

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.03.001

MICA 基因标签 SNP 检测用于结直肠癌的关联分析*

孙长江^{1,2}, 丁伟峰^{2△}

1. 南通大学公共卫生学院, 江苏南通 226001; 2. 南通大学附属医院医学检验科, 江苏南通 226001

摘要:目的 分析结直肠癌(CRC)与主要组织相容性复合体 I 类相关基因 A(MICA)基因分型的标签单核苷酸多态性(TagSNP)的遗传免疫相关因素,进而探讨 MICA 的 TagSNP 辅助诊断 CRC 的可行性。方法 采用 Sanger 测序法检测 104 例散发性 CRC 患者的肿瘤组织及癌旁组织中 MICA 外显子 2~5 区单核苷酸多态性 SNP,采用自动分析系统结合 Chromas 分析软件比对 SNP 位点进行分析,采用 Haploview 软件进行 Tag-SNP 的鉴定与分析。结果 从人类主要组织相容性抗原网站的 MICA 基因外显子 2~5 区筛选出 29 种 Tag-SNP。测序后 Haploview 分析发现,CRC 组织中 29 种 TagSNP 位于 1 个 block 中,呈强连锁不平衡;536 例健康对照组的连锁不平衡性稍弱于 CRC 组;而千人基因组连锁不平衡性更弱,且位于 2 个 block 中。进一步分析发现,其中 7 种 TagSNP 在 CRC 组织及健康对照组中差异有临界统计学意义($P < 0.1$)。结论 MICA 外显子 2~5 区 7 种 TagSNP 在 CRC 组织及健康对照人群中存在差异,且 TagSNP 之间呈强连锁不平衡,说明 Tag-SNP 具有关联分析的潜力。

关键词:结直肠癌; 主要组织相容性复合体 I 类相关基因 A; 标签单核苷酸多态性; 肿瘤免疫
中图分类号:R735.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2022)03-0289-04

Association analysis of MICA gene TagSNPs detection in colorectal cancer*

SUN Changjiang^{1,2}, DING Weifeng^{2△}

1. School of Public Health, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China

Abstract: **Objective** To analyze the genetic immune-related factors of tag single nucleotide polymorphisms (TagSNPs) in colorectal cancer (CRC) and major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) genotyping, and to investigate the feasibility of TagSNPs in MICA for the diagnosis of CRC. **Methods** SNPs in the 2—5 exon region of MICA were detected by Sanger sequencing in 104 patients with sporadic CRC. The SNPs were analyzed by automatic analysis system combined with Chromas software. Haploview software was used to identify and analyze TagSNPs. **Results** Twenty-nine TagSNPs were screened from the 2—5 exon region of MICA gene of human major histocompatibility antigen website. After sequencing, Haploview analysis showed that 29 TagSNPs in CRC tissue were located in one block, presenting strong linkage imbalance. The linkage disequilibrium of 536 healthy control group was slightly lower than that of CRC group. However, the frontal linkage imbalance of "1 000 Genome Project" was weaker and located in 2 blocks. Further analysis showed that 7 TagSNPs showed critical significant differences between CRC tissue and healthy control group ($P < 0.1$). **Conclusion** The 7 TagSNPs in the 2—5 exon region of MICA are different in CRC tissue and healthy control population, and there is a strong linkage between TagSNPs, indicating that TagSNPs have the potential of association analysis.

Key words: colorectal cancer; major histocompatibility complex class I-related chain A; tag single nucleotide polymorphisms; tumor immune

结直肠癌(CRC)是常见的消化系统恶性肿瘤^[1],美国等国家 CRC 死亡人数占癌症死亡人数的 10%,仅次于肺癌,位居第 2 位^[2]。2017 年中国肿瘤登记年报显示,我国城市 CRC 的发病率居恶性肿瘤第 3 位,并且与城市化程度相关,中国疾病预防控制中心统计的死亡人数与因癌死亡人数的比例超过 10%,CRC

防治形势依旧严峻^[3]。

有研究发现,MLH1、MSH2、MSH6、PMS2、APC、SMAD4、BMPRI1A、PTEN、STK11/LKB1、MYH 等基因的单核苷酸多态性(SNP)及位点突变等遗传变异可导致 CRC^[4-7]。然而,这些位于人类主要组织相容性抗原以外的基因变异,不足以完全解释

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81974313);中国博士后科学基金项目(2019M651930);江苏省卫生健康委员会自然科学基金项目(M2020065)。

作者简介:孙长江,男,副教授,主要从事临床生物化学和分子诊断学研究。△ 通信作者,E-mail:dwf@ntu.edu.cn。

本文引用格式:孙长江,丁伟峰. MICA 基因标签 SNP 检测用于结直肠癌的关联分析[J]. 检验医学与临床,2022,19(3):289-291.

CRC 的发病机制。主要组织相容性复合体 I 类相关基因 (MIC) 家族包括 MICA、MICB、MICC、MICD、MICE、MICEF 和 MICG 共 7 个成员,其中仅 MICA 和 MICB 基因编码蛋白质。MICA 基因位于人第 6 号染色体 6p21.31,全长 11 772 bp, cDNA 长 1 382 bp,编码 383 个氨基酸残基^[8-9]。MICA 与其受体自然杀伤细胞的活化型受体 (NKG2D) 相互作用,共同组成免疫监视系统^[8,10]。MICA 基因具有高度多态性,目前已发现 224 种 MICA 等位基因(截至 2020 年 9 月的数据),共编码 104 种不同的蛋白质^[11-13]。MICA 基因的高度多态性及其在不同种族、不同人群的遗传异质性决定了其具有不同的标签单核苷酸多态性 (TagSNP)。

有研究发现,MICA 基因多态性与强直性脊柱炎、贝赫切特综合征、干燥综合征等自身免疫性疾病密切相关^[8,11-12]。但 MICA 基因多态性与 CRC 等实体瘤的遗传免疫因素是否相关尚不清楚。因此,本文旨在研究 CRC 与 MICA 基因的 TagSNP 遗传免疫相关因素,探讨 MICA 基因的 TagSNP 用于连锁分析 CRC 的可行性。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 7 月至 2017 年 6 月南通大学附属医院胃肠外科收治的 104 例散发性 CRC 患者作为 CRC 组,其中,男 81 例,女 32 例,平均年龄 (66.1±10.1) 岁。术中留取肿瘤组织及癌旁组织标本,采用无菌生理盐水清洗后于 -80℃ 冰箱保存。536 例健康对照 (健康对照组) 标本来自复旦大学遗传学研究项目队列^[8,13]。本研究由南通大学附属医院伦理委员会审核并全程监督。

1.2 Sanger 测序法检测 CRC 组织中 MICA 外显子 2~5 区基因多态性 设计 MICA 外显子 2~3 区和 4~5 区的 PCR 扩增引物,采用 Gel Extraction Kit (TianGen 公司) 抽提外周血或组织 DNA,以全基因组 DNA 为模板,高保真扩增 MICA 外显子 2~5 区序列,并对 PCR 产物进行 Sanger 测序。25 μL PCR 反应体系 (TaKaRa 公司): 0.2 μg DNA 模板,1×PCR 反应缓冲液,200 μmol/L dNTPs,上、下游引物各 0.2 μmol/L,Hotstar DNA 聚合酶 2.5 U。95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,56℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环。收集 PCR 产物。上机测序:采用 ABI PRISM® BigDye® Termitor v3.1 cycle Sequencing Kit (Illumina 公司) 试剂及 ABI 3730 测序仪 (ABI 公司) 进行测序。

1.3 SNP 数据分析与处理 通过数据库筛选候选 MICA 基因的 TagSNP 位点,使用 Haploview 软件进行 TagSNP 数据的鉴定与分析,根据 block 选择 TagSNP,设置条件为少见等位基因频率 (MAF) ≥ 0.05, $r^2 > 0.5$ 。采用自动分析系统比对 SNP 数据,再采用 Chromas 分析软件进行 SNP 数据的二次人工比对以保证杂合子结果的准确性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计学软件对数据进行处理。以 $P < 0.1$ 为差异有临界统计学意义,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选候选 MICA 的 TagSNP 位点 通过人类主要组织相容性抗原网站 (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>),筛选 MICA 的 SNP 位点,结果发现,MICA 基因外显子 2~5 区分布有 83 种 SNP 位点。其中后续分析中筛选出的 29 种 MICA 基因的 SNP 位点为候选 TagSNP。

2.2 候选 MICA 基因 TagSNP 在 CRC 组中的连锁性 根据 104 例 CRC 组的 SNP 情况,从 MICA 基因外显子 2~5 区筛选出 29 种 TagSNP,位于 1 个 block 中。29 种 TagSNP 的连锁不平衡性 (LD) = 1 的 TagSNP 占 95.3%, LD > 0.8 的 TagSNP 占 96.5%;无连锁 TagSNP 仅占 2.9%,包括 rs9380254、rs1051785、rs1063632 和 rs1051790;说明 MICA 基因外显子 2~5 区各 TagSNP 间强连锁。

2.3 候选 MICA 基因 TagSNP 在健康对照组中的连锁性 通过对 536 例健康对照组标本的 Haploview 检测,发现 29 种 TagSNP 的 LD = 1 的 SNP 占 90.6%, LD > 0.8 的 SNP 占 91.8%, 0 < LD < 0.8 的 SNP 为 4.7%,无连锁 TagSNP 占 2.9%,包括 rs9380254、rs41554412、rs61738275、rs1063630 和 rs1051790;说明相对于 CRC 组的强连锁不平衡,健康对照组连锁不平衡稍弱。

2.4 候选 MICA 基因 TagSNP 在千人基因组的连锁性 从 HapMap 数据库 (map.org) 下载千人基因组 MICA 基因的 SNP 数据,使用 Haploview 软件,根据 Hardy-Weinberge 平衡,计算出 MICA 基因的 TagSNP,结果显示,rs9380254 在千人基因组中与 rs1063630 等其他 SNP 基本无连锁,二者位于不同的 block。剩余 28 种 TagSNP 中,LD = 1 的 SNP 占 86.9%,无连锁 TagSNP 占 13.1%,包括 rs41554412、rs61738275、rs1063630、rs1051790、rs1051785、rs1063632、rs3819268。说明相对于中国人群,千人基因组人群 MICA 基因外显子 2~5 区各 TagSNP 间连锁不平衡更弱。

2.5 MICA 基因候选 SNP 在 CRC 组与健康对照组中的差异 通过连锁不平衡分析发现,TagSNP 在中国人群的 CRC 组、健康对照组及千人基因组有区别,筛选 7 种 MICA 基因显著性差异的 SNP 位点,进一步比较发现,这些显著性差异 SNP 位点在 104 例 CRC 组与 536 例健康对照组中的差异有临界统计学意义 ($P < 0.1$)。见表 1。

表 1 MICA 基因 7 种显著性差异 SNP 位点

SNP	染色体位置	密码子位置	Hardy-Weinberge P	最小等位基因频率	P
rs9380254	31378335	6	1.000 0	0.199	0.059
rs1051785	31378388	24	0.753 9	0.068	0.065
rs1051790	31378956	122	0.626 3	0.141	0.062
rs1131896	31379115	175	0.524 5	0.383	0.079
rs17206680	31379752	191	1.000 0	0.051	0.086
rs1131898	31379795	206	0.305 9	0.291	0.056
rs41554412	31380194	304	0.734 4	0.175	0.064

3 讨 论

CRC 的一个基本特征是基因或表观遗传的不稳定性。基因或表观遗传的不稳定可以鉴别肿瘤新生生物与正常的大肠上皮^[14-16]。研究发现, CRC 相关的基因或表观遗传学分子病理学机制主要包括: (1) 染色体不稳定(CIN); (2) 微卫星不稳定(MSI); (3) 非 MSI 的超突变; (4) 异常的 DNA 甲基化及全 DNA 的去甲基化^[17]。深入探讨 CRC 分子病理学机制有利于其早期诊断及预防性治疗^[18]。

健康人 MICA 蛋白仅微量表达于肠道上皮, 当感染、应激或恶性转化时其表达可明显上调, 如卵巢癌、肝癌。MICA 表达量与肿瘤发展水平及肿瘤浸润程度有一定关联: 癌症早期 MICA 表达量低, 弥漫型肿瘤时表达量增高。MICA 蛋白在体内有可溶性 MICA(sMICA) 和膜型 MICA(mMICA) 两种形式^[19], 研究发现, sMICA 是肿瘤细胞死亡时由 MICA 分泌和金属蛋白酶水解脱落到外周血的 MICA^[20]。释放 sMICA 是肿瘤细胞削弱 MICA-NKG2D 系统免疫监视的重要途径^[21]。mMICA 和 sMICA 对机体免疫系统的作用方向相反^[22]。有文献报道, 干扰素等可上调肿瘤 mMICA 的表达, 且 MICA 多态性可影响 mMICA 的表达及 sMICA 的剪切^[23]。TagSNP 是疾病尤其是癌症等复杂疾病关联研究的重要分析策略。因此, 探索 MICA 多态性尤其是 MICA 基因 TagSNP 对 CRC 的影响十分重要。本课题组前期研究发现, 104 例 CRC 癌组织和对应癌旁组织的 MICA 基因外显子 2~5 区无体细胞突变发生^[13]。基于此, 本研究选择 536 例健康对照组的外周血标本进行 MICA 基因外显子 2~5 区的 SNP 进行研究。本研究发现, CRC 组与健康对照组 7 种 MICA 基因 TagSNP 位点的差异有临界统计学意义($P < 0.1$)。本课题组将在以后的研究中增加 CRC 组及健康对照组样本量进一步研究, 使数据更具有说服力。

CRC 典型的恶性变过程涉及多种致病因素, 如基因突变、表观遗传学改变、局部炎症改变等。早期发现这些致癌因素并做出早期诊断有利于 CRC 的防治。MICA 基因及其受体 NKG2D 在肿瘤免疫监视及肿瘤细胞杀伤方面有重要作用^[24-25]。MICA 基因 SNP 多态性可影响其与 NKG2D 的识别与结合, 进而影响其免疫监视功能。本研究中, MICA 外显子 2~5 区 7 种 TagSNP 在 CRC 组及健康对照组的差异有临界统计学意义($P < 0.1$), 且 TagSNP 之间强连锁。说明 MICA 基因 TagSNP 具有关联分析 CRC 的潜力^[26-27]。

参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADDE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, GODING SAUER A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin,

- 2020, 70(3): 145-164.
- [3] 国家癌症中心. 2017 中国肿瘤登记年报[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 2-11.
- [4] CHISANGA D, KEERTHIKUMAR S, PATHAN M, et al. Colorectal cancer atlas: an integrative resource for genomic and proteomic annotations from colorectal cancer cell lines and tissues[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(D1): D969-D974.
- [5] ZHANG H, XUE J, HESSLER P, et al. Genomic analysis and selective small molecule inhibition identifies BCL-X (L) as a critical survival factor in a subset of colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2015, 14: 126.
- [6] LUNG M S, TRAINER A H, CAMPBELL I, et al. Familial colorectal cancer[J]. Inter Med J, 2015, 45(5): 482-491.
- [7] KOPETZ S, TABERNEIRO J, ROSENBERG R, et al. Genomic classifier ColoPrint predicts recurrence in stage II colorectal cancer patients more accurately than clinical factors[J]. Oncologist, 2015, 20(2): 127-133.
- [8] ZHOU X, WANG J, ZOU H, et al. MICA, a gene contributing strong susceptibility to ankylosing spondylitis[J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(8): 1552-1557.
- [9] LI P, MORRIS D L, WILLCOX B E, et al. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA[J]. Nature Immunol, 2001, 2(5): 443-451.
- [10] RISTI M, BICALHO M D. MICA and NKG2D; is there an impact on kidney transplant outcome[J]. Frontiers Immunol, 2017, 8: 179.
- [11] PRIETO-PEREZ R, SOLANO-LOPEZ G, CABALEIRO T, et al. Polymorphisms associated with age at onset in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis[J]. J Immunol Res, 2015, 2015: 101879.
- [12] HINDS D A, MCMAHON G, KIEFER A K, et al. A genome-wide association meta-analysis of self-reported allergy identifies shared and allergy-specific susceptibility loci[J]. Nat Genet, 2013, 45(8): 907-911.
- [13] DING W, MA Y, ZHU W, et al. MICA * 012:01 allele facilitates the metastasis of KRAS-mutant colorectal cancer[J]. Front Genet, 2020, 11: 511.
- [14] FLAVAHAN W A, GASKELL E, BERNSTEIN B E. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer[J]. Science, 2017, 357(6348): eaal2380.
- [15] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [16] HANAHAN D, WEINBERG R A. The hallmarks of cancer[J]. Cell, 2000, 100(1): 57-70.
- [17] WALTHER A, HOULSTON R, TOMLINSON I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis[J]. Gut, 2008, 57(7): 941-950.
- [18] HOFSETH L J, HEBERT J R, CHANDA A, et al. Early-onset colorectal cancer: initial clues and current views[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(6): 352-364.
- [19] ZINGONI A, VULPIS E, CECERE F, et al. MICA-129 dimorphism and soluble MICA are associated with the progression of multiple myeloma[J]. Front Immunol, 2018, 9: 926.

感染作用的药材按照一定比例进行配伍,形成蒙药乌日特-3,通过联合西替利嗪,考察其对过敏性鼻炎急性发作期的治疗效果。结果显示,联合组显效率明显高于对照组($P < 0.05$),且联合组治疗后血常规、尿常规、心率、心电图等指标未出现明显异常,表明其不良反应小。另外,过敏原点刺试验结果表明,与治疗前相比,联合组治疗后对户尘螨等 15 种过敏原的敏感性明显降低($P < 0.05$)。

综上所述,蒙药乌日特-3 联合西替利嗪治疗过敏性鼻炎在急性发作期有确切疗效,可为地区性过敏性鼻炎的有效诊疗提供研究基础,而其长期诊疗效果需进一步考察评价。

参考文献

- [1] 孙小草,张强,章秀梅,等.苍耳子水提取物对变应性鼻炎豚鼠鼻黏膜病变和血清炎症细胞因子的影响[J].安徽中医药大学学报,2019,38(6):44-48.
- [2] 张罗,BACHERT C,FOKKENS W J,等.《过敏性鼻炎及其对哮喘的影响(ARIA)》指南 2019 版过敏性鼻炎管理路径(中国版)[J].中国耳鼻咽喉头颈外科,2019,26(12):690-699.
- [3] 宁学松.中药治疗过敏性鼻炎的临床研究进展[J].内蒙古中医药,2017,36(8):138-139.
- [4] 白散丹,苏木亚.蒙药治疗过敏性鼻炎临床观察[J].中国民族医药杂志,2014,20(7):18.
- [5] OSKOU EI Z, AKABERI M, HOSSEINZADEH H. A glance at black cumin (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone, in ischemia: a review[J]. Iran J Basic Med Sci, 2018, 21(12):1200-1209.
- [6] 邓桃妹,彭灿,彭代银,等.甘草化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的探讨[J].中国中药杂志,2021,46(11):2660-2676.
- [7] 再兰甫古丽·吐尼牙孜.小茴香挥发油的抗炎镇痛作用[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(77):179-181.
- [8] ALSAMARAI A M, ABDULSATAR M, AHMED ALO BAIDI A H. Evaluation of topical black seed oil in the treatment of allergic rhinitis[J]. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem, 2014, 13(1):75-82.
- [9] 《蒙医病证诊断疗效标准》编审委员会.蒙医病证诊断疗效标准:蒙古文[M].北京:民族出版社,2007:102-105.
- [10] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会,中华医学会耳鼻喉科分会.变应性鼻炎的诊治原则和推荐方案(2004 年,兰州)[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2005,40(3):8-9.
- [11] 高斐宏,李林,卢炀,等.蒙药十三味红花密诀丸对过敏性鼻炎大鼠鼻黏膜 ICAM-1、VCAM-1、TLR4、NF- κ Bp65 表达的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(9):4143-4145.
- [12] 达格巴雅尔,傲特根其木格,乌云高娃.蒙药验方古日冲治疗过敏性鼻炎 70 例临床观察[J].中国民族医药杂志,2008,14(7):15.
- [13] 许黎,张肖,段冰玉,等.玉屏风散联合左西替利嗪治疗过敏性鼻炎患者的效果分析[J].当代医学,2020,26(18):19-21.
- [14] 卢炀,李林,高斐宏,等.蒙药十三味红花密诀丸治疗过敏性鼻炎 32 例临床观察[J].中医杂志,2016,57(23):2025-2027.
- [15] 胡日查,满达,特木其乐.蒙药成分黑种草的分类学归属及其药效[J].内蒙古大学学报(自然科学版),2018,49(5):103-109.
- [16] 廖成松,韩阳阳,陈志婧.黑种草方剂的组成、功效及临床应用研究进展[J].中国现代应用药学,2021,38(2):252-256.

(收稿日期:2021-04-03 修回日期:2021-10-29)

(上接第 291 页)

- [20] XU X, RAO G S, GROH V, et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A/B (MICA/B) expression in tumor tissue and serum of pancreatic cancer: role of uric acid accumulation in gemcitabine-induced MICA/B expression[J]. BMC Cancer, 2011, 11:194.
- [21] GROH V, WU J, YEE C, et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation[J]. Nature, 2002, 419(6908):734-738.
- [22] GASSER S, ORSULIC S, BROWN E J, et al. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor[J]. Nature, 2005, 436(7054):1186-1190.
- [23] BARANWAL A K, MEHRA N K. Major histocompatibility complex class I chain-related A (MICA) molecules: relevance in solid organ transplantation[J]. Front Immunol, 2017, 8:182.
- [24] COURAU T, BONNEREAU J, CHICOTEAU J, et al. Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1):74.
- [25] WANG T, SUN F, WANG Y, et al. NKG2D Immunoligand rG7S-MICA enhances NK cell-mediated immunosurveillance in colorectal carcinoma[J]. J Immunother, 2018, 41(3):109-117.
- [26] WANG X, WANG W, ZHANG Q, et al. Tagging SNPs in the HOTAIR gene are associated with bladder cancer risk in a Chinese population[J]. Gene, 2018, 664:22-26.
- [27] LIANG L L, CHEN L, ZHOU M Y, et al. Genetic susceptibility of five tagSNPs in the endothelin-1 (EDN1) gene to coronary artery disease in a Chinese Han population[J]. Biosci Rep, 2018, 38(5):BSR20171320.

(收稿日期:2021-06-22 修回日期:2021-12-15)