

维生素 D 受体基因型、单体型与乳腺癌发病风险的相关性研究

黄友泽 陆 红 白永恒 陈以勒 曾云祥 潘贻飞

摘 要 **目的** 探讨维生素 D 受体(VDR)基因型、单体型与乳腺癌发病风险关系。**方法** 选取 146 例乳腺癌患者和 320 例非癌女性对照人群为研究对象,应用 PCR-RFLP 检测 VDR 基因 rs1544410、rs7975232 和 rs731236 点的多态性,采用 ELISA 检测血浆中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 含量,结果用 SPSS 13.0 软件进行分析。**结果** 3 个位点中仅 rs7975232 基因型与乳腺癌发病相关。与纯合子 GG 相比,杂合子基因型 TT 具有较低的发病风险($P=0.001$, OR = 0.460, 95% CI: 0.286 ~ 0.740)。但不同的基因型之间 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 含量并无差异。此外,单体型 AGT 在病例组分布频率为 3.8%,显著高于对照组的分布频率(0.8%, $P=0.002$);而单体型 GTT 在病例组的分布则显著低于对照组(19.8% vs 26.7%, $P=0.018$)。**结论** VDR 基因与乳腺癌发病存在一定相关;携带单体型 GTT 的女性具有较低的患乳腺癌风险,而单体型 AGT 则发病风险较高。

关键词 维生素 D 受体 单体型 基因型 乳腺癌

Relationship between Genotypes and Haplotypes of Vitamin D Receptor Gene and Breast Cancer Risk. Huang Youze, Lu Hong, Bai Yongheng, et al. The 8th People Hospital of Wenzhou City, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To investigate the relationship between genotypes and haplotypes in the vitamin D receptor (VDR) gene and breast cancer risk. **Methods** Samples were collected from 146 breast cancer patients and 320 non-cancer female controls. The genotypes were detected by PCR-RFLP and confirmed by sequencing. The levels of plasma $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ were measured by ELISA. The association between genotype and allelic frequencies with protein levels were calculated and analyzed by SPSS 13.0 software. **Results** Of three SNPs, only rs7975232 TT was shown to associate with 0.46-fold risk of breast cancer. No association of VDR genotypes and the levels of plasma $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ were found. Additionally, the frequency of haplotype AGT was 3.8% in cases, significantly higher than that in controls (0.8%, $P=0.002$). However, the frequency of haplotype GTT in cases were significantly lower than that in controls (19.8% vs 26.7%, $P=0.018$). **Conclusion** VDR gene polymorphisms are related to breast cancer risk. Individuals with haplotype GTT show lower risk, but the individuals with haplotype AGT have higher risk.

Key words Vitamin D receptor; Genotype; Haplotype; Breast cancer

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,但其发病的确切分子机制到目前为止尚未清楚。近年来发现,维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)可能在乳腺癌的病因学中起着重要的作用^[1,2]。本研究拟通过分析 VDR 基因 3'端 UTR 区域 rs1544410、rs7975232 和 rs731236 点的基因型、等位基因和单体型,并检测血浆中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 含量,旨在从遗传功能学角度探讨其与乳腺癌遗传易感性的关系,从而有助于了解疾病的发病机制。

对象与方法

1. 研究对象:收集温州医学院附属第一医院 2009 年 3 月~2010 年 5 月住院后经病理确诊的 146 例乳腺癌患者,年龄分布为 28~78 岁,平均年龄为 50.7 岁。同时选取同期 320 例在该院进行健康体检的女性作为对照人群,对照人群均无相关临床症状,无肿瘤和遗传病史。对照组年龄为 22~84 岁,平均年龄为 44.9 岁。所有患者及健康对照人群均为汉族,且无血缘关系。本研究经医院医学伦理委员会批准,所有受试对象或家属均知情同意。

2. 研究方法:(1)标本采集、血浆分离和总 DNA 提取:抽取乳腺肿瘤患者和健康人群用 EDTA·K₂ 抗凝的外周血 5ml,用全血 DNA 提取试剂盒(飞捷生物公司)提取全基因组 DNA,置于 -20℃ 保存,备用。(2)引物设计和基因分型:根据文献报道设计引物,由上海捷瑞生物公司合成^[3]。PCR 反应体系:10×EasyTaq Buffer 5μl, 25mmol/L 的 MgCl₂ 0.5μl, 各含 25mmol/L 的 dNTP 混合液 0.5μl, 10μmol/L 的引物 P₁ 和 P₂

基金项目:温州市鹿城区科技计划项目(S10106)

作者单位:325000 温州市第八人民医院检验科(黄友泽、陈以勒、曾云祥);温州医学院附属第一医院实验诊断中心(陆红);外科实验室(白永恒、潘贻飞)

通讯作者:白永恒,电子信箱:greatsailor@163.com

各 0.4 μ l, 80 ~ 200ng DNA 模板, 5U/ μ l 的 EasyTaq DNA 聚合酶 0.25 μ l (TransGen Biotech), 加水至 50 μ l。PCR 退火温度、引物序列和酶切条件见表 1。随机筛选部分样本送公司测序进行突变验证。(3) 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 含量检测 采用双抗体夹心 ELISA 法检测血浆中 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 水平, 即用抗人 1,25

(OH) $_2$ D $_3$ 单抗包被于酶标板上, 标准品和样品中的 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 与单抗结合, 加入酶标抗体, 形成免疫复合物连接在板上, 加入酶底物 TMB, 出现蓝色, 加终止液硫酸, 颜色变黄, 在 450nm 处测 OD 值。1,25(OH) $_2$ D $_3$ 浓度与 OD 值成正比, 通过绘制标准曲线求出标本中 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 浓度。

表 1 PCR-RFLP 技术分析 VDR 基因多态性引物和酶切条件

SNPs	引物(5'→3')	碱基变异	退火温度	选择性内切酶
Bsm I	CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA (F)	G/A	57℃	MvaI269 I
	AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG (R)			
Apa I	CAGAGCATGGACAGGGAGCAA (F)	G/T	60℃	Apa I
	GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC (R)			
Taq I	CAGAGCATGGACAGGGAGCAA (F)	T/C	60℃	Taq I
	GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC (R)			

3. 统计学方法: 对照人群的 3 个位点基因型进行 *Hardy - Weinberg* 平衡检验, 采用非条件 *Logistic* 回归分析基因型、等位基因在病例对照中的分布差异; 采用两样本 *t* 检验分析不同基因型间 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 含量差异。应用 SHEsis 平台评价 VDR 单体型分布差异, 结果用 $P < 0.05$ 作为判定统计上差异的标准^[4]。

结 果

1. 乳腺癌和对照组 VDR 基因型和等位基因分布情况: 图 1 显示 rs1544410、rs7975232 和 rs731236 位

点的基因型电泳和测序结果。对照人群 VDR 基因 3 个位点的基因型进行 *Hardy - Weinberg* 平衡检验, 检测得到基因型的观察值与预期值差异均无统计学意义, 提示收集的样本具有群体代表性。此外, 研究发现 rs731236 位点多态性与乳腺癌相关, 见表 2。与野生型纯合子 GG 相比, 杂合子基因型 TT 在病例对照中的分布具有统计学差异 ($P = 0.001$), 经过年龄校正的 OR = 0.460, 95% CI: 0.286 ~ 0.740。

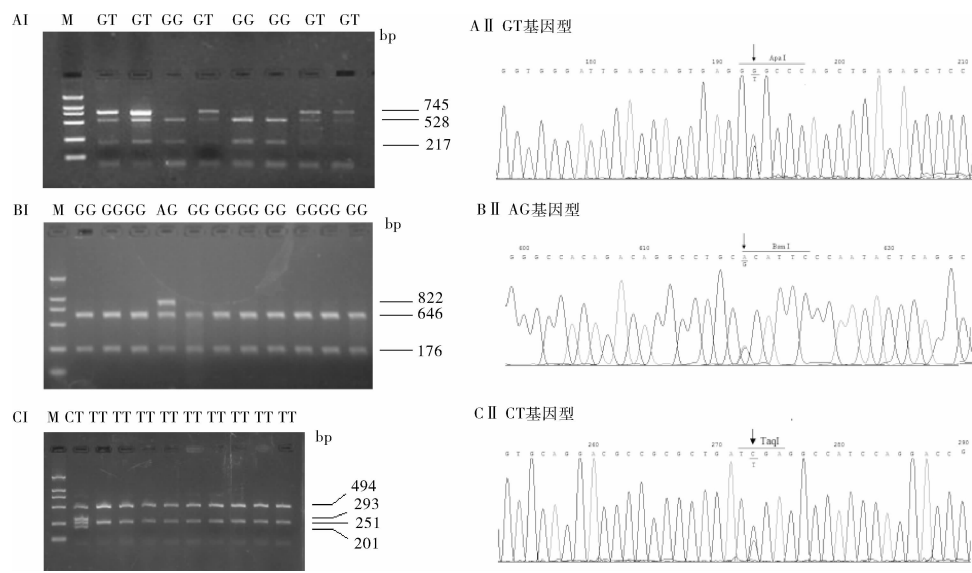


图 1 VDR 基因 rs1544410、rs7975232 和 rs731236 点的基因型电泳图和测序结果图

2. VDR 基因型与血浆中 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 的关系: 随机挑选了 90 例病例组和 90 例对照人群检测血浆中的 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 含量, 结果显示病例组中其含量为 524.83 $\pm$ 380.45 pmol/ml, 明显低于健康对照人群

中 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 的含量 (781.45 $\pm$ 373.05 pmol/ml, $P = 0.041$), 但不同基因型之间 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 的含量则无统计学意义 (数据未列出)。

表 2 乳腺癌和对照组 VDR 基因型和等位基因分布情况 [*n*(%)]

SNPs		病例组	对照组	OR(95% CI) *	<i>P</i>
rs1544410	GG(wt)	120(82. 19)	283(88. 44)	1. 00(ref)	
	GA(ht)	25(17. 12)	37(11. 56)	1. 577(0. 890 ~ 2. 794)	0. 119
	AA(mut)	1(0. 69)	0(0)	—	—
	G	265(90. 75)	603(94. 22)	1. 00(ref)	
	A	27(9. 25)	37(5. 78)	1. 641(0. 959 ~ 2. 809)	0. 071
rs7975232	GG(wt)	90(61. 64)	148(46. 25)	1. 00(ref)	
	GT(ht)	34(23. 29)	132(41. 25)	1. 073(0. 584 ~ 1. 972)	0. 820
	TT(mut)	22(15. 07)	40(12. 50)	0. 460(0. 286 ~ 0. 740)	0. 001
	G	214(73. 29)	428(66. 87)	1. 00(ref)	
	T	78(26. 71)	212(33. 13)	0. 813(0. 591 ~ 1. 119)	0. 204
rs731236	TT(wt)	130(89. 04)	286(89. 38)	1. 00(ref)	
	CT(ht)	16(10. 96)	33(10. 31)	1. 117(0. 575 ~ 2. 171)	0. 743
	CC(mut)	0(0)	1(0. 31)	—	—
	T	276(94. 52)	605(94. 53)	1. 00(ref)	
	C	16(5. 48)	35(5. 47)	1. 056(0. 558 ~ 1. 999)	0. 868

* 非条件 Logistic 回归分析,经过年龄校正,wt 为野生型,ht 为杂合型,mut 为突变株

3. VDR 基因单体型分析:SHEsis 软件显示 VDR 基因 rs1544410、rs7975232 和 rs731236 点存在较强连锁不平衡现象。对人群进行分析发现 VDR 基因以单体型 GGT 为主,GTT 次之,而单体型 AGC 和 GGC 分布最少,如表 3 所示。本研究显示单体型 AGT 在病例组中分布频率为 3. 8% ,明显高于对照组中的分布

频率(0. 8% ,*P* = 0. 002) ;而单体型 GTT 在病例组中分布频率(19. 8%) 则明显低于对照组(26. 7% ,*P* = 0. 002) 。单体型结果提示携带有 GTT 单体型的女性具有较低的患乳腺癌风险(OR = 0. 666) ,而 AGT 单体型则发病风险较高(OR = 4. 632) 。

表 3 VDR 基因单体型在病例和对照组中的分布情况 [*n*(%)]

单体型	病例组	对照组	OR(95% CI)	<i>P</i>
AGC	0. 00(0. 0)	2. 93(0. 5)	—	—
AGT	11. 17(3. 8)	5. 39(0. 8)	4. 632 (1. 641 ~ 13. 072)	0. 002
ATC	11. 77(4. 0)	18. 79(2. 9)	1. 374 (0. 654 ~ 2. 887)	0. 400
ATT	4. 05(1. 4)	9. 89(1. 5)	—	—
GGC	0. 00(0. 0)	3. 03(0. 5)	—	—
GGT	202. 82(69. 5)	419. 65(65. 6)	1. 166 (0. 857 ~ 1. 588)	0. 328
GTC	4. 22(1. 4)	9. 26(1. 4)	—	—
GTT	57. 95(19. 8)	171. 06(26. 7)	0. 666 (0. 475 ~ 0. 934)	0. 018

讨 论

活性维生素 D 及其衍生物在体内对靶细胞的生理生化效应,不仅表现在调节骨骼、肠道的钙磷代谢,调节机体的免疫力,同样也表现在对肿瘤细胞的增殖和凋亡的调控作用。研究显示血清中低水平的 1,25 (OH)₂D₃ 与乳腺癌的进展相关,这可能是通过关键分子维生素 D 受体(VDR) 的介导,进而诱导细胞凋亡或经由 RB - E2F 通路来抑制乳腺癌细胞的增殖或转移来实现的^[5]。此外,免疫组织化学结果显示 VDR 蛋白不仅在 70% ~ 90% 的乳腺癌组织中有表达,并且在不同癌细胞系中表达水平不一样^[6]。鉴于 VDR 结构和(或)功能,以及血循环中维生素 D 的

水平可潜在地受 VDR 基因多态性的影响,故 VDR 的基因多态性与乳腺癌易感性的关系备受关注。

rs1544410(*BsmI*) 、rs7975232(*ApaI*) 和 rs731236(*TaqI*) 位点是 VDR 基因最常见的 SNP 位点,均位于 VDR 基因 3' 末端,该区域的基因变异呈现出连锁不平衡现象,并且潜在地与 VDR mRNA 的表达水平相关^[7]。多数学者认为 rs1544410 位点 A 等位基因的存在能降低乳腺癌的发病或转移风险。在英国和美国妇女中,携带有 rs1544410 GG 基因型分别会增加 1. 92 和 1. 53 倍发生乳腺癌的风险^[8,9]。若血清 1,25 (OH)₂D₃ 水平低于 50nmol/L 同时携带 rs1544410 GG 基因型的女性发生乳腺癌的风险则会增加到

6.82 倍^[10]。对于 rs731236 位点, Lundin 等^[11]认为 CC 基因型患者的病死率(22%)远低于 TT 型(41%)或 CT 型(44%)的病人,且 TT 型病人的癌肿发生淋巴转移的危险比携带 C 等位基因的患者明显增加。本研究以浙江地区汉族妇女作为研究对象,未发现这两个基因型与乳腺癌相关,但发现 rs7975232 位点与乳腺癌相关,携带有 TT 基因型的人群较 GG 基因型患乳腺癌的风险低。我们的研究与来自于澳大利亚的研究结果相符,后者揭示 G 等位基因或 GG 基因型可以增加乳腺癌的患病率^[12]。此外,单体型研究也发现 GTT 具有较低的患乳腺癌风险,而单体型 AGT 则发病风险较高。

此外,研究发现血浆中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 含量与基因型分布频率差异并无直接相关,提示基因型差异可能通过其他某种途径实现其对乳腺癌细胞的影响。然而本研究还存在一些不足,如研究还缺乏评价女性患者的绝经状态、ER 和 PR 表达情况,另外,样本和分析的位点数量不足,未对多个人群进行横向比较研究等,相信做好这些方面才可得到更准确的结论。

参考文献

- 1 Cai Q, Shu XO, Jin F, *et al.* Genetic polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and risk of breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003, 12(9):853-859
- 2 Chen WY, Bertone Johnson ER, Hunter DJ, *et al.* Associations between polymorphisms in the vitamin D receptor and breast cancer risk [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14(10):2335-2339
- 3 Bai Y, Yu Y, Yu B, *et al.* Association of vitamin D receptor polymorphisms with the risk of prostate cancer in the Han population of

- Southern China [J]. *BMC Med Genet*, 2009, 10:125
- 4 Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci [J]. *Cell Res*, 2005, 15(2):97-98
- 5 Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, *et al.* Vitamin D receptor polymorphisms, associated with altered prognosis in patients with malignant melanoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(2):498-504
- 6 Lyakhovich A, Aksekov N, Pennanen P, *et al.* Vitamin D induced up-regulation of keratinocyte growth factor (FGF-7/KGF) in MCF-7 human breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273(2):675-680
- 7 John EM, Schwartz GG, Koo J, *et al.* Sun exposure, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of advanced prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(12):5470-5479
- 8 Curran JE, Vanghan T, Lea RA, *et al.* Association of A vitamin D receptor polymorphism with sporadic breast cancer development [J]. *Int J Cancer*, 1999, 83(6):723-726
- 9 Ludin AC, Soderkvist P, Eriksson B, *et al.* Association of breast cancer progression with a vitamin D receptor gene polymorphism [J]. *South-East Sweden Breast Cancer Group. Cancer Res*, 1999, 59(10):2332-2334
- 10 Guy M, Lowe LC, Bretherton-Watt D, *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms and breast cancer risk [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(16):5472-5481
- 11 Trabert B, Malone KE, Daling JR, *et al.* Vitamin D receptor polymorphisms and breast cancer risk in a large population-based case-control study of Caucasian and African-American women [J]. *Breast Cancer Res*, 2007, 9(6):84
- 12 Lowe LC, Guy M, Mansi JL, *et al.* Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(8):1164-1169
(收稿:2012-01-05)
(修回:2012-02-17)

铜陵地区儿童过敏性疾病过敏原的研究

宋文辉 刘 萍 周云霞 朱应玉 胡春玖 王万平 王华峰 江文胜 张丽新

摘 要 目的 探讨铜陵地区儿童过敏性疾病过敏原的分布特点,为本地区儿童常见过敏性疾病的防治提供科学依据。
方法 选择患有儿童哮喘、过敏性鼻炎和特异性皮炎等的患儿 50 例,男性 31 例,女性 19 例,平均年龄 6.32 ± 3.13 岁。所有对象均选用 20 种过敏原进行皮肤点刺试验,以组胺作阳性对照,生理盐水作阴性对照。**结果** 铜陵地区吸入性过敏原以粉尘螨阳性率最高为 84%,其次是户尘螨阳性率 82%、猫毛和狗上皮阳性率 54%、蟑螂阳性率 48%、艾蒿和葎草、玉米花粉阳性率 46%。食

基金项目:铜陵市科技计划项目(2009NS20);铜陵市卫生局科研项目(2009-12)

作者单位:244009 安徽省铜陵市人民医院儿科(宋文辉、刘萍、周云霞、江文胜、张丽新);皮肤科(朱应玉);耳鼻喉科(胡春玖);244100 铜陵县人民医院儿科(王万平);244000 铜陵有色职工总医院儿科(王华峰)

通讯作者:宋文辉,主任医师,电子信箱:songwenhui66@163.com