

基因芯片技术对结直肠癌相关基因SNPs位点的相关性分析

邹江, 张国梁, 姚宏昌, 谭东毅

邹江, 张国梁, 姚宏昌, 谭东毅, 天津第一中心医院 天津市 300192

作者贡献分布: 此课题由姚洪昌指导; 邹江设计; 研究过程由邹江、张国梁及谭东毅操作完成; 数据分析由邹江完成; 本论文写作由邹江与谭东毅完成。

通讯作者: 邹江, 主任医师, 300192, 天津市, 天津第一中心医院消化科. ericzou@yahoo.com.cn

电话: 022-23626816

收稿日期: 2010-07-06 修回日期: 2010-08-02

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-28

Chip-based analysis of single nucleotide polymorphisms in colorectal cancer-related genes

Jiang Zou, Guo-Liang Zhang, Hong-Chang Yao, Dong-Yi Tang

Jiang Zou, Guo-Liang Zhang, Hong-Chang Yao, Dong-Yi Tang, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China
Correspondence to: Jiang Zou, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China. ericzou@yahoo.com.cn
Received: 2010-07-06 Revised: 2010-08-02
Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To detect single nucleotide polymorphisms (SNPs) in colorectal cancer (CRC)-related genes using gene chip technology and to investigate the relationship between these SNPs and the risk of developing CRC.

METHODS: Blood samples collected from 20 CRC patients and 30 healthy adults were used for DNA extraction, PCR amplification and SNP genotyping using the GenomeLab™ SNPstream Genotyping System. We tested 12 SNPs in 8 genes which were known to be related to the carcinogenesis of CRC. The relationship between the SNPs and the risk of developing CRC was then analyzed.

RESULTS: A significant association was observed between 2 SNPs (MTRR-01 and CYP19A1-06) and the risk of developing CRC (both $P < 0.05$). A significant association was also noted among CYP19A1-09, CYP19A1-06, CYP19A1-14 and CYP19A1-01, which had strong LD ($D' > 0.75$) in pairwise LD.

CONCLUSION: Two SNPs (MTRR-01 and CYP19A1-06) are related to the susceptibility to CRC. SNP array is a simple and fast method to detect SNPs in colorectal cancer-related genes.

Key Words: Colorectal cancer; Polymorphism; Single nucleotide; Oligonucleotide array sequence analysis

Zou J, Zhang GL, Yao HC, Tang DY. Chip-based analysis of single nucleotide polymorphisms in colorectal cancer-related genes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2929-2933

摘要

目的: 探讨结直肠癌(CRC)相关基因的单核苷酸多态性(SNPs)位点与结直肠癌(CRC)发生发展的关联性。

方法: 对20例CRC患者和30例正常对照组血液标本进行DNA提取、PCR扩增及SNPs芯片测序分析, 检测选定的同CRC发病关系较为密切的8个基因中的12个SNPs位点, 对其实验结果进行分析, 判断各位点与CRC的关联性。

结果: MTRR-01、CYP19A1-09与CRC之间有较强的关联性($P < 0.05$); 连锁不平衡(LD)分析发现, CYP19A1-09、CYP19A1-06、CYP19A1-14、CYP19A1-01存在强LD($D' > 0.75$), 其SNPs位点之间有明确的相关性。

结论: 本研究发现2个SNPs位点与CRC发病有密切联系, 应用SNPs芯片技术研究CRC相关基因是一种简便、快捷的方法。

关键词: 结直肠肿瘤; 多态性; 单核苷酸; 寡核苷酸序列分析

邹江, 张国梁, 姚宏昌, 谭东毅. 基因芯片技术对结直肠癌相关基因SNPs位点的相关性分析. *世界华人消化杂志* 2010; 18(27): 2929-2933

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2929.asp>

0 引言

近年研究发现, 结直肠癌(colorectal cancer, CRC)

■背景资料

单核苷酸多态性(SNPs)是指在基因组内某一特定核苷酸位置上存在两种碱基, 其在群体中的分布频率不低于1%。作为第3代分子遗传标记, 具有比第1代、第2代遗传标记更高的密度、稳定和易于分型检测的优势, 因而在疾病特别是多基因疾病研究领域显示出了巨大的优势。

■同行评议者

周素芳, 教授, 广西医科大学科技处

■研究前沿

SNPs的解读给疾病的防治带来了一场革命,关于SNPs的研究已成为人类基因组计划于肿瘤基因组解剖计划(CGAP)中的重要补充和研究热点。其中SNPs与结肠癌的关系目前已成为研究热点。

的发生与发展过程与众多基因的异常相关,除了以往关注较多的*K-ras*、*p53*等基因外,白介素(interleukin, IL)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、细胞色素P450(cytochrome P450, CYP)等代谢酶基因多态性也都受到了相当的重视。随着分子生物学的不断进展,越来越多的研究显示单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)位点与基因的表达调控密切相关^[1]。尽管已经鉴定出了大量的SNPs位点,但对于与CRC有关的SNPs研究还不够完善。2006-04/2008-04,我们根据前人研究报道选择CRC易感基因的SNPs,进一步研究其与CRC发病的关联性。

1 材料和方法

1.1 材料 病例组收集2006-04/2008-04天津第一医院收治的结直肠癌患者20例术前血液标本。所收集病例均为CRC散发病例,排除家族性腺瘤样息肉病和遗传性非息肉病性CRC等典型遗传性CRC。患者术前均未接受放、化疗,其中男7例、女13例,年龄41-84(65.35 ± 11.95)岁。临床Dukes分期: A期3例, B期9例, C期4例, D期4例。对照组选择健康成年人体检采血所获得的血液标本,共30例,其中男21例、女9例,年龄47-81(67.32 ± 11.93)岁。两组在年龄上无统计学差异,所有受试对象均签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 CRC相关基因和SNPs位点的选择: 选择在既往文献中曾被证实或有过报道与癌症发病风险关联的8个基因共12个SNPs位点进行检测研究^[2]。分别是IL1 β -01、CYP19A1-09、GSTP1-01、IL4-01、CYP19A1-14、CYP19A1-01、IL10-02、SOD2-01、IL10-03、CYP19A1-06、MRTT-01、TP53-01。上述基因及SNPs位点资料均来自<http://snp500cancer.nci.nih.gov>^[3]和<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>, 详细信息及碱基序列见这两处网站的SNPs数据库。

1.2.2 检测方法: DNA抽提、PCR扩增和杂交步骤均严格按照上海生物芯片公司的易感基因基因型检测芯片试剂盒使用说明书进行,用Autoprimer软件设计相关多重PCR引物和SNP引物。GenomeLabTM SNPstream Genotyping System12 plex高通量分析仪进行数据检测及分析。在每次检测中都设置阴性、阳性对照品。

统计学处理 采用SNPstats软件,通过Handy-

Weinberg平衡检验确定对照组的群体基因频率分布代表性,计算基因型和等位基因频率,检验基因型和CRC发生风险之间的相关性采用 χ^2 检验、OR及95%CI表示。将选定的12个SNPs位点做连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)分析。以 $P \leq 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 基因多态性分布 经Hardy-Weinberg平衡定律检验,对照组人群均符合遗传平衡($P > 0.05$),表明该样本具有人群代表性。

2.2 SNPs位点基因型与CRC的关系 病例组和对照组SNPs位点基因型频率比较见表1。

2.3 SNPs位点等位基因频率 病例组和对照组SNPs位点等位基因频率比较见表2。

2.4 相关位点的LD分析 对12个SNPs两两间的配对LD分析表明, CYP19A1-09、CYP19A1-06、CYP19A1-14、CYP19A1-01存在强LD($D' > 0.75$),其SNP位点之间有明确的相关性。

3 讨论

大量实验证明CRC的发生与发展是一个多基因参与的复杂过程,既有原癌基因的激活,又有抑癌基因的失活、突变,涉及多个基因、多个位点的突变与丢失。目前发现激活和过度表达的癌基因有*ras*基因、*myc*基因等,发现有突变的癌基因有*p53*、*apc*、*mcc*、*dcc*和*p16*,另外还发现一些错配修复基因和酶活性缺乏或明显减少的酶类,如谷胱甘肽-S转移酶GSTP1、N乙酰基转移酶、亚甲基四氢叶酸还原酶、CYP、蛋氨酸合酶还原酶MRTT等。

SNPs作为第3代遗传标志物具有很多优点,包括高密度、高度稳定,容易实现高通量检测,易于基因分型及等位基因频率的估算^[4],在疾病特别是多基因疾病研究领域显示了巨大优势。进一步研究证实不同人群通常有不同的遗传背景,其SNPs同样存在种族差异,如一个SNPs在某一种族中于某种肿瘤易感相关,但与另一种族就可能不相关,在肺癌^[5,6]和子宫癌^[7,8]中已有研究证实。本研究根据国外文献报道针对CRC高频突变基因的关键突变位点和SNPs位点设计实验检测,旨在对国内临床CRC患者和正常人群检测结果进行比较分析,探索这些位点在中国人群分布规律,以期探讨CRC早期发现、早期治疗新途径。

本研究结果显示, CYP19A1-09基因型频

表 1 病例组和对照组SNPs位点基因型频率比较 $n(\%)$

基因位点	基因型	病例组	对照组	OR值	95%CI	P值
IL1 β -01	T/T	7(35.0)	8(26.7)	1.00		>0.05
	T/G	5(25.0)	16(53.3)	2.00	0.52-7.70	
	G/G	6(30.0)	6(20.0)	0.87	0.19-4.00	
CYP19A1-09	T/T	15(75.0)	11(36.7)	1.00		<0.05
	T/C	4(20.0)	13(43.3)	4.43	1.13-17.34	
	C/C	1(5.0)	6(20.0)	8.18	0.86-78.05	
GSTP1-01	A/A	9(45.0)	17(56.7)	1.00		>0.05
	A/G	10(50.0)	9(30.0)	0.48	0.14-1.60	
	G/G	1(5.0)	4(13.3)	2.12	0.20-21.89	
IL4-01	T/T	9(45.0)	17(56.7)	1.00		>0.05
	T/C	8(40.0)	12(40.0)	0.79	0.24-2.65	
	C/C	3(15.0)	1(3.3)	0.18	0.02-1.95	
CYP19A1-14	T/T	6(30.0)	7(23.3)	1.00		>0.05
	T/C	10(50.0)	16(53.3)	1.37	0.36-5.27	
	C/C	4(20.0)	7(23.3)	1.50	0.29-7.75	
CYP19A1-01	G/G	7(35.0)	7(23.3)	1.00		>0.05
	A/G	10(50.0)	16(53.3)	1.60	0.43-5.94	
	A/A	3(15.0)	7(23.3)	2.33	0.42-12.91	
IL10-02	A/A	10(50.0)	10(33.3)	1.00		>0.05
	A/C	7(35.0)	18(60.0)	2.57	0.75-8.86	
	C/C	3(15.0)	2(6.7)	0.67	0.09-4.89	
SOD2-01	T/T	18(90.0)	25(83.3)	1.00		>0.05
	T/C	2(10.0)	5(16.7)	1.80	0.31-10.34	
IL10-03	A/A	17(85.0)	20(66.7)	1.00		>0.05
	A/G	3(15.0)	9(30.0)	2.55	0.59-10.96	
	G/G	0(0.0)	1(3.3)			
CYP19A1-06	G/G	11(55.0)	11(36.7)	1.00		>0.05
	T/G	8(40.0)	13(43.3)	1.62	0.48-5.45	
	T/T	1(5.0)	6(20.0)	6.00	0.62-58.43	
MRTT-01	A/A	18(90.0)	16(53.3)	1.00		<0.05
	A/G	2(10.0)	13(43.3)	7.31	1.43-37.47	
	G/G	0(0.0)	1(3.3)			
TP53-01	C/C	7(35.0)	10(33.3)	1.00		>0.05
	G/C	11(55.0)	15(50.0)	0.95	0.28-3.30	
	G/G	2(10.0)	5(16.7)	1.75	0.26-11.74	

■创新盘点

本文采用高通量SNPs芯片技术, 一次性检测8个SNPs 12个相关位点与结肠癌的相关性, 分析中国人在这些位点的特点, 为将来在流行病学调查中确定结肠癌的高危人群以及进行患病危险度地评价选择相应的标志物。

率在病例组和对照组间有统计学差异, T、C等位基因比例为69%、31%, 携带基因型T/C患者罹患CRC的发病风险比T/T发病风险增加了4.43倍。有文献报道, CYP系统在人体各种代谢活动中发挥重要的作用, 其相关基因的变异也与众多疾病的发生有关^[9-11]。Bethke等^[12]大样本调查研究发现CYP系统中的CYP1A2和CYP1B1基因与CRC的关系十分密切, 与我们结果相符。MTRR-01基因型频率在两组间也有差异, A、G等位基因比例为83%、17%, 携带基因型A/G患者罹患CRC的发病风险比A/A发病风险增加了7.31倍。Matsuo等^[13]和Otani等^[14]研究表明, 在亚洲人群中, G等位基因与CRC

显著相关, 与我们结果相符。有报道TP53-01、IL10-03、IL10-03、IL10-03、GSTP1等位点与结肠癌相关^[3], 本研究两组间均无统计学差异。本研究还发现CYP19A1-09、CYP19A1-06、CYP19A1-14、CYP19A1-01存在强LD, 说明位点间历史上发生重组的可能性很小, 只需任选其一, 便可了解其余3个位点情况。避免了SNPs与疾病关联研究时选点的盲目性^[15]。

本研究采用高通量分析系统, 应用SNPs芯片为载体对这些位点进行检测, 该方法快速、高效、准确, 是一种十分有应用价值的基因检测方法。本研究由于时间、资金所限所做标本例数不够充足, 有待下一步在实验中扩展。

■同行评价

本文科学性尚可，
对CRC临床诊断
有一定的意义。

表 2 病例组和对照组SNPs位点等位基因频率比较

基因位点	等位基因		病例组		对照组	
	等位基因	%	n	%	n	%
IL1 β -01	T	53	21	52	32	53
	C	47	19	48	28	47
CYP19A1-09	T	69	34	85	35	58
	C	31	6	15	25	42
GSTP1-01	A	71	28	70	43	72
	G	29	12	30	17	28
IL4-01	T	72	26	65	46	77
	C	28	14	35	14	23
CYP19A1-14	T	52	22	55	30	50
	C	48	18	45	30	50
CYP19A1-01	G	54	24	60	30	50
	A	46	16	40	30	50
IL10-02	A	65	27	68	38	63
	C	35	13	32	22	37
SOD2-01	T	93	38	95	55	92
	C	7	2	5	5	8
IL10-03	A	86	37	85	49	82
	G	14	3	15	11	18
CYP19A1-06	G	65	30	75	35	58
	T	35	10	25	25	42
MRTT-01	A	83	38	95	45	75
	G	17	2	5	15	25
TP53-01	C	60	25	62	35	58
	G	40	15	38	25	42

4 参考文献

- Clifford R, Edmonson M, Hu Y, Nguyen C, Scherpbier T, Buetow KH. Expression-based genetic/physical maps of single-nucleotide polymorphisms identified by the cancer genome anatomy project. *Genome Res* 2000; 10: 1259-1265
- Goodman JE, Mechanic LE, Luke BT, Ambs S, Chanock S, Harris CC. Exploring SNP-SNP interactions and colon cancer risk using polymorphism interaction analysis. *Int J Cancer* 2006; 118: 1790-1797
- Packer BR, Yeager M, Staats B, Welch R, Crenshaw A, Kiley M, Eckert A, Beerman M, Miller E, Bergen A, Rothman N, Strausberg R, Chanock SJ. SNP500Cancer: a public resource for sequence validation and assay development for genetic variation in candidate genes. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: D528-D532
- 席素雅, 韩雅玲. 单核苷酸多态性的特点及其在医学中的应用进展. *辽宁医学杂志* 2007; 21: 36-39
- Zhou W, Goodman SN, Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Pignatelli C, Purdie CA, Piris J, Morris R, Harrison DJ, Paty PB, Culliford A, Romans KE, Montgomery EA, Choti MA, Kinzler KW, Vogelstein B. Counting alleles to predict recurrence of early-stage colorectal cancers. *Lancet* 2002; 359: 219-225
- Primdahl H, Wikman FP, von der Maase H, Zhou XG, Wolf H, Orntoft TF. Allelic imbalances in human bladder cancer: genome-wide detection with high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 216-223
- Zavras AI, Wu T, Laskaris G, Wang YF, Cartos V, Segas J, Lefantzis D, Joshipura K, Douglass CW, Diehl SR. Interaction between a single nucleotide polymorphism in the alcohol dehydrogenase 3 gene, alcohol consumption and oral cancer risk. *Int J Cancer* 2002; 97: 526-530
- Jonsson S, Thorsteinsdottir U, Gudbjartsson DF, Jonsson HH, Kristjansson K, Arnason S, Gudnason V, Isaksson HJ, Hallgrimsson J, Gulcher JR, Amundadottir LT, Kong A, Stefansson K. Familial risk of lung carcinoma in the Icelandic population. *JAMA* 2004; 292: 2977-2983
- Lee KM, Abel J, Ko Y, Harth V, Park WY, Seo JS, Yoo KY, Choi JY, Shin A, Ahn SH, Noh DY, Hirvonen A, Kang D. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 19 and 1B1, alcohol use, and breast cancer risk in Korean women. *Br J Cancer* 2003; 88: 675-678
- Han W, Kang D, Park IA, Kim SW, Bae JY, Chung KW, Noh DY. Associations between breast cancer susceptibility gene polymorphisms and clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 124-130
- Bethke L, Webb E, Sellick G, Rudd M, Penegar S, Withey L, Qureshi M, Houlston R. Polymorphisms in the cytochrome P450 genes CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1 and colorectal cancer risk. *BMC Cancer* 2007; 7: 123
- Matsuo K, Hamajima N, Hirai T, Kato T, Inoue M, Takezaki T, Tajima K. Methionine Synthase Reduc-

- tase Gene A66G Polymorphism is Associated with Risk of Colorectal Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2002; 3: 353-359
- 13 Otani T, Iwasaki M, Hanaoka T, Kobayashi M, Ishihara J, Natsukawa S, Shaura K, Koizumi Y, Kasuga Y, Yoshimura K, Yoshida T, Tsugane S. Folate, vitamin B6, vitamin B12, and vitamin B2 intake, genetic polymorphisms of related enzymes, and risk of colorectal cancer in a hospital-based case-control study in Japan. *Nutr Cancer* 2005; 53: 42-50
- 14 A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 437: 1299-1320

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

•消息•

2008 年内科类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	7	41	-0.99	0.043	41	-0.92
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	5432	1	3.71	0.792	6	0.52
G803	肝脏	586	25	-0.49	0.594	11	0.14
G938	国际呼吸杂志	645	22	-0.44	0.294	34	-0.43
G415	国际内分泌代谢杂志	663	20	-0.43	0.379	28	-0.27
G501	临床肝胆病杂志	582	27	-0.50	0.441	22	-0.15
G658	临床荟萃	1709	8	0.48	0.356	32	-0.32
G257	临床内科杂志	875	16	-0.24	0.412	24	-0.21
G855	临床消化病杂志	314	32	-0.73	0.294	34	-0.43
G261	临床心血管病杂志	836	17	-0.28	0.371	29	-0.29
G293	临床血液学杂志	408	31	-0.65	0.329	33	-0.37
G491	岭南心血管病杂志	161	39	-0.86	0.158	40	-0.70
G662	内科急危重症杂志	308	34	-0.73	0.279	36	-0.46
G523	内科理论与实践	34	40	-0.97	0.171	39	-0.67
G746	实用肝脏病杂志	312	33	-0.73	0.562	14	0.08
G190	世界华人消化杂志	2480	6	1.15	0.547	17	0.05
G800	胃肠病学	619	23	-0.46	0.621	10	0.19
G326	胃肠病学和肝病杂志	580	28	-0.50	0.415	23	-0.20
G083	心肺血管病杂志	246	37	-0.79	0.361	31	-0.31
G419	心血管病学进展	585	26	-0.49	0.410	25	-0.21
G260	心脏杂志	553	29	-0.52	0.406	26	-0.22
G610	胰腺病学	268	35	-0.77	0.366	30	-0.30
G234	中国动脉硬化杂志	934	15	-0.19	0.557	16	0.07
G267	中国实用内科杂志	2309	7	1.00	0.487	20	-0.06
G211	中国糖尿病杂志	1567	11	0.36	0.570	13	0.10
G380	中国心血管杂志	256	36	-0.78	0.225	37	-0.57
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	657	21	-0.43	0.562	14	0.08
G633	中国血液净化	680	19	-0.41	0.546	18	0.05
G119	中国循环杂志	694	18	-0.40	0.406	26	-0.22
G231	中华肝脏病杂志	3283	4	1.84	1.119	2	1.15
G235	中华高血压杂志	1168	14	0.01	0.730	8	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	166	38	-0.86	0.207	38	-0.60
G876	中华老年心脑血管病杂志	588	24	-0.49	0.442	21	-0.15
G155	中华内分泌代谢杂志	1612	10	0.40	0.897	5	0.73
G156	中华内科杂志	3484	3	2.02	0.788	7	0.52
G161	中华肾脏病杂志	1643	9	0.42	1.068	3	1.05
G285	中华消化内镜杂志	1314	13	0.14	0.578	12	0.11
G168	中华消化杂志	2571	5	1.23	1.025	4	0.97
G892	中华心律失常学杂志	494	30	-0.57	0.657	9	0.26
G170	中华心血管病杂志	4186	2	2.63	1.375	1	1.64
G172	中华血液学杂志	1501	12	0.30	0.489	19	-0.06
	平均值	1154			0.520		

以上数据摘自2009年版《中国科技期刊引证报告》(核心版). 科学技术文献出版社, 177-178.