

江苏宿迁地区汉族人群 DNMT3B 基因启动子区 -149C>T 和-579G>T 多态性与食管癌易感性的分析*

邱巍, 胡威, 赵建江, 陈素梅, 刘东声 (宿迁市人民医院检验科, 江苏宿迁 223800)

摘要:目的 分析江苏宿迁地区汉族人群 DNA 甲基转移酶 3B(DNMT3B)基因启动子区-149C>T 和-579G>T 单核苷酸多态性(SNP)与食管癌(EC)易感性的关系。方法 利用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)技术分析 246 例食管癌患者及 240 例健康对照者的 DNMT3B 启动子区-149C>T 和-579G>T 位点的基因型。结果 在-149C>T 位点中,食管癌组和对照组的基因型 TT 与 CT 比较差异无统计学意义($\chi^2=0.089, P>0.05$)。在-579G>T 位点中,食管癌组和对照组的基因型 TT 与 GT+GG 比较差异无统计学意义($\chi^2=0.649, P>0.05$)。在年龄和性别分组中,两位点在食管癌组和对照组间基因型频率差异均无统计学意义($\chi^2=0.044\sim 0.876, P$ 值均 >0.05)。结论 DNMT3B 基因启动子区-149C>T 和-579G>T 与食管癌遗传易感性无相关性。

关键词:食管癌;DNA 甲基转移酶 3B;单核苷酸多态性

中图分类号:R735.1;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)02-028-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.02.009

Study on the Promoter Region -149C>T and -579G>T Polymorphism of DNMT3B with Genetic Susceptibility to Esophageal Cancer of Han Population in Jiangsu Suqian

QIU Wei, HU Wei, ZHAO Jian-jiang, CHEN Su-mei, LIU Dong-sheng

(Department of Clinical Laboratory, Suqian People's Hospital, Jiangsu Suqian 223800, China)

Abstract: **Objective** To investigate the association of DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) promoter region single nucleotide polymorphism (SNP) -149C>T and -579G>T with genetic susceptibility of esophageal cancer (EC) of Han population in Jiangsu Suqian. **Methods** Genotypes of the -149C>T and -579G>T locus in DNMT3B promoter region were examined by polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 246 esophageal cancer patients and 240 healthy controls. **Results** In -149C>T site, the distributions of genotypes TT compared with CT in the EC group and the controls were no significant difference ($\chi^2=0.089, P>0.05$). In -579G>T site, the distributions of genotypes TT compared with GT+GG in the EC group and the controls were no significant difference ($\chi^2=0.649, P>0.05$). When stratified by age and gender, there was no significant difference in the EC group and the controls in both two sites ($\chi^2=0.044\sim 0.876, all P>0.05$). **Conclusion** The DNMT3B promoter region -149C>T and -579G>T were not associated with the genetic susceptibility of esophageal cancer.

Keywords: esophageal cancer; DNMT3B; SNP

食管癌(esophageal cancer, EC)是常见的消化道肿瘤,其发病率和死亡率在我国居首位。DNA 甲基转移酶 3B(DNA methyltransferase 3B, DNMT3B)是 DNA 甲基转移酶家族之一,位于人类染色体 20q11.2,大小为 47 kb,编码 859 个氨基酸。DNMT3B 和 DNMT3A 共同催化 DNA 双链的甲基化标记,称为从头甲基化。异常的 DNA 甲基化可能导致基因组范围内的低甲基化和区域性的超甲基化,从而使肿瘤抑制基因失活^[1]。DNMT3B 基因启动子区的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)可影响甲基化转移酶的

表达水平,与肿瘤的发生息息相关。本研究主要分析 DNMT3B 基因启动子区的多态性位点与食管癌的遗传易感性关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象 血液样本来源于 2016 年 1 月~2017 年 12 月在江苏省宿迁市人民医院肿瘤科接受治疗的食管癌患者 246 例,其中男性 177 例,女性 69 例,平均年龄 68.14 ± 8.91 岁。对照组为健康体检者样本 240 例,其中男性 158 例,女性 82 例,平均年龄 58.51 ± 7.94 岁,排除肿瘤及其他全身性疾病。样本均来自江苏宿迁地区汉族人群。

* 基金项目:江苏省宿迁市检验医学重点实验室项目(M201603)。

作者简介:邱巍(1985—),男,硕士,主管检验师,主要从事生物化学与分子生物学检验研究, E-mail: qiuwei1117@163.com。

通讯作者:刘东声(1973—),男,硕士,主任检验师,主要从事分子遗传检验研究, E-mail: 445781722@qq.com。

本研究由宿迁市人民医院医学伦理委员会批准,参与人员知情同意。

1.2 试剂与仪器 TIANamp Blood DNA Kit 全血基因组提取试剂盒(北京天根生化公司), TaKaRa Ex Taq PCR 试剂盒、内切酶和引物(大连宝生物公司), T100 PCR 仪(美国伯乐公司), FR980A 生物电泳图像分析系统(上海复日科技公司), DYY-8C 电泳仪(北京六一仪器厂), Centrifuge 5424R 离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 方法

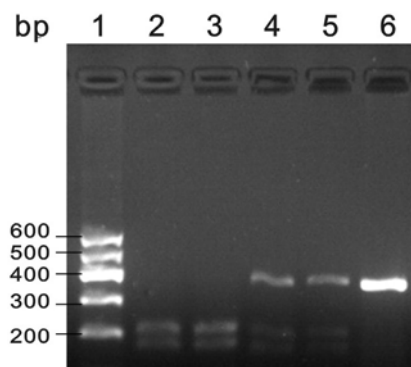
1.3.1 基因组 DNA 提取:采用 TIANamp Blood DNA Kit 提取所有样本的全血基因组 DNA,使用紫外分光光度计检测全血基因组 DNA 的质量。

1.3.2 基因多态性分析:-149C>T 和-579G>T 位点的基因型运用 PCR-RFLP 法检测。 -149C>T 上游引物为 5'-TGCTGTGACAGGCAGAGCAG-3', 下游引物为 5'-GGTAGCCGGGAACCTC-CACGG-3'。 -579G>T 上游引物为 5'-GAG-GTCTCATTATGCCTAGG-3', 下游引物为 5'-GGGAGCTCACCTTCTAGAAA-3'。 PCR 反应体系见参考文献[2,3]。 -149C>T 扩增产物采用 TAKARA BlnI 酶切试剂盒体系进行限制性酶切, -579G>T 扩增产物使用 TAKARA Pvu II 酶切试剂盒体系进行限制性酶切。

1.4 统计学分析 对食管癌组和对照组进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,用卡方检验进行各基因型频率的比较, Logistic 回归模型计算比值比(odds ratio, OR)和 95% 可信区间(confidence intervals, CI),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

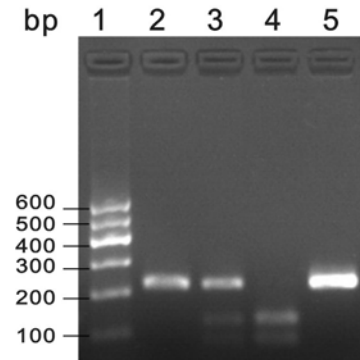
2.1 基因分型结果 -149C>T PCR 扩增产物为 380 bp, 基因型 CT 可被 BlnI 部分切开, 见 380, 207 和 173 bp 三个片段, 基因型 TT 可被完全切开, 见 207 和 173 bp 两个片段, 见图 1。



1:Marker I; 2,3:TT 型. 207 bp/173 bp; 4,5:CT 型. 380 bp/207 bp/173 bp; 6:PCR 产物. 380 bp。

图1 DNMT3B -149C>T 扩增产物电泳图

-579G>T PCR 扩增产物为 225 bp, 基因型 GT 可被 Pvu II 部分切开, 见 225, 132 和 93 bp 三个片段, 基因型 TT 可被完全切开, 见 132 和 93 bp 两个片段, 基因型 GG 不能被切开, 见 225 bp 片段, 见图 2。



1:Marker I; 2:GG 型. 225 bp; 3:GT 型. 225 bp/132 bp/93 bp; 4:TT 型. 132 bp/93 bp; 5:PCR 产物. 225 bp。

图2 DNMT3B -579G>T 扩增产物电泳图

2.2 基因多态性分布比较 经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验,各组基因型频率均符合遗传平衡定律,具备群体代表性。在-149C>T 位点中,经 Logistic 回归校正年龄、性别后,基因型 TT 与 CT 在食管癌组和对照组中差异无统计学意义($\chi^2 = 0.089, P > 0.05$)。按年龄分组后, ≥ 60 岁分型和 < 60 岁分型中 TT 与 CT 基因型比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。按性别分组后,在男性和女性分型中基因型比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 1。在-579G>T 位点中,经 Logistic 回归校正年龄、性别后,基因型 TT 与 GT+GG 在食管癌组和对照组中差异无统计学意义($\chi^2 = 0.649, P > 0.05$)。按年龄分组后, ≥ 60 岁分型和 < 60 岁分型中基因型比较差异均无统计学意义($\chi^2 = 0.491 \sim 0.876$, 均 $P > 0.05$)。按性别分组后,在男性和女性分型中基因型比较差异均无统计学意义($\chi^2 = 0.044 \sim 0.646$, 均 $P > 0.05$),见表 2。

3 讨论 DNA 甲基化是被最早发现的表观遗传学修饰,其过程是将一个甲基加到 DNA 腺嘌呤或胞嘧啶上的修饰过程[4]。基因的激活和失活在个体的发育过程中是非常复杂的过程。基因启动子区 CpG 岛的甲基化水平可影响肿瘤抑制基因的表达[5]。

DNMT3B -149C>T 多态性已在多种肿瘤中报道过,本研究中的食管癌组 TT 基因型为 98.0%,与对照组 TT 基因型 98.3% 分布几乎相同,在 Zhang 等[6]对喉鳞状细胞癌的研究中,喉鳞状细胞癌 TT 基因型为 35.0%,显著高于对照组 TT 基因型(21%),在 Hu 等[7]对胃癌的研究中,胃癌 TT 基因型为 99.2%,对照组 TT 基因型为

98.9%,在 Qian 等^[8]对结直肠癌的研究中,结直肠癌 TT 基因型为 98.9%,对照组 TT 基因型为 97.7%,这表明在汉族人群中-149C>T 与食管癌、胃癌和结直肠癌无相关性,而与喉鳞状细胞癌有相关性。DNMT3B -579G>T 多态性与肿瘤易感性关系也曾报道过,本研究中食管癌组 TT 基因型为 80.1%,其分布与正常对照组 TT 基因型 77.1%一致,而在 Wang 等^[9]对胃癌的研究中,胃癌 TT

基因型为 80.5%,与对照组 TT 基因型 83.4%无差异,在 Qian 等^[8]对结直肠癌的研究中,结直肠癌 TT 基因型为 90.1%,显著高于对照组 TT 基因型(81.8%),表明在汉族人群中-579G>T 与食管癌和胃癌无相关性,而与结直肠癌有相关性。这说明在不同的肿瘤中 DNMT3B 的不同剪切子催化活性有差异。DNMT3B 在肿瘤发生过程中的机制还需要进一步阐明。

表 1 DNMT3B -149C>T 基因型频率分析[n(%)]

项 目	食管癌组(n=246)		对照组(n=240)		χ^2	P 值	OR(95%CI)
	TT	CT	TT	CT			
总数	241(98.0)	5(2.0)	236(98.3)	4(1.7)	0.089	0.676	1.353(0.327~5.593)
年龄(岁) <60	43(17.5)	1(0.4)	106(44.2)	2(0.8)	χ^2_a	1.000	1.233(0.109~13.951)
≥60	198(80.5)	4(1.6)	130(54.2)	2(0.8)	χ^2_a	1.000	1.313(0.237~7.273)
性别 男	174(70.7)	3(1.2)	155(64.6)	3(1.3)	χ^2_a	1.000	0.891(0.177~4.478)
女	67(27.3)	2(0.8)	81(33.7)	1(0.4)	χ^2_a	1.000	2.418(0.215~27.25182)

注:a,用 Fisher 确切概率法分析。

表 2 DNMT3B-579G>T 基因型频率分析[n(%)]

项 目	食管癌组(n=246)		对照组(n=240)		χ^2	P 值	OR(95%CI)
	TT	CT	TT	CT			
总数	197(80.1)	49(19.9)	185(77.1)	55(22.9)	0.649	0.932	0.980(0.614~1.563)
年龄(岁) <60	31(12.6)	13(5.3)	82(34.2)	26(10.8)	0.491	0.484	1.323(0.604~2.896)
≥60	166(67.5)	36(14.6)	103(42.9)	29(12.1)	0.876	0.349	0.770(0.446~1.332)
性别 男	143(58.1)	34(13.8)	122(50.8)	36(15.0)	0.646	0.422	0.806(0.476~1.365)
女	54(22.0)	15(6.1)	63(26.3)	19(7.9)	0.044	0.834	0.921(0.427~1.986)

参考文献:

- [1] 王志刚,吴建新. DNA 甲基转移酶分类、功能及其研究进展[J]. 遗传, 2009, 31(9): 903-912.
Wang ZG, Wu JX. DNA methyltransferases: classification, functions and research progress[J]. Hereditas, 2009, 31(9): 903-912.
- [2] Zhang XM, Li S, Zhang QM. DNA methyltransferase 3B -149C/T polymorphism and the risk of laryngeal squamous cell carcinoma: a case-control study[J]. Genetics & Molecular Research, 2015, 14(4): 12866-12871.
- [3] Hernández-sotelo D, García-Aguilar R, Castro-Coronel Y, et al. The 46359CT polymorphism of DNMT3B is associated with the risk of cervical cancer[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(7): 4275-4280.
- [4] 沈 双,路则明,金景姬,等. 表观遗传学修饰的遗传模式及其研究进展[J]. 科学通报, 2016, 61(36): 3878-3886.
Shen S, Lu ZM, Jin JJ, et al. Genetic modes of epigenetic modification and its research progress[J]. Chin Sci Bull, 2016, 61(36): 3878-3886.
- [5] 朱卫华,刘继斌. 血浆相关基因甲基化在食管癌复发中的临床价值[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(4): 93-94, 97.
Zhu WH, Liu JB. Clinical significance of promoter hypermethylation of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in plasma[J]. J Mod Lab Med, 2016, 31(4): 93-94, 97.
- [6] Zhang XM, Li S, Zhang QM. DNA methyltransferase 3B -149C/T polymorphism and the risk of laryngeal squamous cell carcinoma: a case-control study[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 12866-12871.
- [7] Hu J, Fan H, Liu D, et al. DNMT3B promoter polymorphism and risk of gastric cancer[J]. Digestive Diseases & Sciences, 2010, 55(4): 1011-1016.
- [8] Bao Q, He B, Pan Y, et al. Genetic variation in the promoter of DNMT3B is associated with the risk of colorectal cancer[J]. International Journal of Colorectal Disease, 2011, 26(9): 1107-1112.
- [9] Wang C, Jia Z, Cao D, et al. Polymorphism of DNA methyltransferase 3B and association with development and prognosis in gastric cancer[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0134059.

收稿日期: 2018-01-04

修回日期: 2018-01-30