

5-羟色胺转运体启动子基因多态性与结直肠癌临床病理因素的关系及其对预后的影响

罗敏睿 洪楚原 周亚光 梁延锐 梁志华 钟祯 魏宜胜

【摘要】 目的 探讨多态 5-羟色胺转运体启动子基因(5-HTTLPR)的长短变体(LL 基因型、LS 基因型和 SS 基因型)与结直肠癌临床病理因素的关系及对患者预后的影响。方法 回顾性收集广州医科大学附属第二医院 2009 年 10 月至 2014 年 1 月期间,161 例结直肠癌患者的外周血样本资料,通过聚合酶链式反应(PCR)和琼脂糖凝胶电泳等相关技术判定 5-HTTLPR 基因分型情况,采用吻合度 χ^2 进行本组人群 5-HTTLPR 基因型哈迪-温伯格(H-W)遗传平衡定律检查,并采用 χ^2 检验和 Cox 多因素模型分析其与临床病理及预后的关系。本组患者均知情同意抽取外周血参与研究;本研究通过医院伦理委员会审批(2015056)。结果 161 例结直肠癌患者中男 89 例,女 72 例,中位年龄 64(25~85)岁。结肠癌 86 例(53.4%),直肠癌 75 例(46.6%)。全组包括 12 例 LL 基因型,59 例 LS 基因型,90 例 SS 基因型;基因型符合 H-W 遗传平衡定律($\chi^2=0.288, P=0.592$)。单因素分析显示,5-HTTLPR 基因多态性仅与淋巴结转移有关 [LL 和 LS 基因型的淋巴结转移率为 21.1%(15/71),SS 基因型的淋巴结转移率为 40.0%(36/90), $\chi^2=6.532, P=0.011$]。全组 3 年总体生存率(OS)为 71%,5 年总体生存率(OS)为 63%。多因素分析显示,SS 基因型是影响结直肠癌术后患者总体生存的独立危险因素($HR=1.933, 95\%CI:1.090\sim 3.428, P=0.024$)。结论 5-HTTLPR 各个基因型中,SS 基因型的结直肠癌患者淋巴结转移的风险更高,预后可能更差。

【关键词】 结直肠肿瘤; 多态 5 羟色胺转运体启动子; 淋巴结转移; 预后

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81672436); 广东省公益研究与能力建设专项资金 (2014A020212333)

Association between serotonin transporter promoter gene polymorphism and clinicopathological factors and effect of the polymorphism on the prognosis of colorectal cancer patients Luo Minrui, Hong Chuyuan, Zhou Yaguang, Liang Yanrui, Liang Zhihua, Zhong Zhen, Wei Yisheng
Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China

Corresponding author: Wei Yisheng, Email: yswei2004@126.com

【Abstract】 Objective To examine the association between the genotype (LL, LS and SS) of serotonin transporter promoter gene polymorphism (5-HTTLPR) and clinicopathological factors, and to investigate the effect of 5-HTTLPR on the prognosis of colorectal cancer patients. **Methods** Data of peripheral blood samples of 161 colorectal cancer patients at the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University from October 2009 to January 2014 were collected retrospectively. The genotyping of 5-HTTLPR was determined by PCR and agarose gel electrophoresis. Coincidence χ^2 test was used to examine the 5-HTTLPR genotype with Hardy-Weinberg law. Chi-square test and Cox multifactor model were used to analyze the association of 5-HTTLPR genotype with clinicopathology and prognosis. All the patients were informed and agreed to participate in the study. This study was approved

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2018.07.018

作者单位: 510260 广州医科大学附属第二医院胃肠外科

通信作者: 魏宜胜, Email: yswei2004@126.com

作者简介: 罗敏睿, 男, 1992 年 1 月出生, 在读医学硕士, Email: 821737134@qq.com; 魏宜胜, 男, 1975 年 7 月出生, 医学博士, 副教授, 硕士生导师

by the Hospital Ethics Committee (2015056). **Results** Of 161 colorectal cancer patients, 89 were male and 72 were female; the median age was 64 (25-85) years; 86 (53.5%) cases were colon cancer and 75 (46.5%) were rectal cancer. Genotype was LL in 12 cases, LS in 59 cases and SS in 90 cases, which complied with the law of Hardy-Weinberg genetic balance ($\chi^2=0.288$, $P=0.592$). Univariate analysis showed that 5-HTTLPR gene polymorphism was only associated with lymph node metastasis [lymph node metastasis rate: LL and LS genotype 21.1% (15/71); SS genotype 40.0% (36/90), $\chi^2=6.532$, $P=0.011$]. The 3-year and 5-year overall survival rates of whole patients were 71% and 63% respectively. Multivariate analysis revealed that the SS genotype was an independent risk factor affecting the overall survival of colorectal cancer patients ($HR=1.933$, 95% $CI:1.090-3.428$, $P=0.024$). **Conclusion** Among genotypes of 5-HTTLPR gene, colorectal cancer patients with SS genotype have higher risk of lymph node metastasis and poorer prognosis.

【Key words】 Colorectal neoplasms; 5-HTTLPR; Lymph node metastasis; Prognosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81672436); Public Welfare Research and Capacity Building in Guangdong Province Special Funds(2014A020212333)

结直肠癌是世界上常见的消化道恶性肿瘤之一^[1-3]。虽然结直肠癌的发生发展及预后的分子机制已有较深入的研究,但至今仍然缺少可靠的标志物能准确判断疾病进展及预后。因此,寻找判断结直肠癌预后的新标志物这一方向备受关注。多态 5-羟色胺转运体启动子基因 (serotonin transporter promoter polymorphism, 5-HTTLPR) 为 5-羟色胺转运体基因 (serotonin transporter, SERT) 转录起始位点上游约 1 kb 处 5' 侧翼区域的重复单元序列,由于插入或缺失 44 个碱基对构成的重复片段,形成长型 (long, L) 和短型 (short, S) 两种等位基因,也产生了 LL、LS、SS 三种基因型变体。5-HTTLPR 基因多态性与人的负面情绪,如抑郁、烦躁等有很大关联^[4]。有临床数据报道,5-HTTLPR 还与肠易激综合征有关^[5]。近年来,研究者发现肠易激综合征患者结直肠癌、肝癌、胆道恶性肿瘤、胰腺癌和肾癌的风险相对于正常人明显增高^[6]。这些都显示了 5-HTTLPR 与肠道疾病及肿瘤的进展可能存在一定的关联。但截至目前,关于 5-HTTLPR 基因多态性与结直肠癌的进展及预后的关联尚未有报道。本研究拟探讨 5-HTTLPR 长短变体与结直肠癌临床病理因素及总生存率 (overall survival, OS) 的关联,分析 5-HTTLPR 长、短变体对结直肠癌进展及转归的影响,以期对结直肠癌预后提供可靠的生物标记。

资料与方法

一、研究对象

病例入组标准: 纳入接受根治性手术切除肿

瘤,并由术后病理诊断确诊为结直肠癌以及心肺肝肾功能良好的患者,排除接受放疗和生物靶向治疗、肛管癌和家族性息肉病恶变的患者。回顾性收集广州医科大学附属第二医院 2009 年 10 月至 2014 年 1 月期间,161 例结直肠癌术后患者的外周血样本资料。收集入组病例的年龄、性别、肿瘤分期、肿瘤分化程度、淋巴结转移、神经脉管浸润、肿瘤部位和浸润深度等临床病理资料。肿瘤分期采用美国癌症联合会 (AJCC) 第 8 版颁布的 TNM 分期方法进行分期^[7]。全组男 89 例,女 72 例,中位年龄 64 (25 ~ 85) 岁。I 期 31 例 (19.3%), II 期 70 例 (43.5%), III 期 43 例 (26.7%), IV 期 17 例 (10.6%); 结肠癌 86 例 (53.4%), 直肠癌 75 例 (46.6%)。本组患者均知情同意抽取外周血参与研究,本研究通过医院伦理委员会审批 (2015056)。

二、实验方法

1. DNA 提取: 术前肝素抗凝管抽取外周静脉血 5 ml。天根外周血 DNA 提取试剂盒提取白细胞总 DNA,然后置 -80℃ 保存备用。

2. 聚合酶链式反应 (PCR) 扩增目的基因: 采用 PCR 扩增目的 DNA 并进行基因分型。正向引物: 5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3'; 反向引物: 5'-GAGG-GACTGAGCT-GGACAACCAC-3'。PCR 反应体系和循环条件参照说明书。扩增产物用北京鼎盛生物技术公司的 DNA Marker DL1000 作为参照标准比对。

3. 基因型判读: 2% 琼脂糖凝胶电泳, 荧光/可见光成像分析系统 (美国 BIO-RAD 公司) 下观察, 图像分析可检测到 PCR 扩增条带 528 bp 和 484 bp,

以此判断基因型:(1) 仅有 528 bp 的为 LL 型;(2) 仅有 484 bp 的为 SS 型;(3) 兼有 528 bp 和 484 bp 的为 LS 型,见图 1。

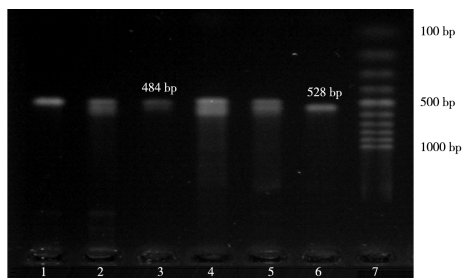


图 1 5-HTTLPR 基因分型琼脂糖凝胶电泳图(泳道 1,3 为基因型 SS; 泳道 2,4,5 为基因型 LS; 泳道 6 为基因型 LL; 泳道 7 为 1000 bp 参照标准)

三、随访

全部病例通过电话及门诊复查随访。每 3 个月随访一次,随访生存状况及复发转移情况,中位随访时间 53 个月(10 ~ 78 个月)。全组术后随访结果完整。

四、统计学方法

计数资料采用频数和百分比表示。通过 Arlequin3.0 软件,应用吻合度 χ^2 进行本组人群 5-HTTLPR 基因型哈迪-温伯格(H-W)遗传平衡定律检验。计数资料用例数和百分率表示,通过统计分析软件包 SPSS 19.0,应用 χ^2 检验和 Mann-Whitney 检验(适用于等级资料)分析临床病理因素与 5-HTTLPR 基因型的关系。使用寿命表法(life table)对生存率进行统计分析。使用 Cox 多因素风险模型分析影响 OS 的独立危险因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

161 例结直肠癌患者有 12 例 LL 型,59 例 LS 型,90 例 SS 型;遗传平衡吻合度检验显示,基因型符合 H-W 遗传平衡定律($\chi^2 = 0.288, P = 0.592$),样本具有群体代表性。单因素分析显示,5-HTTLPR 基因多态性与淋巴结转移有关($\chi^2 = 6.532, P = 0.011$),SS 基因型淋巴结转移阳性更多,见表 1。全组 3 年 OS 为 71%,5 年 OS 为 63%。将 5-HTTLPR 基因多态性纳入预后多因素分析显示,SS 基因型是预后较差的独立危险因素($HR = 1.933, 95\%CI: 1.090 \sim 3.428, P = 0.024$),见表 2。

表 1 161 例结直肠癌患者 5-HTTLPR 基因多态性与临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	基因型[例(%)]		统计值	P 值
		LL 和 LS (71 例)	SS (90 例)		
性别				$\chi^2=2.807$	0.094
男	89	34(47.9)	55(61.1)		
女	72	37(52.1)	35(38.9)		
年龄(岁)				$\chi^2=4.229$	0.121
≤ 49	22	14(19.7)	8(8.9)		
50 ~ 59	35	13(18.3)	22(24.4)		
≥ 60	104	44(62.0)	60(66.7)		
肿瘤 TNM 分期				$U=2879.0$	0.254
I	31	13(18.3)	18(20.0)		
II	70	38(53.5)	32(35.6)		
III	43	12(16.9)	31(34.4)		
IV	17	8(11.3)	9(10.0)		
分化程度				$U=3053.0$	0.519
高分化	15	7(9.9)	8(8.9)		
中分化	122	55(77.5)	67(74.4)		
低分化	24	9(12.7)	15(16.7)		
淋巴结转移				$\chi^2=6.532$	0.011
无	110	56(78.9)	54(60.0)		
有	51	15(21.1)	36(40.0)		
神经管浸润				$\chi^2=0.105$	0.746
无	139	62(87.3)	77(85.6)		
有	22	9(12.7)	13(14.4)		
肿瘤部位				$\chi^2=0.957$	0.328
结肠	86	41(57.7)	45(50.0)		
直肠	75	30(42.3)	45(50.0)		
肿瘤浸润深度				$\chi^2=0.080$	0.777
黏膜和肌层	38	16(22.5)	22(24.4)		
全层	123	55(77.5)	68(75.6)		

注:5-HTTLPR 基因为多态 5-羟色胺转运体启动子基因

讨 论

本研究首次展现了在结直肠癌患者中 5-HTTLPR 基因 SS 基因型更易发生淋巴结转移,揭示 5-HTTLPR 基因多态性与结直肠癌进展有关。本研究也首次显示了 5-HTTLPR 基因多态性是影响结直肠癌 OS 的独立因素,SS 基因型患者 OS 更差。

5-羟色胺是一种调节胃肠运动和分泌的重要神经递质和信号分子,以往很多研究报道了 5-HTTLPR 基因多态性与精神情绪、2 型糖尿病和慢性应激等的相关性^[8-10]。也有文献报道,肠易激综合征患者结肠黏膜 5-羟色胺含量较正常者明显增高,提示 5-羟色胺与肠易激综合征发病有关^[11-12]。5-HTTLPR 基因多态性调控位于突触前膜的 SERT,对其表达起

表 2 161 例结直肠癌患者预后多因素分析

临床因素	HR (95%CI)	P 值
性别		0.338
男	1.000	
女	1.298 (0.761 ~ 2.215)	
年龄		
≤49 岁	1.000	
50~59 岁	0.776 (0.303 ~ 1.988)	0.597
≥60 岁	0.712 (0.398 ~ 1.876)	0.712
肿瘤 TNM 分期		
I	1.000	
II	3.780 (1.115 ~ 12.808)	0.033
III	5.598 (1.630 ~ 19.244)	0.006
IV	17.345 (4.708 ~ 63.908)	0.000
肿瘤分化程度		
高分化	1.000	
中分化	2.247 (0.756 ~ 6.674)	0.145
低分化	1.245 (0.310 ~ 5.000)	0.757
神经血管浸润		0.662
无	1.000	
有	0.837 (0.378 ~ 1.856)	
肿瘤部位		0.112
结肠	1.000	
直肠	1.535 (0.905 ~ 2.605)	
5-HTTLPR 基因型		0.025
LL 和 LS	1.000	
SS	1.929 (1.088 ~ 3.422)	

注:5-HTTLPR 基因为多态 5-羟色胺转运体启动子基因

到重要调节作用,S 型被认为与 SERT 表达降低有关。当 5-羟色胺释放到突触间隙,SERT 再摄取突触间隙中的 5-羟色胺而迅速终止其作用,SERT 在调节脑-肠互动及胃肠功能疾病方面具有重要意义^[13-14]。张伟等^[5]进行的 Meta 分析结果发现,在白种人群中,5-HTTLPR 与腹泻型肠易激综合征发病存在相关性,携带 LL 基因型人群发生腹泻型肠易激综合征风险较高(LL 比 LS: $OR=1.46, 95\%CI: 1.15 \sim 1.86$;LL 比 LS 和 SS: $OR=1.26, 95\%CI: 1.01 \sim 1.57$)。

淋巴结转移代表了肿瘤在局部转移的能力,与患者生存密切相关^[15-18]。有研究报道,淋巴结转移与 P53、P-糖蛋白及 nm23-H1 蛋白的表达有关联^[19-20];同样也有研究,发现 Aurora-A 基因过表达^[21]、CK19mRNA 表达阳性率^[22]均影响消化道肿瘤的淋巴结转移。而本研究揭示了 5-HTTLPR 基因多态性 SS 基因型淋巴结转移更为多见,显示 5-HTTLPR 基因多态性影响了结直肠癌进展。

肿瘤 TNM 分期是决定结直肠癌预后最重要的

因素,但是即使同一分期,预后亦不相同,说明除了分期,还有其他因素影响了结直肠癌的预后。本研究把分期等临床病理因素纳入 Cox 多因素分析模型,发现 5-HTTLPR 基因多态性是独立于分期等临床病理因素之外的影响 OS 的因素,SS 基因型 OS 更差。因此,5-HTTLPR 基因多态性可作为判断结直肠癌预后的新的生物学标记。

由于 5-HTTLPR 中的 SS 基因型与焦虑、抑郁、绝望、内疚、攻击性、神经过敏等气质性格有关,这些负面性格也影响了结直肠癌进展及预后^[8-9]。5-HTTLPR 基因多态性作为一项预测患者进展及预后的指标,但是现在临床中较少被医护人员所关注。因此在临床中,医护人员需要对 5-HTTLPR 基因 SS 基因型患者加强心理指导及随访,督促患者及家属配合治疗,及时发现和治疗负面情绪,同时也为优化化疗方案进行个体化治疗提供方向,以获得较好的治疗效果和预后。

本研究揭示了 5-HTTLPR 基因多态性在结直肠癌进展及转归中的意义,但 5-HTTLPR 基因多态性影响结直肠癌淋巴结转移、分化及预后的分子机制尚需进一步探讨。由于样本量的限制,本研究的结论尚需更大样本量、更多中心的研究证实。

参 考 文 献

- [1] DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(4):252-271. DOI: 10.3322/caac.21235.
- [2] Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64 (2):104-117. DOI: 10.3322/caac.21220.
- [3] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI:10.3322/caac.21262.
- [4] 冯倩,汤臻,赵中. 5-HTTLPR 与抑郁症易感性及抗抑郁疗效的相关性[J/CD].中华临床医师杂志(电子版),2015,9(4): 642-645. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2015.04.028.
- [5] 张伟,孙建华,吴晓亮,等. 5-HTTLPR 多态性与腹泻型肠易激综合征相关性 Meta 分析 [J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(12):1775-1779.
- [6] Hu LY, Ku FC, Lu T, et al. Risk of cancer in patients with irritable bowel syndrome: a nationwide population-based study [J]. Ann Epidemiol, 2015, 25(12):924-928. DOI: 10.1016/j.annepidem.2015.07.006.
- [7] Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al. AJCC Cancer Staging Manual[M]. 8th ed. New York: Springer, 2016.
- [8] 秦永章,荣海钦,季虹,等. 5-HTTLPR 基因多态性与 2 型糖尿病关联性研究[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(7):88-90. DOI:

- 10.3969/j.issn.1673-548X.2011.07.026.
- [9] 乔娟, 朱相华, 赵后锋, 等. 5-HTTLPR 基因多态性与强迫症的相关性研究[J]. 精神医学杂志, 2013, 26(5):351-353. DOI: 10.3969/j.issn.1009-7201.2013.05.009.
- [10] 张俊先, 陈杰, 李新影. 5-HTTLPR 与抑郁相关性的研究动态[J]. 心理科学, 2012, 35(1):226-232.
- [11] Lesch KP, Bengel D, Heils A, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region[J]. Science, 1996, 274(5292):1527-1531.
- [12] Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, et al. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics[J]. Mol Interv, 2004, 4(2):109-123. DOI: 10.1124/mi.4.2.8.
- [13] 何侠垠, 戴宁. 5-羟色胺与肠易激综合征关系的研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2010, 30(1):1-3. DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2010.01.001.
- [14] 常媛媛. 5-羟色胺转运体基因启动子区多态性与肠易激综合征[D]. 天津医科大学, 2011.
- [15] Read TE, Mutch MG, Chang BW, et al. Locoregional recurrence and survival after curative resection of adenocarcinoma of the colon[J]. J Am Coll Surg, 2002, 195(1):33-40.
- [16] Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(7):979-994.
- [17] Telem DA, Chin EH, Nguyen SQ, et al. Risk factors for anastomotic leak following colorectal surgery: a case-control study[J]. Arch Surg, 2010, 145(4):371-376. DOI: 10.1001/archsurg.2010.40.
- [18] Goldberg RM, Fleming TR, Tangen CM, et al. Surgery for recurrent colon cancer: strategies for identifying resectable recurrence and success rates after resection. Eastern Cooperative Oncology Group, the North Central Cancer Treatment Group, and the Southwest Oncology Group [J]. Ann Intern Med, 1998, 129(1):27-35.
- [19] 吴灵飞, 张锦堃. nm23-H₁ 蛋白在上消化道肿瘤中的表达及其与淋巴结转移的关系 [J]. 汕头大学医学院学报, 1997, (S1):16-18.
- [20] 檀碧波, 韩杰, 吕炳蓉, 等. 消化道肿瘤原发灶、淋巴结转移灶中 p53、P-糖蛋白的表达及意义[J]. 山东医药, 2007, 47(21):83. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2007.21.041.
- [21] 贺春, 李朝慧, 邓青, 等. Aurora-A 基因过表达与消化道肿瘤临床病理特征相关性 Meta 分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2016, 23(5):341-346.
- [22] 张秋君. II、III 期消化道肿瘤患者 CK19mRNA 的表达与预后的关系[D]. 安徽医科大学, 2016.

(收稿日期:2017-04-10)

(本文编辑:朱雯洁)

· 医学信息 ·

腹膜内灌注和静脉注射紫杉醇联合 S-1 与顺铂联合 S-1 全身化疗 在治疗胃癌合并腹膜转移患者的 III 期临床比较研究 (PHOENIX-GC 试验)

目的:已有相关研究证实,腹腔内灌注紫杉醇加全身化疗对胃癌伴腹膜转移的患者有良好的临床疗效。本研究旨在验证该治疗方案在预后上是否优于标准全身化疗。方法:本随机对照 III 期试验的入组标准为:未接受或短期内(<2 个月)化疗、没有疾病进展的原发性胃腺癌伴腹膜转移的患者。患者以 2:1 的比例随机分配至两组:腹腔灌注和静脉注射紫杉醇加 S-1 (IP 组,用法用量:第 1 天和第 8 天腹腔灌注紫杉醇 20 mg/m² 及静脉注射紫杉醇 50 mg/m²,并在每个 3 周周期的第 1 天至第 14 天口服 S-1 80 mg/m²);S-1 加静脉注射顺铂(SP 组,用法用量:每个 5 周周期第 1 至 21 天口服 S-1 80 mg/m²,第 8 天静注顺铂 60 mg/m²)。按中心、既往是否化疗、腹膜转移程度分层。主要终点是总体生存率(OS),次要终点为反应率、3 年 OS 和安全性。结果:本研究共招募了 183 例患者,共 164 例符合标准纳入分析。除了 IP 组的患者腹水明显更多外,两组之间的基线特征均衡。IP 和 SP 组的中位生存时间分别为 17.7 和 15.2 个月(HR:0.72,95%CI:0.49~1.04, P=0.080)。在对基线腹水进行校正的事后敏感性分析中,风险比为 0.59(95%CI:0.39~0.87, P=0.008)。IP 组 3 年 OS 为 21.9%(95%CI:14.9%~29.9%),SP 组为 6.0%(95%CI:1.6%~14.9%)。两种方案均有良好的耐受性。

结论:本试验未提示腹腔灌注紫杉醇加全身化疗较传统全身化疗的统计学优势。但探索性分析提示腹腔内灌注紫杉醇可能对胃癌有一定程度的临床获益。

[Ishigami H, et al. Ann Oncol, 2016, 27 (suppl 6). DOI:10.1093/annonc/mdw371.08. 中山大学附属肿瘤医院 陈国明、赵百伟摘译 周志伟审校]