

· 临床检验研究论著 ·

SNP 基因芯片方法的建立及在 MTHFR 多态性检测中的初步应用*

段 梦,李志军,黄恒柳,张 燕,邓少丽[△]

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科,重庆 400042)

摘要:目的 建立单核苷酸多态性(SNP)的基因芯片检测法,并初步应用于结直肠癌患者 MTHFR 基因位点 C677T 的多态性检测,分析其位点突变与致病性的关系。方法 采用醛基修饰玻璃基片,阵列检测亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)C677T 基因型,生物素标记显色。应用该芯片检测 78 例结直肠癌患者及 40 例健康对照组 MTHFR 基因 C677T 多态性,并分析 MTHFR 基因多态性与结直肠癌的相关性。结果 建立检测 MTHFR 基因 SNP 的基因芯片。采用基因芯片法检测病例组中 MTHFR 基因的 C677T 位点 CC、CT、TT 基因型分布频率分别为 38.5%、53.8%、7.7%,健康对照组中 C677T 位点 CC、CT、TT 基因型分布频率分别为 35.0%、62.5%、2.5%。结论 成功建立检测 SNP 的基因芯片法。MTHFR 基因位点 C677T 的基因多态性与结肠癌易感性无明显关系。

关键词:亚甲基四氢叶酸还原酶; 单核苷酸多态性; 结直肠癌; 易感性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)24-3322-02

The establishment of SNP gene chip method and its preliminary application in MTHFR polymorphism detection*

Duan Meng, Li Zhijun, Huang Hengliu, Zhang Yan, Deng Shaoli[△]

(Department of Clinical Laboratory, Research Institute of Surgery, Daping Hospital,

Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract:Objective To establish single nucleotide polymorphism(SNP) microarray assay, and the preliminary application in patients with colorectal cancer gene locations MTHFR C677T polymorphism detection, analysis its locus mutation and pathogenic relations. **Methods** The array detection of methylene tetrahydrofolate reductase(MTHFR) C677T genotype was processed on aldehyde modified glass substrate with Biotin labeling color. The chip was used to test the MTHFR gene C677T polymorphism of 78 colorectal cancer patients and 40 healthy peoples as normal control group, and the correlation of MTHFR gene polymorphisms and colorectal cancer were analyzed. **Results** The gene chip to detect MTHFR gene SNP was established successfully. By using gene chip detection cases of MTHFR gene C677T site CC and CT, TT genotype frequency distribution were 38.5%, 53.8%, 7.7%, control group of C677T site CC and CT, TT genotype distribution frequencies were 35.0%, 62.5%, 2.5%. **Conclusion** The method of gene chip to detect SNP has been established successfully. Gene C677T polymorphism locations in MTHFR gene has no obvious relation with colon cancer susceptibility.

Key words: methylene tetrahydrofolate reductase; single nucleotide polymorphisms; colorectal cancer; munity

当前多采用测序技术检测基因的 SNP 位点,但基因测序步骤繁琐,需较长检测时间,限制了在临床检验的推广应用。基因芯片技术是集分子生物学、微电子技术和计算机科学于一身的新型技术,具有携带信息量大和检测方便的特点,此技术对 SNP 进行分析具有广阔的前景。本研究构建 SNP 芯片,并以生物素为报告分子标记靶序列,通过杂交实现芯片的检测。在世界范围内,结直肠癌发病率和病死率都居常见恶性肿瘤前 4 位,中国每年大约有 14 万新发病例。流行病学调查显示,机体叶酸缺乏可能导致罹患结直肠癌风险,5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶在体内叶酸代谢过程中起了很重要的作用,MTHFR 基因位于 1 号染色体短臂上(1p36.3),存在遗传多态性,目前报道 C677T 位点多态性与结直肠癌研究较多,但结论存在争议^[1-2]。Meta 分析能控制影响异质性的研究及个体水平的相关因素,提高可信度。有研究结果表明^[3],饮食叶酸的摄入量以及血浆叶酸水平与结直肠癌的发生呈负相关。亚甲基四氢叶酸还原酶是叶酸代谢过程中的关键酶,在 DNA 甲基化中起重要作用。MTHFR 基因最常见的是 C677T 多态,该多态改变影响叶酸代谢,与个体罹患结直肠癌的风险有关。为进一步明确中国不同地区人群中是否存在同样的关联,本研究利用构

建的 SNP 基因芯片进行了重庆地区人群的叶酸代谢重要酶 MTHFR 多态性和遗传易感性对结直肠癌发病影响的探究。

1 材料与方法

1.1 一般资料 78 例病例组标本来自第三军医大学第三附属医院肿瘤科住院及门诊患者。其中男性 48 例,女性 30 例,平均年龄(56.43±10.15)岁,所有患者诊断为结直肠癌,均有病理学诊断支持。健康对照组 40 例,男 26 例,女 14 例,平均年龄(53.53±8.26)岁,经体检其身体各功能器官正常,均无急慢性病等。标本为 EDTA-K₂ 抗凝管的静脉全血,3~5 mL,采集后于 4℃ 冰箱保存。

1.2 材料与试剂 MTHFR 基因探针由上海生工合成,芯片活化液购自上海百傲科技有限公司,血液基因组 DNA 提取试剂盒购自 Tiangen 生物公司。实验采用 Beckman 冷冻高速离心机, Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪, 兴化分析仪器厂的分子杂交仪。引物及分子探针由上海生工合成。

1.3 基因芯片建立及 MTHFR C677T 位点检测 MTHFR 基因 C677T 位点探针分别为 5'-GTC TGC GGG AGC CGA TTT CAT CAT-3', 5'-GTC TGC GGG AGT CGA TTT CAT CAT C-3', MTHFR 引物分别为 5'-TGA AGG AGA AGG

* 基金项目:第三军医大学临床科研基金资助项目(2008-1087)。 作者简介:段梦,女,初级技师,主要从事分子生物诊断学研究。

△ 通讯作者, E-mail: dengsl072@yahoo.com.cn。

TGT CTG CGG GA-3'和 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'。将玻璃基片醛基化修饰,通过点样仪将 DNA 探针点到醛基基片上,然后用芯片活化液固定 8 h,使醛基修饰载玻片上醛基的活性增强,提高基因探针的固定效率。固定后 DNA 探针将与醛基玻片共价结合,形成阵列。提取病例组及健康对照组血液基因组 DNA,用 MTHFR 基因特异引物对其含有 MTHFR 基因所在基因片段进行扩增,并将变性后的 DNA 扩增产物与基因芯片上探针进行特异性杂交,采用 Biotin 标记的碱性磷酸酶显色反应,得到结直肠癌患者的 MTHFR 基因位点 C677T 的基因型,进而分析其与结直肠癌的相关性。

1.4 统计学处理 采用 χ^2 检验对获得的数据进行分析,结果用 SPSS10.0 软件进行相关分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结 果

通过扫描芯片,得到样品 DNA 的扩增产物与每个基因位点的野生型和突变型探针杂交形成的杂交图像,图 1 为 CT 杂合子,图 2 为 CC 纯合子,图 3 为 TT 纯合子(图 1~3 见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。78 例结直肠癌患者中 MTHFR 基因的 C677T 位点 CC、CT、TT 基因型分别为 30、42、6 例,所占比例分别为 38.5%、53.8%、7.7%,40 例健康对照组中 MTHFR 基因的 C677T 位点 CC、CT、TT 基因型分别为 14、25、1 例,所占比例分别为 35.0%、62.5%、2.5%。从上述数据统计分析可知 $\chi^2 = 0.0528, P > 0.05$,结直肠癌患者的 MTHFR 基因位点 C677T 的突变与其致病性无明显相关。

3 讨 论

亚甲基四氢叶酸还原酶是叶酸代谢途径中的关键酶,它不可逆地催化 5,10-亚甲基四氢叶酸还原为 5-亚甲基四氢叶酸,在此过程中产生 5 腺苷甲硫氨酸这种甲基代谢过程中的通用供体。这对于同型半胱氨酸甲基化生成甲硫氨酸和 dUMP 甲基化为 dTMP 是十分必要的。MTHFR 基因为一多态性基因,其基因有多种突变类型,不同的基因突变类型 MTHFR 表现出各种不同的酶活性和热稳定性。最常见的突变类型是 C677T 点突变,即 677 位核苷酸 C→T 点突变^[4]。此突变具有遍布世界的相对高频率,在不同种族和人群中发生频率存在较大差别,欧洲人等位基因频率是 24%~40%,日本人是 26%~37%,非洲美洲人约 11%^[5]。

已有多个报道指出,MTHFR 基因多态性与肿瘤易感性有关,包括胃癌、乳腺癌、肺癌等^[6],但是关于亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与结直肠癌易感性之间的关系所做的研究还少,并且结论不一。本次研究中发现,在重庆籍汉族人群中,MTHFR 基因多态性在结直肠癌病例和健康人之间的分布有无明显差异, $P > 0.05$ 。该结论与 Sameer 等^[7]的结果一致,而

与 Yin 等^[8]的结论有所不同,这种情况也许与 MTHFR 多态性在人种之间的分布有所差异有关。

本研究成功构建了检测 MTHFR C677T 位点的基因芯片,检测方法简单易行,并初步评价了 MTHFR C677T 多态性与结直肠癌易感性的关系。但本研究的样本量偏少,尚需进行大规模的流行病学和临床研究、综合分析,才能更好地探讨基因型与表型的内在联系,找出结直肠癌发生发展的分子遗传学机制,从而指导临床的预防和治疗。

参考文献

- [1] Zhong S, Yang JH, Liu K, et al. Quantitative assessment of the association between MTHFR C677T polymorphism and colorectal cancer risk in East Asians[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(6): 2041-2051.
- [2] Delgado-Plasencia L, Medina-Arana V, Bravo-Gutiérrez A, et al. Impact of the MTHFR C677T polymorphism on colorectal cancer in a population with low genetic variability[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2013, 28(9): 1187-1193.
- [3] Lee JE, Wei EK, Fuchs CS, et al. Plasma folate, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), and colorectal cancer risk in three large nested case-control studies[J]. *Cancer Causes Control*, 2012, 23(4): 537-545.
- [4] Scher AI, Eiriksdottir G, Garcia M, et al. Lack of association between the MTHFR C677T variant and migraine with aura in an older population; Could selective survival play a role? [J]. *Cephalalgia*, 2013, 33(5): 308-315.
- [5] Linnebank M, Moskau S, Semmler A, et al. A Possible Genetic Link between MTHFR Genotype and Smoking Behavior[J]. *PLoS one*, 2012, 7(12): e53322.
- [6] Prasad W, Wilkhoo H. Association of the functional polymorphism C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with colorectal, thyroid, breast, ovarian, and cervical cancers[J]. *Onkologie*, 2011, 34(8/9): 422-426.
- [7] Sameer AS, Shah ZA, Nissar S, et al. Risk of colorectal cancer associated with the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism in the Kashmiri population[J]. *Genet Mol Res*, 2011, 10(2): 1200-1210.
- [8] Yin G, Ming H, Zheng X, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism and colorectal cancer risk; A case-control study[J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(2): 365-369.

(收稿日期:2013-07-30)

(上接第 3321 页)

al. Targeting protease-activated receptor-1 with cell-penetrating pepducins in lung cancer[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(1): 513-523.

- [11] Borensztajn K, Bijlsma MF, Reitsma PH, et al. Coagulation factor Xa inhibits cancer cell migration via protease-activated receptor-1 activation[J]. *Thromb Res*, 2009, 124(2): 219-225.
- [12] Darmoul D, Gratio V, Devaud H, et al. Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation[J]. *Mol Cancer Res*, 2004, 2(9): 514-522.
- [13] Kim SJ, Shin JY, Lee KD, et al. Galectin-3 facilitates cell motility

in gastric cancer by up-regulating protease-activated receptor-1 (PAR-1) and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25103.

- [14] Zhu L, Wang X, Wu J, et al. Cooperation of protease-activated receptor 1 and integrin $\alpha v \beta 5$ in thrombin-mediated lung cancer cell invasion[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(2): 553-560.
- [15] Cohen I, Maoz M, Turm H, et al. Etk/Bmx regulates proteinase-activated-receptor1 (PAR1) in breast cancer invasion; signaling partners, hierarchy and physiological significance[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11135.

(收稿日期:2013-08-03)