

研究快报

BRD7 单核苷酸多态性及鼻咽癌易感性分析*

余 鹰 朱诗国 向娟娟 李忠花 张必成 曹 利 李桂源**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 为了探讨 BRD7 基因的遗传变异在鼻咽癌发生的作用, 采用 PCR-SSCP 和直接测序方法对 BRD7 基因的编码区进行单核苷酸多态性 (coding-region single nucleotide polymorphism, cSNP) 分析, 并对两个鼻咽癌家系的高危成员、57 个散发性鼻咽癌病人和 50 个正常人进行了 BRD7 等位基因分型。在 BRD7 基因的编码区发现了 3 个 cSNP (C450T、A538C 和 A737G), 其中 A538C 颠换导致其编码蛋白的第 162 个氨基酸由 Asp 变为 Ala; C450T 改变与同义的 A737C 多态性偶联发生在 87.7% 的鼻咽癌活检组织和配对的外周血、所有的鼻咽癌家系的患者及 8 个易感成员, 但是仅存在于 22% 的正常人血标本中。C450T 多态性变化可以导致其编码蛋白在第 133 位氨基酸的翻译终止 (G133Ter)。以上结果说明, C450T 和 A737C 偶联的多态性改变是鼻咽癌发生和发展的重要遗传易感风险因子之一 ($P < 0.01$); BRD7 基因有两种翻译方式, G133Ter 可以导致另一种截断的翻译本 (truncated isoform)。

关键词 鼻咽肿瘤, BRD7 基因, 易感基因, 单核苷酸多态性

学科分类号 R739.63

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是一种常见于我国南方的上皮源性的恶性肿瘤, 其发生不仅具有明显的地域性和家族集聚现象, 而且存在基因组不稳定的特性^[1]; 统计学资料表明, 10%~15% 的鼻咽癌患者有癌家族史; 因此, 鼻咽癌遗传易感性可能是其发病的一个重要因素。

我们应用 cDNA 代表性差异表达分析法 (cDNA representational difference analysis, cDNA RDA) 成功分离出在鼻咽癌细胞株 HNE1 中表达缺失/下调 cDNA 序列, 其中 8 个 cDNA 序列为新基因序列^[2]。通过 RT-PCR 方法验证其在鼻咽癌活检组织中的差异表达, 发现 AF091521、AF091520、AF152605、AF091517 等 cDNA 序列在正常鼻咽上皮与鼻咽癌组织中存在明显的表达差异, 其中 AF152605 片段在 74% 鼻咽癌活检组织表达下调/缺失^[3], RNA 印迹显示 AF152605 代表转录本为 2.1 kb 大小的基因, 进而采用生物信息学和混合探针文库筛选法^[4]成功克隆出编码含溴区结构域的核转录因子基因, 国际命名委员会命名为 BRD7 (GenBank 登录号分别为 AF179285)^[5]。生物信息学分析, BRD7 基因编码产物包括多个磷酸化和糖基化等功能位点以及与转录调节有关溴区结构域 (Bromodomain), Subprograns 预测 BRD7 蛋

白定位于胞核。本研究旨在筛选 BRD7 基因编码区与鼻咽癌相关的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 在鼻咽癌家系分析其遗传易感性, 确定与鼻咽癌发病密切相关的 BRD7 基因型。

1 材料与方法

1.1 材料

62 例鼻咽癌活检组织及其配对的外周血样品, 来自湖南省肿瘤医院耳鼻喉科门诊, 所有的标本均经过病理学确诊; 50 例正常成年人血标本来自中南大学湘雅医学院检验科 (健康普查血样品); 两个鼻咽癌家系为实验室库存^[6], 一共 20 个成员, 包括 5 个鼻咽癌患者和 1 个喉癌患者, 家系患者的病历资料由中南大学第三临床学院耳鼻喉科提供, 所有成员的外周血淋巴细胞经环孢霉素处理和 EB 病毒转化, 永生化的家系淋巴细胞在含 15% 的小牛血清的 1640 培养基, 在 5% 的 CO₂、37℃ 条

* 国家 863 项目 (102-10-01-05)、973 重点项目《“疾病基因组学”理论和技术体系的建立》及国家自然科学基金 (39700158、30000065) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-4805446, E-mail: ligy@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2001-03-07, 接受日期: 2001-04-05

件下培养.

在 BRD7 基因编码区设计相互重叠、扩增片段为 200~ 300 bp 的配对引物, 由上海细胞所赛尔生物技术公司合成.

1.2 RNA 抽提与差异 RT-PCR

按照 TRIzol™ 试剂盒 (Gibco BRL 公司) 操作程序提取鼻咽癌活检组织 RNA; 后用 DNase I 消化 RNA 中痕量 DNA, PCR 扩增 GAPDH 检测无特异扩增条带以保证 DNA 消化完全. RNA 取量约为 2 µg 按 RT 试剂盒 (Promega 公司) 操作步骤进行逆转录反应. 采用下列参数进行差异 PCR 扩增 BRD7 基因的 cDNA 编码区: 94 °C 变性 50 s; 55 °C 复性 50 s; 72 °C 延伸 1 min; 30 个循环终止.

1.3 SSCP

为了检测 BRD7 基因在鼻咽癌中有无突变, 5 µl PCR 产物加等量的加样缓冲液, 95 °C, 3 min 后冰浴 5 min, 其 5 µl 上样于 9% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶, 0.5 × TBE 电泳缓冲液, 10 mmol/L 电泳 3~ 5 h. 取下凝胶按下列程序银染: 10% 乙醇固定 10 min; 1% HNO₃ 10 min, 双蒸水洗一次; 0.2% AgNO₃ 20 min, 洗两次; 3% 的 Na₂CO₃ (0.05% 甲醛) 显色至条带清晰为止.

1.4 基因组 DNA 提取

按照《分子克隆》实验指南抽提 50 例鼻咽癌活检组织及配对血标本、50 例正常人外周血淋巴细胞和 2 个家系永生淋巴瘤细胞基因组 DNA.

1.5 特异性 PCR 和测序

根据上述多态性结果, 选择扩增多态性高发区的两端引物 (5'-GAACAGACACCCCTTCAAG-3' 和 5'-TGTGAGGTGTCTGTTCCA-3'). 根据其位于在同一个外显子, 直接对基因组 DNA 进行扩增. 模板量取 1 µg, 参数同上. PCR 产物经低熔点琼脂糖凝胶分离后 QIAQUICK Gel Extraction Kit 回收、纯化后, 用 ABI 公司的 377 型 DNA 自动测序仪直接测序分析.

1.6 统计学处理

对 BRD7 等位基因型在鼻咽癌人群和正常人分布, 采用 SPSS 软件进行统计学处理.

2 结 果

2.1 BRD7 基因编码区在鼻咽癌中改变及多态性分析

我们欲考察从鼻咽癌表达差异下调入手克隆的 BRD7 基因在鼻咽癌组织中是否存在突变, 所以在

BRD7 编码区设计了扩增片段重叠的引物, RT-PCR 和 SSCP 进行初步筛选. 在 12 例鼻咽癌组织中, 仅 7 例检测到下调的表达; 对其 SSCP 分析, 发现 BRD7 基因的第 440~ 740 位碱基可能存在突变或多态性 (图 1). 我们对这组 PCR 产物纯化后直接测序, 发现一例在 538 位碱基由 A 变为 C, 使编码蛋白的第 162 位氨基酸 Asp 置换为 Ala; 五例鼻咽癌组织中 BRD7 基因在第 450 位和 737 位碱基同时发生单碱基的颠换, 即 C450T 和 A737G, 前者使得编码蛋白在 133 位氨基酸 (Glu) 翻译终止; 后者是同义多态性 (图 2).

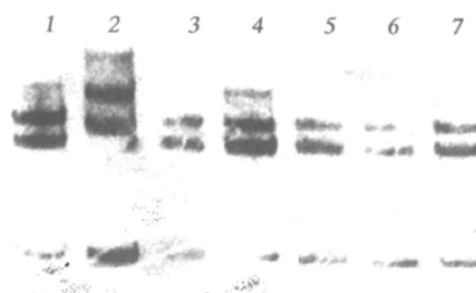


Fig 1 SSCP analysis of PCR products of BRD7 gene coding region (440~ 740 bp) in sporadic nasopharyngeal carcinoma

1~ 7: Sporadic nasopharyngeal carcinoma tissues.

2.2 BRD7 基因型在散发性鼻咽癌人群和正常人的分布

为了确定上述单核苷酸改变的频率以及与鼻咽癌的关系, 我们扩大样品数量进一步分析. 根据上述单核苷酸变化位于同一个外显子, 直接对鼻咽癌活检组织及配对血样品和正常人的血样品的基因组 DNA 进行特异性片段扩增, 纯化后测序. 在 50 例鼻咽癌活检组织和外周血基因组中发现 2 例 A538C 杂合子和 48 例 A538A 纯合子, 以及 5 例 C450C 纯合子、21 例 C450T 杂合子和 24 例 T450T; 而 50 例正常人的外周血基因组中 3 例 A538C 杂合子和 47 例 A538A 纯合子, 以及 39 例 C450C 纯合子、10 例 C450T 杂合子和 1 例 T450T; A737G 的多态性改变与 C450T 偶联, 频率相同 (图 3).

综上, 我们计算了 BRD7 等位基因型在鼻咽癌患者和正常人群中的分布, T450 与偶联的 G737 的等位基因型在鼻咽癌患者的比例 (87.7%) 比正常人明显增多 (22.0%), 而 A538C 的 SNP 在鼻咽癌患者中没有明显的变化, 说明 T450 与偶联的 G737 的等位基因型是鼻咽癌发病和进展的风险因子 ($P < 0.01$) (图 4).

```

421 GCTCTTTAGCCAAACAAGAAGAAGTAGAACAGACACCCCTTCAAGAAGCTTTGAATCAAC
      S S L A K Q E E V E Q T P L Q E A L N Q 142
481 TGATGAGACAATTGCAGAGAAAAGATCCAAGTGCTTTCTTTTCATTTCTGTGACTGATT
      L M R Q L Q R K D P S A F F S F P V T D 162
      ▲
541 TTATTGCTCCTGGCTACTCCATGATCATTAAACACCCAATGGATTTTAGTACCATGAAAG
      F I A P G Y S M I I K H P M D F S T M K 182
601 AAAAGATCAAGAAACAATGACTATCAGTCCATAGAAGAACTAAAGGATAACTTCAAACATA
      E K I K N N D Y Q S I E E L K D N F K L 202
661 TGTGTACTAATGCCATGATTACAATAAACAGAGACCATTATTATAAAAGCTGCAAAGA
      M C T N A M I Y N K P E T I Y Y K A A K 222
721 AGCTGTTGCACTCAGGAATGAAAATTCTTAGCCAGGAAAGAATTGAGAGCCTGAAGCAGA
      K L L H S G M K I L S Q E R I Q S L K Q 242

```

Fig. 2 Part of nucleotide sequence (440~740 bp) and predicted amino acid sequence of BRD7

Bromodomain is highlighted. Positions of SNP founded in this study are shown with cycles and rhombus, and the two cycles represent the coupled bi-SNP. The potential initiator codon of the second translational isoform in the healthy groups with the bi-SNP is marked with shaded triangle.

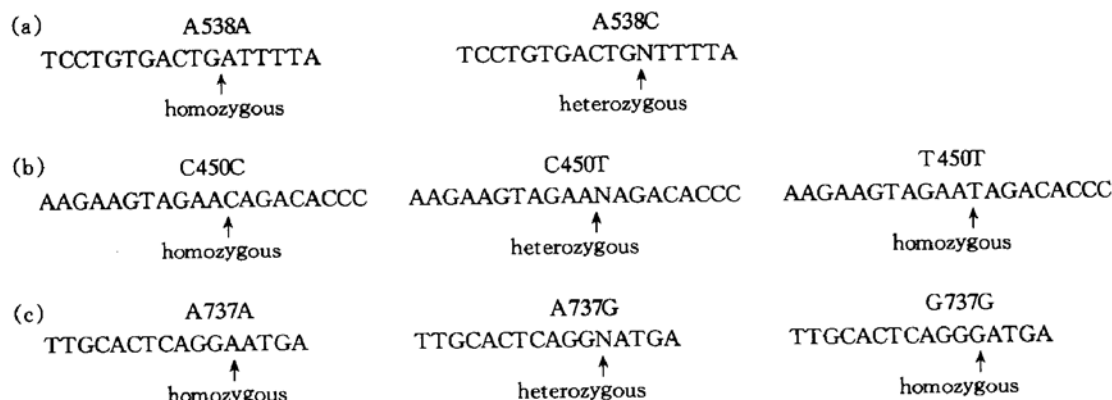


Fig. 3 Patterns of coding region single nucleotide polymorphisms in BRD7 correlated with NPC

All sequences shown above are from the anti-sense strand of the BRD7 gene. Among one hundred and seven individuals analyzed, we detected six heterozygous A538C variants only and sixty-one coupled bi-cSNP variants at 450 nt and 737 nt including 50 NPC patients and 11 healthy controls.

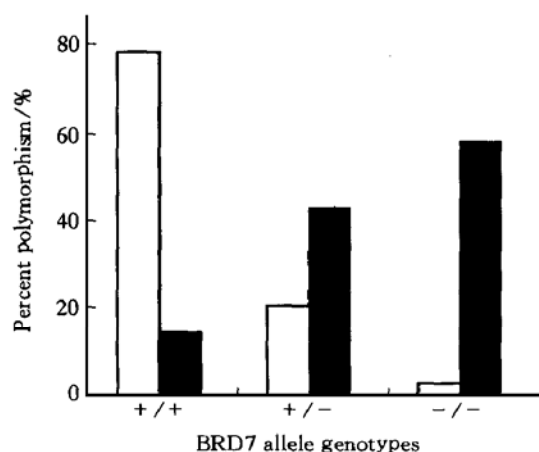


Fig. 4 Distribution of BRD7 allele frequency with the C450T and A736G coupled SNPs

“+” symbol represents C450 and A736; “-” symbol represents T450 and G736. Schematic summary discovered that the BRD7 allele with T450 and G736 may increase significantly the risk of NPC initiation ($P < 0.01$). □: Healthy individuals; ■: NPC patients.

2.3 BRD7 等位基因型的鼻咽癌易感性分析

我们对两个鼻咽癌家系的永生淋巴细胞进行了 BRD7 的等位基因分型。在家系 A 中, 9 个参与检测的成员有 3 个是鼻咽癌患者, 其中 III 2, III 4, III 5, III 6, III 7 和 IV-1 成员检测到偶联的 T450/G737 等位基因型。在家系 B 中, 11 个参与检测的成员有 2 个是鼻咽癌患者, 其中 III 1, III 2, III 3, III 5, III 6, IV-2 和 IV-3 成员检测到偶联的 T450/G737 等位基因型。如图 5 所示, 所有检测的家系患者和 8/9 的易感人群也携 T450/G737 等位基因型, 而患者的配偶 (如家系 A 中 III 1、家系 B 中的 II-1 和 II-2) 没有检测到 T450/G737 等位基因型, 说明 T450/G737 等位基因型可能是鼻咽癌一个重要的遗传易感因素。

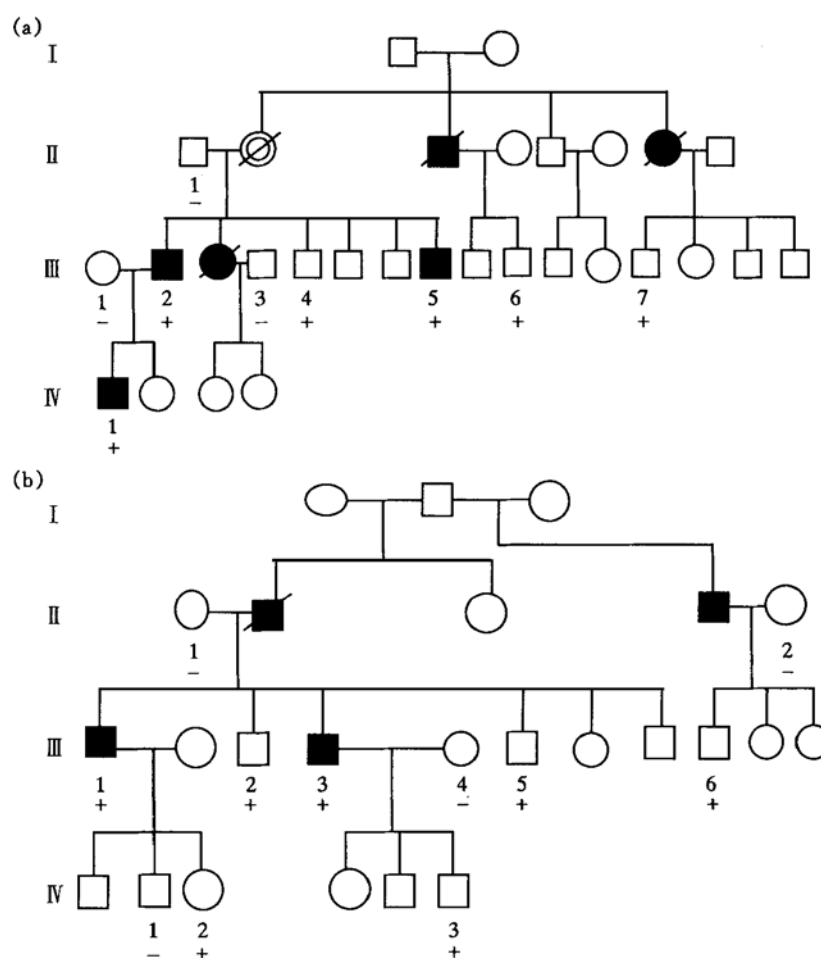


Fig. 5 Pedigrees of NPC families with SNPs of the BRD7 gene

(a) and (b) represent two different NPC families. Black symbols represent affected NPC patients. Clear symbols represent unaffected family members. Double loops represent laryngocarcinoma. Only family members who participated in the molecular investigation were included. (+) and (-) indicate the presence or absence of the NPC-susceptible bi-SNP of BRD7 in the genomic DNA samples of family members who were screened by PCR/sequencing.

3 讨 论

SNP 是基因组核苷酸水平上的变异引起的 DNA 序列多态性, 包括单碱基的转换、颠换以及单碱基的插入/缺失等, 据估计基因组中大约平均每 1 000 bp 就会有一个 SNP. SNP 可以划分两种形式: 一即基因编码区 (coding region) 的功能性变异, 二遍布于整个基因组的非编码区 (调控区、内含子和剪接连接区等) 的单核苷酸变异. SNP 作为第三代遗传标记不仅用于致病基因的搜寻和进化、种群多样性研究, 更重要是, SNP 尤其是 cSNP 与人类各种遗传特征相关, 因此, 开发 SNP 将使诊断学和治疗学产生革命性进步^[7].

鼻咽癌是一种多基因遗传性疾病. 我们克隆的 BRD7 基因的 T450/G737 等位基因型, 在鼻咽癌 (87.7%) 的分布明显高于在正常人 (22%) 的分

布 ($P < 0.01$), 说明 BRD7 的 T450/G737 等位基因型是鼻咽癌发病风险因子之一. 鼻咽癌家系分析表明, 所有的鼻咽癌患者和 8/9 的易感成员携有 T450/G737 的等位基因型, 远远高于健康人群, 因此, BRD7 的等位基因型可能与鼻咽癌遗传易感性相关. 另外, C450T 的颠换使得 BRD7 基因编码产物的第 113 氨基酸翻译终止, Halushka 等^[8]也在高血压易感候选基因的编码上发现一个相似的无义 cSNP. 因为在鼻咽癌患者的血细胞以及在一部分正常人的基因组存在此功能基因, BRD7 基因可能有两种翻译方式. 而且第 484 位仍有与原来阅读框架一致的起始密码子, Bromodomain 等功能结构域在 484 位之后 (504~609 nt), 因此我们推测 BRD7 基因的另一截短翻译方式, 可能从 484 位起始, 这结果与计算机预测是一致的. 不过, 其准确的翻译模式仍需更多的实验依据来补充.

参 考 文 献

- 1 Li G Y, Yao K T, Ronald G. Sister chromatid exchange and nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, 1989, **43** (4): 613~618
- 2 湛凤凰, 江 宁, 曹 利, 等. cDNA 代表性差异表达分析法分离鼻咽癌上皮细胞株 HNE1 表达差异 cDNA 序列的初步研究. *中华医学遗传学杂志*, 1998, **75** (6): 341~344
Zhan F H, Jiang N, Cao L, *et al.* *Chin J Med Genet*, 1998, **75** (6): 341~344
- 3 余 鹰, 张必成, 谢 奕, 等. 鼻咽癌中差异表达基因的分析 and 克隆. *生物化学与生物物理学报*, 2000, **32** (4): 327~332
Yu Y, Zhang B C, Xie Y, *et al.* *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2000, **32** (4): 326~332
- 4 余 鹰, 谢 奕, 朱诗国, 等. 应用混合探针文库筛选法克隆多个肿瘤差异表达基因. *癌症*, 2000, **19** (7): 709~712
Yu Y, Xie Y, Zhu S G, *et al.* *Chinese J Cancer*, 2000, **19** (7): 709~712
- 5 余 鹰, 谢 奕, 曹 利, 等. 一个新鼻咽癌抑瘤候选基因的克隆及其功能初步分析. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (3): 319~324
Yu Y, Xie Y, Cao L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (3): 319~324
- 6 曹 利, 谭国林, 周 鸣, 等. 鼻咽癌家系外周血的 EBV 转化. *中国现代医学杂志*, 1999, **9** (7): 3~4
Cao L, Tan G L, Zhou M, *et al.* *China J Modern Medicine*, 1999, **9** (7): 3~4
- 7 刘万清, 贺 林. SNP 为人类基因组描绘新的蓝图. *遗传*, 1998, **20** (6): 38~40
Liu W Q, He L. *Hereditas*, 1998, **20** (6): 38~40
- 8 Halushka M, Fan J B, Bentley K, *et al.* Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nature genetics*, 1999, **22**: 239~247

Coding-region Single Nucleotide Polymorphisms in BRD7 Gene and Nasopharyngeal Carcinoma Susceptibility*

YU Ying, ZHU Shi-Guo, XIANG Juan-Juan, LI Zhong-Hua, ZHANG Bi-Cheng, CAO Li, LI Gui-Yuan**

(Cancer Research Institute, Xiang-ya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract In order to evaluate the role of inherited variation in the BRD7 gene in human nasopharyngeal carcinoma RT-PCR, SSCP and sequencing were used to identified multiple coding-region single nucleotide polymorphisms (cSNPs), three cSNPs in BRD7 were found in fifty-seven sporadic biopsy specimens and corresponding blood samples from the same NPC patients and two pedigrees of NPC family. One of those cSNPs is A538C transition, which creates a missense change of Asp162Ala in three of NPC patients analyzed and three of fifty healthy individuals. Adjacent to the bromodomain (504~609 nt), another SNP (C450T) behind the start codon (484nt) results in a G133Ter substitution in 87.7% NPC biopsies and corresponding blood samples, all affected family members in the pedigrees and eight of nine susceptible members, the third SNP is synonymous polymorphism (A737G) which is coupled interestingly with the C450T alteration. The latter two forms of SNPs are also observed in eleven of fifty control normal blood samples. This findings suggest that the presence of the two coupled SNPs in BRD7 might be one of important risk factors for the development and/or progression of NPC ($P < 0.01$), and the BRD7 gene might have two modes of translation and the terminational SNP at 450 nt in BRD7 gene results in the second alternatively truncated isoform.

Key words nasopharyngeal neoplasms, BRD7 gene, susceptibility gene, single nucleotide polymorphisms

* This work was supported by grants from the National High Technology "863" Program of China (102-10-01-05); "973" Key Research Programs of China and the National Natural Sciences Foundation of China (39700158 and 30000065).

** Corresponding author. Tel: 86-731-4805383, E-mail: lgy@public.cs.hn.cn

Received: March 7, 2001 Accepted: April 5, 2001