

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.02.002

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.02.002>

ATM基因rs227060位点单核苷酸多态性与肺癌易感性的相关性

彭华^{1*}, 董巍樯^{2*}, 龚咏晴¹, 周晶¹, 郭紫芬¹

(南华大学 1. 药物药理研究所; 2. 附属第一医院妇产科, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] **目的:** 探讨共济失调毛细血管扩张症突变基因(ataxia telangiectasia mutated, ATM)rs227060位点单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)与肺癌易感性之间的相关性。**方法:** 采用聚合酶链反应-SNP敏感性分子开关方法, 检测225例肺癌患者和128例健康体检者ATM基因rs227060多态位点等位基因以及基因型频率分布特点; 并应用非条件Logistic回归法统计分析rs227060单核苷酸多态性与肺癌的相关性。**结果:** rs227060多态位点共检测出CC, CT, TT三种基因型和C, T两种等位基因, 其在肺癌组与对照组的基因型分布频率为: CC基因型17.3%与29.7%、CT基因型61.4%与59.3%、TT基因型21.3%与11%, 两组间基因型频率和等位基因频率分布差异均有统计学意义($P < 0.05$)。在对ATM rs227060基因型的多态性分析过程中发现: 吸烟史在肺癌组与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$), 而年龄、性别、肿瘤家族史在肺癌组与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$); 且以CC基因型作为对照, 携带TT基因型的个体患肺癌的风险是携带CT基因型个体的3.49倍(OR=1.829; 95%CI: 1.045~3.199)。**结论:** ATM基因rs227060位点单核苷酸多态性与肺癌易感性存在相关性, 且携带TT基因型可增加肺癌的发病风险。

[关键词] 肺癌易感性; 单核苷酸多态性; ATM基因; SNP敏感性分子开关

Association between single nucleotide polymorphisms of rs227060 site in ATM gene and lung cancer susceptibility

PENG Hua^{1*}, DONG Weilei^{2*}, GONG Yongqing¹, ZHOU Jing¹, GUO Zifen¹

(1. Institute of Pharmacy and Pharmacology; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang Hunan 421001, China)

Abstract **Objective:** To explore the correlation between the single nucleotide polymorphism (SNP) of rs227060 site in ATM gene and lung cancer susceptibility. **Methods:** A total of 225 lung cancer cases and 128 healthy normal control people were recruited into current study. The allele and the distribution frequency of genotype at the polymorphism of rs227060 loci in ATM gene was detected by PCR-On/Off Switch technique in all patients. The correlation between ATM rs227060 loci and lung cancer was analyzed with unconditional Logistic regression

* 为共同第一作者

收稿日期 (Date of reception): 2016-11-08

通信作者 (Corresponding author): 郭紫芬, Email: guozifen@aliyun.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81102516); 南华大学大学生研究生科研创新项目 (2016XCXC36)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81102516) and the Graduate Students Scientific Research Innovation Projects of University of South China (2016XCXC36), P. R. China.

analysis. **Results:** Three genotypes, CC, CT, TT, and two alleles, C, T, were detected in the polymorphism allele of rs227060 loci, the distribution frequency of the genotype in lung cancer group and control group were CC (17.3% and 29.7%), CT (61.3% and 59.3%), TT (21.4% and 11%), the differences of the frequency of genotype and allele between two groups were not statistically significant ($P < 0.05$). During the analysis of the polymorphism of ATM rs227060 genotype, the difference in smoking history was not statistically significant between the two groups ($P > 0.05$), but in age, gender, family history of malignancy it was statistically different between the two groups ($P < 0.05$). Compared with genotype CC, TT genotype increased the risk of lung cancer by 3.49 times than CT genotype (OR = 1.829; 95%CI: 1.045–3.199). **Conclusion:** There was an association between the SNP of rs227060 site in ATM gene and lung cancer susceptibility, and carrying the TT genotype may increase the risk of lung cancer.

Keywords lung cancer susceptibility; gene polymorphism; ATM gene; PCR-On/Off Switch

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 在恶性肿瘤中发病率占首位, 主要由外在因素和遗传因素共同作用引起。外在因素主要包括吸烟、环境、职业因素, 且吸烟是造成肺癌的主要原因之一。但是只有5%~10%的吸烟者会发展成肺癌, 这与香烟中的致癌物质对不同人群中的个体易感性有关^[1-2]。从20世纪以来, 越来越多的研究表明个体易感性的差异可能是通过基因编码的DNA修复蛋白相关。基因编码的DNA修复蛋白可导致个体肿瘤遗传风险的差异性。因此, 家族遗传因素所引起的作用逐渐被人们所重视^[3-5]。其发病机制至今尚不完全清楚, 但与其他恶性肿瘤相似的是, 基因背景可能是影响发病的重要因素。毛细血管扩张性共济失调症突变基因(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)是导致共济失调毛细血管扩张症的唯一致病基因, 与恶性肿瘤的发生发展密切相关^[6], 定位于染色体11q22.3, 长度为150 kb, 具有66个外显子, 内含子100~11 000 bp, 其编码分子质量($M_r \times 10^3$)为370的磷酸肌醇3-激酶(PI3K)蛋白, 属于PI3K样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族, 这个家族的功能通过蛋白磷酸化在DNA损伤修复通路中起重要作用。近年来研究^[7-9]表明: ATM基因突变可以导致基因组不稳定性增加、DNA双链断裂修复障碍, 影响细胞对辐射的敏感性, 从而使机体的肿瘤易感性增强。目前, 针对ATM基因多态性与恶性肿瘤的相关性国内外已有大量文献报道, 发现ATM基因的多态性增加了乳腺癌^[10]、甲状腺癌^[11]和口腔癌^[12]的发病风险, 但是关于ATM基因rs227060位点多态性与肺癌易感性关系的研究却始终没有一个统一的结论。因此, 本研究采用了聚合酶链反应-SNP敏感性分子开关技术检测ATM基因rs227060位点单核苷酸多态性, 来探讨

rs227060单核苷酸多态位点、吸烟、年龄、性别、肿瘤家族史与肺癌易感性的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

研究对象来源于2015年10月至2016年8月在南华大学附属第一医院及衡阳市中医院就诊的肺癌患者, 采集肺癌患者225例(病例组), 男150例, 女75例, 纳入标准: 1)病例均经病理确诊证实为原发性肺癌患者; 2)且未经抗癌治疗; 3)无合并其它肿瘤; 4)年龄25~70岁。排除标准: 1)严重血管、肺、肾等重要脏器严重器质性病变; 2)有其它器官恶性肿瘤者; 3)内风湿病病史者。同时收集体检健康人群128例(对照组), 男68例, 女60例, 随机选取, 年龄20~70岁, 并收集研究对象的年龄、吸烟史及肿瘤家族史等相关资料。相关问题定义如下: 1)吸烟史。每天吸烟或以上累计持续1年以上; 2)肿瘤家族史。被调查对象的二级亲属(祖父母、外祖父母、叔、舅)、一级家属(父母、子女和同胞)中均有肺癌发生的情况。本研究经医学伦理委员会批准, 所有研究对象均签订了知情同意书。

1.2 DNA提取

采集研究对象的外周静脉血(空腹)2 mL, 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝, 采用血液基因组DNA试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取全血基因组DNA。提取DNA后用超微量分光光度计测得血液基因组DNA的吸光度($A_{260/280\text{ nm}}$)值, 其比值都处于1.7~2.0之间, 这表明所提取的DNA无RNA污染和蛋白污染。然后再采用0.8%的琼脂糖凝胶电泳辅

以验证, 验证成功置于 -80°C 冰箱中保存, 以便后续实验。

1.3 引物设计与合成

使用 Gene Bank 数据库查询 ATM 基因 (000011.10) 序列及相应 rs227060 多态位点信息。利用 Primer Premier 6.0 软件自行设计等位基因特异性引物, 引物由上海生物技术有限公司合成(表1)。

1.4 方法

采用聚合酶链反应-SNP 突变敏感性分子开关^[13](PCR on-off switch) 进行快速基因分型。上游引物(F1)、(F2)分别与下游引物(R)扩增, 上游引物等位基因特异性检测引物与模板配对时, 聚

合酶链反应能够延伸并得到扩增产物。而当上游引物等位基因特异性检测引物与模板不完全配对时, 聚合酶链反应不能被延伸, 也不能得到扩增产物。因此, 当上游引物(F1)与一个模板匹配时则为CC基因型; 当上游引物(F2)与一个模板匹配时则为TT基因型; 而(F1)与(F2)均得到产物时则为CT基因型。聚合酶链反应体系(25 μL): 包括模板DNA 1.5 μL 、引物各1 μL 、2 \times Pfu Mix 12.5 μL 、ddH₂O 补足至25 μL 。反应条件: 1.94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 1个循环; 2.94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40个循环; 3.72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 1个循环。取PCR扩增产物5 μL 经1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳, 后置凝胶成像系统GIS-1600(上海天能科技有限公司)下观察并拍照。

表1 ATM rs227060位点分子开关检测引物

Table 1 ATM rs227060 locus molecular switch detection primer

引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	扩增片段长度/bp
上游引物序列1(F1)	AATACTCAA <u>AA</u> AGCTTCTC <u>T</u>	54	331
上游引物序列2(F2)	AATACTCAA <u>AA</u> AGCTTCTC <u>T</u>	54	331
下游引物序列(R)	TACTTCCATTATTTCTTG	55	—

标下划线碱基代表为多态位点, 检测引物3'末端均经过硫代磷酸化修饰。

Underlined nucleotide were polymorphic site, and the 3' phosphorothioate-modified primers were employed.

1.5 统计学处理

数据采用SPSS 18.0统计软件处理。采用交叉法分析肺癌组与对照组患者性别、年龄、吸烟史及肿瘤家族史有无统计学差异; 采用 χ^2 检验分别对肺癌组与对照组人群rs227060基因型分布频率以及等位基因频率; 应用非条件logistic回归模型计算风险比值(OR)和95%可信区间(95%CI)。所有检验为双侧概率检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR-On/off switch 对 ATM 基因 rs227060 位点分型

采用PCR-on/off Switch对rs227060多态位点特异性扩增, 根据3'末端的多态位点不同即对其基因分型。电泳结果显示纯合子只有一条产物带, 且当上游引物(F1)与下游引物(R)扩增得到产物则为CC基因型, 上游引物(F2)与下游引物(R)扩增得到产物则为TT基因型。电泳结果显示杂合子两条正

向引物均扩增的两条产物条带, 且当(F1)与(F2)均得到产物则为CT基因型(图1)。

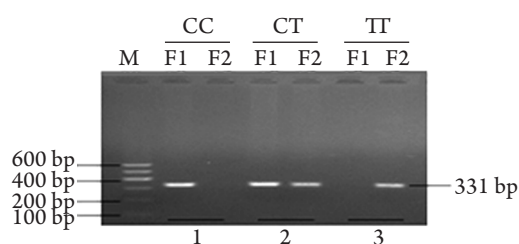


图1 On/Off Switch介导的rs227060C/T多态PCR产物1.5%琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 1.5% gel electrophoretic map of the produce of rs227060C/T phosphorothioate-modified allele-specific primers extended by ON/OFF Switch

M: DNA marker; 1, 2, 3代表不同的样本; F1: 上游引物1(与C碱基配对的引物); F2: 上游引物2(与T碱基配对的引物)。

M: DNA marker; 1, 2, 3 represent different sample; F1: Forward primer1 (a primer pairing with C base); F2: Forward primer2 (a primer pairing with T base).

2.2 基因多态位点的频率分布

在该研究对象中, ATM基因rs227060多态位点有3种基因型, 即CC, CT, TT基因型。其中CT基因型在肺癌组最常见, 其次是TT, CC基因型。经基因型分析发现, 肺癌组与对照组分布频率分别为: CC基因型17.3%与29.7%, CT基因型61.4%与59.3%, TT基因型21.3%与11%; 两组间基因型和等位基因频率差异均有统计学意义($P < 0.05$); 以CC基因型作为参照基因型, CT基因型OR值为0.524(95%CI: 0.350~2.751; $P = 0.45$), TT基因型OR值为1.829(95%CI: 1.045~3.199; $P = 0.028$)。这些结果提示TT基因型会增加肺癌发病风险, 而CT基因型可减少肺癌发病风险(表2)。

2.3 两组患者一般资料比较

病例组和对照组在吸烟史差异无统计学意义

($P > 0.05$); 而性别、年龄及肿瘤家族史在两组间差异均有统计学意义($P < 0.05$), 且有家族遗传史者在肺癌组的分布频率高于健康对照组($\chi^2 = 9.831$, $P = 0.002$, 表3)。

2.4 ATM基因型肺癌危险因素分析

对ATM基因型相关肺癌危险因素(吸烟史、性别、年龄、肿瘤家族史)进行非条件logistic回归分析。结果显示: ATM rs227060基因型与吸烟史在肺癌组与对照组相比无统计学意义($P > 0.05$), 说明吸烟史可能不影响rs227060位点多态性对肺癌的发病风险; 而ATM rs227060基因型与性别、年龄、肿瘤家族史在肺癌组与对照组相比有统计学意义($P < 0.05$), 说明rs227060位点多态性与性别、年龄和肿瘤家族史对肺癌发病风险存在一定的影响(表4)。

表2 ATM基因rs227060位点基因型及等位基因频率分布

Table 2 Frequency distribution of ATM gene rs227060 locus genotype and allele

组别	基因型频率/[例(%)]				等位基因频率/[例(%)]		
	CC	CT	TT	P	C	T	P
病例组	39 (17.3)	138 (61.3)	48 (21.4)	0.007	216 (48)	234 (52)	0.008
对照组	38 (29.7)	76 (59.3)	14 (11)		152 (59.4)	104 (40.6)	

表3 组间一般资料比较

Table 3 Comparison of general date between each group

一般资料	病例组/[例(%)]	对照组/[例(%)]	χ^2	P
性别			8.715	0.004
男	155 (68.9)	68 (53.1)		
女	70 (31.1)	60 (46.9)		
年龄/岁			4.845	0.031
<50	78 (34.7)	30 (23.4)		
≥ 50	147 (65.3)	98 (76.6)		
吸烟史			2.103	0.151
有	98 (43.6)	66 (51.6)		
无	127 (56.4)	62 (48.4)		
肿瘤家族史			9.831	0.002
有	58 (25.8)	15 (11.7)		
无	167 (74.2)	113 (88.3)		

表4 ATM基因型相关肺癌危险因素分析(病例组/对照组)

Table 4 ATM genotype analysis of risk factors related to lung cancer (case group/control group)

危险因素	rs227060/例			OR (95%CI)	P
	C/C	C/T	T/T		
性别				2.205 (1.375~3.537)	0.001
男	25/23	90/35	28/10		
女	14/15	48/41	20/4		
年龄/岁				2.090 (1.242~3.517)	0.005
<50	14/22	45/30	15/6		
≥50	25/16	93/46	33/8		
吸烟史				0.673 (0.423~1.069)	0.094
有	11/17	75/35	20/9		
无	28/21	63/41	28/5		
肿瘤家族史				3.032 (1.617~5.687)	0.001
有	9/5	35/15	8/6		
无	30/33	103/61	40/8		

3 讨论

肺癌是由致病因素和遗传因素共同作用的多基因遗传病, 临床病死率极高。基因多态性与人类疾病的关联十分密切。但目前还没有准确治疗方法。所以易感基因对疾病的早期筛查、诊断十分重要。本研究采用聚合酶链反应-SNP敏感性分子开关方法筛选出肺癌遗传易感基因。利用高保真DNA聚合酶介导的SNP敏感性分子开关由耐外切酶消化的磷酸修饰碱基特异性引物, 对硫化磷酸修饰的碱基特异性引物而言, 高保真聚合酶分子中心发挥了复合分子开关中“开”和“关”的效能。该分子开关几个先决条件: 1)高保真DNA聚合酶; 2)引物3'末端必须进行硫代磷酸化修饰, 当引物与模板配对时, 将会达到一个配对引物延伸的效果, 有PCR产物, 即表现出分子开关中“开”的效能; 当引物与模板不配对时, 引物将终止延伸, 无PCR产物, 即表现出分子开关中“关”的效能。相比其他方法, 该技术具有高度灵敏性、检测成本低、耗材少、快速检测等优势。

rs227060位点在多种肿瘤等疾病中存在多态性。Rendleman等^[14]在病例对照组中研究发现ATM基因rs227060位点与非霍奇金淋巴瘤发病风险存在相关性, 为了评估ATM rs227060位点在非霍奇金淋巴瘤中的作用, 对rs227060, rs611646多态位点进行了连锁不平衡分析, 得出rs227060多态位点等位基因频率为0.642, 存在连锁不平衡性, 后再经分子和遗传学研究表明: rs227060多态位点在淋巴瘤

中发挥重要的作用。接着, Wang等^[15]在病例对照研究中发现: rs227060位点基因型及等位基因频率在儿童白血病研究中没有统计学意义($P=0.2474$)。然而, 这可能是受ATM基因遗传背景与环境因素影响, 如二手烟或放射线照射因素相互作用, 可能改变ATM基因位点突变, 提示ATM单基因型改变可能影响台湾地区儿童白血病发病风险。

在本研究收集的225例肺癌患者和128例健康正常者ATM基因rs227060位点多态性与肺癌易感性的相关研究中, 结果证实: 肺癌患者和体检健康者rs227060T等位基因频率分别为0.52和0.406, 低于高加索人(0.66), 且在高加索人群中ATM基因多态性与肺癌的发病风险不存在相关性^[16], 这些研究的差异可能与人种不同导致基因遗传背景的差异有关。并以CC基因型作为参照物, 携带TT基因型的个体患肺癌的风险是携带CT基因型个体的3.49倍。因此, rs227060位点携带TT基因型与肺癌的发病风险存在相关性($OR>1$), 且携带CT基因型的个体发生肺癌的风险可能较低。与Yang等^[16]的研究结果基本一致。最后, 对ATM基因型相关肺癌危险因素(吸烟史、性别、年龄、肿瘤家族史)进行非条件Logistic回归分析, 结果发现吸烟史可能不影响rs227060位点多态性对肺癌的发病风险, Hsia等^[17]在台湾人群的一项病例对照研究中发现: 吸烟也不影响rs227060位点多态性对肺癌的发病风险($P=0.7779$), 与本文中吸烟对rs227060位点多态性对肺癌的发病风险的结论一致。前人^[18]在关于肺癌的一些危险因素的研究中也有证实: 直系亲属

有肺癌史的阳性者罹患肺癌的危险度达到1.95, 且亲缘关系越近, 基因型分布也就越相似, 导致肺癌遗传风险也就越高。因此, 本研究表明ATM基因rs227060单核苷酸多态位点与肺癌的易感性可能存在相关性。

综上所述, 肺癌的危险因素在发病中起着重要的作用, 其基因遗传因素也逐渐被人们所重视。首先, 本研究的研究对象均来自医院, 不可避免地存在选择性偏倚; 其次, 本研究纳入对象均为原发性肺癌患者, 后续将采取样本多元化进行研究; 最后, 下一步的实验研究尽可能多发现ATM基因多态位点, 进行多位点的联合研究分析。因此, 利用聚合酶链反应-SNP敏感性分子开关技术对肺癌易感基因的筛查, 能更好的为进一步肺癌早期诊断和发病风险评估奠定理论基础。

参考文献

- Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5): 277-300.
- Deschasaux M, Souberbielle JC, Latino-Martel P, et al. Prospective associations between vitamin D status, vitamin D-related gene polymorphisms, and risk of tobacco-related cancers[J]. *Am J Clin Nutr*, 2015, 102(5): 1207-1215.
- Hsia TC, Liu CJ, Chu CC, et al. Association of DNA double-strand break gene XRCC6 genotypes and lung cancer in Taiwan[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(3): 1015-1020.
- Tsai CW, Tsai MH, Tsou YA, et al. The joint effect of smoking and hOGG1 genotype on oral cancer in Taiwan[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(9): 3799-3803.
- Liu CJ, Hsia TC, Tsai RY, et al. The joint effect of hOGG1 single nucleotide polymorphism and smoking habit on lung cancer in Taiwan[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(10): 4141-4145.
- Kang J, Deng XZ, Fan YB, et al. Relationships of FOXE1 and ATM genetic polymorphisms with papillary thyroid carcinoma risk: a meta-analysis[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(7): 7085-7096.
- Ying MF, Zhao R. Role of single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes in susceptibility to pancreatic cancer in Chinese population[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(1): gmr7273.
- Fachal L, Gómez-Caamaño A, Peleteiro P, et al. Association of a XRCC3 polymorphism and rectum mean dose with the risk of acute radio-induced gastrointestinal toxicity in prostate cancer patients[J]. *Radiother Oncol*, 2012, 105(3): 321-328.
- Biskup E, Naym DG, Gniadecki R. Small-molecule inhibitors of Ataxia Telangiectasia and Rad3 related kinase (ATR) sensitize lymphoma cells to UVA radiation[J]. *J Dermatol Sci*, 2016, 84(3): 239-247.
- Mao C, Chung VC, He BF, et al. Association between ATM 5557G>A polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(2): 1113-1118.
- Song CM, Kwon TK, Park BL, et al. Single nucleotide polymorphisms of ataxia telangiectasia mutated and the risk of papillary thyroid carcinoma[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2015, 56(1): 70-76.
- Bau DT, Chang CH, Tsai MH, et al. Association between DNA repair gene ATM polymorphisms and oral cancer susceptibility[J]. *Laryngoscope*, 2010, 120(12): 2417-2422.
- Zhang J, Li K. On-off regulation of 3' exonuclease excision to DNA polymerization by Exo+ polymerase. *J Biochem Mol Biol*, 2003, 36(6): 525-528.
- Rendleman J, Antipin Y, Reva B, et al. Genetic variation in DNA repair pathways and risk of non-Hodgkin's lymphoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101685.
- Wang CH, Wu KH, Yang YL, et al. Association between Ataxia Telangiectasia Mutated gene polymorphisms and childhood leukemia in Taiwan[J]. *Chin J Physiol*, 2011, 54(6): 413-418.
- Yang H, Spitz MR, Stewart DJ, et al. ATM sequence variants associate with susceptibility to non-small cell lung cancer[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(10): 2254-2259.
- Hsia TC, Tsai CW, Liang SJ, et al. Effects of ataxia telangiectasia mutated (ATM) genotypes and smoking habits on lung cancer risk in Taiwan[J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(9): 4067-4071.
- Yao XQ, Sun SL, Liu P, et al. Characteristics of distribution in 1213 cases of lung cancer[J]. *J Occupational Health and Damage*, 2008, 18(1): 9-10.

本文引用: 彭华, 董巍, 龚咏晴, 周晶, 郭紫芬. ATM基因rs227060位点单核苷酸多态性与肺癌易感性的相关性[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(2): 227-232. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.02.002
Cite this article as: PENG Hua, DONG Weilei, GONG Yongqing, ZHOU Jing, GUO Zifen. Association between single nucleotide polymorphisms of rs227060 site in ATM gene and lung cancer susceptibility[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(2): 227-232. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.02.002