

· 临床检验研究论著 ·

ATM 基因 rs664982 位点单核苷酸多态性与食管癌易感性研究*

樊卫¹, 徐克平², 嵇先国³, 祁金友¹, 杨兆东², 汪性展²

(江苏省淮安市楚州医院: 1. 检验科; 2. 胸外科; 3. 放疗科, 江苏淮安 223200)

摘要:目的 研究共济失调毛细血管扩张征突变(ATM)基因 rs664982 位点单核苷酸多态性与患食管癌易感性之间的关系。方法 采用测序技术对 183 例食管癌患者(食管癌组)及 125 例体检健康者(对照组)进行 ATM 基因单核苷酸多态性分型检测;应用非条件 Logistic 回归统计分析 ATM rs664982 单核苷酸多态性与食管癌的相关性;利用 SHEsis 软件分析 rs664982 和 rs664143 连锁不平衡性及其单体型与疾病的相关性。结果 食管癌组吸烟者及有肿瘤家族史者所占比例高于对照组($P < 0.05$);ATM rs664982 基因型与性别、年龄、饮酒在食管癌组与对照组相比无统计学差异($P > 0.05$),ATM rs664982 基因型与吸烟、肿瘤家族史在食管癌组与对照组相比有统计学差异($P < 0.05$);与基因型 C/C 比较,T/T 基因型可增加食管癌发病风险,C/T 基因型可降低发病风险;rs664982 和 rs664143 没有强的连锁不平衡性。结论 不同种族人群存在不同的 ATM 基因多态性,这可能是导致不同种族人群食管癌发病率和临床表现存在显著不同的因素之一。

关键词:食管肿瘤; 多态性,单核苷酸; ATM 基因; 连锁不平衡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)01-0011-03

Correlation between single nucleotide polymorphisms of rs664982 site in ATM gene and susceptibility to esophageal cancer*

Fan Wei¹, Xu Keping², Ji Xian'guo³, Qi Jinyou¹, Yang Zhaodong², Wang Xingzhan²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Thoracic Surgery; 3. Department of Radiation Oncology, Chuzhou Hospital, Huai'an, Jiangsu 223200, China)

Abstract: **Objective** To explore the correlation between the single nucleotide polymorphisms(SNPs) of rs664982 site in ATM gene and susceptibility to esophageal cancer. **Methods** SNPs genotyping of ATM gene was analyzed in 183 patients with esophageal cancer(esophageal cancer group) and 125 patients without esophageal cancer(control group) by using sequencing technology. The correlation between ATM rs664982 SNPs and esophageal cancer was analyzed with non-conditional Logistic regression analysis. Rs664982 and rs664143 locus linkage disequilibrium and haplotype association with disease were analyzed by SHEsis software. **Results** The proportion of smokers and subjects with tumor family history was statistically different between the two groups($P < 0.05$). ATM rs664982 genotype in gender, age, alcohol consumption was not statistical different between the two groups($P > 0.05$), but in smoking and family history of cancer was statistically different($P < 0.05$). Compared with genotype C/C, T/T genotype might increase the onset risk of esophageal cancer, C/T genotype might reduce the onset risk. Rs664982 and rs664143 were without strong linkage disequilibrium. **Conclusion** ATM gene polymorphisms could be with difference between various ethnic groups, which might be one of the reasons that lead to different incidence and clinical manifestations of esophageal cancer in different racial.

Key words: esophageal neoplasms; polymorphism, single nucleotide; ATM gene; linkage disequilibrium

共济失调毛细血管扩张征突变(ATM)基因属于 DNA 修复基因,其胚系突变或基因多态性可导致个体对多种肿瘤易感,包括淋巴样肿瘤和实体瘤^[1-7]。食管癌是苏北地区高发恶性肿瘤,其发病与遗传因素、环境因素和个人饮食习惯存在一定的关系。本研究通过比较食管癌与体检健康者 ATM 基因 rs664982 位点单核苷酸多态性,以探讨此位点单核苷酸多态性、吸烟、饮酒等因素与食管癌关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 9 月至 2012 年 5 月本院收治的食管癌患者 183 例(食管癌组);同期体检健康者 125 例(对照组)。所有受试对象均同意并签署临床科研知情同意书。

1.2 方法 采集患者静脉外抽血,以 DNA 提取试剂盒(上海生工)提取 DNA 进行 PCR 扩增。第 1 轮 PCR 反应体系: Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.5 μ L, 不含 Mg²⁺ 的 10 \times PCR 缓冲液 [100 mol/L Tris-HCl pH8.8, 500 mol/L KCl, 0.8% (v/v)

Nonidet]5 μ L, MgCl₂ (25 mol/L)5 μ L, dNTP(10 mol/L)1 μ L, 引物 F(5'-ATC CTG GCT GAC TCC TTC TT-3'), R(5'-TCC TCT AGT AAT GAT GCT GAC AAT-3'), 模板 DNA 各 1 μ L, 双蒸水 35.5 μ L; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s 循环 25 次, 72 $^{\circ}$ C 8 min; 产物大小为 996 bp。第 2 轮 PCR 反应体系: Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.5 μ L, 不含 Mg²⁺ 的 10 \times PCR 缓冲液 [100 mol/L Tris-HCl pH8.8, 500 mol/L KCl, 0.8% (v/v) Nonidet]5 μ L, MgCl₂ (25 mol/L)5 μ L, dNTP(10 mol/L)1 μ L, 引物 Fi(5'-CAA CTT GGA TTG GGG CAG AT-3'), Ri(5'-AAC CAT TCT GAA AAT AAT AAT ACC AT-3')各 1 μ L, 模板 0.2 μ L, 双蒸水 36.3 μ L; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 8 min; 产物大小为 714 bp。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳后,采用 PCR 产物纯化回收试剂盒(上海生工)回收目的条带,采用 3730 测序列分析仪(美国 ABI)进行测序分析。

* 基金项目:淮安市科技支撑计划资助项目(HAS2011039)。 作者简介:樊卫,女,检验技师,主要从事分子肿瘤学研究。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。应用交叉法分析食管癌组与对照组患者性别、年龄、饮酒习惯、吸烟习惯及肿瘤家族史的差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;采用 χ^2 检验比较不同人群中的基因型分布以及等位基因频率,发病风险即比值比(OR 值)及其 95% 置信区间(95% CI)以非条件 Logistic 回归模型计算;所有显著性检验均采用双侧概率检验,显著性检验水准 $\alpha = 0.05$ 。计算等位基因频率分布,利用 SHEsis 软件对 rs664982 和 rs664143 位点进行连锁不平衡分析,计算 D' 值和 r^2 值。

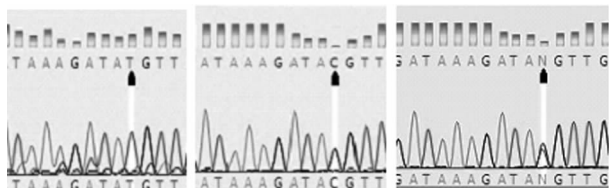
2 结 果

2.1 两组患者一般资料比较 食管癌组吸烟者及有肿瘤家族史者所占比例高于对照组($P < 0.05$);组间性别比例存在统计学差异($P < 0.05$),但性别与食管癌的相关性尚需进一步证实;组间年龄构成和饮酒者比例无统计学差异($P > 0.05$),见表 1。

表 1 组间一般资料比较[n(%)]

一般资料	食管癌组	对照组	χ^2	P 值
性别				
男	123(67.2)	65(52.0)	7.228	0.009
女	60(32.8)	60(48.0)		
年龄(岁)				
<60	39(21.3)	28(22.4)	0.052	0.888
≥60	144(78.7)	97(77.6)		
饮酒				
有	83(45.4)	47(37.6)	1.831	0.197
无	100(54.6)	78(62.4)		
吸烟				
有	91(49.7)	35(28.0)	14.503	0.000
无	92(50.3)	90(72.0)		
肿瘤家族史				
有	34(18.6)	11(8.8)	5.693	0.021
无	149(81.4)	114(91.2)		

2.2 PCR 产物测序 PCR 产物测序图见图 1。



从左至右分别为 TT、CC 和 CT 基因型,箭头所示为基因突变位点。

图 1 ATM 基因 rs664982 测序图

2.3 ATM 基因型相关食管癌危险因素分析 非条件 Logistic 回归分析显示,ATM rs664982 基因型与性别、年龄、饮酒在食管癌患者组与对照组相比无统计学意义($P > 0.05$),说明 rs664982 位点多态性与性别、年龄、饮酒对食管癌发病风险无显著影响;ATM rs664982 基因型与吸烟和肿瘤家族史在食管癌患者组与对照组相比有统计学意义($P < 0.05$),说明 rs664982 位点多态性与吸烟和肿瘤家族史对食管癌发病风险有一定影响,见表 2。

2.4 组间 rs664982 基因型分布比较 食管癌组 rs664982 位点 3 种基因型分布频率不符合 Hardy-Weinberg 平衡,样本人群不具有代表性($\chi^2 = 22.37, P = 2.24 \times 10^{-6}$)。C、T 等位基

因频率组间比较无统计学差异($\chi^2 = 0.013, P = 0.934$),见表 3。以 C/C 基因型作为参照基因型,C/T 和 T/T 基因型 OR 值分别为 0.903(95% CI:0.532~1.532, $P = 0.704$)、1.208(95% CI:0.508~2.875, $P = 0.669$),说明 C/T 基因型可减少食管癌发病风险,T/T 基因型可增加发病风险。

表 2 ATM 基因型相关食管癌危险因素分析 (食管癌组/对照组, n/n)

危险因素	rs664982			OR 值(95%CI)	P 值
	C/C	C/T	T/T		
性别					
男	28/15	86/42	9/8	1.136(0.624~2.067)	0.676
女	18/18	36/37	6/5		
年龄(岁)					
<60	13/4	25/23	1/1	1.008(0.982~1.036)	0.541
≥60	33/29	97/56	14/12		
饮酒					
有	17/14	37/30	6/3	1.082(0.611~1.917)	0.787
无	29/19	85/49	9/10		
吸烟习惯					
有	17/6	68/25	6/4	2.187(1.230~4.050)	0.005
无	29/27	54/54	9/9		
肿瘤家族史					
有	9/3	23/8	1/0	1.892(1.110~3.990)	0.004
无	37/30	99/71	14/13		

表 3 ATM rs664982 各基因型分布频率组间比较[n(%)]

基因型	食管癌组	对照组
C/C	46(25.1)	33(25.6)
C/T	122(66.7)	79(61.6)
T/T	15(8.2)	13(12.8)
C	214(58.5)	145(58.0)
T	152(41.5)	105(42.0)

表 4 rs664982 和 rs664143 位点基因型分布及其与食管癌的相关性

基因型	食管癌组 [n(%)]	对照组 [n(%)]	OR 值(95%CI)
IVS61-55T>C(rs664982)			
C/C	46(25.1)	33(25.6)	1.00(参照)
C/T	122(66.7)	79(61.6)	0.903(0.532~1.532)
T/T	15(8.2)	13(12.8)	1.208(0.508~2.875)
IVS62+60G>A(rs664143)			
A/A	44(24.0)	32(25.6)	1.00(参照)
A/G	121(66.1)	77(61.6)	0.87(0.511~1.498)
G/G	18(9.9)	16(12.8)	1.22(0.542~2.756)

2.5 rs664982 和 rs664143 连锁不平衡分析及其单体型与疾病相关性 采用 SHEsis 软件对 rs664982 和 rs664143 进行连锁不平衡分析及其单体型与疾病相关性分析, D' 值和 r^2 值分别为 0.528、0.069; $0 < D' < 1$,无法比较两位点连锁不平衡的差别,仅说明两位点间可能发生重组或突变,4 种单倍型均可

出现; $r^2 < 0.33$ 提示二者间没有强的连锁不平衡关系。见表 4。

3 讨论

ATM 基因编码蛋白具有以下功能:(1)使受损伤的细胞正确停留在细胞周期的限制点,使其得以充分修复;(2)激活损伤诱导的 DNA 修复;(3)阻止损伤诱导的细胞凋亡;(4)调控免疫细胞对抗原的反应;(5)阻止基因的重排^[8]。ATM 基因是维持基因组稳定性的重要看守基因,与人类恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[9]。

rs664982 位点在多种肿瘤中存在多态性。Lo 等^[9]发现 9 个 ATM 基因位点单核苷酸多态性(rs189037、rs228597、rs228592、rs664677、rs609261、rs599558、rs609429、rs227062 和 rs664982)的基因型在 730 例肺癌患者和 730 例健康者中具有较高的多态性连锁不平衡,并认为 ATM 基因位点单核苷酸多态性和吸烟可增加肺癌发病风险,与本文中吸烟和位点多态性增加食管癌发病风险的结论一致。Lee 等^[10]研究了抗氧化维生素摄入量和 ATM 基因型对乳腺癌发病风险的联合或独立作用,发现部分抗氧化维生素的摄入可能改变 ATM 基因位点突变,提示 ATM 单基因型改变可能影响韩国妇女乳腺癌发病风险。Lee 等^[11]为了评估 ATM 基因多态性在乳腺癌中的作用,对变异等位基因频率为 0.10 以上的多态位点(rs664982、rs664143 等)进行了分析,发现 rs664982 位点等位基因频率为 0.46,且存在连锁不平衡($P < 0.01$),也说明 ATM 基因多态性在韩国女性乳腺癌发病中发挥了重要作用。

本研究中,食管癌患者和体检健康者 rs664982T 等位基因频率分别为 0.415 和 0.42,低于高加索人(0.66),与 Lee 等^[11]的研究结果基本一致。本研究中 rs664982T 等位基因频率低于拉美裔人和高加索人($P < 0.05$),可能与入种不同导致基因遗传背景相差较远有关;而与太平洋周边地区人群 C、T 等位基因频率无统计学差异($P > 0.05$),可能太平洋周边地区人群具有相似的遗传背景有关;与非洲裔美国人 C、T 等位基因频率也没有统计学差异($P > 0.05$),原因可能是非洲大陆和环太平洋地带存在某种联系,导致人群存在一定程度相似的遗传背景^[12]。

综上所述,亲缘关系越近,其基因型分布越相似,反之则差

异越显著。本研究进一步研究 ATM 基因单核苷酸多态性与食管癌易感性提供了一定的资料,并为疾病前瞻性研究提供了重要的分子遗传学数据。

参考文献

- [1] 刘小群. ATM 与肿瘤的关系研究进展[J]. 中国癌症杂志, 2011, 21(12): 973-977.
- [2] 鲁强, 张志磊, 邹存华, 等. 卵巢上皮性肿瘤组织 ATM 基因表达缺失及其临床意义的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(10): 799-801, 804.
- [3] 夏文进, 苏丹, 刘鹏, 等. ATM 基因单核苷酸多态性与非小细胞肺癌易感性的研究[J]. 中国癌症杂志, 2010, 20(2): 121-124.
- [4] 李高峰, 王宏梅, 陈龙华. ATM 基因表达沉默对肝癌细胞生长的影响[J]. 军医进修学院学报, 2009, 30(4): 517-518, 527.
- [5] 周雪梅, 乔健, 王尧, 等. 人脑胶质瘤中 ATM、ATR、Chk1 和 Chk2 基因表达研究[J]. 中华神经医学杂志, 2009, 8(7): 653-657.
- [6] 赵丽, 金梦迪, 李婷, 等. 应用 FISH 技术检测慢性淋巴细胞白血病 ATM 和 RB1 基因缺失[J]. 中国肿瘤临床, 2010, 37(8): 440-443.
- [7] 李明娟, 王维维, 陈士伟, 等. 辐射小鼠血细胞 ATM、CDKN1A、DDB2 和 GADD45A 基因表达分析[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2011, 29(2): 93-98.
- [8] Nowak R. Discovery of AT gene s park s biomedical research bonanza[J]. Science, 1995, 268(5218): 1700-1701.
- [9] Lo YL, Hsiao CF, Jou YS, et al. ATM polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers[J]. Lung Cancer, 2010, 69(2): 148-154.
- [10] Lee SA, Lee KM, Lee SJ, et al. Antioxidant vitamins intake, ataxia telangiectasia mutated(ATM) genetic polymorphisms, and breast cancer risk[J]. Nutr Cancer, 2010, 62(8): 1087-1094.
- [11] Lee KM, Choi JY, Park SK, et al. Genetic polymorphisms of ATM and breast cancer risk[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005, 14(4): 344-352.
- [12] 李四光. 地壳构造与地壳运动[J]. 中国科学, 1973, 4(5): 400-429.

(收稿日期: 2012-09-18)

(上接第 10 页)

- [2] Andersen CY, Schmidt KT, Kristensen SG, et al. Concentrations of AMH and inhibin-B in relation to follicular diameter in normal human small antral follicles[J]. Hum Reprod, 2010, 25(5): 1282-1287.
- [3] Lin YH, Chiu WC, Wu CH, et al. Antimüllerian hormone and polycystic ovary syndrome[J]. Fertil Steril, 2011, 96(7): 230-235.
- [4] Woo HY, Kim KH, Rhee EJ, et al. Differences of the association of anti-Müllerian hormone with clinical or biochemical characteristics between women with and without polycystic ovary syndrome[J]. Endocr J, 2012, 59(9): 781-790.
- [5] Chen MJ, Yang WS, Chen CL, et al. The relationship between anti-Müllerian hormone, androgen and insulin resistance on the number of antral follicles in women with polycystic ovary syndrome[J]. Hum Reprod, 2008, 23(1): 952-957.

- [6] Eilertsen TB, Vanky E, Carlsen SM. Anti-Müllerian hormone in the diagnosis of polycystic ovary syndrome: can morphologic description be replaced[J]. Hum Reprod, 2012, 27(8): 2494-2502.
- [7] Nardo LG, Yates AP, Roberts SA, et al. The relationships between AMH, androgens, insulin resistance and basal ovarian follicular status in non-obese subfertile women with and without polycystic ovary syndrome[J]. Hum Reprod, 2009, 24(11): 2917-2923.
- [8] Tehrani FR, Solaymani-Dodaran M, Hedayati M, et al. Is polycystic ovary syndrome an exception for reproductive aging[J]. Hum Reprod, 2010, 25(7): 1775-1781.
- [9] Visser JA, de Jong FH, Laven JS, et al. Anti-müllerian hormone is a new marker for ovary function[J]. Reproduction, 2006, 131(1): 1-9.

(收稿日期: 2012-09-02)