

· 基础论著 ·

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A7、1A8 基因多态性与结直肠癌的相关性研究

许茜 宋丽雪 丁媛媛 邱晓辉 许景峰 李丽 马建

【摘要】 目的 研究我国健康人与结直肠癌患者 UGT1A7 和 UGT1A8 基因多态性分布与结直肠癌的相关性。方法 提取 297 例健康受试者和 301 例结直肠癌患者血样标本的 DNA, 确定 UGT1A7 和 UGT1A8 基因型, 研究 UGT1A7 和 UGT1A8 基因多态性分布与结直肠癌的相关性。结果 结直肠癌患者组携带 UGT1A7*2*2 和 UGT1A7*3*3 基因型分别为 14.29% 和 15.28%, 明显高于健康受试组的 3.70% 和 3.37%。两组比较, $P=0.013$ 和 0.002 , $OR(95\% CI)$ 分别为 $4.31(1.12\sim 6.33)$ 和 $6.32(2.10\sim 9.61)$; 结直肠癌患者组携带 UGT1A8*1*3 基因型为 16.94%, 明显高于健康受试组的 3.03% ($P<0.001$), $OR(95\% CI)$ 为 $4.65(1.87\sim 6.82)$; 携带 UGT1A8*2*3 基因型 18.94%, 显著高于健康受试组的 4.38% ($P<0.000$), $OR(95\% CI)$ 为 $8.46(2.18\sim 11.54)$ 。结论 UGT1A7*2*2 和 UGT1A7*3*3、UGT1A8*1*3 和 UGT1A8*2*3 与结直肠癌相关联, 是结直肠癌的风险基因。其中 UGT1A7*3*3 和 UGT1A8*2*3 是结直肠癌的高风险基因, 与结直肠癌密切相关。

【关键词】 结直肠肿瘤; UGT1A7; UGT1A8; UGT 基因多态性

Research on the relationship of UGT1A7 and UGT1A8 gene polymorphism with colorectal cancer

Xu Qian, Song Lixue, Ding Yuanyuan, Di Xiaohui, Xu Jingfeng, Li Li, Ma Jian. Department of Clinical Pharmacology, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100700, China

Corresponding author: Xu Jingfeng, Email: xjf@vip.163.com

【Abstract】 Objective To study the allelic frequency of UGT1A7 and UGT1A8 genes, and relationship between the mutations of UGT1A7 and UGT1A8 genes with colorectal cancer. **Methods** To determine the allelic frequency of the UGT1A7 and UGT1A8 mutant in a group of 297 healthy subjects and 301 colorectal cancer. To study the relationship of UGT1A7 and UGT1A8 gene polymorphism with colorectal cancer. **Results** The allelic frequency of the UGT1A7*2*2 and UGT1A7*3*3 were 14.29% and 15.28% in colorectal cancer respectively, obviously super 3.70% and 3.37% in healthy subjects, to compare the allelic frequency of two groups, $P=0.013$, $OR=4.31(95\% CI: 1.12-6.33)$ and $P=0.002$, $OR=6.32(95\% CI: 2.10-9.61)$ respectively. they were significant difference. The allelic frequency of the UGT1A8*1*3 were 16.94% and 3.03% in colorectal cancer and healthy subjects respectively, and had also significant difference, $P<0.000$, $OR=8.46(95\% CI: 2.18-11.54)$. **Conclusions** The gene mutation of the UGT1A7*2*2, UGT1A7*3*3, UGT1A8*1*3 and UGT1A8*2*3 were correlation with colorectal cancer. The gene mutation of the UGT1A7*2*2, UGT1A7*3*3, UGT1A8*1*3 and UGT1A8*2*3 may increase risk of the colorectal cancer, and UGT1A7*3*3, UGT1A8*2*3 gene mutation were high risk predisposing gene of the colorectal cancer.

【Key words】 Colorectal cancer; UGT1A7; UGT1A8; UGT polymorphism

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (glucuronosyltransferase, UGT) 是许多药物、毒物和环境致癌物的代谢酶。对人体内源性和外源性化合物的代谢和清除起着重要作用。由于 UGT 是一个基因超家族, 其亚族基因功能相似但在不同组织和器官中表达, 因此其专属性不同。如近年发现 UGT1A7 主要表达在胃肠道的上段如胃和咽喉组织, UGT1A8 主要表达在结肠, 参与肝外再循环的毒物及药物的代谢^[1-2]。UGT1A7 和 UGT1A8 基因变异可使编码表达的 UGT1A 酶活性降低, 胃及结肠黏膜组织葡萄糖醛酸结合能力下降, 使致癌物易感性增强, 可能是结直肠癌的高危因素^[3]。所以本文通过焦磷酸测序法 (Pyrosequencing), 测定结直肠癌患者 UGT1A7 和 UGT1A8 基因多态性分布, 与健康人比较, 研究分析 UGT1A7 和 UGT1A8 基因变异与结直肠癌的关联性。

材料与方法

1. 仪器和试剂: PyrosequencingTM Pyromark ID 焦磷酸测序仪 (瑞典 Biotage 公司); 焦磷酸测序采用 SNP 通用试剂盒 (瑞典 Biotage 公司); Tpersonal-48 PCR 仪 (美国 Biometra 公司); 乙腈、甲醇为色谱纯 (美国 Merck 公司); 全血基因组 DNA 提取试剂盒, 天根公司; Taq DNA 聚合酶、10× Buffer、MgCl₂、dNTP, 上海生工生物技术服务有限公司。

2. 血液试验标本及 DNA 提取: 598 例标本血样来自本院结直肠癌患者 301 例和 I 期临床健康志愿者 297 例。其中男 310 例, 女 288 例。所有血液标本采集前均签署知情同意书。

采集受试者外周静脉血 2 ml, 用 EDTA-2Na 抗凝, 吸取全血 300 μl 于 1.5 ml EP 管中, 采用全血基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 并加入 50 μl TE 液溶解 DNA, 放置过夜, 待测。

3. UGT1A 基因 SNP 分析: 按照 Gene Bank 人类 UGT1A 基因型 DNA 序列, 应用 AssaY Design Software: Version 1.0.6 软件和 Pyromark ID 系统辅助设计引物, 焦磷酸测序引物由上海生工生物工程技术服务公司合成。UGT1A7 正向引物 5'-TGCCGATGCTCGCTGGACT-3'; 反向引物 5'-CCAATGAAGATCATATTGGGC-3'; 焦磷酸测序引物 5'-ATGGCCACAGGACTC-3'; UGT1A8 上游引物 5'-TGGGGTACGGTTTTGCCTGCCTGTGA-3';

下游引物 5'-GAAAATGTCAAATCACAATTCAGTAAGGAATCT-3'; 焦磷酸测序引物 5'-ATGGAGCTCCGCAA-3'。取 DNA 提取物进行 PCR 扩增, 反应条件为: 95 °C 变性 4 min, 之后 44 个循环 (95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s), 再经 72 °C 延伸 3 min, 最后 4 °C 保存。产物经纯化后进行凝胶电泳分析。

按文献^[4-5]进行单链 DNA 分离液配置、DNA 模板制备、PCR 产物固定和引物杂交。PCR 产物的焦磷酸测序则用瑞典 Biotage 公司生产的 Pyromark ID 测序仪和 SNP 通用试剂盒, 按仪器和试剂盒说明书进行 PCR 产物 SNP 的焦磷酸测序。并根据检测序列的碱基序列判断突变类型。

4. 统计学分析: 等位基因和等位基因型频率比较采用 χ^2 检验, 通过 Fisher 分析 UGT1A 突变等位基因和基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。统计分析使用 SPSS 11.5 软件, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. UGT1A 基因型判定: UGT1A7 基因第一外显子发生 4 处碱基突变, 包括 387T>G, 391、392CG>AA 和 622T>C, 导致 Asn129 Lys、Arg131Lys 和 Trp208Arg 3 处氨基酸密码子错义突变。因此 UGT1A7 的基因多态性 (SNP) 包括: UGT1A7*1 (A129L, A131L, T208A) 为 218 bp; UGT1A7*2 (L129A, L131A, T208A) 为 189 bp; UGT1A7*3 (L129A, L131A, A208A) 为 210 bp 和 UGT1A7*4 (A129L, A131L, A208T) 为 215 bp。结果见图 1。

UGT1A8 基因第一外显子发生 3 处碱基突变, 包括 518C>G、765A>G 和 830G>A。518 位点突变导致 173 密码子错义突变, 使丙氨酸被甘氨酸替代。830G>A 突变导致 277 密码子编码的半胱氨酸变成酪氨酸。765A>G 突变为沉默突变。UGT1A8 的 SNP 为 UGT1A8*1 (A173, T255, C277)、UGT1A8*1a [A173, T255 (A>G), C277]、UGT1A8*2 (G173, T255, C277) 和 UGT1A8*3 (A173, T255, Y277)。经过 Pyromark ID 系统测序, 能清晰显示出所检测片段的 DNA 序列。与经 ABI 标准测序的结果作比较, 结果一致。如 UGT1A8*1 基因多态性的 Pyrosequencing 测序和 ABI 测序图所示 (图 2)。

2. UGT1A 基因多态性分布与结直肠癌的相关性: UGT1A7 基因多态性分布与结直肠癌的相关性

见表1。健康受试组和结直肠癌组 UGT1A7*1*1 野生型纯合子分布频率分别为 35.02% (104 例) 和 27.57% (83 例), 两组比较, 无统计学差异 ($P=0.321$)。

UGT1A7*1*X (2.3.4) 突变杂合子分布频率, 健康受试组和结直肠癌组分别为 50.17% (149 例) 和 37.21% (112 例), 两组比较无差异 ($P=0.242$), OR (95% CI) 为 0.74 (0.41~0.98), 表明 UGT1A7*1*X (2.3.4) 突变杂合子不会增加患结直肠癌的风险, 该基因与结直肠癌无关联。

UGT1A7*X (2.3.4) *X (2.3.4) 突变纯合子分布频率, 健康受试组和结直肠癌组分别为 15.49% (44 例) 和 35.21% (106 例)。两组比较, 有显著性差异 ($P=0.046$), OR (95% CI) 为 5.32 (2.80~8.61)。表明 UGT1A7*X (2.3.4) *X (2.3.4) 突变纯合子会增加患结直肠癌的风险, 该突变基因与结直肠癌相关联。进一步分析 UGT1A7 亚族基因型的分布, 结直肠癌患者组携带 UGT1A7*2*2 和 UGT1A7*3*3 突变纯合子基因型频率分别为 14.29% (43 例) 和 15.28% (46 例), 明显高于健康受试组

的 3.70% (11 例) 和 3.37% (10 例)。两组比较, $P=0.013$ 和 0.002, OR (95% CI) 分别为 4.31 (1.12~6.33) 和 6.32 (2.10~9.61)。表明 UGT1A7*2*2 和 UGT1A7*3*3 是结直肠癌的高风险基因, UGT1A7*3*3 基因与结直肠癌的关联度更高。

UGT1A8 基因多态性分布与结直肠癌的相关性见表 2。健康受试组和结直肠癌组 UGT1A8*1*1 野生型纯合子分布频率分别为 40.07% (119 例) 和 10.96% (33 例)。两组比较, 有显著性差异 ($P=0.048$), OR (95% CI) 为 0.47 (0.35~0.96)。因为 UGT1A8*1a 是沉默突变, 因此纯合基因型 UGT1A8*1/*1, UGT1A8*1/*1a, UGT1A8*1a/*1a 占健康受试组总人数的 75.08% (223 例); 结直肠癌组 UGT1A8*1/*1, UGT1A8*1/*1a, UGT1A8*1a/*1a 占总病例数的 43.19% (130 例)。UGT1A8*1*1 野生型纯合子与结直肠癌无关联。

UGT1A8*1*X (2.3) 突变杂合子的分布频率, 健康受试组和结直肠癌组分别为 16.84% (50 例) 和 32.56% (98 例), 两组比较, 有显著性差异 ($P=0.032$), OR (95% CI) 为 1.87 (1.11~4.89)。

表1 UGT1A7基因多态性与结直肠癌的相关性[例, (%)]

组别	例数	*1*1	*1*x (2.3.4)	*1*2	*1*3	*1*4	*x*x (2.3.4)
健康受试者组	297	104 (35.02)	149 (50.17)	65 (21.89)	82 (27.61)	2 (0.67)	44 (14.81)
结直肠癌患者组	301	83 (27.57)	112 (37.21)	52 (17.28)	58 (19.27)	2 (0.66)	106 (35.22)
OR (95% CI)		1 (参考值)	0.74 (0.41~0.98)	0.78 (0.52~0.85)	0.82 (0.55~2.64)	—	5.32 (2.80~8.61)
P 值		0.321	0.242	0.328	0.215	—	0.046
组别	例数	2*2*	*2*3	*3*3	*3*4	*4*4	
健康受试者组	297	11 (3.70)	22 (7.41)	10 (3.37)	1 (0.34)	0	
结直肠癌患者组	301	43 (14.29)	14 (4.65)	46 (15.28)	1 (0.33)	2 (0.66)	
OR (95% CI)		4.31 (1.12~6.33)	0.57 (0.32~0.78)	6.32 (2.10~9.61)	—	—	
P 值		0.013	0.101	0.002	—	—	

表2 UGT1A8基因多态性与结直肠癌的相关性[例, (%)]

组别	例数	*1*1	*1*1a	*1a*1a	*1*x (2.3)	*1*2	*1a*2
健康受试者组	297	119 (40.07)	39 (13.13)	65 (21.89)	50 (16.84)	31 (10.44)	10 (3.37)
结直肠癌患者组	301	33 (10.96)	36 (11.96)	61 (20.27)	98 (32.56)	36 (11.96)	11 (3.65)
OR (95% CI)		0.47 (0.35~0.96)			1.87 (1.11~4.89)		
P 值		0.032	0.216	0.904	0.048	0.897	—
组别	例数	*1*3	*x*x (2.3.)	*2*2	*2*3	*3*3	
健康受试者	297	9 (3.03)	24 (8.08)	11 (3.70)	13 (4.38)	0	
结直肠癌患者组	301	51 (16.94)	73 (24.25)	12 (3.99)	57 (18.94)	4 (1.33)	
OR (95% CI)		4.65 (1.87~6.82)	8.03 (2.12~12.16)	—	8.46 (2.18~11.54)	—	
P 值		0	0.011	—	0	0.127	

表明 UGT1A8*1*x (2.3) 突变杂合子会增加患结直肠癌的风险, 该突变基因与结直肠癌相关联。进一步分析 UGT1A8 亚族基因型的分布, 健康受试组和结直肠癌组 UGT1A8*1*2 分别为 10.44% (31 例) 和 11.96% (36 例), UGT1A8*1a*2 分别为 3.37% (10 例) 和 3.65% (11 例), 两组基因的分布频率基本相近, 说明 UGT1A8*1*2 和 UGT1A8*1a*2 与结直肠癌无关联。本组中的 UGT1A8*1*3 基因分布频率, 健康受试组和结直肠癌组分别为 3.03% (9 例) 和 16.94% (51 例), 两组比较, 有显著性差异 ($P < 0.001$), OR (95% CI) 为 4.65 (1.87 ~ 6.82)。表明 UGT1A8*1*3 是患结直肠癌的风险基因, 与结直肠癌相关联。

UGT1A8*X (2.3.4) *X (2.3.4) 突变纯合子, 健康受试组和结直肠癌组基因分布频率分别为 8.08% (24 例) 和 24.25% (73 例)。本组中的 UGT1A8*2*2 和 UGT1A8*3*3 在中国人中个体数量较少, 而 UGT1A8*2*3 基因分布频率两组有显著性差异, 分别为 4.38% (13 例) 和 18.94% (57 例), $P < 0.000$, OR (95% CI) 为 8.46 (2.18 ~ 11.54)。表明 UGT1A8*2*3 是患结直肠癌的高风险基因, 与结直肠癌密切相关。

讨 论

UGT 酶能够催化多种致癌物的葡萄糖醛酸结合反应, 对人体内源性和外源性化合物的代谢和清除起着重要作用。由于 UGT 亚族基因在不同组织和器官中表达, 且存在广泛的基因多态性, 其功能和催化活性也有着极大的差别。研究发现, UGT 基因多态性与肿瘤危险性和不同肿瘤的发生率相关联^[6-7]。如 UGT 基因多态性在咽喉癌、消化道癌、肝癌、肺癌、乳腺癌和胰腺癌等的发生和预后中发挥着重要作用。UGT1A7 主要分布在食管、口咽喉部和胃肠道的上段。有 4 个等位基因, UGT1A7*1、UGT1A7*2, UGT1A7*3 和 UGT1A7*4。UGT1A7 基因多态性对近端消化道肿瘤的发生起作用, 主要表现在对苯并芘的葡萄糖醛酸化能力的降低^[1,8]。UGT1A8 主要表达在结肠, 参与肝外再循环的毒物、环境致癌物及药物的代谢, 并选择性定位在胃肠道的不同部位。UGT1A8 等位基因有 UGT1A8*1、UGT1A8*1a、UGT1A8*2 和 UGT1A8*3, 不同的等位基因导致了 UGT1A8 酶蛋白催化能力的明显差异, 这种功能特性的改变使致癌物易感性增强。所

以 UGT1A8 可能是结直肠癌的靶基因^[3]。

UGT1A7 对很多致癌物有代谢解毒作用, 不同的等位基因型对多环芳烃的代谢活性差异很大。携带突变的等位基因型 UGT1A7*2、UGT1A7*3 或 UGT1A7*4 的个体代谢活性均比野生型 UGT1A7*1 低, 尤其以 UGT1A7*3 (L129A, L131A, A208A) 活性最低。携带解毒能力低的突变等位基因的个体可能对某些致癌物敏感性更高, 从而对某些肿瘤易感。本文对 301 例结直肠癌患者和 297 例 I 期临床健康志愿者的 UGT1A7 基因多态性分布与结直肠癌的关联性研究表明, 结直肠癌患者组携带 UGT1A7*2*2 和 UGT1A7*3*3 突变纯合子基因型频率分别为 14.29% 和 15.28%, 明显高于健康受试组的 3.70% 和 3.37%。两组比较, $P = 0.013$ 和 0.002, OR (95% CI) 分别为 4.31 (1.12 ~ 6.33) 和 6.32 (2.10 ~ 9.61)。表明 UGT1A7*2*2 和 UGT1A7*3*3 是结直肠癌的高风险基因, 尤其 UGT1A7*3*3 基因与结直肠癌的关联度更高, 是结直肠癌易感基因。其原因可能是携带低活性的 UGT1A7*2*2 和 UGT1A7*3*3 个体, 对杂环胺的代谢或解毒能力下降, 导致杂环胺在肠道内持续存在, 从而诱发结直肠癌。

编码 UGT1A8 基因主要在胃肠道表达, 尤其在大肠内表达丰富, 对内源性和外源性毒物及药物的代谢起着重要作用^[2-3,9]。但 UGT1A8 基因多态性导致其表达的酶蛋白对葡萄糖醛酸结合能力下降或产生特性改变, 使致癌物在结肠中的易感性增强。本研究发现, 结直肠癌患者组携带 UGT1A8*1*3 基因型为 16.94%, 明显高于健康受试组的 3.03% ($P < 0.001$), OR (95% CI) 为 4.65 (1.87 ~ 6.82); 携带 UGT1A8*2*3 基因型 18.94%, 显著高于健康受试组的 4.38%, $P < 0.000$, OR (95% CI) 为 8.46 (2.18 ~ 11.54)。表明 UGT1A8*1*3 和 UGT1A8*2*3 基因是结直肠癌的风险基因, 与结直肠癌相关联, 可能是结直肠癌的靶基因。我们在 UGT1A1、2B7 基因多态性与结直肠癌的相关性的研究中发现, UGT1A1*6 和 UGT1A1*28 基因突变与结直肠癌有关联, OR 值分别为 3.34 ($P < 0.001$) 和 1.73 ($P = 0.011$)。表明 UGT1A1*6 和 UGT1A1*28 基因变异的个体易患结直肠癌, 可能也是结直肠癌高危易感基因。

结直肠癌是人类主要的恶性肿瘤之一, 随着经济的发展和生活水平的提高, 我国人民膳食结构向高脂肪、高蛋白和低纤维素转变, 结直肠癌的发病

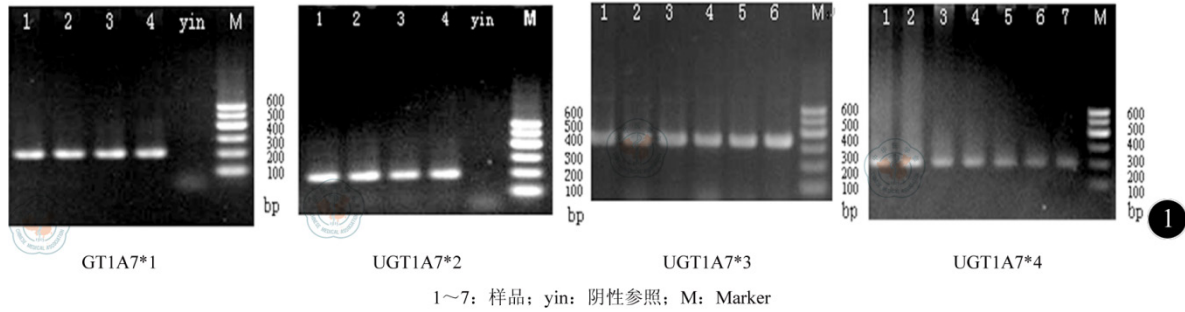


图1 UGT1A7基因PCR产物电泳图

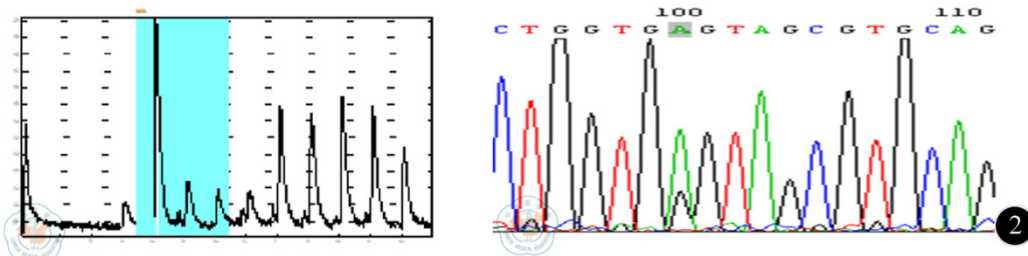


图2 UGT1A8*1基因型 Pyrosequencing和ABI测序

率明显增加,说明膳食结构是诱发结直肠癌的重要原因之一。因此通过肿瘤分子流行病学及基因多态性与结直肠癌遗传易感性研究将有助于结直肠癌的早期诊断和治疗,有利于结直肠癌的病因机制的揭示,为癌症的基因治疗和化学预防开辟新的途径。

志谢 本文感谢江苏顺达基因技术开发有限公司李玉萍、黄玲老师的大力支持和帮助

参考文献

[1] Zheng Z, Park JY, Guillemette C, et al. Tobacco carcinogen detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with oro laryngeal cancer risk[J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(18): 1411-1418.

[2] Cheng Z, Radominska-Pandya A, TePhly TR. Studies on the substrates Pecificity of human intestinal UDP-glucuronosyl transefrases IA8 and IA10[J]. Durg Metba Dispos, 1999, 27(11): 1165-1170.

[3] Vanderlogt EM, Bergevoet SM, Roelofs HM, et al. Genetic polymorphisms in UDP-glucuronosyl transferases and glutathione Stransferases and colorectal cancer risk[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(12): 2407-2415.

[4] 许景峰, 赵刚涛, 许茜, 等. 焦磷酸测序技术检测 UGT1A3 和 UGT2B7 在中国汉族人群中的基因多态性[J]. 中南药学, 2011, 9(10): 728-733.

[5] 许景峰, 闫晨霞, 杨永革, 等. UGT 基因多态性对米格列奈在中国人体内药代动力学个体差异的影响[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(13): 63-69.

[6] Vogel A, Ockenga J, Ehmer U, et al. Polymorphisms of the carcinogen detoxifying UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 in proximal digestive tract cancer[J]. Z Gastroenterol, 2002, 40(7): 497-502.

[7] 王亚东. 尿苷二磷酸葡萄糖转移酶基因多态性与肿瘤遗传易感性研究进展[J]. 卫生研究, 2008, 37(5): 620-632.

[8] Strassburg CP, Vogel A, Kneip S, et al. Polymorphisms of the human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A7 gene in colorectal cancer[J]. Gut, 2002, 50(6): 851-856.

[9] 金明娟, 陈坤, 张勇晶, 等. 二磷酸尿苷葡萄糖昔转移酶 IA7 基因多态性与国人结直肠癌的相关性研究[J]. 中华消化杂志, 2006, 26(9): 590-593.

(收稿日期: 2014-03-11)
(本文编辑: 梁雷)

许茜, 宋丽雪, 丁媛媛, 等. 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A7、1A8 基因多态性与结直肠癌的相关性研究 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8 (7): 1298-1302.