

• 论 著 •

282 例结直肠癌患者 UGT1A1 * 28 基因多态性分析*

黄春锦, 张 浩[△]

(复旦大学附属华东医院, 上海 200040)

摘 要:目的 分析结直肠癌患者尿苷二磷酸葡萄糖醛酰转移酶 1A1(UGT1A1) * 28 基因多态性,以期能为结直肠癌的个体化治疗提供指导。方法 采用聚合酶链反应(PCR)-测序的方法分析 282 例结直肠癌患者 UGT1A1 * 28 基因多态性。结果 在 282 例结直肠癌患者中,携带 TA 6/6、TA 6/7、TA 7/7 基因型的患者分别占 82.27%、17.38%、0.35%;在 164 例男性患者中,携带 TA 6/6、TA 6/7、TA 7/7 基因型的患者分别占 79.88%、19.51%、0.61%;在 118 例女性患者中,携带 TA 6/6、TA 6/7、TA 7/7 基因型的患者分别占 85.60%、14.40%、0.00%。在 31 例年轻患者中,携带 TA 6/6、TA 6/7、TA 7/7 基因型的患者分别占 83.87%、16.13%、0.00%;在 105 例中年患者中,携带 TA 6/6、TA 6/7、TA 7/7 基因型的患者分别占 81.91%、17.14%、0.95%;在 146 例老年患者中,携带 TA 6/6、TA 6/7、TA 7/7 基因型的患者分别占 82.19%、17.81%、0.00%。结论 结直肠癌患者 UGT1A1 * 28 基因多态性主要为 TA 6/6、TA 7/7 基因型主要存在于中年男性患者中。

关键词:结直肠癌; 尿苷二磷酸葡萄糖醛酰转移酶; 基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)09-1173-03

Analysis on gene polymorphism of UGT1A1 * 28 in 282 cases of colorectal cancer*

Huang Chunjin, Zhang Hao[△]

(Affiliated Huadong Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract:Objective To analyze the gene polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 1A1(UGT1A1) * 28 in the patients with colorectal cancer in order to provide the guidance for personalized therapy of colorectal cancer. **Methods** The PCR direct sequencing was adopted to detect the gene polymorphism of UGT1A1 * 28 in 282 patients with colorectal cancer. **Results** In 282 cases of colorectal cancer, The frequencies of carrying TA 6/6, TA 6/7 and TA 7/7 genotype were 82.27%, 17.38% and 0.35% respectively; in 164 male patients, the frequencies of carrying TA 6/6, TA 6/7 and TA 7/7 genotype were 79.88%, 19.51% and 0.61% respectively; in 118 female patients, the frequencies of carrying TA 6/6, TA 6/7 and TA 7/7 genotype were 85.60%, 14.40% and 0.00% respectively. In 31 young patients, the frequencies of carrying TA 6/6, TA 6/7 and TA 7/7 genotype were 83.87%, 16.13% and 0.00% respectively; in 105 middle-aged patients, the frequencies of carrying TA 6/6, TA 6/7 and TA 7/7 genotype were 81.91%, 17.14% and 0.95% respectively; in 146 elderly patients, the frequencies of carrying TA 6/6, TA 6/7, TA 7/7 genotype were 82.19%, 17.81% and 0.00% respectively. **Conclusion** The gene polymorphism of UGT1A1 * 28 is mainly TA 6/6 in the patients with colorectal cancer. TA 7/7 genotype exists mainly in the middle-aged male patients.

Key words:colorectal cancer; UDP-glucuronosyltransferase 1A1; polymorphism

结直肠癌是常见的高危害消化道恶性肿瘤,发生率仅次于胃癌和食道癌。全球每年新发病例超过 100 万,年死亡人数超过 50 万,中国每年新发病例已超过 17 万,死亡近 10 万。近 20 年来结直肠癌的发病率在逐渐增加,同时,其发病年龄趋向老龄化。一般而言,结直肠癌多在 60~70 岁发病,50 岁以下不到 20%。中国患者的发病年龄多在 40~60 岁,高峰在 50 岁左右,比欧美约提前 10 年,30 岁以下的结直肠癌患者也比欧美多见^[1-3]。

胆红素尿苷二磷酸葡萄糖醛酰转移酶(UGT)基因参与抗癌药物伊立替康(CPT-11)的代谢活化产物 SN-38 的进一步结合和解毒。在 UGT1A1 基因启动子区存在(TA)₆ 或 7 次重复的多态性,TA₇/7 纯合子基因型患者 UGT 的酶活力只有 TA₆/6 纯合子基因型患者的 1/3,造成前者体内 SN-38 的浓度是后者的 3 倍,引起严重的毒副反应^[4]。2005 年,美国食品药品监督管理局(FDA)在伊立替康的说明书中建议,UGT1A1 启动子区 TA₇/7 纯合子基因型患者在使用伊立替康治疗时应减少

剂量。

本研究采用聚合酶链反应(PCR)-测序法研究了 282 例中国人的结直肠癌肿瘤血液标本中 UGT1A1 * 28 的基因多态性,同时比较了不同性别和年龄群体中 UGT1A1 * 28 基因突变频率的差异,以期能为伊立替康的使用提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究使用的临床标本来自全国超过 100 家 3 级医院,每份标本都通过病理检查确诊。包括 282 份血液标本。所有参与本研究的结直肠癌患者或其家属均签署过授权给上海赛安生物医药科技有限公司进行 UGT1A1 * 28 基因检测的知情许可同意书。所有标本均为抽取的 2 mL 外周血,置于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,低温保存和运输。

1.2 仪器与试剂 试验使用的 Pfu 酶、dNTP 购自上海申能博彩生物科技有限公司, DNA 提取试剂盒购自 Axygen Scientific 公司,所使用的 PCR 仪则购自杭州博日科技有限公司,离心机购自湘仪离心机仪器有限公司,PCR 产物序列测定由上

* 基金项目:卫生部医药卫生科技发展研究中心基金项目(W2012FZ139)。 作者简介:黄春锦,男,检验技师,主要从事临床检验工作。

[△] 通讯作者, E-mail: dhao@hotmail.com。

海鼎安生物科技有限公司完成。

1.3 方法 基因组 DNA 的提取按照试剂盒说明书进行, PCR-测序法检测 UGT1A1 * 28 基因多态性采用 primer 5 进行引物设计, 由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。正向引物: TGT TGC CTA TTA AGA AAC CTA A, 反向引物: GGC GTC AGG TGC TAG GAC, 扩增产物大小为 387 bp。25 L 扩增体系包括 2.5 L 10×PCR 缓冲液, 0.4 mol/L 的上、下游引物, 0.25 mmol 的三磷酸脱氧核苷(dNTP), 0.5 U Pfu 酶, 100 ng DNA 模板。PCR 扩增程序为: 95 ℃ 先变性 3 min, 然后进行 45 个循环的扩增: 95 ℃ 40 s, 58 ℃ 20 s, 70 ℃ 40 s, 最后在 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物纯化测序由上海鼎安生物科技有限公司完成。

2 结 果

2.1 PCR 产物测序结果 采用 PCR 的方法, 检测 UGT1A1 * 28 基因多态性, 其代表性结果如图 1~3 所示。

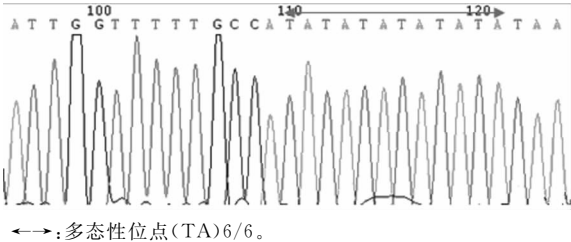


图 1 PCR 产物测序的代表性图谱(UGT1A1 * 28 基因型 TA 6/6)

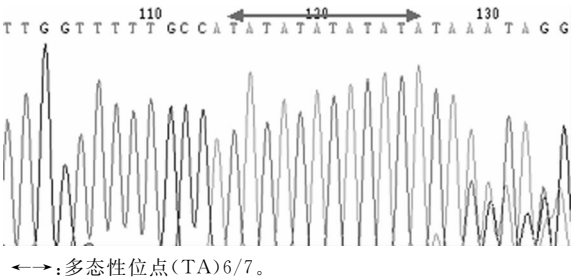


图 2 PCR 产物测序的代表性图谱(UGT1A1 * 28 基因型 TA 6/7)

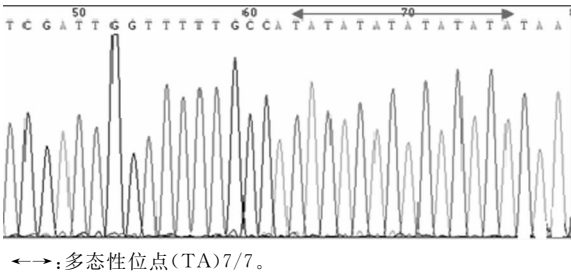


图 3 PCR 产物测序的代表性图谱(UGT1A1 * 28 基因型 TA 7/7)

2.2 结直肠癌患者 UGT1A1 * 28 基因型分布 本研究检测了 282 例结直肠癌患者, 包括 164 例男性患者和 118 例女性患者。在 282 例结直肠癌患者中, 携带 TA 6/6、TA 6/7、TA 7/7 基因型的患者分别占 82.27%、17.38%、0.35%。男性患者 UGT1A1 * 28 基因型主要为 TA6/6, 占 79.88%, 其次是 TA6/7, 占 19.51%, 只有 0.61% 的男性患者基因型是 TA7/7; 女性患者基因型也主要是 TA6/6, 占 85.60%, 其次是 TA6/7, 占 14.40%, 没有检测到 TA7/7 基因型的存在。31 例年轻患者中, 基因型主要为 TA6/6, 占 83.87%, 其次是 TA6/7, 占 16.

13%, 没有检测到 TA7/7 基因型的存在; 105 例中年患者中, 基因型主要为 TA6/6, 占 81.91%, 其次是 TA6/7, 占 17.14%, 只有 0.95% 的中年患者基因型是 TA7/7; 146 例老年患者中, 基因型主要为 TA6/6, 占 82.19%, 其次是 TA6/7, 占 17.81%, 没有检测到 TA7/7 基因型的存在。

3 讨 论

UGT1A1 有多种变异形式, 研究得最多的是启动子区 TA 重复次数的变异, 最常见的是 6 次重复(野生型, UGT1A1 * 1)和 7 次重复(变异型, UGT1A1 * 28), 而 TA 重复次数的多少会影响基因的表达和酶的活力, 并导致不同程度的毒副反应^[5-7]。如果把 TA 重复 6 次时基因的转录活力定义为 100%, 那么 5、7、8 次重复时的转录活力大概分别为 130%、65%、50%^[8], TA 重复 7 次会引起严重的嗜中性白细胞减少症, 即使低剂量伊立替康也会发生, 因此, 有研究者根据 UGT1A1 * 28 的基因型制订了一个详细的伊立替康用量表^[9]。另外一些研究发现, 同一个基因如果存在两种多态性, 则可能增加不良反应的发生风险, 如果 UGT1A1 * 28 和 UGT1A1 * 6 都存在, 发生嗜中性白细胞减少症的更高比例^[10]。

有报道认为 UGT1A1 * 28 变异频率存在明显的人种差异^[8,11-17], 根据这些报道, 波利尼西亚人的 TA6/6 野生型比例最高, 为 97%~99%, 亚洲人排第二, 为 81%~92%, 高加索人排第三, 为 61%~73%, 第四是非洲人, 为 44%~52%, 白种人最低, 为 40%~50%。最新的研究发现, 沙特阿拉伯人的 TA6/6 野生型位于亚洲人和高加索人之间, 为 74.3%^[18]。而白种人 UGT1A1 * 28 纯合变异基因型 TA7/7 变异频率最高, 达到了 10%~15%, 因此, 白种人在使用伊立替康前进行 UGT1A1 * 28 多态性的检测最有意义, 而这种检测对中国人是否有意义, 目前尚无一致的定论。

国内学者对 UGT1A1 * 28 多态性的研究较少, 笔者的研究和其他研究者调查的结果一致^[19-21], 总体来讲, UGT1A1 * 28 多态性在中国人中的分布频率是: 野生型 TA6/6 占 75%~85%, 杂合型 TA6/7 占 15%~25%, 而变异纯合型 TA7/7 占比在 5% 以下。因为 TA7/7 占比特别少, 在对中国人使用伊立替康治疗时, 是否需要检测 UGT1A1 * 28 多态性, 医学界还没有一致的定论。

伊立替康是治疗结直肠癌最有效的化疗药^[22-23], UGT1A1 编码代谢伊立替康的酶, 其遗传多态性和伊立替康引起的药物毒性相关已经为很多研究所证实, Shulman 等^[24]对 UGT1A1 * 28 基因型和临床结果相关性的研究发现, UGT1A1 * 28 的 TA7/7 基因型明显和严重的血液学毒性及高住院率相关, 能预测低的结直肠癌生存率。而最新的研究则显示, 当用基于伊立替康的化疗治疗结直肠癌患者时, UGT1A1 * 28 基因型不能成为预测药物响应和无进展生存期的可靠指标, 至于能否预测总体生存期, 则需要更多的证据才能得出结论^[25]。

参考文献

[1] Zhao P, Dai M, Chen W, et al. Cancer trends in China[J]. Jpn J Clin Oncol, 2010, 40(4): 281-285.
[2] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics[J]. JAMA, 2013, 310(9): 982.
[3] 杨玲, 李连弟, 陈育德, 等. 中国 2000 年及 2005 年恶性肿瘤发病死亡的估计与预测[J]. 中国卫生统计, 2005, 22(4): 218-221.
[4] Bandrés E, Zárate R, Ramirez N, et al. Pharmacogenomics in colorectal Cancer: the first step for individualized therapy[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(44): 5888-5901.

- [5] Li Y, Buckley D, Wang S, et al. Genetic polymorphisms in the TA-TA box and upstream phenobarbital-responsive enhancer module of the UGT1A1 promoter have combined effects on UDP-glucuronosyltransferase 1A1 transcription mediated by constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, or glucocorticoid receptor in human liver[J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(9): 1978-1986.
- [6] Sugiyama T, Hirose T, Kusumoto S, et al. The UGT1A1 * 28 genotype and the toxicity of low-dose irinotecan in patients with advanced lung Cancer[J]. *Oncol Res*, 2010, 18(7): 337-342.
- [7] 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.
- [8] Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(14): 8170-8174.
- [9] Hu ZY, Yu Q, Pei Q, 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.
- [10] Teh LK, Hashim H, Zakaria ZA, et al. Polymorphisms of UGT1A1 * 6, UGT1A1 * 27 & UGT1A1 * 28 in three major ethnic groups from Malaysia[J]. *Indian J Med Res*, 2012, 136(2): 249-259.
- [11] Fertrin KY, Goncalves MS, Saad ST, et al. Frequencies of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) gene promoter polymorphisms among distinct ethnic groups from Brazil[J]. *Am J Med Genet*, 2002, 108(2): 117-119.
- [12] Innocenti F, Grimsley C, Das S, et al. Haplotype structure of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter in different ethnic groups[J]. *Pharmacogenetics*, 2002, 12(9): 725-733.
- [13] Sugatani J, Yamakawa K, Yoshinari K, et al. Identification of a defect in the UGT1A1 gene promoter and its association with hyperbilirubinemia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292(2): 492-497.
- [14] Ki CS, Lee KA, Lee SY, et al. Haplotype structure of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene and its relationship to serum total bilirubin concentration in a male Korean population[J]. *Clin Chem*, 2003, 49(12): 2078-2081.
- [15] Premawardhena A, Fisher CA, Liu YT, et al. The global distribution of length polymorphisms of the promoters of the glucuronosyltransferase 1 gene (UGT1A1): hematologic and evolutionary implications[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2003, 31(1): 98-101.
- [16] Sai K, Saeki M, Saito Y, et al. UGT1A1 haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese patients with Cancer [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2004, 75(6): 501-515.
- [17] Font A, Sánchez JM, Tarón M, et al. Weekly regimen of irinotecan/docetaxel in previously treated non-small cell lung Cancer patients and correlation with uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) polymorphism[J]. *Invest New Drugs*, 2003, 21(4): 435-443.
- [18] Alkharfy KM, Alghamdi AM, Bagulb KM, et al. Distribution of selected gene polymorphisms of UGT1A1 in a Saudi population [J]. *Arch Med Sci*, 2013, 9(4): 731-738.
- [19] 王岩, 徐建明, 沈琳, 等. 中国人尿苷二磷酸葡萄糖苷酸转移酶 1A 基因多态性与伊立替康毒性的相关性[J]. *中华肿瘤杂志*, 2007, 29(12): 913-916.
- [20] 马冬, 张绪超, 杨冬阳, 等. 中国人 UGT1A1 冰 28 的基因多态性以及伊立替康毒性和疗效的关系[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2011, 32(4): 495-499.
- [21] Zhang A, Xing Q, Qin S, et al. Intra-ethnic differences in genetic variants of the UGT-glucuronosyltransferase 1A1 gene in Chinese populations[J]. *Pharmacogenomics J*, 2007, 7(5): 333-338.
- [22] Garcia-Carbonero R, Supko JG. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(3): 641-661.
- [23] Ulukan H, Swaan PW. Camptothecins: a review of their chemotherapeutic potential[J]. *Drugs*, 2002, 62(14): 2039-2057.
- [24] Shulman K, Cohen I, Barnett-Griness O, et al. Clinical implications of UGT1A1 * 28 genotype testing in colorectal Cancer patients [J]. *Cancer*, 2011, 117(14): 3156-3162.
- [25] Liu X, Cheng D, Kuang Q, et al. Association between UGT1A1 * 28 polymorphisms and clinical outcomes of irinotecan-based chemotherapies in colorectal Cancer: a meta-analysis in Caucasians[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): 58489.

(收稿日期: 2015-01-12)

(上接第 1172 页)

参考文献

- [1] 颜永乾. 时间分辨荧光免疫分析测定乙型肝炎病毒表面抗原 cut-off 值的确定[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(10): 1276-1278.
- [2] 甘新宇, 杨洋, 于丽君, 等. ELISA 检测抗-HCV 抗体灰区设置的探讨[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(11): 1405-1406.
- [3] 容莹, 孙秀双, 郑望春, 等. 乙型肝炎表面抗原检测结果分析及灰区设置探讨[J]. *检验医学与临床*, 2010(15): 1593-1595.
- [4] Clinical Laboratory Standards Institute. EP6-A2 evaluation of the linearity of quantitative analytical methods[S]. 2003: 1-47.
- [5] 黄悦勤, 李立明. 临床流行病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 118-123.
- [6] Kapucu A, Macmillan NA, Rotello CM. Positive and negative remember judgments and ROCs in the plurals paradigm: evidence for alternative decision strategies[J]. *Mem Cognit*, 2010, 38(5): 541-554.
- [7] 舒玲, 李露瑶, 张春莹, 等. 丙肝病毒抗体检测结果的分析与解读[J]. *现代预防医学*, 2014, 41(2): 300-303.
- [8] 李育芬, 楚承霞, 杨颖. HCV 检测方法研究进展及其临床意义[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013(5): 1342-1344.
- [9] 陈俊梅, 严艳, 孔宁, 等. 二种丙型肝炎病毒抗体确证试剂盒检测性能的比较[J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(3): 206-209.
- [10] 陈卫中, 潘晓平, 宋兴勃, 等. ROC 曲线中最佳工作点的选择[J]. *中国卫生统计*, 2006, 23(2): 157-158.
- [11] 张强, 何升, 阙婷, 等. ROC 曲线确立血液学各指标在地贫筛查中的 CUT-OFF 值[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2013, 21(1): 27.

(收稿日期: 2015-01-10)