

基于SNP芯片研究PI3K/Akt/mTOR通路上自噬相关基因SNPs与胃癌的关联

舒智雄, 吴传城, 吴晓丽, 刘宝英*
(福建医科大学公共卫生学院, 福建 福州 350122)

Relationships between gastric cancer and SNPs of autophagy-related genes on the PI3K/Akt/mTOR pathway

SHU Zhixiong, WU Chuancheng,
WU Xiaoli, LIU Baoying*
(School of Public Health, Fujian Medical University,
Fuzhou 350122, Fujian, China)

【摘要】目的：探讨与胃癌发生相关的PI3K/Akt/mTOR通路上新的与自噬相关基因单核苷酸多态性位点(SNPs)，为寻找有价值的胃癌发生相关的分子标志物提供新的依据。**方法：**采用1:1配对病例-对照研究的方法。通过KEGG pathway网站和Gene Ontology、Ensemble数据库及HaploView、STRING、Cytoscape软件联合SNP芯片筛选目标SNPs，采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对筛选出来的SNPs位点在来自福建省仙游县的622例胃癌患者和622例健康人群基因组中进行验证。**结果：**SNP芯片及生物信息学分析筛选出*IRS1* rs10205233、*PIK3CD* rs3934934、*PIK3R1* rs706711、*PIK3R1* rs706714和*AKT1* rs35285446为候选位点。扩大样本验证发现*IRS1* rs10205233的多态性变异(C>T)显著降低了胃癌的发病风险[共显性模型、显性模型的OR(95%CI)分别为0.761(0.595, 0.975)、0.764(0.601, 0.973)]。进一步分层分析，该位点显性模型、隐性模型、共显性模型以及等位基因在贲门癌和非贲门癌人群中均未见统计学差异($P>0.05$)。并未见其他位点与患胃癌风险的关联有统计学意义。对*PIK3R1*基因2个位点(rs706711、rs706714)的单体型分析也未见统计学差异。**结论：***IRS1* rs10205233位点与福建省胃癌高发区仙游县的胃癌发生存在关联，T等位基因可能是胃癌发生的一个遗传保护因素。

【关键词】PI3K/Akt/mTOR通路；自噬；单核苷酸多态性；胃癌

中图分类号：R730.2

文献标志码：A

文章编号：1004-616X(2020)02-0118-08

doi: 10.3969/j.issn.1004-616x.2020.02.007

【ABSTRACT】OBJECTIVES: To explore new autophagy related single nucleotide polymorphisms (SNPs) on the PI3K/Akt/mTOR pathway and their association with gastric carcinogenesis. **METHODS:** A 1:1 matched case-control study was conducted. SNP microarray was combined with KEGG pathway, Gene Ontology and Ensemble database to screen target SNPs. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) was used to detect SNP loci in 622 patients with gastric cancer and 622 healthy individuals from the Xianyou county, Fujian province. **RESULTS:** SNP chip and bioinformatics analyses screened *IRS1* rs10205233, *PIK3CD* rs3934934, *PIK3R1* rs706711, *PIK3R1* rs706714 and *AKT1* rs35285446 as candidate sites. Validations using expanded samples found that the polymorphism of *IRS1* rs10205233 (C>T) significantly reduced the risk of gastric cancer [OR(95%CI), with co-dominant and dominant models of 0.761 (0.595, 0.975) and 0.764 (0.601, 0.973)], respectively. Further stratification analyses show that the dominant, invisible, codominant models and alleles of the site were not statistically different among cardia cancer and non-cardia cancer patients ($P>0.05$). There was no correlation between the other 4 loci and the haplotype of *PIK3R1* (rs706711, rs706714) with susceptibility to gastric cancer ($P>0.05$). **CONCLUSION:** The *IRS1* rs10205233 locus was associated with gastric carcinogenesis in the Xianyou county, a high-risk area of gastric cancer in Fujian province. The T allele may be a genetic protective factor for gastric cancer.

【KEY WORDS】PI3K/Akt/mTOR signal pathway; autophagy; single nucleotide polymorphism; gastric cancer

收稿日期：2019-09-05；修订日期：2020-01-11

基金项目：福建省自然科学基金(2015J01673, 2017J01811)；福建省医学创新课题(2016-CX-41)

作者信息：舒智雄, E-mail: 821216552@qq.com。*通信作者, 刘宝英, E-mail: liuby5@126.com

胃癌是世界范围内常见的恶性肿瘤之一,居消化系统肿瘤的首位^[1],是我国农村地区上消化道肿瘤死亡首要原因^[2],福建省仙游县更是我国恶性肿瘤尤其是胃癌的高发区^[3]。大量研究表明自噬功能紊乱会导致肿瘤发生、影响肿瘤进展及预后^[4],近年来细胞自噬与胃癌的关系引起广泛关注^[5]。自噬的激活涉及众多信号通路,其中磷脂酰肌醇3-激酶、丝苏氨酸激酶和雷帕霉素靶蛋白(phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase/mechanistic target of rapamycin, PI3K/Akt/mTOR)等信号通路在自噬体的形成和成熟过程中发挥着关键性的作用^[6],抑制其信号传导可使自噬水平提高进而抑制肿瘤细胞的增殖^[7]。PI3K/Akt/mTOR 通路上基因单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphisms, SNPs)的存在可能导致其信号传递受阻,从而参与肿瘤的发生发展^[8],但目前尚未见系统性分析该通路上与自噬相关的基因单核苷酸多态性与胃癌的关联性的研究报道。因此,本研究采用SNP芯片联合生物信息学筛选仙游县胃癌患者血液中与对照人群间差异的PI3K/Akt/mTOR通路上相关基因SNPs,采用病例-对照研究分析筛选出来的SNPs与胃癌易感性的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

采用1:1配对的病例-对照研究,胃癌病例来源于福建省仙游县医院的胃癌新发病例。大样本纳入标准为:经手术或内窥镜取得组织标本,经病理确诊的新发病例;确诊日期为2013年4月—2017年3月;在仙游本地居住10年以上。芯片组纳入标准是在此基础上选择男性,年龄50~70岁,经病理确诊为胃腺癌的患者。排除标准:经病理确诊为胃部炎症、良性病变及病情危重或不能清晰回答问题者及肿瘤继发病例和复发病例。

健康对照纳入标准:按性别、年龄、地区与病例进行配对,其中芯片健康对照选择年龄 ± 3 岁与病例进行配对,大样本健康对照选择年龄 ± 5 岁与病例进行配对。选在仙游本地居住10年以上。排除标准为:胃癌或慢性萎缩性胃炎的直系家属。

以上标本均要求资料和血样完整,最后SNP芯片检测阶段我们纳入病例和对照各96例,均为男性,年龄分布在52~71岁。其中病例组平均年龄(63.8 ± 4.6)岁,对照组平均年龄(63.8 ± 4.7)岁。

在验证阶段纳入确诊胃癌病例622例,正常对照622例,其中男性466对,女性156对。病例组由312

例贲门癌患者和310例非贲门癌患者组成。病例组年龄分布在39~89岁,平均年龄为(67.3 ± 9.7)岁;对照组年龄分布在41~87岁,平均年龄为(67.2 ± 9.7)岁。经均衡性检验,病例组与对照组在年龄、性别、职业等方面差异均无统计学意义($P > 0.05$)。文化程度和婚姻状况差异有统计学意义($P < 0.05$)。病例组中高中及以上的文化程度比例低于对照组,已婚的婚姻状况比例高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

1.2 资料收集

采用统一设计的调查表,进行面对面的访谈式调查,内容包括研究对象的年龄、性别、文化程度、婚姻状况、职业史等相关因素,病例的病史资料经患者本人及医院同意后通过摘录电子病例获得。同时采集病例及对照人群的空腹外周静脉血5 mL,抽取的血样置于EDTA抗凝管,3 000 r/min离心10 min后,分装成血浆、白细胞、红细胞,置-80℃低温冰箱保存。本研究涉及的调查数据及人体数据,均已通过福建医科大学生物医学研究伦理委员会的审查,符合医学伦理相关规定和要求。

1.3 基因分型原理与位点的筛选

1.3.1 芯片基因分型原理 利用Affymetrix生产的920K Axiom Precision Medicine Research Array对病例和对照的外周血白细胞中的总DNA进行单核苷酸多态性基因型检测。基因芯片分型技术采用酶介导及单碱基测序的全自动化流程,共包含可检测的位点92万余个,其中80多万个SNPs及临床相关变异位点经过GWAS研究分析,对主要的祖先群体具有最佳的基因组覆盖率。

1.3.2 PI3K/Akt/mTOR通路上相关基因SNPs的筛选方法 通过KEGG pathway网站和Gene Ontology数据库汇总PI3K/Akt/mTOR、Autophagy通路(Homo sapiens)上所有基因,利用Ensemble数据库和HaploView软件查找二者交集基因SNPs,并与芯片中的取交集,得到芯片中PI3K/Akt/mTOR通路上与自噬有关基因SNPs,利用SPSS和Excel软件通过卡方检验筛选出以上SNPs在病例组和对照组中表达有差异($P < 0.05$)的位点。同时将以上具有统计学意义SNPs所在的基因通过STRING、Cytoscape软件做蛋白互作网络(protein protein interaction network, PPI network)分析基因编码蛋白间的相互作用,筛选关键节点基因。根据1000 Genomes Browser (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>)查找以上关键节点基因SNPs在中国南方汉族人群中的最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF),选择MAF在0.15~0.4



的位点,筛选功能预测有相应功能的SNPs,对各多态性位点进行Hardy-Weinberg遗传平衡度(H-W平衡)检验,选取基因型频率分布在健康对照人群中符合H-W平衡($P>0.05$)的位点作为候选基因位点进行后续实验分析。过程如图1。

1.3.3 大样本人群中基因分型原理与方法 在622对病例对照人群样本中将5个候选SNPs区域的DNA模板通过PCR技术扩增,再使用特异的延伸引物与PCR产物进行单碱基延伸反应。采用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)技术,检测延伸产物分子质量,应用专用的分析软件,通过判断分子大小的差异进行SNP分型检测。

ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术,检测延伸产物分子质量,应用专用的分析软件,通过判断分子大小的差异进行SNP分型检测。

1.4 PCR扩增引物设计

对5个候选SNPs进行基因型鉴定,使用Sequenom公司 Genotyping Tools 及 Mass ARRAY Assay Design 软件设计待测SNPs的PCR扩增引物及单碱基延伸引物,序列见表1。

表1 5个SNP位点引物序列

多态性位点	PCR引物	单碱基延伸引物
rs10205233	F: ACGTTGGATGTTCTCCACGCTTTCTTCTG R: ACGTTGGATGCTATCTCTAAAGGGTAAGGC	GGGTAAGGCTTTCCAAGGAC
rs3934934	F: ACGTTGGATGAACGTGGCAGGATAACCAAG R: ACGTTGGATGAGTTCACAAATGACACTGGG	GAACAAACTGATGCCCAA
rs706711	F: ACGTTGGATGCTGATATGCTCTATTGGTTGC R: ACGTTGGATGACTGGAAGTCTTTGTGGAGC	CCCCTCTCCGACAACTGAAATGC
rs706714	F: ACGTTGGATGCGCAGATGTTGAACAACAAGG R: ACGTTGGATGCATAACGACTCAACCCAAAC	GGGAGAGTCATTAAGCAACCAC
rs35285446	F: ACGTTGGATGAGGAGACGGGTGTGAGTGAA R: ACGTTGGATGTCTGTGTGCTGGGCTGGGAT	GGGATGCCGAAGACAA

1.5 质量控制

按以下标准进行质量控制:①所有病例均经过病理确诊;②剔除DNA总量 $<0.6\text{ }\mu\text{g}$ 、存在降解、有小片段RNA污染及未能检测出基因型的样本;③芯片分型过程中使用评估信号值分布与背景信号值的差异(Dish QC)对样品进行质控,剔除Dish QC低于0.82的样品;④基因型的检测和判读采用盲法;⑤芯片检测与MALDI-TOF-MS技术检测进行结果一致性的比较。

本次实验Dish QC均大于0.82,所有样品都通过质量检测。所有样本选择2%的SNPs进行重复检测,一致性为98.47%。前两批采用MALDI-TOF-MS检测的42个SNPs与芯片中的取交集得到5个位点,比较这5个位点分型结果,发现两种方法检测结果一致性好,且分型失败率低,说明芯片分型结果可靠,如表2所示。

软件进行数据录入并建立数据库。采用 χ^2 检验计算对照组的各基因多态性位点分布是否符合H-W平衡,并进行一般人口学资料的均衡性及两组间的SNPs的表达是否有差异的检验;采用Cox Regression命令拟合条件Logistic模型对单个位点的基因型、等位基因在不同胃癌部位进行单因素Logistic分析,计算其比值比OR(odds ratio, OR)及95%可信区间(confidential interval, CI),模型中对相关混在因素进行调整。以上分析均使用SPSS 24.0软件包完成。所有P值基于双侧检验,统计学检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 芯片中PI3K/Akt/mTOR通路基因SNPs筛选情况

按照上述筛选策略,各步结果如图1。根据基因编码蛋白网络图显示至少与4个蛋白相互作用(图2),且Confidence Score >0.8 (表3)筛选得到*IRS1*、*PIK3CD*、*PIK3R1*、*AKT1*、*RPS6KB1*、*PPP2CA*等关键节点基因。与胃癌相关的PI3K/Akt/mTOR通路上自噬相关关键节点中满足MAF和H-W标准的共4个基因5个SNPs,分别为*IRS1* rs10205233、*PIK3CD* rs3934934、*PIK3R1* rs706711、*PIK3R1* rs706714、*AKT1* rs35285446,详见表4。

表2 两种检测方法检测相同SNP的一致性情况

SNP ID	总碱基数	一致碱基数	一致率/%
rs10431294	38	36	94.74
rs2515402	38	36	94.74
rs2724377	124	121	97.58
rs7290134	124	124	100.00
rs1805034	118	117	99.15
合计	442	434	98.19

1.6 统计学方法

所有实验室数据经复查和核对后应用EpiData3.1

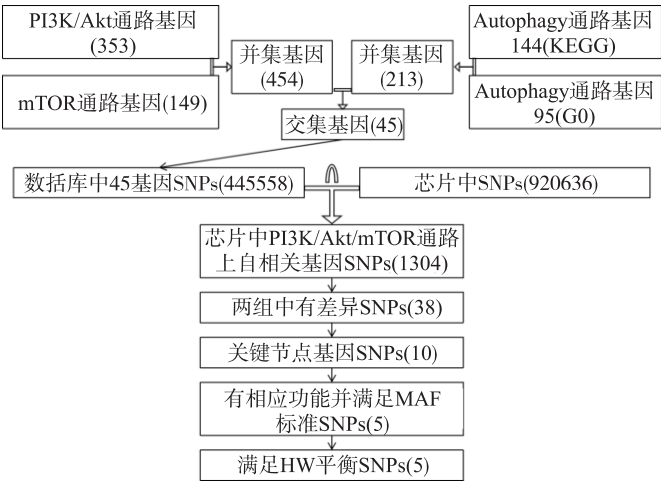
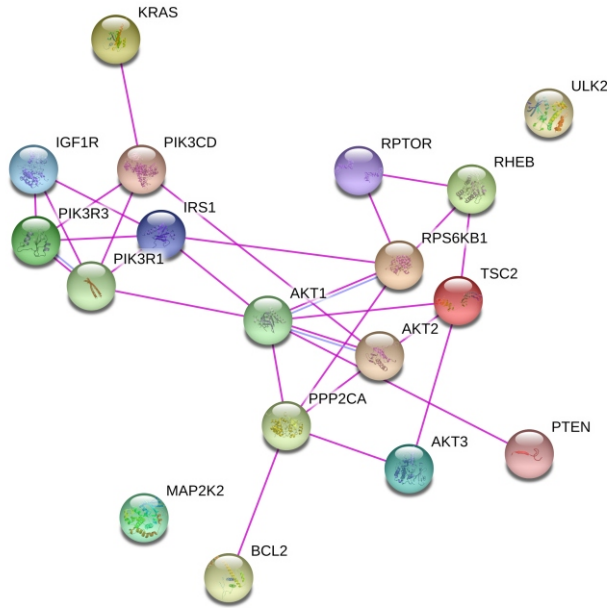


图1 PI3K/Akt/mTOR通路上自噬相关基因筛选结果图



图中每一个圈代表一个蛋白；红线代表有实验证据表面二者间有相互作用，蓝线表示二者为同源蛋白；线段长短代表两蛋白间作用紧密程度，越短关系越密切。
图2 PI3K/Akt/mTOR通路上与胃癌相关的自噬相关基因编码蛋白网络图

表3 与胃癌相关基因编码蛋白在STRING数据库分析相互作用的综合得分

节点1	节点2	节点1_ID	节点2_ID	综合得分
PPP2CA	AKT2	ENSP00000418447	ENSP00000375892	0.993
AKT1	PPP2CA	ENSP00000451828	ENSP00000418447	0.993
PPP2CA	AKT3	ENSP00000418447	ENSP00000263826	0.993
RPTOR	RHEB	ENSP00000307272	ENSP00000262187	0.971
AKT1	RPS6KB1	ENSP00000451828	ENSP00000225577	0.892
RHEB	TSC2	ENSP00000262187	ENSP00000219476	0.856
AKT1	AKT2	ENSP00000451828	ENSP00000375892	0.832
PIK3R1	PIK3R3	ENSP00000428056	ENSP00000262741	0.827
PIK3R1	PIK3CD	ENSP00000428056	ENSP00000366563	0.814
PIK3CD	KRAS	ENSP00000366563	ENSP00000256078	0.809

篇幅有限，仅列出综合得分(confidence score)>0.8的部分。

表4 芯片筛查后用于进行大样本验证的相关基因及其位点

基因	位点	遗传变异	物理位置	P ^a	MAF ^b	H-W P ^c
IRS1	rs10205233	C/T	2: 227 614 005	0.045	0.181	0.456
PIK3CD	rs3934934	A/G	1: 9 776 339	0.049	0.176	0.290
PIK3R1	rs706711	A/G	5: 67 520 226	0.010	0.286	0.598
PIK3R1	rs706714	A/C	5: 67 522 851	0.022	0.281	0.596
AKT1	rs35285446	-/T	14: 105 249 085	0.018	0.367	0.543

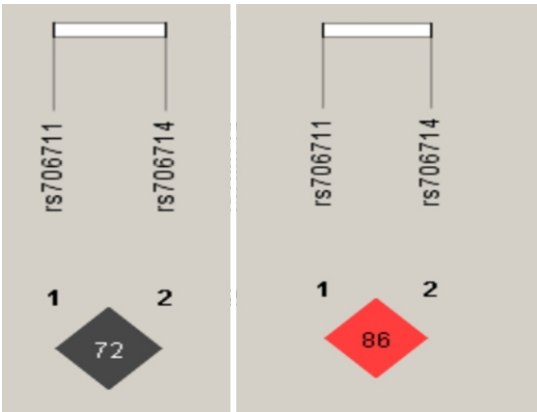
a: 芯片阶段基因型在病例组和对照组中分布的 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义; b: 中国南方汉族人群 MAF; c: 在 96 例健康人群中进行 H-W 检验, H-W $P>0.05$ 表示均衡可比。

2.2 PI3K/Akt/mTOR 通路上自噬相关基因 SNPs 与胃癌易感性研究

本次选取的 5 个 SNPs 位点的基因型频率分布在 622 例对照组中符合 H-W 平衡($P>0.05$)。Cox 回归分析结果显示, 在调整了婚姻状况与文化程度之后, *IRS1* rs10205233 的多态性变异(C>T)显著降低了胃癌的发病风险[共显性模型、显性模型的 *OR*(95%*CI*)分别为 0.761(0.595, 0.975)、0.764(0.601, 0.973)], 进一步分层分析, 该位点显性模型、隐性模型、共显性模型以及等位基因在贲门癌和非贲门癌人群中均未见统计学差异($P>0.05$)。此外, 尚未发现其余 4 个位点的共显性模型、等位基因、显性模型及隐性模型与胃癌、贲门癌、非贲门胃癌的发病风险存在关联。结果详见表 5~9。

2.3 PIK3R1 单体型分析

我们所研究的 *PIK3R1* 基因 2 个多态性位点的连锁不平衡分析(图 3)显示 2 位点间具有强连锁不平衡关系, 2 位点共可产生 4 个单体型 SNP 位点, 排列顺序依次为 rs706711、rs706714, 结果单体型 1、2、3、4 在病例和对照组的分布差异均无统计学意义($P>0.05$)。表 10。



左: r^2 值; 右: D' 值。
图3 rs706711 与 rs706714 之间的连锁关系分析

3 讨论

细胞自噬的生物学功能在许多类型肿瘤中已得到



表5 *IRS1*基因rs10205233位点与胃癌易感性的Cox回归分析

rs10205233	胃癌			贲门癌			非贲门癌		
位点	病例/对照	OR*(95%CI)	P	病例/对照	OR*(95%CI)	P	病例/对照	OR*(95%CI)	P
共显性									
CC	448/409	1		224/205	1		224/204	1	
CT	159/196	0.761(0.595, 0.975)	0.031**	81/100	0.761(0.538, 1.076)	0.122	78/96	0.772(0.541, 1.103)	0.156
TT	15/17	0.804(0.394, 1.637)	0.547	7/7	0.912(0.310, 2.685)	0.868	8/10	0.795(0.303, 2.085)	0.641
等位基因									
C	1055/1014	1		529/510	1		526/504	1	
T	189/230	0.861(0.722, 1.027)	0.097	95/114	0.872(0.68, 1.117)	0.278	94/116	0.867(0.675, 1.115)	0.266
显性模型									
CC	448/409	1		224/205	1		224/204	1	
CT+TT	174/213	0.764(0.601, 0.973)	0.029**	88/107	0.770(0.548, 1.081)	0.131	86/106	0.774(0.548, 1.094)	0.147
隐性模型									
CC+CT	607/605	1		305/305	1		302/300	1	
TT	15/17	0.88(0.434, 1.783)	0.723	7/7	1.013(0.347, 2.953)	0.982	8/10	0.865(0.332, 2.249)	0.765

*: OR 经婚姻状况、文化程度进行调整; ** $P<0.05$.表6 *PIK3CD*基因rs3934934位点与胃癌易感性的Cox回归分析

rs3934934 位点	胃癌				贲门癌				非贲门癌			
	病例/对照	OR*(95%CI)	P		病例/对照	OR*(95%CI)	P		病例/对照	OR*(95%CI)	P	
共显性												
AA	411/431	1			206/210	1			205/221	1		
AG	192/178	1.104(0.863, 1.412)	0.433		97/95	0.986(0.695, 1.398)	0.936		95/83	1.222(0.859, 1.737)	0.265	
GG	19/13	1.472(0.701, 3.090)	0.308		9/7	1.410(0.513, 3.876)	0.506		10/6	1.571(0.512, 4.822)	0.429	
等位基因												
A	1014/1040	1			509/515	1			505/525	1		
G	230/204	1.081(0.915, 1.276)	0.361		115/109	1.027(0.814, 1.295)	0.822		115/95	1.133(0.892, 1.439)	0.307	
显性模型												
AA	411/431	1			206/210	1			205/221	1		
AG+GG	211/191	1.128(0.887, 1.433)	0.325		106/102	1.017(0.726, 1.424)	0.923		105/89	1.241(0.879, 1.753)	0.221	
隐性模型												
AA+AG	603/609	1			303/305	1			300/304	1		
GG	19/13	1.429(0.683, 2.990)	0.343		9/7	1.414(0.516, 3.876)	0.500		10/6	1.458(0.480, 4.429)	0.506	

*: *OR*经婚姻状况、文化程度进行调整.

表7 *PIK3R1* 基因 rs706711 位点与胃癌易感性的 Cox 回归分析

rs706711 位点	胃癌			贲门癌			非贲门癌		
	病例/对照	OR*(95%CI)	P	病例/对照	OR*(95%CI)	P	病例/对照	OR*(95%CI)	P
共显性模型	0								
AA	325/343	1		172/169	1		153/174	1	
AG	252/245	1.093(0.859, 1.390)	0.468	123/127	0.989(0.700, 1.397)	0.949	129/118	1.241(0.881, 1.749)	0.217
GG	45/34	1.359(0.846, 2.183)	0.205	17/16	1.153(0.564, 2.357)	0.697	28/18	1.645(0.858, 3.153)	0.134
等位基因									
A	902/931	1		467/465	1		435/466	1	
G	342/313	1.076(0.930, 1.245)	0.324	157/159	1.017(0.825, 1.253)	0.878	185/154	1.15(0.937, 1.411)	0.180
显性模型									
AA	325/343	1		172/169	1		153/174	1	
AG+GG	297/279	1.124(0.891, 1.419)	0.324	140/143	1.008(0.722, 1.407)	0.962	157/136	1.287(0.922, 1.796)	0.138
隐性模型									
AA+AG	577/588	1		295/296	1		282/292	1	
GG	45/34	1.299(0.822, 2.053)	0.263	17/16	1.159(0.576, 2.329)	0.679	28/18	1.456(0.784, 2.704)	0.234

*: *OR* 经婚姻状况、文化程度进行调整.

证实,在细胞废物清除、结构重建、生长发育中起重要作用^[9]。自噬的发生是一个复杂的受严格调节的细胞内容物的降解和再循环的动态过程,涉及多条信号

通路,并由将近40个自噬相关基因编码的自噬相关蛋白调节^[10]。其中PI3K/Akt/mTOR信号作为一条经典的抗凋亡、促存活通路,其异常激活在肿瘤形成中有着

表8 *PIK3R1* 基因 rs706714 位点与胃癌易感性的 Cox 回归分析

rs706714 位点	胃癌			贲门癌			非贲门癌		
	病例/对照	OR*(95%CI)	P	病例/对照	OR*(95%CI)	P	病例/对照	OR*(95%CI)	P
共显性模型									
AA	50/36	1		21/18	1		29/18	1	
AC	250/248	0.759(0.476, 1.211)	0.247	129/123	0.992(0.497, 1.977)	0.981	121/125	0.611(0.319, 1.172)	0.138
CC	322/338	0.725(0.461, 1.141)	0.164	162/171	0.860(0.441, 1.677)	0.658	160/167	0.639(0.340, 1.200)	0.164
等位基因									
A	350/320	1		171/159	1		179/161	1	
C	894/924	0.933(0.809, 1.077)	0.345	453/465	0.932(0.761, 1.141)	0.495	441/459	0.932(0.761, 1.143)	0.499
显性模型									
AA	50/36	1		21/18	1		29/18	1	
AC+CC	572/586	0.738(0.473, 1.150)	0.180	291/294	0.906(0.469, 1.749)	0.768	281/292	0.628(0.340, 1.161)	0.138
隐性模型									
AA+AC	300/284	1		150/141	1		150/143	1	
CC	322/338	0.914(0.73, 1.145)	0.434	162/171	0.866(0.633, 1.184)	0.368	160/167	0.956(0.687, 1.331)	0.792

*: OR 经婚姻状况、文化程度进行调整.

表9 *AKT1* 基因 rs35285446 位点与胃癌易感性的 Cox 回归分析

rs35285446 位点	胃癌			贲门癌			非贲门癌		
	病例/对照	OR*(95%CI)	P	病例/对照	OR*(95%CI)	P	病例/对照	OR*(95%CI)	P
共显性									
DEL	283/276	1		141/138	1		142/138	1	
DEL.T	280/278	0.984(0.781, 1.240), 0.889		135/140	0.936(0.670, 1.308), 0.698		145/138	1.056(0.763, 1.464), 0.741	
TT	59/68	0.869(0.585, 1.290), 0.486		36/34	1.000(0.584, 1.714), 0.999		23/34	0.738(0.402, 1.354), 0.327	
等位基因									
DEL	846/830	1		417/416	1		429/414	1	
T	398/414	0.969(0.845, 1.111), 0.649		207/208	0.986(0.811, 1.197), 0.884		191/206	0.964(0.794, 1.170), 0.710	
显性模型									
DEL	283/276	1		141/138	1		142/138	1	
DEL.T+TT	339/346	0.963(0.772, 1.201), 0.737		171/174	0.947(0.687, 1.305), 0.740		168/172	0.998(0.732, 1.363), 0.992	
隐性模型									
DEL+DEL.T	563/554	1		276/278	1		287/276	1	
TT	59/68	0.876(0.600, 1.279), 0.493		36/34	1.038(0.626, 1.721), 0.886		23/34	0.720(0.400, 1.298), 0.275	

*: OR 经婚姻状况、文化程度进行调整.

表10 *PIK3R1* 不同单体型与胃癌遗传易感性的关系

单体型	胃癌			贲门癌			非贲门癌		
	病例/对照	OR*(95%CI)	P	病例/对照	OR*(95%CI)	P	病例/对照	OR*(95%CI)	P
Hap1(AA)	251/257	—		126/134	—		125/123	—	
Hap2(AC)	680/645	0.935(0.780, 1.121)	0.467	339/333	0.921(0.716, 1.185)	0.521	341/312	0.937(0.719, 1.220)	0.627
Hap3(GA)	69/93	1.243(0.898, 1.722)	0.190	33/37	1.060(0.655, 1.717)	0.811	36/56	1.432(0.912, 2.248)	0.119
Hap4(GC)	244/249	1.003(0.840, 1.198)	0.970	126/120	0.961(0.748, 1.236)	0.757	118/129	1.056(0.821, 1.359)	0.672

*: OR 经婚姻状况、文化程度进行调整.

极其重要作用^[11]。Singh 等^[12]通过分析 PIK3CA、PTEN、mTOR 等分子作用机制，并使用 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制剂观察胃癌细胞的恶化状态，发现胃癌细胞中存在 PI3K/Akt/mTOR 信号通路，推断出使用 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制剂能改善胃癌细胞恶化状态。此外，Liu 等^[13]研究发现，在胃癌细胞中，PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白的含量较正常细胞多，并且人体对细胞异变的防卫组织会排斥这种蛋白，这也说明该通路蛋白是导致胃癌发生的一个重要原因。由此可知，PI3K/Akt/mTOR 信号通路可调控胃癌细胞的增

殖生长，是使胃部细胞恶化的重要通路。但目前尚未见系统性分析自噬通路相关基因与胃癌关联性的研究，因此我们采用 SNP 芯片较系统地研究 PI3K/Akt/mTOR 通路上自噬相关基因 SNPs 与胃癌易感性的关联。

本研究首先通过 KEGG 等数据库筛选出 45 个 PI3K/Akt/mTOR 通路上自噬相关基因极其 445 558 个标签 SNPs，为了更广泛地筛选自噬通路新基因 SNPs，我们将以上所有标签 SNPs 与 SNP 芯片中的位点做交集，发现有 1 304 个 PI3K/Akt/mTOR 通路上自



噬相关基因 SNPs 位于芯片中。通过卡方检验后发现 38 个 SNPs 基因分型在胃癌病例和对照中分布差异有统计学意义。但这些位点有些在人群中的变异率很低,有些所对应的基因并不直接受调控因素的影响,而是通过基因间相互作用,间接受调控因素变化影响。因此我们进一步通过生物信息学分析筛选出 PI3K/Akt/mTOR 通路上可能与胃癌有关联的 4 个自噬相关的关键节点基因(*IRS1*、*PIK3CD*、*PIK3R1*、*AKT1*)及其 5 个 SNPs,然后对其进行大样本验证,最后发现 *IRS1* rs10205233 位点与胃癌的易感性相关,而其他位点与胃癌发病风险无关联,并且 5 个位点均未见文献报道与肿瘤相关。

在许多癌症研究中证实,PI3K/Akt/mTOR 信号通路作为联系胞外信号和胞内应答效应的桥梁分子,可对细胞的生长、增殖、凋亡、迁移等一系列的生理功能产生作用,从而影响癌症的发生及转归。Beclin1 蛋白在调节自噬起始囊泡形成的过程中起关键作用,*Beclin1* 是酵母 *ATG6* 在哺乳动物中调节自噬的同源基因,是自噬第一阶段不可或缺的基因^[14],而在 Beclin1 依赖的自噬中,PI3K 活性在自噬体形成中至关重要^[15]。PI3K 是一类脂质激酶,其主要的生化功能是促使磷酸肌醇的 3-羟基基团磷酸化。研究认为,通过酪氨酸激酶受体、细胞黏附分子、G 蛋白偶联受体等的活化,PI3K 可以催化磷脂肌醇(PI)产生 PIP3、PIP4 和 PIP5。PIP3 结合并激活蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB 或 Akt)和 PDK-1,从而使哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)磷酸化,进而激活一系列下游信号通路,抑制自噬的发生^[16]。mTOR 信号作为调控自噬的一条经典通路,在自噬体的形成和成熟过程中发挥着关键性的作用,同时也具有联系多种自噬调控信号通路的作用,抑制 mTOR 信号可使自噬水平提高进而抑制肿瘤细胞的增殖。mTOR 蛋白是一种丝/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶,而 PI3K/Akt 具有 Ser/Thr 激酶的活性,是 mTOR 的上游信号。已有大量实验研究证明^[17-18],PI3K/Akt/mTOR 信号通路可调控许多与细胞代谢、凋亡、增殖和分化有关的蛋白,因此该通路上相关基因单核苷酸多态性的改变可能会影响多种蛋白活性,影响通路的生物学功能,进而影响肿瘤的发生与发展^[19]。

我们扩大样本量后的病例对照研究发现 PI3K/Akt/mTOR 信号通路上 *IRS1* rs10205233 位点(C>T)多态性变异降低了胃癌的发病风险。而胰岛素受体底物 1(insulin receptor substrate, *IRS1*)又是 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的上游信号,Lecker SH 等^[20]发现, *IRS1*/PI3K/AKT1 信号通路的启动取决于 *IRS1* 的活性,当细

胞外的胰岛素信号通过胰岛素受体和 *IRS1* 传递到胞内以后,活化的 *IRS1* 激活 PI3K,再使其下游的信号分子 AKT1 磷酸化,进而将信号传递到 mTOR 通路。多项研究表明 *IRS1* 单核苷酸多态性与肿瘤有关^[21-22],如 Jung 等^[23]的研究发现 *IRS1* rs1801123、*IRS1* rs1801278 与年龄等因素的联合作用显著增加了患结直肠癌的风险。因此,我们推测 *IRS1* rs10205233 位点突变后,使 *IRS1* 转录翻译受阻,无法将信号传递给 PI3K/Akt,进而抑制 mTOR 的激活,引起细胞周期 G1 期的延缓或阻滞,诱导胃癌细胞凋亡^[24],并提高自噬水平将癌细胞吞噬降解,从而抑制癌细胞的增殖。

rs10205233 位点可能是新的胃癌患者的遗传易感标志物,与福建省胃癌高发区仙游县的胃癌发生发展有关。胃癌的发生发展受到多通路、复杂的级联调控,节点基因交织在一起,形成复杂的调控网络,调节着自噬水平,基因突变容易使其丧失对自噬的调控从而导致胃癌的发生。本研究从信号通路入手,通过 Affymetrix Axiom 芯片技术与生物信息学方法,更科学、有效地筛选出符合要求的基因位点,为胃癌的分子机制研究提供基础资料,为筛查胃癌易感人群和胃癌早期诊断提供基础数据。但同时也需要更多相关的功能性研究来阐明所发现阳性位点的生物学致病机理以及探索更多未知信号通路,绘制全面的胃癌发生发展的信号通路图,更深入地了解自噬相关基因变异在胃癌发生发展中的作用机制。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 孙可欣,郑荣寿,张思维,等. 2015 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2019, 28(1): 1-11.
- [3] 李丹,杨发宏,肖文杰,等. 福建省仙游县 2011—2012 年胃癌死亡及生存状况分析[J]. 中国预防医学杂志, 2015, 16(6): 429-433.
- [4] WHITE E. The role for autophagy in cancer[J]. J Clin Invest, 2015, 125(1): 42-46.
- [5] ZHOU H Y, YUAN M, YU Q F, et al. Autophagy regulation and its role in gastric cancer and colorectal cancer[J]. Cancer Biomark, 2016, 17(1): 1-10.
- [6] JIANG J, XU Y T, REN H J, et al. MKRN2 inhibits migration and invasion of non-small-cell lung cancer by negatively regulating the PI3K/Akt pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 189.
- [7] HAAS N B, APPLEMAN L J, STEIN M, et al. Autophagy

- inhibition to augment mTOR inhibition: a phase I/II trial of everolimus and hydroxychloroquine in patients with previously treated renal cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(7): 2080–2087.
- [8] GE Y Q, LIU H T, QIU X N, et al. Genetic variants in PI3K/Akt/mTOR pathway genes contribute to gastric cancer risk[J]. *Gene*, 2018, 670: 130–135.
- [9] PARZYCH K R, KLIONSKY D J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3): 460–473.
- [10] TOOZE S A, DIKIC I. Autophagy captures the Nobel prize[J]. *Cell*, 2016, 167(6): 1433–1435.
- [11] LIM H J, CROWE P, YANG J L. Current clinical regulation of PI3K/PTEN/Akt/mTOR signalling in treatment of human cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(4): 671–689.
- [12] SINGH S S, YAP W N, ARFUSO F, et al. Targeting the PI3K/Akt signaling pathway in gastric carcinoma: a reality for personalized medicine?[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(43): 12261–12273.
- [13] LIU Y W, CHEN S, XUE R, et al. Mefloquine effectively targets gastric cancer cells through phosphatase-dependent inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470(2): 350–355.
- [14] WIRTH M, JOACHIM J, TOOZE S A. Autophagosome formation: the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage[J]. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23(5): 301–309.
- [15] CHIU W J, LIN S R, CHEN Y H, et al. Prodigiosin-emerged PI3K/beclin-1-independent pathway elicits autophagic cell death in doxorubicin-sensitive and -resistant lung cancer[J]. *J Clin Med*, 2018, 7(10): E321.
- [16] YANG H, NI H M, DING W X. The double-edged sword of MTOR in autophagy deficiency induced-liver injury and tumorigenesis[J]. *Autophagy*, 2019, 15(9): 1671–1673.
- [17] ZHANG Q, ZHU H X, XU X S, et al. Inactivated Sendai virus induces apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathway in human non-small cell lung cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 465(1): 64–70.
- [18] DUAN S Y, HUANG W Q, LIU X T, et al. IMPDH2 promotes colorectal cancer progression through activation of the PI3K/AKT/mTOR and PI3K/AKT/FOXO1 signaling pathways[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 304.
- [19] BIZHANI F, HASHEMI M, DANESH H, et al. Association between single nucleotide polymorphisms in the PI3K/AKT/mTOR pathway and bladder cancer risk in a sample of Iranian population[J]. *EXCLI J*, 2018, 17: 3–13.
- [20] LECKER S H, GOLDBERG A L, MITCH W E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(7): 1807–1819.
- [21] WANG G, PAN J G, ZHANG L, et al. Long non-coding RNA CRNDE sponges miR-384 to promote proliferation and metastasis of pancreatic cancer cells through upregulating IRS1 [J]. *Cell Prolif*, 2017. DOI: 10.1111/cpr.12389.
- [22] WANG C, JEONG K, JIANG H Y, et al. YAP/TAZ regulates the insulin signaling via IRS1/2 in endometrial cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(5): 996–1010.
- [23] JUNG S Y, ZHANG Z F. The effects of genetic variants related to insulin metabolism pathways and the interactions with lifestyles on colorectal cancer risk[J]. *Menopause*, 2019, 26(7): 771–780.
- [24] ALIWAINI S, AWADALLAH A M, MORJAN R Y, et al. Novel imidazo[1, 2-a]pyridine inhibits AKT/mTOR pathway and induces cell cycle arrest and apoptosis in melanoma and cervical cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(1): 830–837.

《癌变·畸变·突变》杂志2021年征订启事

《癌变·畸变·突变》杂志是中国科学技术协会主管、中国环境诱变剂学会(国家一级学会)主办、汕头大学医学院承办、科学出版社出版的学术期刊,1989年创刊,国内外公开发行。本刊宗旨:介绍环境因子致癌、致畸变和致突变领域的新理论、新技术、新方法以及国内外研究动态,开展学术交流,促进本学科的繁荣与发展。本刊为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、《中国学术期刊综合评价数据库》统计源期刊,《中文科技资料目录——医药卫生》收录源期刊,《中国科技期刊引证报告》及《中国学术期刊文摘》收录期刊,被《中国期刊网》和《中国期刊全文数据库》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中文科技期刊数据库》、《中国生物医学文献数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库》、《中国核心期刊(遴选)数据库》全文收录。

本刊主要刊载内容:①药物、农药、食品添加剂、化妆品、营养保健品、其他化学物质、放射线,以及水体、空气、土壤中存在的环境污染与肿瘤发生、胎儿发育畸形、遗传基因突变的关系;②癌变机制;③抗突变物与抗癌物的开发利用;④环境风险因子评价;⑤相关医学基础与临床研究等。本刊设有“专家述评”、“论著”、“肿瘤防治”、“研究简报”、“相关医学基础与临床”、“技术与方法”及“综述”等栏目。

(下转第131页)



- [10] RHODES D R, YU J J, SHANKER K, et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform [J]. *Neoplasia*, 2004, 6(1): 1–6.
- [11] TANG Z F, LI C W, KANG B X, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W98–W102.
- [12] FRANZ M, RODRIGUEZ H, LOPES C, et al. GeneMANIA update 2018[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(W1): W60–W64.
- [13] WARDE-FARLEY D, DONALDSON S L, COMES O, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Web Server issue): W214–W220.
- [14] KANEHISA M, FURUMICHI M, TANABE M, et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D353–D361.
- [15] KANEHISA M, SATO Y, FURUMICHI M, et al. New approach for understanding genome variations in KEGG[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D590–D595.
- [16] CONRAD M, SATO H. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x (c) (–): cystine supplier and beyond[J]. *Amino Acids*, 2012, 42(1): 231–246.
- [17] ROBERT S M, BUCKINGHAM S C, CAMPBELL S L, et al. SLC7A11 expression is associated with seizures and predicts poor survival in patients with malignant glioma[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(289): 289ra86.
- [18] MA Z H, ZHANG H, LIAN M, et al. SLC7A11, a component of cysteine/glutamate transporter, is a novel biomarker for the diagnosis and prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(5): 3019–3029.
- [19] SHIOZAKI A, IITAKA D, ICHIKAWA D, et al. xCT, component of cysteine/glutamate transporter, as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Gastroenterol*, 2014, 49(5): 853–863.
- [20] GAO M H, MONIAN P, QUADRI N, et al. Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis[J]. *Mol Cell*, 2015, 59(2): 298–308.
- [21] DAHLMANN M, YAKUBOV E, CHEN D S, et al. Chemotherapeutic xCT inhibitors sorafenib and erastin unraveled with the synaptic optogenetic function analysis tool [J]. *Cell Death Discov*, 2017, 3: 17030.
- [22] WADA F, KOGA H, AKIBA J, et al. High expression of CD44v9 and xCT in chemoresistant hepatocellular carcinoma: Potential targets by sulfasalazine[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(9): 2801–2810.
- [23] LIN C H, LIN P P, LIN C Y, et al. Decreased mRNA expression for the two subunits of system xc(–), SLC3A2 and SLC7A11, in WBC in patients with schizophrenia: Evidence in support of the hypo-glutamatergic hypothesis of schizophrenia [J]. *J Psychiatr Res*, 2016, 72: 58–63.
- [24] CHEN L, CUI H M. Targeting glutamine induces apoptosis: a cancer therapy approach[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 22830–22855.
- [25] HENSLEY C T, WASTI A T, DEBERARDINIS R J. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(9): 3678–3684.
- [26] WALKER D K, DRUMMOND M J, DICKINSON J M, et al. Insulin increases mRNA abundance of the amino acid transporter SLC7A5/LAT1 via an mTORC1-dependent mechanism in skeletal muscle cells[J]. *Physiol Rep*, 2014, 2(3): e00238.

(上接第125页)

读者对象：从事遗传学、毒理学、药理学、肿瘤学研究及环境保护、卫生防疫、计划生育、肿瘤防治、药品与生物制品研制等工作的科技人员和相关领域的大专院校师生。

知名专家的专题述评、内容丰富的研究论文、高质量的装帧与印刷将使本刊成为您从事科学研究的得力助手与展示您研究成果的理想园地。

本刊为双月刊，大16开本，内文80页，封面纸张采用200克进口铜版纸，内页采用105克进口铜版纸，随文排彩色图版。国内刊号：CN 44–1063/R，邮发代号：80–285，北京市报刊发行局发行。国际刊号：ISSN 1004–616X，国外发行代号：6364 (BM)，中国国际图书贸易总公司发行。国内定价每期10.00元，全年订价：60.00元。

2021年征订工作即将开始，欢迎新老客户订阅。如漏订者可直接向编辑部订阅(免邮寄费)，也可在当地邮局补订。

联系方式：广东省汕头市新陵路22号(汕头大学医学院内)，《癌变·畸变·突变》编辑部收。

邮 编：515041；电话及传真：0754–88900267；E-mail: office@egh.net.cn；主页：www.egh.net.cn

