

CD44 基因多态性与乳腺癌遗传易感性及临床病理参数的关系

周鑫¹, 吴诚义^{2△}

1. 重庆市肿瘤研究所 乳腺中心 (重庆 400030); 2. 重庆医科大学附属第一医院 内分泌乳腺外科 (重庆 400016)

【摘要】 目的 探讨 CD44 基因 rs4756195 位点多态性与中国重庆地区汉族女性乳腺癌遗传易感性的关系。**方法** 采用病例对照研究, 利用 Sequenom MassArray® iPLEX GOLD 系统检测 170 例乳腺癌患者和 178 例健康对照者 CD44 基因 rs4756195 位点单核苷酸多态性, 并对检测结果进行 t 检验、 χ^2 检验和非条件 logistic 回归分析。**结果** CD44 基因 rs4756195 位点 AA、AG 和 GG 三种基因型在乳腺癌组和对照组的分布频率差异有统计学意义 ($\chi^2=6.272, P=0.043$); 与携带 AA 基因型的个体比较, 携带 AG、GG 基因型的个体乳腺癌的发病风险明显增加 ($OR=6.035, 95\%CI: 1.262\sim28.856, P=0.024$; $OR=5.367, 95\%CI: 1.166\sim24.709, P=0.031$)。携带 GG 基因型的乳腺癌腋窝淋巴结转移率高于携带 AA 和 AG 基因型的乳腺癌, 差异有统计学意义 ($62.6\% \text{ vs. } 44.7\%, \chi^2=4.473, P=0.034$); 携带 AA 和 AG 基因型的乳腺癌 CD44 阳性率高于携带 GG 基因型的乳腺癌 ($68.1\% \text{ vs. } 45.5\%, \chi^2=6.930, P=0.008$)。**结论** CD44 基因 rs4756195 位点多态性与中国重庆地区汉族女性乳腺癌的发病风险相关, AG 和 GG 基因型是中国重庆地区汉族女性乳腺癌的易感基因型。CD44 基因 rs4756195 位点多态性与乳腺癌腋窝淋巴结转移、CD44 表达相关, 提示携带 GG 基因型的乳腺癌可能预后不良。

【关键词】 乳腺癌 CD44 基因 多态性 CD44⁺/CD24^{-/low} 表型 肿瘤易感性

Association of CD44 Polymorphisms with Genetic Susceptibilities and Clinico-pathologic Characteristics in Breast Cancer

ZHOU Xin¹, WU Cheng-yi^{2△} 1. Department of Breast Surgery, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China; 2. Department of Endocrine and Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

△ Corresponding author, E-mail: 242777759@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the association of CD44 rs4756195 polymorphisms with genetic susceptibilities and clinico-pathologic characteristics to breast cancer of Han Nationality in Chongqing, China.

Methods This case-control study included 170 patients with breast cancer and 178 healthy controls, single nucleotide polymorphisms (SNPs) of CD44 rs4756195 polymorphisms at intron 1 were genotyped by Sequenom MassArray® iPLEX GOLD System. Data was analyzed via t test, Chi-square test and Logistic regression analysis.

Results The frequencies of genotypes (AA, AG and GG) of CD44 rs4756195 showed a significant difference in the distribution of the genotypes between patients with breast cancer and healthy controls ($\chi^2=6.272, P=0.043$). The GG and AG genotype significantly increased the risk of breast cancer compared with AA genotype ($OR=6.035, 95\%CI: 1.262-28.856, P=0.024$; $OR=5.367, 95\%CI: 1.166-24.709, P=0.031$). The rate of axillary lymph nodes metastasis in patients with breast cancer who carried with GG genotype was higher than those carried with AG and GG genotype ($62.6\% \text{ vs. } 44.7\%, \chi^2=4.473, P=0.034$). The positive rate of CD44 in patients with breast cancer who carried with AG and GG genotype was higher than those carried with GG genotype ($68.1\% \text{ vs. } 45.5\%, \chi^2=6.930, P=0.008$). **Conclusion** CD44 rs4756195 polymorphisms are closely associated with the increased risk for breast cancer in Han Nationality; AG and GG genotype are susceptible genotype for breast cancer. CD44 rs4756195 polymorphisms are closely associated with the expression of CD44 and axillary lymph nodes metastasis, the patients with breast cancer who carried with GG genotype may have bad prognosis.

【Key words】 Breast cancer CD44 gene Polymorphism CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype Tumor susceptibility

CD44 是一种细胞表面的跨膜糖蛋白, 属于黏附分子; 广泛分布于造血系统、上皮系统、内皮系统

和中胚层来源的细胞上^[1]。研究表明, CD44 与肿瘤的增殖、迁移、侵袭和肿瘤相关的血管生成密切相关^[2-4], 并且 CD44 基因是乳腺癌干细胞表型的重要标志物之一^[5]。因此 CD44 基因多态性可能影响

△ 通讯作者, E-mail: 242777759@qq.com

不同个体的肿瘤易感性,目前国内尚未检索到 CD44 基因多态性与乳腺癌易感性的文献报道。为此,本研究采用人群病例-对照研究,利用 MassArray-iPLEX 技术和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)平台检测 CD44 基因 rs4756195 位点多态性,探讨其多态性与中国重庆地区汉族女性乳腺癌遗传易感性的关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

所有研究对象均为中国重庆地区汉族女性,包括乳腺癌患者 170 例和健康对照者 178 例。乳腺癌组来源于重庆医科大学附属第一医院内分泌外科和重庆市肿瘤研究所乳腺中心 2010 年 1~12 月收治的乳腺癌患者,所有患者均为新发肿瘤,均经病理证实,并利用免疫组织化学进行了雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、P53 蛋白的检测。入组前均未接受任何抗癌治疗。随机抽取同期重庆市肿瘤研究所肿瘤筛查中心进行健康体检的无肿瘤及其它遗传疾病的无关个体作为健康对照组。将母系家族中一级直系亲属患有乳腺癌者定义为有乳腺癌家族史。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司);自动点样仪(Nanodispenser RSI000 v1. 2. 1, 美国 Sequenom 公司);SpectroCHIP 芯片(美国 Sequenom 公司);MALDI-TOF-MS(美国 Sequenom 公司)。CD44 兔抗人单克隆抗体(工作浓度为 1:50)、CD24 鼠抗人单克隆抗体(工作浓度为 1:100)及 Polymer 双染检测试剂盒均购自北京中杉生物生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集和 DNA 提取 在获得知情同意后,抽取乳腺癌患者及健康志愿者清晨空腹外周静脉血 2 mL,并置于酸性枸橼酸葡萄糖抗凝管中,−40 °C 保存;应用 DNA 提取试剂盒提取 DNA(按说明书操作),DNA 保存于−70 °C 备用。

1.3.2 引物设计与合成 根据基因的目标序列和所选择的多态性位点,利用 Sequenom MassARRAY® Assay Design 3. 1 软件(美国

Sequenom 公司)设计多重 PCR 特异性扩增引物和单碱基延伸引物(由上海英骏生物公司完成引物合成)。针对 CD44 基因 rs4756195 位点特异性扩增的引物为 5'-ACGTTGGATGGTTCAGTTTAGGACAGACTC-3' 和 5'-ACGTTGGATGCCAAAGTGCTGGGATTGTAG-3',扩增片段长度为 99 bp,单碱基延伸的引物为 5'-TTCCAGCGCCCGGCCTTATTTG-3',延伸引物的相对分子质量为 6653. 3,若延伸单碱基 A,则相对分子质量为 6924. 5,若延伸单碱基 G,则相对分子质量为 6940. 5。

1.3.3 基因分型分析 提取纯化后的基因组 DNA 样品定量稀释至 100 ng/μL,按设计顺序每孔加 1 μL 样品于 384 孔板上,然后添加 PCR 扩增体系如下: *Taq* 聚合酶 0. 1 U,各 2. 5 pmol PCR 引物,25 mmol dNTP。PCR 反应条件为:95 °C 15 min,然后 95 °C 20 s,56 °C 30 s,72 °C 30 s 循环 45 次,72 °C 延伸 5 min。添加 0. 3 U 虾碱性磷酸酶(Shrimp alkaline phosphatase, SAP)去除剩余的 dNTP。单碱基延伸反应通过添加 5. 4 pmol 的各延伸引物,50 μmol 的 dNTP/ddNTP 混合物,0. 5 U Thermosequenase DNA 聚合酶,反应条件为 94 °C 2 min,然后 40 个循环的 94 °C 5 s,52 °C 5 s,80 °C 5 s。反应产物用树脂脱盐 20 min 后经自动点样仪点样于 SpectroCHIP 芯片。点样后的芯片用 MALDI-TOF-MS 平台检测。

1.3.4 双重免疫组化染色检测不同基因型乳腺癌患者癌组织 CD44、CD24 的表达 癌组织石蜡标本 5 μm 连续切片,常规脱蜡水化后,用微波炉进行抗原修复;按 Polymer 双染检测试剂盒说明书检测 CD44、CD24 的表达,分别用 DAB 和 AP-Red 显色,苏木精复染,封片剂封片;为了证明 CD44/CD24 双染的可靠性,用已知 CD44 和 CD24 阳性的扁桃体组织做阳性对照,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。阳性结果判断:CD44 阳性细胞为细胞膜红色,CD24 阳性细胞为细胞质棕黄色。细胞膜红色、细胞质无或少棕黄色染色的细胞鉴定为 CD44⁺/CD24^{−/low}。采用盲法,由两位病理科医师独立计数,每张片随机选取 15 个高倍视野,分别计算 CD44⁺ 细胞和 CD44⁺/CD24^{−/low} 细胞的比例。参考 Honeth 等^[6] 的评分方法:0 分(无阳性细胞);1 分(阳性细胞 1%~10%);2 分(阳性细胞 11%~50%);3 分(阳性细胞 51%~75%);4 分(阳性细胞 76%~100%);0 分为阴性,≥1 分为阳性。

1.3.5 统计学方法 采用 *t* 检验比较两组间年龄

差异,分析不同基因型与乳腺癌患者年龄、原发灶大小的相关性; χ^2 检验比较两组绝经状况和乳腺癌家族史的差异;分别计算各组 CD44 基因多态基因型频率,并由基因型计算等位基因频率。 χ^2 检验确定其是否符合 Hardy-Weinberg 平衡,比较基因型的组间分布频率,分析不同基因型与乳腺癌临床病理特征的相关性;应用非条件 logistic 回归分析计算比值比(odds ratios, OR)和 95% 可信区间(confidence interval, CI),分析和比较不同基因型与乳腺癌风险之间的相关性,并排除年龄、绝经状况及乳腺癌家族史等混杂因素的影响。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的一般资料比较

乳腺癌组患者年龄 31~80 岁,平均年龄 50.1 岁;绝经前 99 例,绝经后 71 例;有乳腺癌家族史的 4 例。对照组年龄 26~84 岁,平均年龄 48.4 岁;绝经前 91 例,绝经后 87 例;有乳腺癌家族史的 3 例。两组之间年龄、绝经状况及乳腺癌家族史差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 CD44 基因型、等位基因型分布及其与乳腺癌发病风险的关系

CD44 基因在乳腺癌组和对照组中有 AA、AG 和 GG 三种基因型,其特征质谱图见图 1。两组中 CD44 基因型分布频率均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡($\chi^2=0.783, P=0.690$; $\chi^2=2.870, P=0.238$)。乳腺癌组 AA、AG 和 GG 基因型频率分别为 1.2%、26.4%和 72.4%,对照组的 3 种基因型频率分别为 6.2%、23.0%和 70.8%,两组间基因型分

布频率差异有统计学意义($\chi^2=6.272, P=0.043$, 表 1)。与携带 AA 基因型的个体比较,携带 AG、GG 基因型的个体乳腺癌的发病风险明显增加($OR=6.035, 95\%CI: 1.262\sim28.856, P=0.024$; $OR=5.367, 95\%CI: 1.166\sim24.709, P=0.031$, 表 1)。乳腺癌组 A、G 等位基因频率分别为 14.4%和 85.6%,对照组 A、G 等位基因频率分别为 17.7%和 82.3%,两组间等位基因型分布频率差异无统计学意义($\chi^2=1.390, P=0.238$, 表 1);与携带 A 等位基因个体比较,携带 G 等位基因的个体乳腺癌的发病风险无明显增加($OR=1.277, 95\%CI: 0.850\sim1.918, P=0.239$, 表 1)。

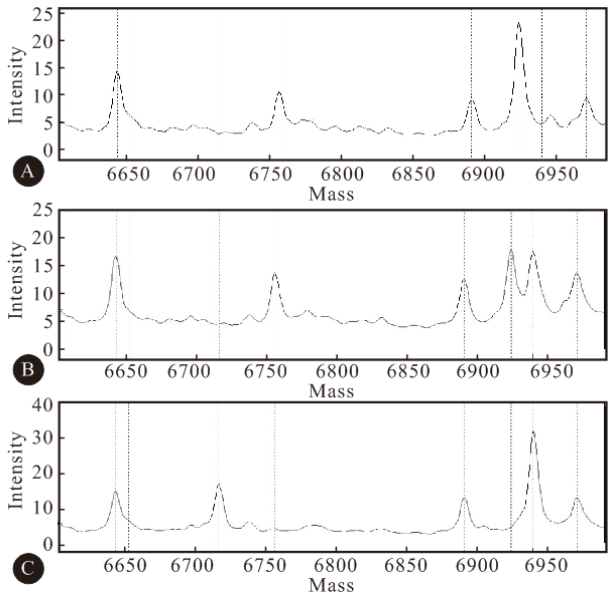


图 1 CD44 基因 rs4756195 多态位点 AA(A)、GA(B)和 GG(C)基因型的特征质谱图

Fig 1 Schematic of the AA (A), AG (B) and GG (C) polymorphism of rs4756195 in CD44

表 1 CD44 基因 rs4756195 位点多态性与乳腺癌易感性的关系

Table 1 Distribution of the CD44 rs4756195 polymorphisms and risk of breast cancer

Variable	Controls (case, %)	Breast cancer (case, %)	χ^2	P	OR (95%CI)	P
Genotype			6.272	0.043		
AA	11 (6.2)	2 (1.2)			1.00	
AG	41 (23.0)	45 (26.4)			6.035 (1.262-28.856)	0.024
GG	126 (70.8)	123 (72.4)			5.367 (1.166-24.709)	0.031
Allelotype			1.390	0.238		
A	63 (17.7)	49 (14.4)			1.00	
G	293 (82.3)	291 (85.6)			1.277 (0.850-1.918)	0.239

2.3 双重免疫组化染色检测乳腺癌中 CD44、CD24 的表达

见图 2 及表 2。携带 AA 和 AG 基因型的乳腺癌 CD44 阳性率为 68.1%(32/47),携带 GG 基因型的乳腺癌 CD44 阳性率为 45.5%(56/123),两者差

异有统计学意义($\chi^2=6.930, P=0.008$, 表 2);携带 AA 和 AG 基因型的乳腺癌 CD44⁺/CD24^{-/low} 阳性率(44.7%, 21/47)高于携带 GG 基因型(36.6%, 45/123)的乳腺癌,但两者差异无统计学意义($P>0.05$, 表 2)。

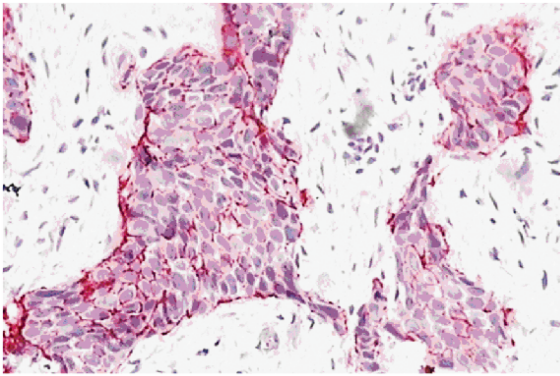


图 2 乳腺癌中 CD44⁺/CD24^{-/low} 细胞和 CD44⁻/CD24⁻ 细胞

Fig 2 CD44⁺/CD24^{-/low} cells and CD44⁻/CD24⁻ cells in breast cancer

2.4 CD44 基因多态性与乳腺癌患者年龄、原发灶

表 2 CD44 基因型分布与乳腺癌临床病理参数的关系〔例数(%)〕

Clinicopathologic characteristics	n	Genotype		χ^2	P
		GG (n=123)	AG+AA (n=47)		
TNM stage				0.003	0.960
I + II	108	78 (63.4)	30 (63.8)		
III	62	45 (36.6)	17 (36.2)		
Histology				1.078	0.299
Infiltrating ductal carcinoma	128	90 (72.6)	38 (79.7)		
Others	42	33 (27.4)	9 (20.3)		
Axillary lymph metastasis				4.473	0.034
Yes	99	77 (62.6)	21 (44.7)		
No	71	46 (37.4)	26 (55.3)		
Menstruation status				0.836	0.361
Premenopause	99	69 (56.1)	30 (63.8)		
Postmenopause	71	54 (43.9)	17 (36.2)		
ER				0.001	0.979
Positive	101	73 (59.3)	28 (59.6)		
Negative	69	50 (40.7)	19 (40.4)		
PR				0.003	0.956
Positive	79	57 (46.3)	22 (46.8)		
Negative	91	66 (53.7)	25 (53.2)		
HER2				0.001	0.979
Positive	54	39 (31.7)	15 (31.9)		
Negative	116	84 (68.3)	32 (68.1)		
P53				0.008	0.927
Positive	75	54 (43.9)	21 (44.7)		
Negative	95	69 (56.1)	26 (55.3)		
CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low}				0.938	0.333
Positive	66	45 (36.6)	21 (44.7)		
Negative	104	78 (63.4)	26 (55.3)		
CD44				6.930	0.008
Positive	88	56 (45.5)	32 (68.1)		
Negative	82	67 (54.5)	15 (31.9)		

3 讨论

CD44 基因位于 11 号染色体短臂上,有 20 个高度保守的外显子^[7];按照含有 CD44 基因中所含

大小的关系

47 例携带 AA 和 AG 基因型的乳腺癌患者平均年龄 50.1 岁,原发灶平均直径 4.3 cm;123 例携带 GG 基因型的乳腺癌患者平均年龄 50.0 岁,原发灶平均直径 4.9 cm;2 组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.5 CD44 基因多态性与乳腺癌临床病理参数的关系

见表 2。CD44 基因 rs4756195 位点多态性与乳腺癌临床分期、病理类型、停经状况、ER、PR、HER2、P53 表达无明显相关性($P>0.05$);携带 AA 和 AG 基因型的乳腺癌腋窝淋巴结转移率为 44.7%,携带 GG 基因型的乳腺癌腋窝淋巴结转移率为 62.6%,两者差异有统计学意义($P=0.034$)。

外显子类型不同分类,可分为 2 类:①仅由组成型外显子编码而成,称为标准型 CD44(CD44s),CD44s 广泛存在于各组织内,与透明质酸结合,参与细胞及细胞与基质间的黏附作用过程,对肿瘤侵袭转移发

挥重要作用;②由含有 v 区变异型外显子编码而成 CD44 分子,称变异型 CD44(CD44v);CD44 变构体表达水平的变化与肿瘤细胞侵袭转移密切相关^[7]。CD44 蛋白参与细胞间的黏附、淋巴细胞的活化、介导淋巴细胞归巢或再循环及细胞的运动、细胞内外的信号传导及凋亡等生理过程^[8,9]。

目前 CD44 基因多态性在肿瘤方面的相关研究较少,Winder 等^[10]检测了 137 例胃腺癌 CD44 信号通路中的 CD44 基因、骨桥蛋白基因和透明质酸合成酶基因的多态性,单因素分析显示 CD44 基因 rs187116 和 rs7116432 多态性与胃腺癌的肿瘤复发时间、总生存率密切相关;多因素分析显示 CD44 基因 rs187116 多态性与胃腺癌的肿瘤复发时间、总生存率密切相关;携带 CD44 基因 T-A 单体型的胃腺癌患者的肿瘤复发风险和死亡风险最低;作者认为 CD44 基因多态性可以预测局部胃腺癌的临床预后;Zhou 等^[11]在对美国白种女性和非裔女性的研究中,发现 84% 的乳腺癌患者的 CD44 基因第 1 内含子存在 Ex2+14 A>G 单核苷酸多态性,并且 Ex2+14 A>G 单核苷酸多态性与 CD44 的表达明显相关;携带 CD44 基因 Ex2+14 A>G 多态的纯合型的乳腺癌患者年龄较小、肿瘤较大、区域淋巴结转移较多和肿瘤复发率较高;作者认为 CD44 基因 Ex2+14 A>G 多态性与乳腺癌的发展相关,可以在乳腺癌风险评估、预后、诊断及基因流行病学分析中发挥作用。Vazquez 等^[12]发现携带 CD44 基因 rs187115 多态 C/C 基因型的软组织肉瘤的总生存率较差,发病时间较早。上述研究显示 CD44 基因多态性与肿瘤的发病风险和预后相关,但已有的 CD44 基因多态性研究是基于国外人群,由于人种之间的遗传差异,其 SNPs 在中国人群中与疾病的相关性亟待验证。

本组资料显示乳腺癌组和对照组中 AA、AG 和 GG 三种基因型的分布频率差异有统计学意义;携带 AG、GG 基因型的个体乳腺癌的发病风险分别是携带 AA 基因型的个体的 6.035 倍和 5.367 倍;上述研究结果提示 CD44 基因 rs4756195 位点多态性与中国重庆地区汉族女性乳腺癌的发病风险相关,AG 和 GG 基因型可能是中国重庆地区汉族女性乳腺癌的易感基因型。本组资料还显示,与携带 AA 和 AG 基因型的乳腺癌比较,携带 GG 基因型的乳腺癌 CD44 表达较低,腋窝淋巴结转移率较高,提示 CD44 基因多态性与乳腺癌腋窝淋巴结转移、CD44

表达相关。腋窝淋巴结状态是临床评估乳腺癌预后的重要指标,乳腺癌腋窝淋巴结转移往往提示预后不良。CD44 与肿瘤的增殖、迁移、侵袭和肿瘤血管生成密切相关^[2-4],因此上述研究结果提示携带 GG 基因型的乳腺癌可能预后不良。很多研究证实,CD44⁺/CD24^{-/low}表型的乳腺癌细胞具有干细胞样肿瘤起源性和侵袭的特性,CD44⁺/CD24^{-/low}表型也被认为肿瘤干细胞表型,本研究结果显示,GG 基因型中 CD44⁺/CD24^{-/low}阳性率与 AA+AG 基因型中 CD44⁺/CD24^{-/low}阳性率的差异无统计学意义,但此结论尚需扩大样本量进一步检测验证。

参 考 文 献

- 1 Bourguignon LY, Zhu D, Zhu H. CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression. *Front Biosci*, 1998;3:d637-649.
- 2 Sheridan C, Kishimoto V, Fuchs RK, *et al.* CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties, an early step necessary for metastasis. *Breast cancer Res*, 2006;8(5): R59.
- 3 Slven M, Krupinski J, Gaffney J, *et al.* Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol*, 2006;26(1): 58-68.
- 4 Gotte M, Yip GW. Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res*, 2006;66(21):10233-10237.
- 5 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003;100(7):3983-3988.
- 6 Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, *et al.* The CD44⁺/CD24⁻ phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res*, 2008;10(3):R53.
- 7 Haynes BF, Liao HX, Patton KL. The transmembrane hyaluronate receptor (CD44) multiple functions, multiple forms. *Cancer Cell*, 1991;3(9):347-350.
- 8 钱皓, 凌沛学, 王凤山等. 黏附分子 CD44 与恶性肿瘤关系的研究进展. *中国生化药物杂志*, 2007;28(3):207-210.
- 9 McKallip RJ, Fisher M, Gunthert U, *et al.* Role of CD44 and its v7 isoform in staphylococcal enterotoxin B-induced toxic shock: CD44 deficiency on hepatic mononuclear cells leads to reduced activation-induced apoptosis that result in increased liver damage. *Infect Immun*, 2005;73(1):50-61.
- 10 Winder T, Ning Y, Yang D, *et al.* Germline polymorphisms in genes involved in the CD44 signaling pathway are associated with clinical outcome in localized gastric adenocarcinoma (GA). *Int J Cancer*, 2011;129(5):1096-1104.
- 11 Zhou J, Nagarkatti PS, Zhong Y, *et al.* Unique SNP in CD44 intron 1 and its role in breast cancer development. *Anticancer Res*, 2010;30(4):1263-1272.
- 12 Vazquez A, Grochola LF, Bond EE, *et al.* Chemosensitivity profiles identify polymorphisms in the p53 network genes 14-3-3 τ and CD44 that affect sarcoma incidence and survival. *Cancer Res*, 2010;70(1):172-180.

(2012-04-09 收稿, 2012-07-12 修回)

编辑 沈进