

19 个 STR 座位基因多态性与 胃肿瘤的关联性研究

于来水¹ 潘凌子¹ 肖南¹ 梁晓华¹ 刘辉²

[摘要] **目的:**探讨 19 个短串联重复序列 (STR) 座位 (D19S433、D5S818、D21S11、D18S51、D6S1043、D3S1358、D13S317、D7S820、D16S539、CSF1PO、Penta D、vWA、D8S1179、TPOX、Penta E、TH01、D12S391、D2S1338、FGA) 基因多态性与胃肿瘤的关联。**方法:**利用毛细管电泳技术检测 38 例胃肿瘤患者 19 个 STR 座位的基因多态性并进行基因平衡 (Hardy-Weinberg) 分析, 对照组为 200 例健康个体, 通过统计学方法比较两组数据各位点基因频率。**结果:**实验组 19 个 STR 座位基因分布情况符合遗传规律, STR 座位检测结果显示: 实验组 TH01-7、D5S818-15、D3S1358-18、D7S820-9、Penta E-23、D2S1338-19 的频率显著高于对照组 ($P < 0.05$), D7S820-12、D12S391-17、D2S1338-20 的频率显著低于对照组 ($P < 0.05$), Penta E 座位纯合子的实际频率显著低于理论频率 ($P < 0.05$)。**结论:**TH01-7、D5S818-15、D3S1358-18、D7S820-9、Penta E-23、D2S1338-19 6 个基因座附近可能存在胃肿瘤的易感基因, D7S820-12、D12S391-17、D2S1338-20 3 个基因座附近可能存在胃肿瘤的抑制基因, Penta E 座位的杂合子表现可能增加患胃肿瘤的风险。

[关键词] 胃肿瘤; 短串联重复序列; 多态性

doi: 10.13201/j.issn.1004-2806-b.2016.04.002

[中图分类号] R735.2 **[文献标志码]** A

Association between genetic polymorphism of 19 STR loci and gastric cancer

YU Laishui¹ PAN Lingzi¹ XIAO Nan¹ LIANG Xiaohua¹ LIU Hui²

(¹Dalian Blood Centre, Dalian, 116001, China; ²Dalian Medical University)

Corresponding author: LIANG Xiaohua, E-mail: liangxiaohua@dlbc.org.cn; LIU Hui, E-mail: liuhui60@sina.com

Abstract Objective: To explore the association between gastric cancer and the genetic polymorphism of 19 STR loci (D19S433, D5S818, D21S11, D18S51, D6S1043, D3S1358, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, vWA, D8S1179, TPOX, Penta E, TH01, D12S391, D2S1338 and FGA). **Method:** The capillary electrophoresis was applied to analyze 19 STR loci in 38 patients with gastric cancer and Hardy-Weinberg balance was tested. Two hundred healthy people were collected as control group. The significant differences in frequency of gene and homozygote were analyzed by statistical methods. **Result:** The gene distributions of 19 STR in experimental group were consistent with hereditary rules. The frequency of TH01-7, D5S818-15, D3S1358-18, D7S820-9, PentaE-23 and D2S1338-19 in the experimental group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$), while the frequency of D7S820-12, D12S391-17 and D2S1338-20 were obviously lower ($P < 0.05$), and the actual frequency of homozygote at the locus PentaE was obviously lower than the theoretical frequency ($P < 0.05$). **Conclusion:** There may be predisposing genes of gastric cancer near the six loci of TH01-7, D5S818-15, D3S1358-18, D7S820-9, PentaE-23 and D2S1338-19, while there may be suppressor gene of gastric cancer near the three loci of D7S820-12, D12S391-17 and D2S1338-20, and the expression of heterozygote at the locus Penta E may increase the risk of gastric cancer.

Key words gastric cancer; short tandem repeats; polymorphism

短串联重复序列 (short tandem repeats, STR) 又名微卫星 (microsatellite, MS) DNA, 其由 2~6 个核苷酸组成, 广泛分布于人类的染色体中, 具有高度多态性和个体特异性^[1-2]。研究发现微卫星的不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 与肿瘤的发生具有密切的关系, 在肿瘤的进程中亦有很高

的研究价值^[3-7]; 鉴于微卫星 DNA 与肿瘤的相关性, 而胃肿瘤又属于全球高发的恶性肿瘤之一^[8], 本实验意在通过检测胃肿瘤患者染色体中部分 STR 的多态性, 找到与胃肿瘤相关的 STR 序列, 从而为胃肿瘤的早期预防、诊断、基因治疗提供一定的理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

实验组选取我地区经术后病理确诊胃肿瘤 (多

¹大连市血液中心 (辽宁大连, 116001)

²大连医科大学

通信作者: 梁晓华, E-mail: liangxiaohua@dlbc.org.cn; 刘辉, E-mail: liuhui60@sina.com

为进展期胃肿瘤)患者 38 例,未经放化疗治疗,其中男 26 例,女 12 例;年龄 42~88 岁。静脉采血,ED-TA 抗凝,血液标本由大连市友谊医院提供;对照组选取大连地区健康人 200 例,无明确亲缘关系,年龄 30~60 岁,检测结果由大连市血液中心提供。

1.2 仪器与试剂

台湾 RBC BioScience 核酸自动纯化系统、美国 ABI-3130 遗传分析仪、美国 ABI PE970 台湾 RBC BioScience 核酸自动纯化系统、美国 ABI-3130 遗传分析仪、美国 ABI PE9700 PCR 扩增仪、美国 Luminex 100 IS 分析系统、英国 Biochrom 紫外分光光度计、北京天根 TIANamp Blood DNA Kit 血液基因组 DNA 提取试剂盒、北京基点认知 Goldeneye DNA 身份鉴定系统 20A。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 的提取 采用北京天根公司生产的“血液基因组 DNA 提取试剂盒”对血液标本进行 DNA 提取,实验操作过程严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.2 STR 的检测 采用北京基点认知公司生产的“Goldeneye DNA 身份鉴定系统 20A”对 DNA 进行 STR 分型检测,实验操作过程严格按照试剂盒说明书进行,应用 Data Collection 软件对检测结果进行数据采集,采用 GeneMapper 软件对检测数据进行分析。

1.4 统计学分析

实验数据采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,基因平衡(Hardy-Weinberg)分析采用吻合度检验法验证,计算公式如下: $\chi^2 = \sum (\text{期望值} - \text{观察值})^2 / \text{期望值}$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;STR 基因频率分析选用 χ^2 检验,纯合子分布分析选用二项分布检验,双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STR 检测结果的判读

本研究严格按照要求进行 STR 内部质控及对照实验,结果显示内部质控与对照结果符合规定要求,说明本实验检测结果准确、有效。某患者 STR 检测结果见图 1。

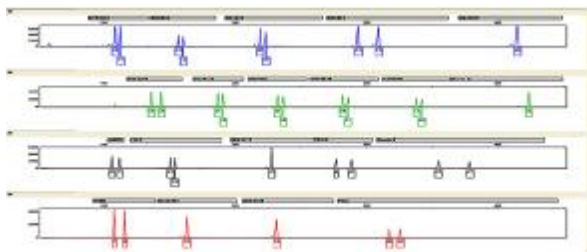


图 1 某患者 STR 检测结果图

检测结果的判读:基因座如出现 2 个峰值,说明检出 2 个“等位基因”,视为杂合子,如图 1 第 1 排基因座区域的 D19S433 座位,分别在 13、14 处出现峰值,则判读结果为 D19S433(13,14);若基因座只出现一个峰值,说明只检出一个“等位基因”,即视为纯合子,如图 1 第 1 排基因座区域的 D6S1043 座位,在 18 处出现一个峰值,则判读结果为 D6S1043(18,18);图 1 第 3 排基因座区域的 AMEL 座位为性别座位,不作为本研究的观察座位,因此在检测结果中不予以体现。检测结果:D19S433(13,14)、D5S818(11,12)、D21S11(29,30)、D18S51(11,15)、D6S1043(18,18)、D3S1358(15,17)、D13S317(11,12)、D7S820(11,12)、D16S539(10,11)、CSF1PO(11,12)、Penta D(13,13)、vWA(17,18)、D8S1179(13,13)、TPOX(8,11)、Penta E(12,17)、TH01(7,9)、D12S391(19,19)、D2S1338(19,19)、FGA(22,24)。

2.2 基因平衡(Hardy-Weinberg)吻合度验证结果

对实验组 19 个 STR 座位进行 Hardy-Weinberg 吻合度验证,计算结果显示,各座位基因型期望值与观察值差异无统计学意义($P > 0.05$),符合遗传规律,结果见表 1。

2.3 STR 座位基因多态性检测结果

实验组与对照组共检出 STR 位点 208 个,其中实验组检出 159 个,未检出 49 个,对照组检出 203 个,未检出 5 个,统计结果显示实验组 D5S818-15、D3S1358-18、D7S820-9、PentaE-23、TH01-7、D2S1338-19 频率显著高于对照组($P < 0.05$),D7S820-12、D12S391-17、D2S1338-20 频率显著低于对照组($P < 0.05$),详见表 2~8。

2.4 STR 座位纯合子分布统计结果

实验组 STR 座位纯合子分布统计结果显示:Penta E 座位纯合子的实际频率与理论频率差异有统计学意义($P < 0.05$),其余座位差异无统计学意义,详见表 9。

3 讨论

近年来,伴随着分子生物学技术的迅速发展,疾病的基因诊断进程逐步加快。本研究亦在利用分子生物学手段,探索、发现与胃肿瘤相关的基因座位,从分子水平为胃肿瘤的早期诊断、基因治疗提供新的理论依据。

为保证实验数据科学、严谨、准确,本研究对实验组、对照组进行了严格的筛选,检测过程严格遵守 SOP 要求。其中实验组选取未经放化疗已确诊的胃肿瘤患者,避免了因放化疗引起基因突变造成的检测结果假阳性或假阴性;对照组选取无明确亲缘关系的健康人群,确保了对照组选择的科学合理;检测过程严格进行实验室质量控制并重点关注检测过程的关键控制点,以保证检测数据的准确性和可靠性。

表 1 胃肿瘤患者 19 个 STR 座位 Hardy-Weinberg 吻合度测验分析表

基因座位	χ^2	P	基因座位	χ^2	P	基因座位	χ^2	P
D19S433	23.82	0.99	D5S818	24.74	0.92	D21S11	33.01	0.91
D18S51	64.18	0.87	D6S1043	55.63	0.13	D3S1358	9.98	0.44
D13S317	12.26	0.66	D7S820	24.02	0.29	D16S539	28.70	0.12
CSF1PO	16.89	0.07	Penta D	16.69	0.73	vWA	18.89	0.59
D8S1179	27.87	0.47	TPOX	10.70	0.38	Penta E	87.56	0.58
TH01	7.57	0.27	D12S391	18.72	0.91	D2S1338	28.57	0.97
FGA	51.23	0.91						

表 2 D18S51、Penta E、FGA 座位频率分布表

D18S51	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)	Penta E	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)	FGA	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)
10	0.013	0.008	5	0.067	0.013	16.2	0.000	0.003
11	0.013	0.005	6	0.000	0.003	17.0	0.000	0.005
12	0.067	0.038	7	0.000	0.003	18.0	0.040	0.010
13	0.145	0.185	8	0.000	0.003	19.0	0.013	0.058
14	0.171	0.193	9	0.000	0.018	20.0	0.053	0.045
15	0.132	0.203	10	0.039	0.035	21.0	0.145	0.130
16	0.184	0.133	11	0.118	0.083	22.0	0.132	0.135
17	0.092	0.055	12	0.079	0.113	17.0	0.000	0.005
18	0.026	0.035	13	0.092	0.063	22.2	0.013	0.003
19	0.079	0.045	14	0.105	0.050	23.0	0.211	0.253
20	0.050	0.060	15	0.079	0.100	23.2	0.000	0.005
21	0.013	0.005	16	0.105	0.113	24.0	0.197	0.185
22	0.013	0.020	17	0.118	0.108	24.2	0.000	0.008
23	0.000	0.003	18	0.053	0.082	25.0	0.145	0.098
24	0.000	0.005	19	0.067	0.075	25.2	0.000	0.003
25	0.000	0.005	20	0.026	0.045	26.0	0.026	0.045
26	0.000	0.005	21	0.026	0.040	26.2	0.000	0.005
			22	0.000	0.023	27.0	0.013	0.0130
			23	0.026	0.000			
			24	0.000	0.003			
			25	0.000	0.005			

表 3 D19S433、D5S818、D21S11 座位频率分布表

D19S433	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)	D5S818	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)	D21S11	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)
11	0.013	0.005	7	0.026	0.013	28.0	0.053	0.035
11.2	0.013	0.000	8	0.013	0.000	28.2	0.013	0.008
12	0.013	0.030	9	0.026	0.063	29.0	0.263	0.208
12.2	0.000	0.008	10	0.132	0.178	29.2	0.000	0.008
13	0.319	0.315	11	0.355	0.318	30.0	0.342	0.373
13.2	0.026	0.038	12	0.197	0.238	30.2	0.000	0.020
14	0.211	0.228	13	0.184	0.180	30.3	0.013	0.000
14.2	0.118	0.105	14	0.039	0.013	31.0	0.092	0.083
15	0.132	0.070	15	0.026	0.000	31.2	0.053	0.063
15.2	0.105	0.145				32.0	0.039	0.028
16	0.013	0.013				32.2	0.105	0.113
16.2	0.026	0.035				33.0	0.000	0.010
17.2	0.013	0.010				33.2	0.026	0.053
						34.2	0.000	0.003

表 4 D16S539、Penta D、D8S1179 座位频率分布表

D16S539	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)	Penta D	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)	D8S1179	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)
8	0.013	0.013	7	0.000	0.008	8	0.000	0.008
9	0.224	0.308	8	0.026	0.043	10	0.092	0.128
10	0.197	0.125	9	0.303	0.290	11	0.013	0.060
11	0.211	0.258	10	0.079	0.120	12	0.013	0.060
12	0.250	0.175	11	0.158	0.160	13	0.237	0.225
13	0.079	0.103	12	0.197	0.208	14	0.211	0.218
14	0.026	0.015	13	0.211	0.128	15	0.171	0.153
15	0.000	0.005	14	0.026	0.038	16	0.145	0.078
			15	0.000	0.008	17	0.039	0.025

表 5 D6S1043、D12S391、D2S1338 座位频率分布表

D6S1043	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)	D12S391	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)	D2S1338	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)
10	0.000	0.028	15	0.000	0.018	16	0.000	0.018
11	0.092	0.075	16	0.013	0.003	17	0.053	0.055
12	0.118	0.125	17	0.013	0.120	18	0.145	0.123
13	0.118	0.153	18	0.237	0.230	19	0.211	0.100
14	0.132	0.175	19	0.316	0.235	20	0.066	0.173
15	0.013	0.010	20	0.197	0.143	21	0.039	0.033
17	0.066	0.045	21	0.132	0.095	22	0.013	0.040
17.3	0.000	0.003	22	0.026	0.090	23	0.289	0.270
18	0.237	0.180	23	0.066	0.033	24	0.092	0.125
19	0.145	0.158	24	0.000	0.023	25	0.079	0.038
20	0.066	0.028	25	0.000	0.013	26	0.000	0.023
21	0.013	0.010				27	0.013	0.003
21.3	0.000	0.005						
22	0.000	0.005						
24	0.000	0.003						

表 6 D7S820、CSF1PO、vWA 座位频率分布表

D7S820	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)	CSF1PO	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)	vWA	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)
8	0.158	0.128	8	0.000	0.003	13	0.000	0.003
9	0.105	0.038	9	0.105	0.065	14	0.237	0.273
10	0.224	0.153	10	0.145	0.210	15	0.026	0.035
11	0.355	0.348	11	0.368	0.285	16	0.211	0.190
12	0.118	0.275	12	0.290	0.360	17	0.237	0.240
12.1	0.000	0.003	13	0.092	0.053	18	0.171	0.163
13	0.026	0.053	14	0.000	0.018	19	0.105	0.080
14	0.013	0.005	15	0.000	0.003	20	0.013	0.015
			16	0.000	0.005	21	0.000	0.003

表 7 D3S1358、TH01 座位频率分布表

D3S1358	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)	TH01	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)
13	0.000	0.008	6.0	0.067	0.123
14	0.039	0.058	7.0	0.368	0.220
15	0.434	0.403	8.0	0.000	0.035
16	0.224	0.325	9.0	0.539	0.558
17	0.184	0.140	9.3	0.000	0.040
18	0.118	0.055	10.0	0.026	0.025
19	0.000	0.008			
20	0.000	0.005			

表 8 D13S317、TPOX 座位频率分布表

D13S317	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)	TPOX	实验组 (n=76)	对照组 (n=200)
8	0.197	0.240	8	0.553	0.493
9	0.158	0.158	9	0.159	0.128
10	0.118	0.115	10	0.000	0.025
11	0.263	0.290	11	0.250	0.328
12	0.197	0.168	12	0.026	0.023
13	0.066	0.023	13	0.013	0.005

表 9 STR 座位纯合子频率统计分析表

基因座位	理论频率	实际频率	基因座位	理论频率	实际频率	基因座位	理论频率	实际频率
D19S433	0.132	0.189	D5S818	0.211	0.220	D21S11	0.158	0.214
D18S51	0.132	0.125	D6S1043	0.158	0.140	D3S1358	0.184	0.288
D13S317	0.184	0.190	D7S820	0.184	0.227	FGA	0.053	0.173
D16S539	0.158	0.203	CSF1PO	0.263	0.260	Penta D	0.158	0.207
vWA	0.132	0.198	D8S1179	0.158	0.169	TPOX	0.237	0.394
Penta E	0.000	0.086	TH01	0.421	0.432	D12S391	0.211	0.217
D2S1338	0.184	0.173						

本研究选择 19 个 STR 基因座位,其中包括美国联邦调查局(FBI)的 CODIS(Combined DNA Index System)规定的 13 个必需基因座,另外 6 个基因座是 D19S433、D6S1043、D12S391、D2S1338、Penta E 和 Penta D,其具有以下特点:①等位基因频率均匀分布;②等位基因长度 90~500 bp,易于 DNA 检出及分型;③核心重复单位 4 个 bp,避免因重复单位过长、过短造成的诸多问题;④各基因座位位于不同的染色体上,遗传信息独立传递;⑤ PCR 扩增结果稳定且成功率、灵敏度相对较高。

本研究对实验组 19 个 STR 座位进行基因平衡(Hardy-Weinberg)吻合度测验,结果显示各 STR 座位基因频率期望值与观察值差异无统计学意义($P>0.05$),说明实验组 STR 座位基因分布情况符合遗传规律,各位点基因为随机组合分布,实验组的选择可靠;19 个 STR 座位基因频率统计结果显示:实验组 D5S818-15、D3S1358-18、D7S820-9、PentaE-23、TH01-7、D2S1338-19 频率显著高于对照组 ($P<0.05$),D7S820-12、D12S391-17、D2S1338-20 频率显著低于对照组($P<0.05$),STR 定位于人类染色体上,显著性差异的存在,说明相应染色体上存在与胃肿瘤相关的基因,检测结果说明 D5S818-15、D3S1358-18、D7S820-9、PentaE-23、TH01-7、D2S1338-19 6 个基因座附近可能存在胃肿瘤的易感基因,D7S820-12、D12S391-17、D2S1338-20 3 个基因座附近可能存在胃肿瘤的抑制基因;实验组 19 个 STR 座位纯合子分布统计结果显示:Penta E 座位纯合子实际频率与理论频率有显著性差异($P<0.05$),纯合子频率显著性减少,提示 Penta E 座位的杂合子表现可能有增加患胃肿瘤的风险。

胃肿瘤的发生发展是一个涉及多基因、多因素的复杂过程,本研究发现了与胃肿瘤相关的 STR 座位,但由于选择座位的有限性以及无法进行准确的基因定位,并不能十分清晰地说明胃肿瘤与基因的关联,胃肿瘤与基因的相关性值得我们进一步深入研究。

参考文献

[1] Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer [J]. Arch Pathol Lab Med,2011,135:1269-1277.

[2] Drobnic K, Budowle B. The analysis of three short tandem repeat(STR) loci in the Slovene population by multiplex PCR [J]. J Forensic Sci,2000,45:893-895.

[3] Steinbak A, Malpica A, Slewal A, et al. Biomarkers and microsatellite instability analysis of curettings can predict the behavior of FIGO stage I endometrial endometrioid adenocarcinoma [J]. Modern Pathology, 2011,24:1262-1271.

[4] Zaanen A, Meunier K, Sangar F,et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: from molecular oncogenic mechanisms to clinical implications [J]. Cell Oncol(Dordr),2011,34:155-176.

[5] 刘争,赵华,罗志永,等. 乳腺癌与癌前病变微卫星 DNA 杂合性缺失研究[J]. 中国实验诊断学,2011,15(4):592-595.

[6] Ling XL, Fang DC, Wang RQ, et al. Mitochondrial microsatellite instability in gastric cancer and its pre-cancerous lesions[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10:800-803.

[7] 吕丽琼,刘建勇. 乳腺癌微卫星不稳定性及其与临床病理关系的研究[J]. 广西医科大学学报,2010,27(4):548-552.

[8] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011,61:69-90.

(收稿日期:2015-07-16)