

· 论 著 ·

DNMT3B 基因启动子区 -579G>T 多态性与江苏宿迁地区人群胃癌易感性的分析*

邱巍, 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 DNA 甲基转移酶 3B(DNMT3B)基因启动子区 -579G>T 单核苷酸多态性(SNP)与江苏宿迁地区汉族人群胃癌(GC)易感性的关系。方法 病例组为 233 例胃癌患者,对照组为 208 例健康体检者。提取外周血基因组 DNA,利用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测 DNMT3B 启动子区 -579G>T 位点的基因频率分布。结果 TT 基因型与 GT+GG 基因型频率在胃癌组和对照组中差异有统计学意义($\chi^2=6.517, P<0.05$)。按年龄分组后,年龄 ≥ 60 岁的胃癌组和对照组人群间比较,TT 与 GT+GG 基因型频率差异有统计学意义($\chi^2=4.728, P<0.05$)。按性别分组后,2 组间基因型频率差异均无统计学意义($\chi^2=3.541, P>0.05; \chi^2=3.676, P>0.05$)。结论 DNMT3B -579G>T 与胃癌的遗传易感性有关联,可作为胃癌遗传易感性风险因素。

关键词: DNA 甲基转移酶 3B; 胃癌; 单核苷酸多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.20.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)20-2842-03

Study on the relationship between promoter -579G>T of DNMT3B with genetic susceptibility to gastric cancer in Jiangsu Suqian region*

QIU Wei, ZHAO Jianjiang, CHEN Sumei, LIU Dongsheng[△]

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

Abstract: Objective To investigate the association between DNA methyltransferase 3B(DNMT3B) promoter single nucleotide polymorphism(SNP) with susceptibility to gastric cancer(GC) in Han population of Suqian region. **Methods** A total of 233 patients with gastric cancer were recruited into the study group, 208 healthy persons were recruited in the control group. Genomic DNA was extracted from peripheral blood, and the frequency distribution of -579G>T locus in DNMT3B promoter region was detected by polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP). **Results** The distribution of TT genotypes compared with GT+GG in all the two groups were significantly different($\chi^2=6.517, P<0.05$). When stratified by age, there was significant difference between TT and GT+GG genotypes at the age range ≥ 60 years($\chi^2=4.728, P<0.05$). When stratified by gender, there was no significant difference between different gender groups($\chi^2=3.541, P>0.05; \chi^2=3.676, P>0.05$). **Conclusion** The DNMT3B -579G>T is associated with the genetic susceptibility of gastric cancer. It might be a risk factor of gastric cancer.

Key words: DNMT3B; gastric cancer; single nucleotide polymorphism

DNA 甲基化是表观遗传调控的一种,在转录调节与染色质结构重塑中起着非常重要的作用。异常的 DNA 甲基化可能导致全基因组的低甲基化和区域化,并可能使肿瘤抑制基因失活^[1]。DNA 甲基转移酶 3B(DNMT3B)是 DNMT3 家族中的一员,其家族包括 DNMT3A、DNMT3B 和 DNMT3L。DNMT3B 是从头甲基化酶,在多种肿瘤中异常表达^[2-6]。DNMT3B 基因启动子区的单核苷酸多态性(SNP)可改变基因的表达水平。本研究分析了 DNMT3B 基因启动子区 -579G>T 的 SNP 与江苏宿迁地区汉族人群胃癌(GC)易感性的关系,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1 月至 2015 年 12 月宿迁市人民医院住院的胃癌患者 233 例,其中男 177 例,女 56 例,平均年龄(62.1 \pm 11.1)岁。纳入研究的患者均符合中华人民共和国卫生行业标准中关于胃癌诊断的标准^[7]。对照组为健康体

检者 208 例,其中男 136 例,女 72 例,平均年龄(59.4 \pm 12.2)岁,排除心脑血管疾病、糖尿病、肿瘤、消化系统疾病及其他全身性疾病。2 组人群均为宿迁地区汉族人群,年龄、性别比例相匹配且个体之间均无血缘关系。

1.2 仪器与试剂 GeneAmp 9700 PCR 仪由美国 ABI 公司生产。FR-980A 生物电泳图像分析系统为上海复日科技有限公司生产。PCR 试剂盒和酶切试剂盒为大连宝生物工程有限公司生产。血液基因组 DNA 提取系统为北京天根生化科技公司生产。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取 按照 TIANGEN 血液基因组 DNA 提取试剂盒提取样本基因组 DNA,溶解于 pH 8.0 TE 缓冲液中,置 -20℃ 保存备用。

1.3.2 DNMT3B 基因启动子区 -579G>T 多态性检测 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法检测 -579G>T 位

* 基金项目:江苏省宿迁市科技局资助项目(S201208)。

作者简介:邱巍,男,检验师,主要从事生物化学与分子生物学检验研究。△ 通信作者,E-mail:445781722@qq.com。

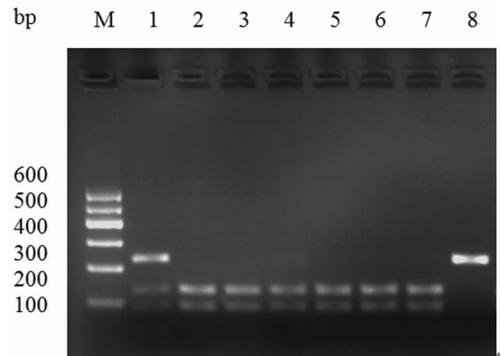
点的基因型。DNMT3B 基因启动子区 -579G>T 上游引物序列为 5'-GAG GTC TCA TTA TGC CTA GG-3', 下游引物序列为 5'-GGG AGC TCA CCT TCT AGA AA-3', 产物片段大小为 225 bp。PCR 反应体系为: 10×缓冲液(无 Mg²⁺) 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL, 10 μmol/L 上、下游引物各 1.0 μL, 5 U/μL Taq 聚合酶 0.125 μL, DNA 模板 2.0 μL(约 100 ng), 灭菌双蒸水补足体积至 25 μL。扩增条件为: 预变性 95 °C 5 min; 变性 95 °C 30 s, 退火 56 °C 30 s, 延伸 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 延伸 72 °C 10 min。使用 TAKARA 酶切试剂盒, 酶切体系为: PCR 产物 5.0 μL, Pvu II 10.0 U, 10 mol/L buffer 2.0 μL, 灭菌双蒸水补足体积至 20 μL; 酶切条件为 37 °C 水浴反应过夜。酶切产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 使用电泳图像分析系统记录和分析结果。随机抽取部分 PCR 产物送上海桑尼生物科技有限公司测序, 验证酶切结果的准确性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理和统计学分析, 计数资料以例数及百分率表示, 采用 χ^2 检验比较各基因型频率在病例组与对照组之间的差异, Logistic 回归校正年龄和性别因素, 计算比值比(OR)和 95% 可信区间(95% CI)分析相对危险度, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基因分型结果 DNMT3B -579G>T PCR 产物大小为 225 bp, 经 Pvu II 酶切后 GT 基因型为 225 bp、132 bp 和 93 bp 3 条片段; TT 基因型为 132 bp 和 93 bp 2 条片段; GG 基因型为 225 bp 1 条片段, 结果见图 1。测序结果显示 -579G>T 位点有 3 种基因型, 分别为 GT、TT 和 GG, 测序结果与酶切结果一致。

2.2 胃癌组与健康对照组基因多态性分布比较 经 Hardy-Weinberg 遗传平衡吻合度检验, DNMT3B -579G>T 在病例组($\chi^2 = 2.905, P = 0.088$)和对照组($\chi^2 = 1.231, P = 0.267$)中基因型分布符合遗传平衡定律。经 Logistic 回归校正年龄、性别后, 在 DNMT3B -579G>T 位点中, TT 与 GT+GG 基因型频率在胃癌组和对照组中差异有统计学意义($\chi^2 = 6.517, P < 0.05$)。按年龄分组后, ≥60 岁组中 TT 与 GT+GG 基因型频率差异有统计学意义($\chi^2 = 4.728, P < 0.05$), <60 岁组中 TT 与 GT+GG 基因型频率差异无统计学意义($\chi^2 = 1.833, P > 0.05$)。按性别分组后, 在男性和女性组中 TT 与 GT+GG 基因型频率差异均无统计学意义($\chi^2 = 3.541, P > 0.05$; $\chi^2 = 3.676, P > 0.05$), 见表 1。



注: M 表示 DNA 标记物; 1 表示 GT 型; 2~7 表示 TT 型; 8 表示 GG 型。

图 1 DNMT3B 启动子-579G>T 位点 PCR 产物酶切结果

表 1 DNMT3B -579G>T 基因型与等位基因频率分析[n(%)]

项目	TT 基因型		GT+GG 基因型		χ^2	P	OR(95%CI)
	胃癌组(n=233)	对照组(n=208)	胃癌组(n=233)	对照组(n=208)			
总数	202(86.7)	161(77.4)	31(13.3)	47(22.6)	6.517	0.012	1.902(1.155~3.132)
年龄							
<60 岁	71(30.5)	60(28.8)	14(6.0)	20(9.6)	1.833	0.176	1.690(0.787~3.631)
≥60 岁	131(56.2)	101(48.6)	17(7.3)	27(13.0)	4.728	0.030	2.060(1.065~3.986)
性别							
男	144(61.8)	106(51.0)	25(10.7)	32(15.4)	3.541	0.060	1.739(0.973~3.106)
女	58(24.9)	55(26.4)	6(2.6)	15(7.2)	3.676	0.055	2.636(0.954~7.283)

2.3 DNMT3B -579G>T 等位基因频率在中国汉族人、韩国人和美国白种人中的分布 中国汉族人 DNMT3B -579G>T 等位基因频率与文献报道的韩国人^[8]和美国白种人^[9]等位基因频率之间比较, 发现与韩国人差异无统计学意义($P > 0.05$), 而与美国白种人差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 DNMT3B -579G>T 等位基因频率在中国汉族人和韩国人、美国白种人中的分布[n(%)]

人群	n	TT 型	GT 型	GG 型	P
中国汉族人	208	161(77.4)	42(20.2)	5(2.4)	-
韩国人	432	317(73.4)	108(25.0)	7(1.6)	0.342
美国白种人	843	137(16.2)	401(47.6)	305(36.2)	0.000

注: - 表示无数据。

3 讨 论

DNA 甲基化在生物基因组中是一种常见的复制后修饰, 它参与机体内多种重要的生理过程, 包括调节基因表达、基因印记、维持染色体完整性等^[10]。甲基化转移酶通过调节基因启动子区 CpG 岛的 DNA 甲基化水平影响基因的表达。基因启动子区 CpG 岛的高甲基化被视为肿瘤抑制基因失活及其他遗传病发生的物质基础, 此现象常见于各种恶性肿瘤中。DNMT3B 位于染色体 20q11.2, 大小为 47 kb。DNMT3B 基因启动子区的单核苷酸多态性可能影响基因表达水平^[3]。研究表明, 其与各种癌症的易感性相关, 如肝癌、肺癌、鼻咽癌、乳腺癌、胃癌等^[3-6, 11]。

在本研究中, 233 例胃癌病例的 DNMT3B -579G>T 基因型 TT 基因型频率为 0.867, 显著高于 208 例对照组的基因

型频率 0.774; TT 基因型与 GT+GG 基因型频率在胃癌组和对照组中差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.517, P < 0.05$)。经年龄分组后,在年龄 ≥ 60 岁的患者中,基因型频率差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Khoram-Abadi 等^[11]对 1 387 例胃癌患者和 2 064 例对照人群的聚类分析发现 DNMT3B -579G>T 和胃癌无相关性,而与结直肠癌有相关性。Ahmadi 等^[12]以西伊朗人群中的 100 例胃癌患者和 112 例健康对照者为研究对象,评估了 DNMT3B -579G>T 多态性与胃癌风险的关系,发现在病例组和对照组之间的基因分布差异无统计学意义;然而,临床病理分类分析发现-579 T 等位基因可能增加胃癌患者病理特征恶性进展的相对风险。这可能与 DNMT3B -579G>T 等位基因频率在中国汉族人群和其他人群中的分布频率不同有关。许多研究表明 DNMT3B 基因多态性与癌症易感性相关。然而,不同的研究方法和样本量可能导致研究的结论不尽相同。因此,需要更准确的基因型检测方法和较大样本量来研究 DNMT3B -579G>T 多态性与癌症的关联。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Yang XX, He XQ, Li FX, et al. Risk-association of DNA methyltransferases polymorphisms with gastric cancer in the Southern Chinese population[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(7): 8364-8378.
- [3] Lao Y, Wu H, Zhao C, et al. Promoter polymorphisms of DNA methyltransferase 3B and risk of hepatocellular carcinoma[J]. Biomedical Reports, 2013, 1(5): 771-775.
- [4] Shen H, Wang L, Spitz MR, et al. A novel polymorphism

in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(17): 4992-4995.

- [5] Chang KP, Hao SP, Tsang NM, et al. Gene expression and promoter polymorphisms of DNA methyltransferase 3B in nasopharyngeal carcinomas in Taiwanese People: a case-control study[J]. Oncol Rep, 2008, 19(1): 217-222.
- [6] Cebrian A, Pharoah PD, Ahmed S, et al. Genetic variants in epigenetic genes and breast cancer risk[J]. Carcinogenesis, 2006, 27(8): 1661-1669.
- [7] 中华人民共和国卫生部. WS316-2010 胃癌诊断标准[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2010.
- [8] Lee SJ, Jeon HS, Jang JS, et al. DNMT3B polymorphisms and risk of primary lung cancer[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(2): 403-409.
- [9] Liu Z, Wang L, Wang L, et al. Polymorphisms of the DNMT3b gene and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study[J]. Cancer Letters, 2008, 268(1): 158-165.
- [10] 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.
- [11] Khoram-Abadi KM, Forat-Yazdi M, Kheirandish S, et al. DNMT3B -149 C>T and -579 G>T polymorphisms and risk of gastric and colorectal cancer: a meta-analysis[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(6): 3015-3020.
- [12] Ahmadi K, Soleimani A, Irani S, et al. DNMT3B -579 G>T promoter polymorphism and the risk of gastric cancer in the West of Iran[J]. J Gastrointest Cancer, 2017: 1-5.

(收稿日期: 2017-04-13 修回日期: 2017-06-17)

(上接第 2841 页)

- [2] 胡自强. 脊柱结核的诊断及手术治疗进展[J]. 医学综述, 2014, 20(18): 3372-3374.
- [3] 中国防痨协会临床专业委员会. 结核病临床诊治进展年度报告(2012 年)[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(7): 488-510.
- [4] Fu Y, Yi Z, Wu X, et al. Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(12): 4246-4251.
- [5] 李君, 李泽清. 耐多药骨关节结核的诊断与治疗新进展[J]. 青海医药杂志, 2015, 45(2): 73-74.
- [6] 李丹, 杜德兵, 陈玉龙, 等. T 细胞斑点试验、结核蛋白芯片、抗酸染色涂片和结核菌素试验对肺结核病诊断价值的比较[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(11): 38-41.
- [7] Winthrop L, Weinblatt E, Daley L. You can't always get what you want, but if you try sometimes (with two tests-TST and IGRA-for tuberculosis) you get what you need[J]. Ann Rheum Dis, 2012, 71(11): 1757-1760.
- [8] 李文文, 冯喜英, 关巍. 结核病诊断与治疗的研究进展

[J]. 中华肺部疾病杂志, 2016, 9(2): 204-206.

- [9] 刘盼含, 刘钢, 徐源. 结核菌素皮试和 γ 干扰素释放试验在筛查慢性关节炎患者潜伏性结核感染中的研究进展[J]. 四川医学, 2015, 36(5): 729-732.
- [10] 张梅, 焦祖伟, 聂渝琼. 我国结核病诊断方法现状与进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(12): 3018-3020.
- [11] Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, et al. Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection-United States, 2010[J]. MMWR Recomm Rep, 2010, 59(RR/5): 1-25.
- [12] 郝云连. 结核菌素试验在临床结核病诊断中的意义[J]. 中国社区医师, 2014, 30(8): 111.
- [13] 高玉然, 张翠英, 刘琳, 等. 结核抗体检测及结核菌素试验在结核病诊断中的价值[J]. 中国热带医学, 2011, 11(5): 542-544.
- [14] 林伟灵. 结核患者结核抗体、血沉以及 C-反应蛋白检测的临床分析[J]. 中国医药导报, 2012, 9(31): 55-56.

(收稿日期: 2017-03-28 修回日期: 2017-06-02)