者胃癌发病风险增高, 可能是部分癌高发家族癌症发生的原因之一。

**【关键词】** 家族性胃癌; 胚系突变; *CDH1* 基因

中图分类号: Q75; R73

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2005)06-0350-04

**【ABSTRACT】** BACKGROUND & AIM: To detect the germline mutations in E-Cadherin gene (*CDH1*) and to investigate their possible role in familial gastric cancer. MATERIAL AND METHODS: With PCR, denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) and direct sequencing, we screened all exons of the E-cadherin gene for mutations in 80 Chinese gastric cancer patients, 62 of whom had positive family history, we investigated 80 healthy individuals and conducted a case-control study to investigate whether such mutations affect the risk of developing gastric carcinoma. RESULTS: Two of 80 gastric cancer patients carried missense mutation Thr340Ala (heterozygosity). This variation was not found in the control population. We confirmed a T→C polymorphism site at position -13 in upstream of exon 13. The polymorphism was identified in 10 of 80 gastric cancer patients and 12 of 80 healthy individuals and the frequency of this polymorphism did not differ between the familial gastric cancer patients and controls. We found a germline E-cadherin nonsense mutation at codon 751 in exon 14 in 19 of 80 patients analyzed. Only 7 of 80 healthy individuals were Asn751Asn carriers, and significant difference existed between gastric cancer patients and control population, especially between the elder patients and controls. CONCLUSION: Though the germline mutations of *CDH1* gene did not occur frequently in familial gastric cancer, *CDH1* gene Asn751Asn single nucleotide polymorphism might increase the risk of gastric cancer in Chinese population.

**【KEY WORDS】** familial gastric cancer; *CDH1* gene; germline mutation

收稿日期: 2005-01-21; 修订日期: 2005-05-16

基金项目: 江苏省卫生厅重点研究项目基金 (No. H9805, H200207); 江苏省卫生厅重点人才基金 (No. RC2002070); 江苏省肿瘤防治研究所青年科技基金 (No. ZQ200409)

作者简介: 张元颖 (1978-), 女, 南京市人, 实习研究员, 硕士, 主要从事肿瘤分子遗传学方面研究。E-mail: yuanying-z@163.com

\* Correspondence to: WANG Ya-ping Tel: 86-25-83686495

大约有 10% 的胃癌呈家族聚集性, 环境因素与遗传因素对胃癌的发生均有一定影响。胃癌的发生是一个涉及多种癌基因、抑癌基因及多阶段累积的复杂过程<sup>[1]</sup>, E 型钙依赖粘附蛋白 (E-cadherin) 作为转移抑制因子在肿瘤发展过程中起着重要的作用。E-cadherin (CDH1) 基因定位于 16q22.1, 全长约 100 kb, 由 16 个外显子和 15 个内含子组成<sup>[2]</sup>。1998 年 Guilford 等<sup>[3]</sup> 在新西兰发现一个伴有 E-cadherin 基因胚源性突变的胃癌家系。之后, 在欧洲与日本的家族性胃癌患者中相继发现 E-cadherin 基因胚源性突变<sup>[4]</sup>。关于中国人家族性胃癌与 E-cadherin 基因胚系突变的研究还不多见, 因此我们对中国江苏地区的家族性胃癌患者进行 CDH1 基因胚系突变的全基因筛查, 以探讨 CDH1 基因胚系突变在中国人家族性胃癌中的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

80 例胃癌患者均来自于江苏中部和南部地区, 男 61 例, 女 19 例。其中有癌症家族史 62 例; 无明确癌症家

族史 18 例。发病年龄 26~79 岁, 其中小于 50 岁的患者 24 例, 大于或等于 50 岁且小于 65 岁的患者 31 例, 大于或等于 65 岁的患者 25 例。另有正常对照 80 例, 其中男 27 例, 女 53 例, 年龄 17~70 岁。每例患者和正常对照均取外周静脉血, 提取基因组 DNA (QIA amp) 备用。

### 1.2 方 法

**1.2.1 PCR 反应** 以外显子为扩增单位设计 CDH1 基因引物。由于相邻的第 4 和第 5 外显子及其间隔的第 4 内含子较短, 将其作为一个片段扩增, 因此共设计了 15 对引物 (表 1)。PCR 反应体积 25  $\mu$ l, 其中模板 DNA 60 ng, 4  $\times$  dNTPs 终浓度各 0.2 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 终浓度 1.5 mmol/L, Taq 酶 1~1.5 U。循环条件, 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 35 s, 35 个循环周期, 72  $^{\circ}$ C 延长 5 min。

**1.2.2 变性高效液相色谱 (denaturing high-performance liquids chromatography, DHPLC) 分析** PCR 产物 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 以 0.1  $^{\circ}$ C/s 速率缓慢降温至 25  $^{\circ}$ C。取 8  $\mu$ l PCR 产物上样于核酸分析柱 (DNASep), 进行 DHPLC (WAVE 系统, Transgenomic) 分析。根据 PCR

表 1 CDH1 基因引物序列

Table 1 Primers for CDH1 gene

Exon	Forward primer	Reward primer	Product size(bp)
1	5' TGCCTCCGGGGCTCACCT 3'	5' AGAGGAAGGGGCCAGGG 3'	291
2	5' GTTTCGGTG AGCAGGAGGG 3'	5' CCTACTCCGCCAGGGAC 3'	216
3	5' CTCT GTGATTCTGCCCTGC 3'	5' CGCACTAAAACAACAGCGAAC 3'	290
4~5	5' CTGTTCCTCATCTCTTTCC 3'	5' GACCAAAAAATCCTGGGTGG 3'	511
6	5' CCTTCTCCCATGTTTCTTCC 3'	5' GTATTCAGATTCTCATTAGTGG 3'	232
7	5' CAGCTTGTCTAAACCTTCATC 3'	5' CCTCCACACCTCTGGATC 3'	248
8	5' GCTAGTGTCTGGTCTGCTG 3'	5' AGTGGTGACACTTAGTTCATG 3'	245
9	5' GACACATCTCTTGTCTCTGC 3'	5' GGGACAAGGGTATGAACAGC 3'	269
10	5' AGTCATGGCAGAAACCACAG 3'	5' CAGTGTGCTGCAAGTCACTTG 3'	418
11	5' CCAGAGCTGTCCCGCTTC 3'	5' GTCGAGGCAGCAAAGGCTC 3'	203
12	5' GTCGTGTTGAAGGCAATGG 3'	5' GAAGCATGGCAGTTGGAGC 3'	345
13	5' TTCCTCCCTGGTCTCATC 3'	5' TCAAAGGCTGAGTCACTTGC 3'	304
14	5' TTGCTCTGTCTCCCCACC 3'	5' TCCGAATAAAGAGATCACCCAC 3'	205
15	5' AGTGAAGGCATCATCCAACC 3'	5' AGCTTAGAGATGAGCCATGC 3'	294
16	5' AGATGCTTTGTCCCTTCTTC 3'	5' AGCACATGGGTCTGGGGC 3'	272

产物的正常一级结构, 专用软件确定色谱分析条件 (每一外显子的 PCR 产物设定 1~3 个色谱温度), 对比 DHPLC 的峰型。

**1.2.3 DNA 序列分析** 对于 DHPLC 分析出现异常峰型的基因外显子, PCR 产物直接进行序列分析 (ABI 3100 Avant Sequencer), 确认突变类型。

### 1.3 统计 学分析

胃癌患者与正常对照之间突变检出率的比较, 采用 Fisher's 确切概率法 (Fisher's exact test), 双侧检验。Odds Ratio (OR) 值的计算采用 Epi Info 6.04b 统计软件。

## 2 结 果

### 2.1 DHPLC 和 DNA 序列分析

CDH1 基因的所有外显子均成功进行 PCR 扩增。对 80 名胃癌患者进行 CDH1 全基因的 DHPLC 筛查, 在第 8, 13, 14 外显子中发现异常峰型 (图 1)。DNA 序列分析表明, 第 8 外显子中由于 CDH1 基因第 1 142 位碱基存在遗传性的碱基转换 A $\rightarrow$ G (杂合型), 使得第 340 号密码子发生错义突变 Thr340Ala (ACG $\rightarrow$ GCG) (图 2.a)。2 例胃癌患者携带 CDH1 基因第 8 外显子错义突变 Thr340Ala, 此 2 例胃癌患者均有家族史。10 例胃癌患者检出第 13 外显子上游 (内含子) 第 13 位碱基存在多态



位点 IVS(13) -13 T→C。第 14 外显子中 *CDH1* 基因第 2 377 位碱基发生 C→T (杂合型) 的碱基转换, 导致同义突变 Asn751Asn(AAC→AAT) (图 2. b)。共有 19 例胃癌患者检出同义突变 Asn751Asn, 其中 14 例胃癌患者有家族史, 2 例胃癌患者发病年龄小于 50 岁, 3 例胃癌患者为弥漫型胃癌。这一同义突变是新发现的一个多态位点, 尚未见报道。

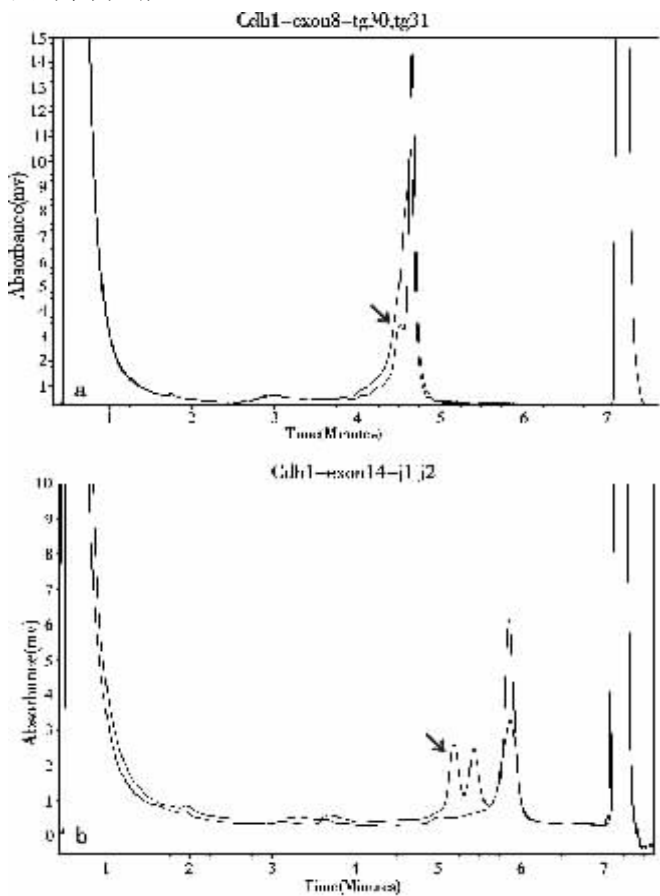


图 1 DHPLC 图像 a: exon 8 DHPLC 图像; b: exon14 DHPLC 图像。箭头所指为异常峰形。

Figure 1 DHPLC of mutation type exons. a: DHPLC of exon 8 in wild type and mutation type *CDH1* gene; b: DHPLC of exon 14 in wild type and mutation type *CDH1* gene. Arrows show the aberrant peaks.

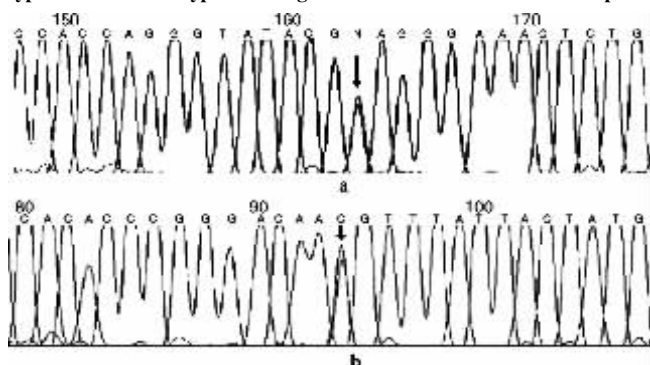


图 2 突变型 *CDH1* 基因第 8 外显子和第 14 外显子测序结果。a: exon8 反向测序显示错义突变 A1142G 导致 Thr340Ala。b: Exon14 正向测序显示同义突变 C2377T (Asn751Asn)。箭头所指为突变位点。

Figure 2 Sequencing results of exon 8 and exon14 in mutation type *CDH1* gene. a: partial sequence of exon 8 (reverse sequencing); b: partial sequence of exon14 (forward sequencing). Arrows show the mutation sites.

## 2.2 统计分析结果

比较各突变检出率在胃癌患者与正常对照中的差异 (表 2), 23.8% (19/80) 的胃癌患者中检出同义突变 Asn751Asn, 相同的突变存在于 8.8% (7/80) 的正常对照, 胃癌患者中检出率远远高于正常人群, 两组差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。2.5% (2/80) 的胃癌患者检出 *CDH1* 基因错义突变 Thr340Ala (杂合型), 在 80 例正常人中未检出这一突变, 属于罕见错义突变。多态位点 IVS(13) -13 T→C 存在于 12.5% (10/80) 的胃癌患者和 15.0% (12/80) 的正常对照, 胃癌患者中检出率与正常人群相近, 两组差异无统计学意义。

表 2 *CDH1* 基因突变在胃癌患者和正常对照中检出率比较

Table 2 The comparison on the frequencies of mutations in *CDH1* gene between gastric cancer patients and healthy controls

Exon	Mutation	AA Variation	Proportion of mutation of DNA ( $\times 10^{-2}$ )		
			Patients	Healthy	P value
8	A1142G	Thr340Ala	2.5 (2/80)	0	-
13	IVS(13)-13T→C	-	12.5 (10/80)	15.0 (12/80)	0.82
14	C2377T	Asn751Asn	23.8 (19/80)	8.8 (7/80)	0.02*

\*  $P < 0.05$ , OR = 3.25 (1.19 ~ 9.18)

## 2.3 分组比较 Asn751Asn 检出率与正常对照的结果

2.3.1 将胃癌患者按发病年龄分为 3 组, 即: 低年龄发病组 (< 50 岁); 围绕中位发病年龄组 (约在中位发病年龄上下 7 岁范围, 50 ~ 65 岁); 高年龄发病组 ( $\geq 65$  岁), 分别与正常对照进行比较。结果, 发病年龄  $\geq 65$  岁的高年龄组胃癌患者中 Asn751Asn 的检出率与正常对照之间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 表 3)。胃癌患者不同年龄组之间差异无统计学意义。

表 3 不同年龄组胃癌患者 *CDH1* 基因 Asn751Asn 检出率与正常对照之间的分层比较

Table 3 The comparison on the frequencies of Asn751Asn in *CDH1* gene between sub-groups and healthy individuals

Groups	Sub-groups	Number of screening for Asn751Asn			P value	OR (95% CI)
		Carriers	Non-carriers	Total		
Healthy	-	7	73	80	-	-
	< 50	4	20	24	0.28	2.03 (0.44 ~ 8.87)
	50 ~ 60	6	25	31	0.18	2.43 (0.65 ~ 9.13)
GC patients	$\geq 65$	9	16	25	0.0028*	5.71 (1.63 ~ 20.47)

GC: gastric cancer. \*  $P < 0.01$

2.3.2 按有无癌症家族史将胃癌患者分为两组, 分别与正常对照进行比较。结果显示, 具有癌症家族史的胃癌患者与正常对照之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 表 4)。胃癌患者组间比较差异无统计学意义。

表 4 胃癌患者中 *CDH1* 基因 Asn751Asn 检出率与正常对照之间的分层比较Table 4 The comparison on the frequencies of Asn751Asn in *CDH1* gene between sub-groups and healthy individuals

Groups	Sub-groups	Number of screening for Asn751Asn			P value	OR
		Carriers	Non-carriers	Total		
Healthy	-	7	73	80	-	-
GC patients	CFH	14	48	62	0.032*	2.96(1.02 ~ 8.83)
	NCFH	5	13	18	0.045*	3.90(0.90 ~ 16.83)

CFH: cancer family history; NCFH: no cancer family history. \*  $P < 0.05$ 

### 3 讨论

胃癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一,在我国具有较高的发病率和死亡率,其发病率呈逐年上升的趋势。部分胃癌患者亦呈现出明显的家族聚集现象,提示遗传因素在胃癌的发病中具有重要作用。E-cadherin 是一类介导细胞-细胞间相互黏附、具有维持组织结构完整性和极性的钙依赖性跨膜蛋白。E-cadherin 由细胞外肽段、跨膜区和细胞内肽段组成。细胞外肽段通过 HAV 序列识别和介导细胞间相互粘附,细胞内肽段通过连结素蛋白与细胞骨架连接。粘附下降是导致肿瘤发生、发展的重要原因之一。E-cadherin 的表达及功能变化与肿瘤细胞分化、侵袭转移密切相关。E-cadherin 在介导细胞与细胞间相互粘附、调节细胞分化、维持细胞极性和上皮细胞形态及保持组织结构完整性等方面具有重要作用,其功能破坏是导致细胞恶性转化的关键过程。近年来的研究表明, E-cadherin 在肿瘤发生中起抑制作用,胚系突变的存在是部分家族性胃癌的病因,它的缺失或失活可能是突变携带者肿瘤发生的早期事件。

E-cadherin 突变主要是剪切突变和由插入、缺失以及无义突变引起的蛋白截短,错义突变较少。对于已发现的移码突变、无义突变,评价它的病因作用并不困难;然而对于检出的错义突变,有时难以确定其病因学作用。我们在 2 例有家族史的胃癌患者检出的 *CDH1* 基因第 8 外显子错义突变 Thr340Ala,而在 80 例正常对照中未检出这一突变,提示 *CDH1* 基因 Thr340Ala 可能不属于基因的多态性,可能是一个罕见的错义突变。错义突变 Thr340Ala 位于编码细胞外肽段部分,氨基酸极性的改变对蛋白质分子产物的稳定性和功能可能发生一定影响。已有报道在家族性弥漫型胃癌家族中发现 Thr340Ala 错义突变,但其作用尚需进行蛋白功能方面的深入研究。

关于内含子的生物功能,一种说法认为内含子在细胞内扮演着调节的角色;内含子在蛋白质多样化的演化上扮演着重要角色;此外,内含子对维持基因的稳定也有一定作用。第 13 外显子上游(内含子)第 13 位多态位点 IVS(13) -13 T→C 与胃癌发生相关性不大,正常人群也有一定比例存在此多态性,但它是否在其他方面发生作用还有待深入研究。

第 14 外显子的同义突变 Asn751Asn 作为中国人群 *CDH1* 基因上新发现的一个多态位点,在胃癌患者中检出率与正常人群有显著差异,可能是中国人胃癌的一个遗传易感因素。同义突变虽不会影响 DNA 编码的蛋白质的氨基酸序列,但编码区的单碱基同义突变可能激活邻近的隐蔽裂解信号,影响内含子正常位点的剪接,产生异常的 mRNA,对 RNA 的成熟过程有一定影响。为了研究存在于中国人中的 Asn751Asn 突变是否可能在一定程度上影响到我国胃癌的发病年龄,我们以中位年龄上下 7 岁范围为界对胃癌患者进行分组分析,结果表明,发病年龄  $\geq 65$  岁的胃癌患者中这一同义突变的检出率明显高于正常对照,而低龄组和中位年龄组胃癌患者与对照之间差异无统计学意义。进一步的统计学分析显示,在以年龄分组的胃癌患者之间, Asn751Asn 的突变率的差异均无统计学意义。由此我们认为: *CDH1* 基因 Asn751Asn 的存在,可使携带者胃癌发病风险增高,但可能不影响患者的发病年龄。同时,为观察 *CDH1* 基因突变引起的胃癌是否和癌症家族史相联系,我们又以有无癌症家族史对胃癌患者进行分组。结果表明,有癌症家族史的胃癌患者中这一同义突变的检出率明显高于正常对照,这提示 Asn751Asn 的存在可能是部分癌高发家族癌症发生的原因之一,并可能在部分胃癌发病中起作用。

### 参考文献:

- [1] Xu AG, Li SG, Liu JH, *et al.* The function of apoptosis and protein expression of bcl-2, p53 and C-myc in the development of gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2000, 6(3): 27-29.
- [2] Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, *et al.* Early Gastric Cancer in Young, Asymptomatic Carriers of Germ-Line E-Cadherin Mutations[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(25): 1 904-1 909.
- [3] Guilford P, Hopkins J, Harraway J, *et al.* E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer[J]. *Nature*, 1998, 392(6674): 402-405.
- [4] Wang Y, Song JP, Ikeda M, *et al.* Ile-Leu substitution (I415L) in germline E-cadherin gene (CDH1) in Japanese familial gastric cancer[J]. *Jpn J Clin Oncol*. 2003, 33(1): 17-20.

