

NBS1 基因 SNPs 与中国汉族人群 原发性肝癌的遗传易感性*

黄 坚^{1)**} 赵艳平¹⁾ 李 倩³⁾ 张俊霞²⁾ 王 岩¹⁾ 张 蓓¹⁾

⁽¹⁾首都医科大学附属北京友谊医院实验中心/肝病中心, 北京 100050; ⁽²⁾天津市传染病医院肝病科, 天津 300192;

⁽³⁾中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所全国肿瘤防治研究办公室, 北京 100021)

摘要 为分析 DNA 损伤修复相关基因 *NBS1* 单核苷酸多态性(SNPs)与原发性肝癌遗传易感性的关系, 并对高分辨率单链构象多态性(SSCP)检测技术在 SNPs 分型中的适用性进行评估, 本研究对来自中国汉族人群的 327 例原发性肝癌以及 295 例阴性对照中 *NBS1* 基因常见 SNPs 的稀有等位基因频率进行检测和分析. 此外, 对 *NBS1* 基因 6 个常见 SNPs 分别选择部分样本同时进行直接序列测定, 以比较 2 种方法的检测效果. 119 例原发性肝癌以及 95 例肝硬化/慢性肝炎组织标本的 SSCP 分析结果表明, 6 个常见 *NBS1* 基因 SNPs 位点(102G>A, 320+208G/A, 553G>C, 1197T>C, 2016A>G 和 2071-30A>T)中, SNP 1197T>C 的稀有等位基因频率为 68.1%, 显著高于肝硬化/慢性肝炎对照的 57.9% ($P = 0.0298$). 对该 SNP 位点另外采用 208 份肝细胞癌和 200 份健康人群血液标本进一步分析, 肝细胞癌 SNP 1197T>C 的稀有等位基因频率为 66.8%, 显著高于健康人群对照的 58.8% ($P = 0.0170$). 其他 5 个 SNPs 的稀有等位基因频率在原发性肝癌与肝硬化/慢性肝炎之间均无显著性差异. 高分辨率 SSCP 分析法与直接序列测定法对所选样本的 SNPs 基因分型结果完全一致, 而且直接测序法对 PCR 扩增产物质量的要求相对高分辨率 SSCP 分析更高. 研究表明, 中国汉族人群 *NBS1* 基因 SNP 1197T>C 可能与原发性肝癌的发生相关, 高分辨率 SSCP 技术准确度与直接测序法相当, 且操作更加简便易行, 非常适用于大量样本多个已知 SNPs 的基因分型.

关键词 高分辨率 SSCP 分析, *NBS1*, 单核苷酸多态性, 原发性肝癌, 遗传易感性

学科分类号 Q75, R73

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00536

NBS1 基因是在一种被称为 Nijmegen 断裂综合征(Nijmegen breakage syndrome, NBS)的家族性常染色体隐性遗传病中发现的基因, 其染色体 8q21 位置的缺失突变可导致对放疗敏感、基因组不稳定以及高发恶性肿瘤等^[1]. 多个研究证实, *NBS1* 基因突变增加了癌症发生的风险, Nbs1 功能的部分缺失与多种肿瘤的发生相关^[2-4], 近年来的研究还发现, *NBS1* 某些常见单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs)位点的变异有可能与肿瘤的易感性相关, 如在对乳腺癌、膀胱癌、肺癌、胶质瘤和白血病等肿瘤的研究中发现, *NBS1* 基因常见 SNPs, 102G>A(L34L)、553G>C(E185Q)、1197T>C(D399D)和 2071-30A/T, 可能与肿瘤的易感性相关^[5-10].

肝实质细胞和胆管细胞均由肝卵圆细胞分化而

来. 原发性肝癌主要包括肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC, 约占 90%)和肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC, 约占 10%), 是对人类健康和生命威胁很大的恶性肿瘤之一, 我国每年有 11~13 万人死于原发性肝癌, 占全球肝癌死亡数的 45%左右. 有关原发性肝癌的发病机理仍不是很清楚^[11], 如为什么有的肝炎肝硬化会发展至肝癌而有的又没有发生癌变. 近年来的动物实验研究发现, *NBS1* 基因突变及其导致的功能缺失

* 国家自然科学基金项目(81071973)及教育部留学回国人员科研启动基金(2011 年第 41 批)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-63137545, Fax: 010-67566239, E-mail: hjlq123@163.com

收稿日期: 2011-11-16, 接受日期: 2012-03-31

促进了肝癌的发生^[4], 但目前尚不知 *NBS1* 基因 SNPs 是否与原发性肝癌的易感性有关。

SNPs 与肿瘤遗传易感性关系的研究是近年来的研究热点, 但往往需要对较大样本量的检测才能获得比较可靠的结果, 目前国内外采用最多的 SNPs 基因分型方法是直接测序法, 但该方法检测费用昂贵, 对 PCR 产物的要求较高, 其他如常规单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, SSCP)、限制性片段长度多态性(restricted fragment length polymorphisms, RFLP)以及 PCR 产物 *T_m* 值检测等方法也常用于 SNPs 基因分型^[5, 12], 但受检测技术精度的限制, 存在分辨率较低、假阳性/阴性率较高导致结果不可靠等缺点。我们之前在 WHO IARC(international agency for research on cancer, Lyon, France)采用高分辨率 SSCP 分析技术(高压/超薄胶/恒温等)^[10, 13]进行基因突变筛选时发现, 用其分析 SNPs 具有非常好的准确度, 条带分辨率大大高于常规 PCR-SSCP 方法, 且对 PCR 产物的要求不高、速度快、当天出结果, 有可能非常适合对大量标本中多个 SNPs 的分析。

基于上述情况, 本研究拟采用高分辨率 SSCP 分析技术, 对原发性肝癌中 *NBS1* 基因 6 个常见 SNPs 的稀有等位基因频率进行检测, 除了包括以上 4 个位点 102G>A、553G>C、1197T>C 以及 2071-30A>T, 还包括位于 Nbs1 重要功能区域——Mre11 结合区的 SNP 2016A>G(P672P), 以及一个尚未见报道的在原发性肝癌中具有较高稀有等位基因频率的 *NBS1* SNP 320+208G/A。分析这 6 个

NBS1 基因常见 SNPs 与原发性肝癌遗传易感性的关系, 同时对高分辨率 SSCP 分析技术在 SNPs 检测中的应用价值进行评估。

1 材料与方法

1.1 研究对象及标本来源

327 例原发性肝癌标本, 包括 119 例石蜡包埋肿瘤组织和 208 例 HCC 血液标本, 分别来自于首都医科大学附属北京友谊医院、北京佑安医院及天津传染病医院, 石蜡包埋组织标本包括 HCC 94 例, ICC 21 例, 混合型 4 例, 男性 100 例, 女性 19 例, 年龄范围 22~80 岁, 平均年龄 51.6 岁。95 例肝硬化/慢性肝炎的肝穿刺标本, 来自于北京友谊医院和天津传染病医院, 其中肝硬化 53 例, 慢性肝炎 42 例, 男性 69 例, 女性 26 例, 年龄范围 18~72 岁, 平均年龄 48.5 岁。200 例正常血液标本来源于健康体检人群。上述临床病例和健康人群来自全国各地, 均为汉族。

1.2 主要检测试剂与引物

石蜡包埋组织基因组 DNA 提取试剂盒 EZ DNA FFPE™ DNA Kit 购自北京美科美生物技术公司; 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生物技术公司; Platinum® Tap DNA 聚合酶购自 Invitrogen 公司; 制胶试剂亲和硅烷(Bind-Silane)、剥离硅烷(Repel-siliconizing)以及银染试剂 AgNO₃ 购自上海生工生物工程技术有限公司。用于检测 6 个 SNPs 基因型的 PCR 引物通过 Primer3 软件设计, 由北京泰吉兴科生物技术公司合成, 引物序列见表 1。

Table 1 Primers for SSCP and direct DNA sequencing for the *NBS1* gene

SNPs	Sequence		Product size/bp
	Forward	Reverse	
102G/A	TATGTGTGTGTTTCGTGTACA	CAACCCCCTTACTGGAAA	204
320+208 G/A	AGTTCCTGCTTAGCACAGTATT	TGAAATTATCAGTTCCTCATCA	244
553G/C	CACATGTTTTCTTCATTGTAGA	AAATTTGGGGAACCTCTTTC	291
1197T/C	AACGATCTTTGTTTCTCTAT	TTTGCAGGACTCCTTTACA	173
2016A/G	CTTACCTATCCATCTTAACCC	CATTTCAAACACTGACCTCT	228
2071-30 A/T	TTTGCACTTATGCATGA	CAAGTTTCTGGGCTCAC	250

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取. 根据 HE 染色病理切片定位肿瘤组织, 从切片中分离肿瘤细胞, 分别按照 FFPE 组织 DNA 提取试剂盒以及血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书方法提取石蜡切片或血液标本基因组 DNA, 紫外分光光度计定量, 提取后的基因组 DNA 保存在 -20°C 冰箱备用.

1.3.2 高分辨率 SSCP 分析.

a. 样品的 PCR 扩增和变性. 首先在 PCR 扩增仪(Bio-Rad 公司)分别对 6 个 SNPs 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系($10\ \mu\text{l}$): $1\sim 4\ \text{mmol/L}\ \text{MgCl}_2$, $0.1\sim 0.2\ \text{mmol/L}\ \text{dNTP}$, $0.2\sim 0.4\ \text{mmol/L}$ 上下游引物, $0.5\ \text{U}\ \text{Platinum}^{\circledR}\ \text{Taq}\ \text{DNA}$ 聚合酶, $1\ \mu\text{l}\ 10\times\ \text{PCR}$ 缓冲液, $1\ \mu\text{l}$ 基因组 DNA(约 $100\ \text{ng}$). PCR 反应条件: 95°C 预变性 $5\ \text{min}$; 然后 95°C 变性 $50\ \text{s}$, $45\sim 60^{\circ}\text{C}$ 退火 $60\ \text{s}$, 72°C 延伸 $60\ \text{s}$, 共扩增 $37\sim 40$ 个循环; 最后 72°C 延伸 $5\ \text{min}$. PCR 结束后, 在 $10\ \mu\text{l}$ PCR 反应产物中加入 $20\ \mu\text{l}$ 加样缓冲液($0.02\ \text{mol/L}\ \text{NaOH}$, 95% 去离子甲酰胺, $20\ \text{mmol/L}\ \text{EDTA}$, 0.05% 二甲苯蓝和溴酚蓝), 在 PCR 仪上 98°C 变性 $10\ \text{min}$, 冰浴骤冷. 取其中的 $10\ \mu\text{l}$ 于 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳.

b. 高分辨率 SSCP 凝胶的制备. 采用北京六一仪器厂生产的 DYCZ-20E DNA 序列分析电泳系统进行 SSCP 电泳, 可同时进行 56 个样品的电泳(根据需要可以一次跑 2 块胶, 同时进行 112 个样品的检测). 电泳玻璃板的处理程序如下: 分别用温水、清洁剂清洗长、短玻璃板, 然后再分别用去离子水和无水乙醇擦洗玻璃板 2 次; 将 $1\ \text{ml}$ 亲和硅烷溶液均匀地涂在长玻璃板上, $10\ \text{min}$ 后, 用干净的镜头纸轻轻擦拭玻璃板以除去多余的亲和硅烷, 然后将 $1.5\ \text{ml}$ 剥离硅烷均匀地涂在短玻璃板上, $10\ \text{min}$ 后, 用干净的镜头纸轻轻擦拭玻璃板以除去多余的剥离硅烷; 按说明书将长短玻璃板组合, 然后将制好的 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶溶液快速均匀地加入长短玻璃板的缝隙间($0.4\ \text{mm}$); 将 56 孔长城齿梳从胶溶液顶部插入; 放置 $1\sim 2\ \text{h}$, 胶凝固后拔出长城齿梳即可进行 SSCP 电泳.

c. 高分辨率 SSCP 凝胶的电泳. 将凝胶板按说明书方法组装置于电泳槽, 上下槽分别装入 $1\times\ \text{TBE}$ 电泳缓冲液, 将变性后的样品分别加入 56 个加样孔中(加样时在上槽放置冰袋, 使样品加入后保持低温, 待电泳约 $15\ \text{min}$, DNA 进入凝胶后再

拿开), 然后接通 Bio-Rad 3 000 高压电泳仪, 恒功率(45W , 电压约 $1\ 000\sim 1\ 200\ \text{V/胶}$)室温电泳 $3.5\sim 4.5\ \text{h}$, 其间始终用风扇降温, 保持凝胶各个部位电泳温度均匀. 至第一条指示剂带完全跑出凝胶后结束电泳.

d. 高分辨率 SSCP 凝胶的银染与照相. 电泳毕, 从电泳槽中取出凝胶板, 剥离短玻璃板, 将凝胶(连带长玻璃板)用 10% 醋酸固定 $1\ \text{h}$; 去离子水振荡洗胶 3 次, 每次 $2\ \text{min}$; 将凝胶移至 0.2% AgNO_3 (含 0.45% 甲醛)中, 在脱色摇床上振荡 $30\ \text{min}$; 从 AgNO_3 中取出凝胶, 用去离子水浸洗 $5\ \text{s}$. 然后立刻将凝胶转移至预冷的显影液($3\%\ \text{Na}_2\text{CO}_3$, 0.15% 甲醛, 0.02% 硫代硫酸钠)中充分振荡至条带清晰; 迅速将凝胶放于 10% 醋酸终止液中约 $5\ \text{min}$, 然后放入去离子水中. 银染毕, 将胶放于观片灯上, 用数码相机拍照.

e. 高分辨率 SSCP 电泳结果的分析. 将拍照的 SSCP 电泳凝胶图像输入计算机中分析, 将不同种类的带型进行分类(一般为 3 种, 分别代表野生、杂合及稀有碱基纯合型), 与已知 SNPs 基因型样本的带型进行比对, 确定不同种类条带类型所属基因型, 然后再计算分属各种基因型的样本数量.

1.3.3 序列测定验证. 分别从不同种类带型对应的样本中取 1 例样本, 用与 SSCP 检测同样的引物进行 PCR 扩增, 然后进行序列测定(北京诺赛基因组研究中心有限公司), 以确认不同种类带型所属基因型. 为了评估 SSCP 检测的准确度, 本研究对 $102\text{G}>\text{A}$ 、 $320+208\text{G}/\text{A}$ 和 $1197\text{T}/\text{C}$ 3 个 SNPs 各取 60 例, $553\text{G}>\text{C}$ 、 $2016\text{A}>\text{G}$ 以及 $2071-30\text{A}>\text{T}$ 各取 10 例左右样本同时进行直接序列测定, 并与 SSCP 分析的检测结果进行比较.

1.3.4 统计学分析. 采用 χ^2 检验, 应用 SAS 9.2 软件对各 SNPs 的稀有等位基因频率在原发性肝癌与阴性对照之间的差别进行统计分析. 以 $P < 0.05$ 为具有显著性统计学意义.

2 结 果

2.1 NBS1 基因 6 个常见 SNPs 的 SSCP 分析结果

如图 1 所示, $102\text{G}>\text{A}$, $320+208\text{G}/\text{A}$, $553\text{G}>\text{C}$, $1197\text{T}>\text{C}$, $2016\text{A}>\text{G}$ 和 $2071-30\text{A}/\text{T}$ 的 SSCP 检测电泳图谱清楚显示每个 SNPs 均包括 3 种代表性带型, 经分别取代表性带型对应的样本进行测序鉴定, 3 种代表性带型分别为野生、杂合以及稀有碱基纯合基因型.

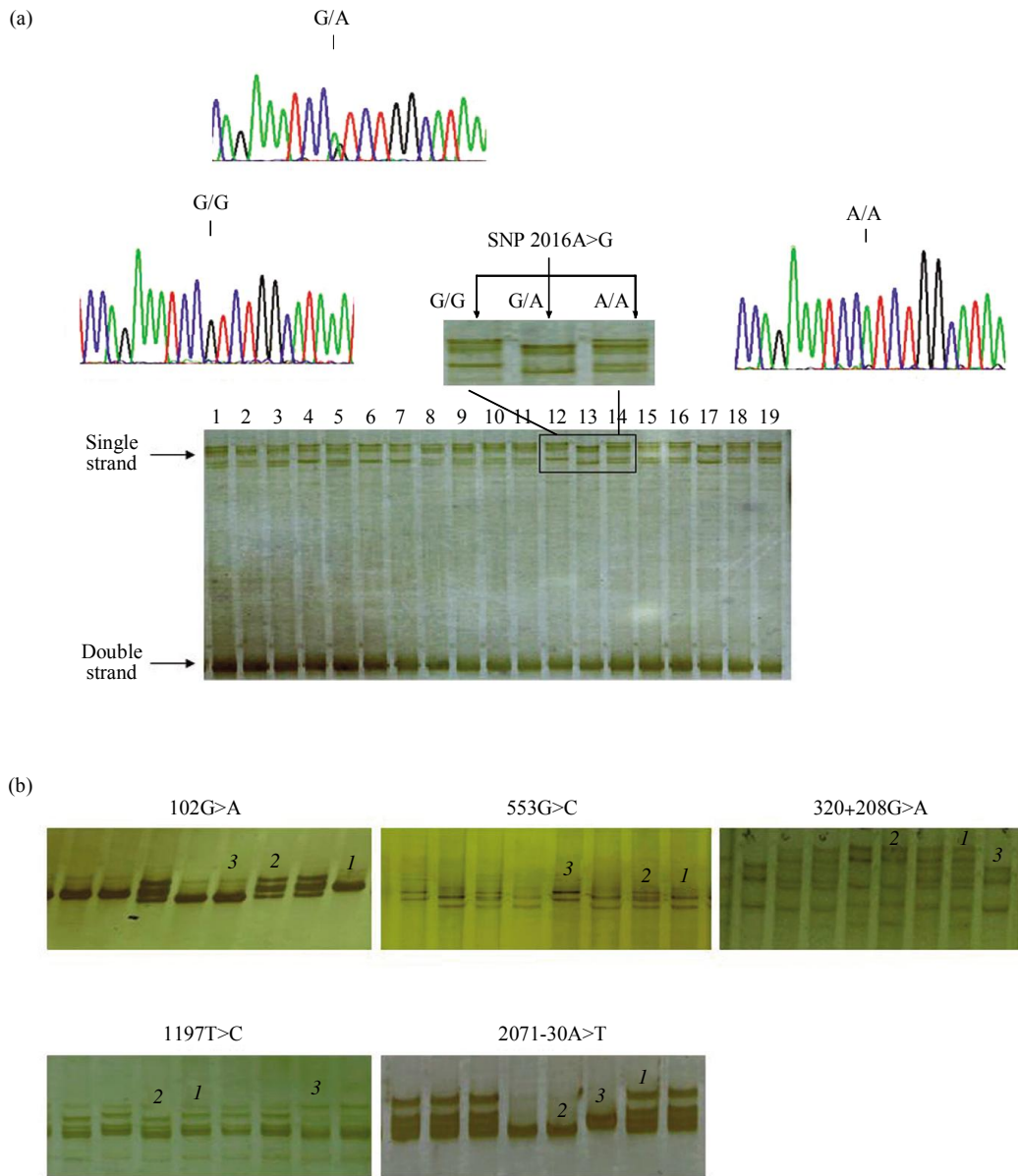


Fig. 1 Representative SSCP analysis and sequencing for *NBS1* SNP 2016A>G, as well as SSCP analysis for other five *NBS1* SNPs

(a) SSCP analysis for *NBS1* SNP 2016A>G in cases 1~19. Three different patterns of electrophoretic band represent three genotypes of *NBS1* SNP 2016A>G, i. e. A/A, A/G and G/G respectively. (b) SSCP analysis for *NBS1* SNPs 102G>A, 553G>C, 320+208G/A, 1197T>C and 2071-30A>T. Each SNP contains three patterns of electrophoretic bands, representing genotypes types of wild(1), heterozygous(2) and rare allele homozygous(3), confirmed by sequencing.

如表 2 所示, 119 例原发性肝癌以及 95 例肝硬化 / 慢性肝炎组织标本的 SSCP 分析结果表明, *NBS1* 基因 SNP 1197T>C 的稀有等位基因频率为 68.1%, 显著高于肝硬化 / 慢性肝炎对照(57.9%, $P = 0.0298$). 为了避免由于样本量较少以及对照组种类选择带来的误差, 对该 SNPs 位点另外采用

208 份 HCC 和 200 份健康人群血液标本进一步进行 SSCP 分析, 结果见表 3, 1197T>C 的稀有等位基因频率为 66.8%, 显著高于正常对照的 58.8%($P = 0.0170$). 结果表明中国汉族人群中 *NBS1* 基因 SNP 1197T>C 可能与原发性肝癌的发生相关, 该结果与 Watanabe 等^[10]在原发性胶质瘤中的发现一致.

Table 2 Comparison of rare allele frequency of the six NBSI SNPs in tissue samples between the cases of primary liver cancer and the controls of liver cirrhosis/chronic hepatitis B

SNPs	Primary liver cancer (n = 119)	Liver cirrhosis/chronic hepatitis B (n = 95)	χ^2	P - value
102G/A (L34L)				
G/G	42	38		
G/A	44	32		
A/A	33	25		
Rare allele frequency/%*	46.2	43.2	0.400 1	0.527 0
320+208 G/A				
G/G	22	25		
G/A	42	30		
A/A	55	40		
Rare allele frequency/%*	63.9	57.9	0.586 5	0.207 8
553 G/C (E185Q)				
G/G	36	41		
G/C	57	28		
C/C	26	26		
Rare allele frequency/%*	45.8	42.1	0.584 4	0.444 6
1197T/C (D399D)				
T/T	18	26		
T/C	40	28		
C/C	61	41		
Rare allele frequency/%*	68.1	57.9	4.719 9	0.029 8
2016A/G (P672P)				
A/A	44	36		
A/G	48	32		
G/G	27	27		
Rare allele frequency/%*	42.9	45.3	0.248 3	0.618 3
2071-30 A/T				
A/A	53	43		
A/T	33	30		
T/T	33	22		
Rare allele frequency/%*	41.6	38.9	0.307 9	0.579 0

*Rare allele frequency/%=(heterozygous + rare allele homozygous \times 2) \times 100/(all cases \times 2).

Table 3 Comparison of rare allele frequency of SNP 1197T/C in blood sample between HCC cases and the health controls

SNP 1197T/C	HCC cases (n = 208)	Healthy controls (n = 200)	χ^2	P - value
T/T	33	48		
T/C	72	69		
C/C	103	83		
Rare allele frequency(%)	66.8	58.8	5.699	0.017 0

其他 5 个 SNPs 102G>A、320 +208G/A、553G > C、2016A > G 以及 2071-30A > T 的稀有等

位基因频率在原发性肝癌与肝硬化 / 慢性肝炎之间均无显著性差异。

2.2 SSCP 分析与直接序列测定结果的比较

分别选择 60 例样本对 102G>A、320+208G/A 和 1197T/C 3 个 SNPs 以及 11~13 例样本对 553G>C、2016A>G 和 2071-30A>T 3 个 SNPs, 同时进行高分辨率 SSCP 分析和序列测定. 结果发现, 所有 SNPs 的 SSCP 分析均得到清楚的结果, 而应用序列测定方法, 可能由于测序用 PCR 产物扩增不理想(如产物浓度过低或特异性不够), 102G>A、320+208G/A 和 1197T/C 分别有 2 个、19

个和 4 个样品测序失败, 但其他测序成功的样品 SNPs 基因型结果与 SSCP 检测结果完全一致(结果见表 4). 将测序失败的样品重新扩增和测序, 结果与 SSCP 分析完全一致. 由此说明, 本研究采用的高分辨率 SSCP 分析技术具有与直接测序法同样的准确度, 检测结果真实可信, 而且直接测序法对 PCR 扩增产物质量的要求相对高分辨率 SSCP 更高.

Table 4 Comparison of results of the six *NBS1* SNPs genotyping by SSCP analysis and direct sequencing

SSCP analysis	Sequencing			
	Wild	Heterozygous	Homozygous	Sequencing failure*
102G/A (L34L)				
G/G	19	0	0	0
G/A	0	29	0	2
A/A	0	0	10	0
320+208 G/A				
G/G	6	0	0	3
G/A	0	16	0	5
A/A	0	0	19	11
553 G/C (E185Q)				
G/G	6	0	0	0
G/C	0	4	0	0
C/C	0	0	3	0
1197T/C (D399D)				
T/T	7	0	0	1
T/C	0	36	0	0
C/C	0	0	33	3
2016A/G (P672P)				
A/A	5	0	0	0
A/G	0	5	0	0
G/G	0	0	2	0
2071-30 A/T				
A/A	4	0	0	0
A/T	0	4	0	0
T/T	0	0	3	0

* Sequencing in the first time.

3 讨 论

DNA 双链断裂(double strand breaks, DSBs)是最严重的 DNA 损伤方式之一, 其修复障碍易导致基因组不稳定进而增加癌症发生的风险. 作为

DSBs 修复相关的关键基因之一, *Nbs1* 通过行使对 DNA 复制、细胞周期检查点等的调控在维持细胞基因组的稳定性方面具有重要作用^[1]. *NBS1* 基因位于染色体 8q21, 分子质量大约为 95 ku. 近年来多个研究发现, *NBS1* 基因的一些常见多态性位点

与肿瘤的发生发展密切相关, 其中研究较多的是位于 *NBS1* 基因外显子 5 的 SNP 553G>C, 如在对乳腺癌、膀胱癌、肺癌和白血病等的研究中发现 SNP 553G>C 的多态性与肿瘤的发生发展相关^[5-7]. 还有研究分别在肺癌、胶质瘤和白血病中发现 102G/A、1197T>C 和 2071-30A/T 的多态性与肿瘤的发生发展相关^[3,8,10]. Nbs1 通常通过形成 Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN)复合物的形式来行使其 DNA 损伤修复功能, 因此, Nbs1 中的 Mre11 结合区是其最重要的功能区域之一, 但其中存在的 1 个常见 SNP 2016A/G(P672P)尚无报道与肿瘤的易感性相关. SNP 320+208G/A 是本实验室在进行原发性肝癌中 *NBS1* 基因突变筛选时发现的一个未报道过的 SNP, 初步检测结果显示其在原发性肝癌中有较高的稀有等位基因频率.

近年来的研究表明, 基因组 DNA 的损伤修复与肝癌的发生紧密相关^[4], HBV 相关肝癌中几乎都能在细胞基因组中发现整合的病毒 DNA, 而基因组 DNA 的 DSBs 据报道能够促进 HBV 的整合^[11]. 因此, 作为与 DSBs 损伤修复相关的关键基因, *NBS1* 基因可能与 HBV 相关肝癌的发生密切相关, 动物实验研究也证明了这一点^[4]. 本研究对中国汉族人群中 *NBS1* 基因上述常见 SNPs 与原发性肝癌的易感性关系进行了研究, 发现 *NBS1* 基因 SNP 1197T>C 可能与原发性肝癌的发生相关. 最近 Watanabe 等^[10]在 87 例欧洲白人原发性胶质瘤中发现 71.6%的病例存在 *NBS1* 基因 SNP 1197T>C, 与健康人群存在显著性差异, 这与我们在原发性肝癌中的发现一致. 与其他研究者在乳腺癌、膀胱癌、肺癌和白血病等肿瘤中的发现不同, 未发现原发性肝癌 SNPs 102G>A、553G>C 以及 2071-30A>T 的稀有等位基因频率与肝硬化 / 慢性肝炎之间存在显著性差异. 另外, 尚未见报道的 SNP 320+208G/A 虽然在原发性肝癌中有很高的稀有等位基因频率, 但在肝硬化 / 慢性肝炎中的频率也较高, 二者无统计学差异. 之后, 我们还进一步检测了 323 例健康人群该 SNP 的稀有等位基因频率, 发现在原发性肝癌与健康人群对照之间也不存在显著性差异, 因此, 初步研究结果显示 SNP 320+208G/A 与原发性肝癌的易感性关系不大, 至于是否与其他肿瘤有关尚待研究.

一般来说, SNPs 与肿瘤的易感性研究往往需要通过较大样本量的检测才能获得比较可信的结果. 目前 SNPs 基因型的检测多采用直接测序法,

但该方法检测费用昂贵, 往往需要几十万甚至上百万元的经费才能完成较大样本(如数千例样本多个位点)的分析, 这对于普通研究者来说是难以承受的, 而且测序对 PCR 产物的要求较高, 若 PCR 扩增不理想, 经常会导致测序失败. 其他检测方法如常规 PCR-SSCP、PCR-RFLP 以及 PCR 产物的 T_m 值检测等方法也常用于 SNPs 分析, 但受检测技术精度的限制, 存在分辨率较低、假阳性 / 阴性率较高等缺点而导致结果不可靠, 最后往往还是需要测序才能获得真实可靠的结果.

SSCP 技术是目前国内外常用的基因检测技术, 在未知基因突变的筛选等方面具有很大的作用. 众所周知, SSCP 检测技术在筛选未知基因突变时, 有可能由于突变位点的位置对 DNA 单链构象的影响不大而存在漏检的可能, 但检测已知 SNPs 或基因突变位点则可以通过设计合适的 PCR 引物而避免该问题的发生, 因此尤其适合大量标本多个基因以及多个 SNPs 位点或已知基因突变位点的分析. 我国很多研究者都尝试过用 SSCP 进行基因分型以及突变筛选工作, 但由于在实际检测过程中一般都是除了在电泳前将 PCR 产物进行了加热变性, 其他步骤基本与普通 DNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳一样, 检测的精度不够、分辨率较低、重复性和稳定性不好, 导致检测结果不够理想, 因此, 近年来在 SNPs 的基因分型研究中并不常用, 而更多的是采用直接测序的方法. 我们在 WHO IARC 采用的高分辨率 SSCP 分析技术与目前国内大多数研究使用的常规 PCR-SSCP 技术相比存在以下不同: 采用高压(1 000~1 500V/胶)、超薄胶(0.4 mm), 高聚合度(12.5%的聚丙烯酰胺凝胶), 高变性度(采用高碱性加样缓冲液, 低温预电泳以提高凝胶中 DNA 单链的比例), 以及恒温电泳(排除凝胶局部温度差异的影响, 使 DNA 单链构象具可比性)等手段, 一次性可检测上百例标本, 操作简便, 分辨率大大高于常规 PCR-SSCP 方法, 而且对样本的 PCR 扩增要求低于直接测序法. 通过本研究对高分辨率 SSCP 分析与直接测序两种方法检测结果的比较, 充分显示了高分辨率 SSCP 分析技术具有与测序一样的准确度, 且实验过程简便易行.

通过引物设计筛选适合对 SNPs 进行 SSCP 分析的引物, 高分辨率 SSCP 分析技术还可以用于其他基因的 SNPs 基因型检测, 尤其适合对大量标本中多个基因多个 SNPs 的稀有等位基因频率分析, 有望成为今后 SNPs 分析的常用检测手段.

参 考 文 献

- [1] Zhang Y, Zhou J Q, Chang UK Lim. The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control. *Cell Res*, 2006, **16**(1): 45-54
- [2] Paulli M, Viglio A, Boveri E, *et al.* Nijmegen breakage syndrome-associated T-cell-rich B-cell lymphoma: Case report. *Pediatr Dev Pathol*, 2000, **3**(3): 264-270
- [3] Kruger L, Demuth I, Neitzel H, *et al.* Cancer incidence in Nijmegen breakage syndrome is modulated by the amount of a variant NBS protein. *Carcinogenesis*, 2007, **28**(1): 107-111
- [4] Dumon-Jones, Frappart P O, Tong W M, *et al.* Mice heterozygous for NBN (the murine homologue of NBS1) developed a wide variety of tumors affecting the liver, mammary gland, prostate, and lung, in addition to lymphomas. *Cancer Res*, 2003, **63**(21): 7263-7269
- [5] Mosor M, Ziokowska I, Januszkiewicz D, *et al.* Polymorphisms and haplotypes of the NBS1 gene in childhood acute leukaemia. *Eur J Cancer*, 2008, **44**(15): 2226-2232
- [6] Lan Q, Shen M, Berndt S I, *et al.* Smoky coal exposure, NBS1 polymorphisms, p53 protein accumulation, and lung cancer risk in Xuan Wei, China. *Lung Cancer*, 2005, **49**(3): 317-323
- [7] Lu J, Wei Q, Bondy M L, *et al.* Polymorphisms and haplotypes of the NBS1 gene are associated with risk of sporadic breast cancer in non-Hispanic white women ≤ 55 years. *Carcinogenesis*, 2006, **27**(11): 2209-2216
- [8] ZiÅłkowska I, Mosor M, Wierzbicka M, *et al.* Increased risk of larynx cancer in heterozygous carriers of the I171V mutation of the NBS1 gene. *Cancer Sci*, 2007, **98**(11): 1701-1705
- [9] Sanyal S, Festa F, Sakano S, *et al.* Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis*, 2004, **25**(5): 729-734
- [10] Watanabe T, Nobusawa S, Lu S Q, *et al.* Mutational inactivation of the Nijmegen breakage syndrome gene (*NBS1*) in glioblastomas is associated with multiple TP53 mutations. *J Neuropath Exp Neur*, 2009, **68**(2): 210-215
- [11] Thorgeirsson S S, Grisham T W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 2002, **31**(4): 339-346
- [12] 白雪蕾, 孙丽萍, 刘 瑾, 等. 10-1082G/A 位点单核苷酸多态性与中国北方人群胃癌发病风险的病例对照研究. *癌症*, 2008, **27**(1): 35-40
- Bai X L, Sun L P, Liu J, *et al.* *Chin J Cancer*, 2008, **27**(1): 35-40
- [13] Huang J, Grotzer M A, Watanabe T, *et al.* Mutations in the Nijmegen breakage syndrome gene in medulloblastomas. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**(13): 4053-4058
- [14] 朱德强, 黄志勇. DNA 损伤与肝癌发生. *世界华人消化杂志*, 2007, **15**(16): 1775-1780
- Zhu D Q, Huang Z Y. *World Chin J Digestology*, 2007, **15**(16): 1775-1780
- [15] Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y, *et al.* Hepatitis B virus related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene*, 2003, **22**(25): 3911-3916

Association of Single Nucleotide Polymorphisms of *NBS1* Gene With Genetic Susceptibility to Primary Liver Cancer in a Chinese Han Population*

HUANG Jian^{1)**}, ZHAO Yan-Ping¹⁾, LI Qian³⁾, ZHANG Jun-Xia²⁾, WANG Yan¹⁾, ZHANG Bei¹⁾

¹⁾ Liver Research Center/Experimental Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China;

²⁾ Department of Hepatology, Tianjin Infectious Disease Specialty Hospital, Tianjin 300192, China;

³⁾ National Office of Cancer Prevention and Control, Cancer Hospital/Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

Abstract As DNA repair associated gene, *NBS1* plays a key role in the repair of DNA double strand breaks and the maintenance of genomic stability. It has been shown in recent studies some common *NBS1* variants maybe associated with genetic susceptibility of tumors. In the present study, rare allele frequency of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *NBS1* gene in primary liver cancer were detected by the method of high resolution Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis, with the aims to analyze the correlation between *NBS1* SNPs and primary liver cancer, and evaluate the applicability of the high resolution SSCP technique in the genotyping of SNPs. The rare allele frequency of *NBS1* SNPs were detected in 327 cases of primary liver cancer and 295 negative controls from Han people of China by the method of high resolution SSCP analysis. The correlation was analyzed between *NBS1* SNPs and primary liver cancer. Genotyping of six common *NBS1* SNPs in part samples was carried out by both SSCP analysis and direct sequencing simultaneously to compare the difference between them and evaluate the accuracy and applicability of SSCP analysis in genotyping of SNPs. The results from the tissue samples showed, among six *NBS1* SNPs (102G>A, 320+208G/A, 553G>C, 1197T>C, 2016A>G and 2071-30A>T), the rare allele frequency of *NBS1* SNP 1197T>C was significantly higher in the 119 cases of primary liver cancer (68.1%) than that in the 95 controls of cirrhosis/chronic hepatitis B (57.9%) ($P=0.0298$). Similar results was obtained by detection with blood samples of 208 cases of hepatocellular carcinoma (66.8%) and 200 cases of health controls(58.8%)($P=0.0170$). There was no any significant difference of the rare allele frequency of the other five *NBS1* SNPs. The same result was observed for genotyping of *NBS1* SNPs either by the high resolution SSCP analysis or by the direct sequencing. However, higher quality of PCR products is requested for the direct sequencing compared with SSCP analysis. These results suggest that the *NBS1* SNP 1197T>C may be associated with the risk of primary liver cancer in the Chinese Han population. High resolution SSCP analysis, with the same accuracy as direct sequencing in the genotyping of *NBS1* SNPs and easier to handle, is suitable for the genotyping of multiple known SNPs in large scale cohort study.

Key words high resolution SSCP analysis, *NBS1*, single nucleotide polymorphisms, primary liver cancer, genetic susceptibility

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00536

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81071973) and The Project Sponsored by The Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry(2011, No. 41).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-63137545, Fax: 86-10-67566239, E-mail: hjlq123@163.com

Received: November 16, 2011 Accepted: March 31, 2012