

恶性肿瘤患者 UGT1A1 基因启动子多态性检测结果分析*

吴泽刚, 李 艳, 郑红云, 熊 格 (武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

摘要:目的 应用基因测序技术检测分析 UGT1A1 基因启动子多态性特点, 并探讨 UGT1A1 * 28 和 UGT1A1 * 6 基因多态性在武汉地区的分布。方法 收集 2013 年 1 月~2014 年 12 月武汉大学人民医院肿瘤内科 230 例肿瘤患者外周血, 通过 Sanger 测序法测定靶片段的基因序列, 分析患者 UGT1A1 基因启动子区 TA 盒多态性。结果 研究检测的 230 例肿瘤患者中, TA6/TA6 野生型 198 例(86.1%), TA6/TA7 杂合型 29 例(12.6%), TA7/TA7 变异型 3 例(1.3%)。结论 武汉地区恶性肿瘤患者 UGT1A1 基因 TA6/TA6 野生型最常见。

关键词: UGT1A1 基因; 基因测序; 多态性; 伊立替康

中图分类号: R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2015)03-035-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.03.010

Analysis on Gene Polymorphism of UGT1A1 Gene Promoter in Patients with Malignant Tumour

WU Ze-gang, LI Yan, ZHENG Hong-yun, XIONG Ge

(Department of Clinical Laboratory,

Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: Objective To detect UGT1A1 gene promoter polymorphism with gene sequence method and analyze the distribution of UGT1A1 * 28 and UGT1A1 * 6 gene polymorphism in Wuhan. **Methods** A total of 230 samples were collected from tumor patient in Medical Oncology Department of Renmin Hospital of Wuhan University from January 2013 to December 2014, then gene sequence of the target fragments were detected by Sanger sequencing method and analyzed patient UGT1A1 gene promoter polymorphism TA box. **Results** In this research examination 230 example tumor patient, 198 patients (86.1%) were identified with TA6/TA6 genotype, 29 patients (12.6%) were identified with TA6/TA7 genotype, 3 patients (1.3%) TA7/TA7 variant. **Conclusion** TA6/TA6 wild-typewas higher frequency in patients with malignant tumour in Wuhan.

Keywords: UGT1A1 gene; gene sequencing; polymorphism; irinotecan

伊立替康(Irinotecan, CPT-11)对大多数的实体瘤都具有抗癌活性,是最常用的一线化疗药物之一,对提高肿瘤患者长期生存率具有重要意义^[1]。研究表明采用以伊立替康为基础的联合化疗方案,20%的患者会产生严重的3到4级中性粒细胞减少及腹泻,毒性反应是少数患者不能耐受此药治疗的关键^[3]。尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT1A1)基因编码的蛋白质是伊立替康在体内代谢的关键酶^[4],因此 UGT1A1 基因型检测对于临床正确用药,减少毒副作用,提高疗效具有明确的临床意义。本研究对 230 例恶性肿瘤患者的 UGT1A1 基因多态性进行检测,并对 UGT1A1 基因多态性的分布进行分析。

1 材料与方法

1.1 研究对象 本研究的实验对象为 2013 年 1

月~2014 年 12 月间来我院肿瘤内科就诊的肿瘤患者 230 例,其中肺癌患者 81 例,肝癌患者 13 例,胃癌患者 19 例,结肠癌患者 10 例,乳腺癌患者 8 例,卵巢癌患者 15 例,鼻咽癌患者 12 例,直肠癌患者 15 例,宫颈癌患者 13 例,淋巴瘤患者 7 例,喉癌患者 6 例,其他肿瘤患者 31 例;年龄 25~83 岁。入院后采集外周血 2~3 ml(采血管为 EDTA-K₂ 抗凝管),于 4℃ 保存备用,检测前患者均签署了知情同意书。

1.2 试剂与仪器 全血 DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Blood Mini Kit(德国 Qiagen 公司),凝胶成像系统(BioSpectrum 公司),DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen 公司),Sub-Cell GT Cell 型水平电泳系统(BIO-BAD 公司),9700 型 PCR 仪和 3500dx 型测序仪(ABI 公司)。

* 基金项目:国家临床重点专科建设项目(财社[2010]305号)。

作者简介:吴泽刚(1985-),男,硕士,医师,研究方向为感染性疾病的分子诊断,E-mail:wuzegang1234@163.com。

通讯作者:李 艳,E-mail:yantfl120@163.com。

1.3 方法

1.3.1 引物设计:本研究根据 Genbank 的 UGT1A1 基因序列,利用 Primer 5.6 软件设计针对涵盖有 UGT1A1 基因启动区 TATA 序列的引物一对,以 GAPDH 为内参基因,见表 1。

1.3.2 人基因组 DNA 提取:用全血人基因组 DNA 提取试剂盒提取待测血浆标本 DNA, -20°C 保存备用,严格按说明书操作。

1.3.3 PCR 扩增目的片段:目的基因片段扩增的反应体系为:Premix $10\ \mu\text{l}$,引物 $1\ \mu\text{l}$,DNA $2\ \mu\text{l}$,灭菌去离子水补至体积为 $20\ \mu\text{l}$ 。扩增循环条件: 42°C 5 min, 95°C 3 min; 94°C 30 s, 56°C 50 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min, 扩增结束后置 4°C 保温。PCR 扩增产物经 $2\ \text{g}/\text{dl}$ 琼脂糖凝胶电泳后,采用凝胶成像系统拍照成像,验证 PCR 扩增产物是否含有 UGT1A1 启动区目的片段和 GAPDH 内参基因。

表 1 UGT1A1 启动区和 GAPDH 内参基因

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增子长度(bp)
UGT1A1	F:ATAGTCGTCCTTCTTCCTC R:AACAGTATCTCCAGCAT	420
GAPDH	F:TCATGCCTTCTTGCCCTT R:TTGATTTGGAGGGATCTCG	480

注:F 为上游引物,R 为下游引物。

1.3.4 回收扩增后目的片段:切下目的 DNA 条带,采用 Axygen DNA 凝胶回收试剂盒回收 DNA 后, -20°C 保存备用,严格按说明书操作。

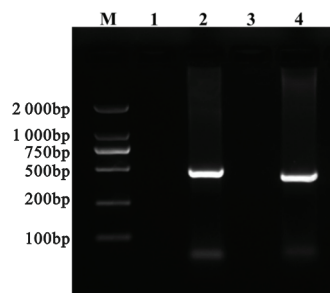
1.3.5 测序检测序列:取 BigDye 缓冲液 $1.15\ \mu\text{l}$, BigDye $0.3\ \mu\text{l}$,待测 DNA $1\ \mu\text{l}$,正反向引物各 $1\ \mu\text{l}$,灭菌去离子水补体积为 $6\ \mu\text{l}$ 。PCR 扩增条件: 98°C 变性 2 min 后; 96°C 10 s, 50°C 5 s, 60°C 4 min, 25 个循环。然后,置 4°C 保温。加 $16\ \mu\text{l}$ 醋酸钠/乙醇混合液,充分振荡, 4°C 离心后弃上清液;加 $70\ \text{ml}/\text{dl}$ 的乙醇 $70\ \mu\text{l}$ 洗涤沉淀 2 次。室温干燥沉淀后加 $10\ \mu\text{l}$ 的甲酰胺充分溶解 DNA,在 PCR 仪上 95°C 热变性 2 min,冰中骤冷,待用。将纯化后测序反应产物在 ABI3500dx 型测序仪上进行测序,按仪器说明书操作。电泳结束后仪器自动分析彩色测序图谱,其 DNA 最低检出浓度为 $20\sim 40\ \text{ng}/\text{L}$ 。

1.3.6 测序结果的处理:分析测序结果 UGT1A1 启动区的 TATA 序列。

1.4 统计学分析 根据序列分析的结果在 Microsoft Excel 计算本研究中得到的各种基因型的比例。

2 结果

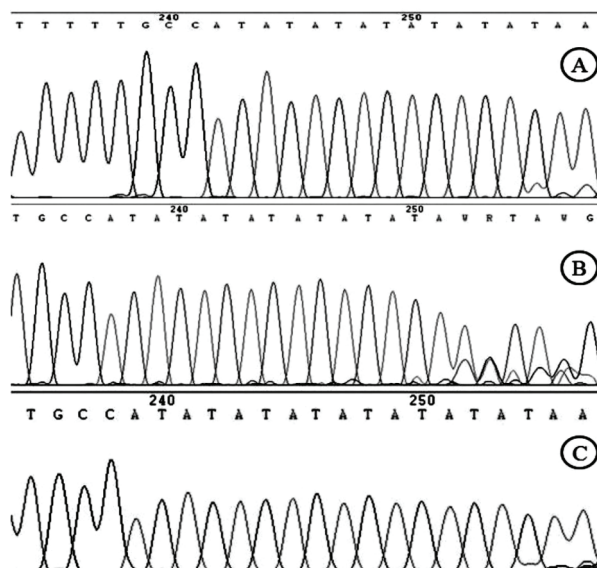
2.1 凝胶电泳法检测 PCR 产物 UGT1A1 启动区和内参基因目的片段结果 见图 1。



注:M 为标准带;1 和 3 为空白孔;2 和 4 分别为内参基因和 UGT1A1 启动区;

图 1 UGT1A1 启动区和内参基因扩增后凝胶电泳图

2.2 UGT1A1 基因启动区 TATA 序列三种基因型在基因测序仪上测定的结果 见图 2。



a. 表示 UGT1A1 * 6 野生型(TA6/TA6); b. 表示 UGT1A1 * 28 杂合型(TA6/TA7); c. 表示 UGT1A1 * 28 变异型(TA7/TA7)。

图 2 基因测序结果

2.3 UGT1A1 启动区基因检测结果 230 例肿瘤患者中三种基因型:TA6/TA6 型(UGT1A1 * 6 野生型)198 例,检出率 86.1%;TA6/TA7(UGT1A1 * 6/UGT1A1 * 28 杂合型)29 例,检出率 12.6%;TA7/TA7(UGT1A1 * 28 变异型)3 例,检出率 1.3%。

3 讨论 伊立替康(Irinotecan, CPT-11)是一种半合成水溶性喜树碱衍生物,通过抑制 DNA 拓扑异构酶 I 来发挥抗肿瘤作用^[1,5]。伊立替康有较广的抗癌谱,目前已广泛应用于结肠直肠癌、胃癌、小细胞肺癌等实体瘤的治疗,但由于个体差异明显,临

床应用常常受到其毒性的限制^[6,7]。近年来国内外很多学者都致力于伊立替康毒性预测的研究,以期提高伊立替康在临床应用中的安全性和疗效,而大多数的研究点集中在伊立替康在体内活性产物的主要代谢酶尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1(uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1, UGT1A1)^[8,9]。UGT1A1 基因是尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶家族(uridine diphosphate glucuronosyltransferases, UGTs)中的一员,其产物 UGT1A1 的主要作用是使各种不同外源性药物和内生底物葡萄糖醛酸化,增加底物的极性,使其更好地从体内被清除,如胆红素、雌激素、伊立替康等^[10]。UGT1A1 基因以缺失、插入、单核苷酸多态性等形式表现出很大的个体差异,目前研究最多的基因多态性主要集中在 UGT1A1 基因启动子区 TATA 序列上。研究表明,UGT1A1 基因启动子区具有一定多态性,其不典型 TATA 区域中包含了 5~8 个 TA 重复序列,其中以含 6 个 TA 重复序列的基因型最为常见,随着 TA 重复序列数目的增加,UGT1A1 表达下降^[11]。UGT1A1 的变异型 UGT1A1 * 28 启动子不典型 TATA 区域包含 7 个 TA 重复序列。UGT1A1 * 28 等位基因的存在导致活性代谢产物 SN-38 显著增加,最终导致患者累积 SN-38 进而引发毒性^[12,13]。美国 FDA 要求伊立替康的包装上注明该药容易使 UGT1A1 * 28 基因纯合子患者产生毒副作用,并且叮嘱临床医师慎重考虑给药剂量。因此,检测 UGT1A1 基因启动子区多态性可为临床医师制定给药剂量方案提供参考,对预防伊立替康药物的严重毒副作用有重要意义。

UGT1A1 * 28 等位基因变异频率已在全球范围内进行了评估,在亚洲人约为 15%,在非洲人约为 45%,在高加索人则达到了 26%~38%。UGT1A1 基因突变的发生率存在明显的地域和种族差异,UGT1A1 * 28 在欧洲国家、印度、埃及和美国黑人人群的检出率分别为 16%,12%,8%和 23%,而在日本和中国人群中的检出率明显较低^[14]。本研究结果表明武汉地区的 UGT1A1 * 28 检出率较低,检测的 230 例肿瘤患者中,TA6/TA7 杂合型检出率为 12.6%,TA7/TA7 变异型 3 例检出率为 1.3%,与其他报道的中国人群检出率相似^[13,14]。

综上所述,伊立替康的不良反应与患者个体的 UGT1A1 基因多态性有重要关系,因此,临床医生可以通过检测 UGT1A1 基因的多态性为肿瘤化疗患者制定伊立替康给药方案提供依据,提高其临床使用的安全性,实现临床抗肿瘤药物的个体化治

疗。

参考文献:

- [1] Salz LB, Cox JV, Blanke C, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group[J]. N Engl J Med, 2000, 343(13):905-914.
- [2] Zhe YH, Qi Y, Qi P, et al. Dose-dependent association between UGT1A1 * 28 genotype and irinotecan-induced neutropenia; low doses also increase risk[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(15):3832-3842.
- [3] Marcuello E, Altes A, Menoyo A, et al. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colon rectal cancer[J]. Br J Cancer, 2004, 91(4):678-682.
- [4] 王 晖,武晓楠,丁 丽,等.伊立替康相关不良反应与 UGT1A1 基因多态性的关系[J].现代肿瘤医学, 2013, 21(1):161-163.
Wang H, Wu XN, Ding L, et al. The association of irinotecan related adverse effects and UGT1A1 gene polymorphism [J]. Journal of Modern Oncology, 2013, 21(1):161-163.
- [5] 陈志威,苏大芝,曹 勤,等.尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1 基因常见多态性位点的分布[J].中华消化杂志, 2014, 34(5):311-315.
Chen ZW, Su DZ, Cao Q, et al. Distribution of common polymorphic loci of gene uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 [J]. Chinese Journal of Digestion, 2014, 34(5):311-315.
- [6] 徐建明.尿苷二磷酸葡萄糖苷转移酶 1A1 与伊立替康相关毒性的关系[J].中华肿瘤杂志, 2013, 35(4):241-243.
Xu JM. Study of irinotecan-induced toxicity and its correlation to UGT1A1[J]. Chinese Journal of Oncology, 2013, 35(4):241-243.
- [7] 李 虎,黄 鹤,刘继红.UGT1A1 基因启动子多态性与伊立替康化疗毒性作用的关系[J].中华妇产科杂志, 2011, 46(12):888-891.
Li H, Huang H, Liu JH. Study of irinotecan-induced toxicity and its correlation to UGT1A1 gene promoter polymorphisms[J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2011, 46(12):888-891.
- [8] Wang J, Fang LJ, Li L, et al. A new frame-shifting mutation of UGT1A1 gene causes type I Crigler-Najjar syndrome[J]. Chinese Medical Journal, 2011, 124(23):4109-4111.
- [9] Schulz C, Heinemann V, Schalhorn A, et al. UGT1A1 gene polymorphism: impact on toxicity and efficacy of irinotecan-based regimens in metastatic colorectal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(40):5058-5066.
- [10] 陈群蓉,孙顺昌,彭运生,等.UGT1A1 基因启动子区 A(TA)_nTAA 多态性分析及其与血清胆红素关系[J].诊断学理论与实践, 2012, 11(2):149-152.
Chen QR, Sun SC, Peng YS, et al. Polymorphism of A (TA)_n TATAA in promoter region of UGT1A1 gene and its correlation with serum bilirubin [J]. Journal of Diagnostics Concepts & Practice, 2012, 11(2):149-152.

(上接 37 页)

- [11] Cai X, Cao WG, Ding HH, et al. Analysis of UGT1A1 * 28 genotype and SN-38 pharmacokinetics for irinotecan-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer; results from a multicenter, retrospective study in Shanghai [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 139(9): 1579-1589.
- [12] Ribrag V, Koscielny S, Casasnovas O, et al. Pharmacogenetic study in Hodgkin lymphomas reveals the impact of UGT1A1 polymorphisms on patient prognosis [J]. *Blood*, 2009, 113(14): 3307-3313.
- [13] 张 勇, 苏 丹, 郭晓川, 等. UGT1A1 * 28 和 UG-

T1A1 * 6 基因多态性与伊立替康不良反应的关系 [J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35(5): 489-492, 495.

Zhang Y, Su D, Guo XC, et al. Relationship between UGT1A1 * 28 and UGT1A1 * 6 gene polymorphism and adverse reactions of irinotecan-based chemotherapy [J]. *Academic Journal of Chinese PLA Medical School*, 2014, 35(5): 489-492, 495.

- [14] Strassburg CP. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin Johnson, and Rotor syndrome) [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2010, 24(5): 555-571.

收稿日期: 2015-01-01

修回日期: 2015-02-04