

锌指蛋白 6 基因多态性与直肠癌发生的关联性

何 珊¹, 高 芳¹, 戎松浩¹, 马淑一¹, 高 丽²

(¹ 包头医学院医学技术与麻醉学院, 包头 014040; ² 包头师范学院生态环境学院, 包头 014030)

摘要 目的 探讨锌指蛋白 6 (ZBED6) 基因三个单核苷酸多态性 (SNP) 位点多态性与直肠癌发病风险的相关性, 为直肠癌早期诊断和治疗提供实验依据。方法 利用聚合酶链式反应-限制性内切酶长度多态性检测方法 (PCR-RFLP), 对无亲缘关系的 109 例随机直肠癌患者和 110 例健康对照者的 ZBED6 基因进行分型。利用非条件 Logistic 回归分析, 通过计算 OR 和 95% CI, 探讨 ZBED6 三个 SNP 位点等位基因以及基因型与直肠癌发病风险的相关性。结果 ZBED6 基因 SNP rs7552670 位点与直肠癌发病风险相关, 经统计分析携带 TC 基因型者与携带 TT 基因型的人群相比, 直肠癌发病风险会提高 2.653 倍 (TT vs TC; OR = 2.653, 95% CI = 1.501 ~ 4.690), 其余 SNP 与直肠癌发病风险无关。结论 ZBED6 基因 rs7552670 多态性与直肠癌发生具有相关性, TC 基因携带者直肠癌发病风险增高。

关键词 直肠癌; ZBED6; 基因多态性; 非条件 Logistic 回归; rs7552670 位点; 相关性

中图分类号 R 394

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)04-0664-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.011

结直肠癌是一类与遗传、环境等因素相关的复杂疾病^[1-2], 因此, 研究结直肠癌的易感基因和遗传变异, 发掘用于癌症早期诊断的分子标志将有助于结直肠癌的早期筛查和后期治疗。锌指蛋白 6 (zinc finger protein 6, ZBED6) 具有广泛的组织特异性分布, 可调控多种基因的表达。它可作为胰岛素样生长因子 2 (insulin like growth factor 2, IGF2) 基因的抑制因子^[3-6], 促进结直肠癌的生长和侵袭^[7]。在结肠癌细胞系 (rochester kiss off, RKO) 细胞中敲除 ZBED6 基因后, RKO 细胞生长速度加快^[8], 且与其直接相互作用的基因均与细胞的增殖分化相关, 表明 ZBED6 直接参与结肠癌的发展^[8]。但进一步的调控机制尚不明确。

研究^[9-13]表明单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与疾病发生具有紧密关联。ZBED6 基因中的 SNP 与基因表达具有重要关联^[14]。当 ZBED6 发生单碱基突变后, ZBED6 表达水平下降。而 ZBED6 基因表达水平与结直肠癌的

发生发展具有重要关联性。因此, 该研究拟在直肠癌病例个体中开展 ZBED6 基因 rs7552670、rs7540041、rs3737972 位点基因多态性的研究, 探究 ZBED6 基因三位点多态性与直肠癌发生的关联性, 为直肠癌早期诊断提供新的分子标志。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取包头市肿瘤医院 2020 年 10 月—2021 年 4 月经组织病理学诊断的直肠癌患者 109 例 (病例组), 彼此间无亲缘关系。女性 44 例, 男性 65 例, 平均年龄为 (58.31 ± 7.76) 岁。同期收集社区无癌症病史健康人群 110 例 (对照组), 女性 45 例, 男性 65 例, 平均年龄为 (56.65 ± 7.78) 岁。所有入选对象间均不存在血缘关系, 且病例组与对照组在年龄、性别上差异无统计学意义 (年龄: $t = 1.587, P = 0.114$; 性别: $\chi^2 = 0.007, P = 0.935$)。该研究获得了包头医学院伦理委员会的批准 [批准号: 包医伦审 2021 第 (037) 号]。

1.2 血液的采集 使用 EDTA 抗凝采血管, 分别采集病例组以及正常对照组研究对象全血, 患者血液在术前采集。

1.3 SNP 位点筛选 通过美国国立生物技术信息中心 (national center for biotechnology information, NCBI) 数据库查询 ZBED6 基因 SNP 的所有信息, 从中选择错义突变且最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) 大于 0.05 的 SNP 位点, 最终选择

2024-12-26 接收

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (编号: 2020MS08075);

包头医学院创新团队发展计划项目 (编号: bycxtd-14)

作者简介: 何 珊, 女, 讲师;

高 丽, 女, 副教授, 通信作者, E-mail: gaoli8905@163.com;

马淑一, 女, 教授, 通信作者, E-mail: mashuyi-2008@163.com

了 rs7552670、rs7540041、rs3737972 三个位点。

1.4 基因分型

1.4.1 基因组 DNA 的提取 使用血液 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司),根据操作流程,提取各直肠癌患者和对照组外周血样本基因组 DNA。

1.4.2 引物设计与合成 利用 Primer 5 软件针对 rs7552670、rs7540041、rs3737972 三个位点进行引物设计,交由上海生工合成,引物序列见表 1。

表 1 ZBED6 基因 3 位点引物序列

Tab.1 Primer sequences of ZBED6 gene at 3 loci

SNP	PCR primer(5'-3')	Length(bp)
rs7552670	F:TTCTTTGGAAACTGCGTCTT	358
	R:GGCCTTGACCGAATGACT	
rs7540041	F:AGGTTGCCATCCAGTATC	377
	R:GGAATTTTCAGCCCTTGTT	
rs3737972	F:GGGTTTGCGAATTAAGGG	361
	R:CCTGGTCCAATGAGGTGA	

1.4.3 目的片段的 PCR 扩增 通过 PCR 扩增三个位点对应的目的片段,反应体系总体积为 50 μ l;其中模板 1 μ l,2 $\times$ Taq PCR Master Mix 25 μ l,上下游引物各 2 μ l 以及去离子水 20 μ l。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 7 min,4 $^{\circ}$ C。

1.4.4 限制性内切酶基因分型及测序 使用 Alu I 限制性内切酶对 rs7552670 和 rs7540041 两个位点进行基因分型。rs7552670 位点 TT 型:168 bp、190 bp;TC 型:168 bp、190 bp 和 358 bp;CC 型:358 bp。rs7540041 位点 GG 型:185 bp、115 bp 和 77 bp;AG 型:300 bp、185 bp、115 bp 和 77 bp;AA 型:300 bp 和 77 bp。两位点酶切反应总体积为 10 μ l,包括 Alu I 内切酶 0.2 μ l,10 $\times$ 限制性内切酶 Buffer 1 μ l 和 PCR 产物 4 μ l。37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,后采用 2% 琼脂糖凝胶电泳,进行基因型分析。每个位点随机选取

50 份 PCR 产物,送由上海生工生物公司进行测序,验证基因型。rs3737972 位点 PCR 扩增后产物直接交由上海生工测序,判断基因型。

1.5 统计学处理 利用 SPSS 26 软件进行统计分析。采用 *t* 检验和 χ^2 检验分别比较病例组和对照组间的年龄及性别分布差异是否有统计学意义;在对照组中,采用 χ^2 检验对基因型分布进行哈迪-温伯格平衡定律(hardy-weinberg equilibrium, HWE)检验。利用非条件 Logistic 回归计算风险比(OR)以及 95% 可信区间(CI),分别分析 rs7552670、rs7540041、rs3737972 三位点基因型是否与直肠癌发病风险存在关联,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZBED6 三位点基因多态性结果 ZBED6 基因 rs7552670(T/C)位点酶切分型结果如图 1A 所示,结果显示 ZBED6 基因 rs7552670 位点存在 T 和 C 2 个等位基因,有 TT、TC 和 CC 3 种基因型。随机抽取 50 个 PCR 产物进行测序,结果如图 2A 所示,抽样测序结果与酶切结果完全一致。ZBED6 基因 rs7540041(G/A)位点酶切分型结果如图 1B 所示,结果显示 rs7540041 位点存在 G 和 A 2 个等位基因,有 GG、GA 和 AA 3 种基因型。随机抽取 50 个 PCR 产物进行测序,结果如图 2B 所示,抽样测序结果与酶切结果完全一致。rs3737972 位点分型通过测序完成,结果如图 2C 所示,rs3737972 位点存在 A 和 G 2 个等位基因,有 3 种基因型 AA、AG 和 GG。

2.2 ZBED6 基因三个 SNP 位点等位基因与直肠癌发病风险的关联性 分析直肠癌病例组与正常对照组人群 ZBED6 基因 SNP 位点的等位基因,结果表明三个 SNP 位点的等位基因分布情况均与直肠癌的发病风险无关,见表 2。

2.3 ZBED6 SNP 位点基因型与直肠癌发病风险的关系 正常对照组中 ZBED6 基因 SNP rs7552670、

表 2 各 SNP 位点等位基因与直肠癌的关联分析[n(%)]

Tab.2 Association analysis of alleles at various SNP loci with rectal cancer[n(%)]

SNP	Genotype	Control group	Case group	OR(95% CI) ^a
rs7552670	T	160(72.7)	150(68.8)	1
	C	60(27.3)	68(31.2)	1.209(0.800-1.826)
rs7540041	G	164(74.5)	166(76.1)	1
	A	56(25.5)	52(23.9)	0.917(0.594-1.417)
rs3737972	A	156(70.9)	138(63.3)	1
	G	64(29.1)	80(36.7)	1.413(0.947-2.109)

^a:Balancing gender and age factors.

rs7540041、rs3737972 位点的基因型频率数分布符合 Hardy-Weniberg 平衡定律 (rs7552670: $\chi^2 = 1.733, P = 0.420$; rs7540041: $\chi^2 = 0.132, P = 0.936$; rs3737972: $\chi^2 = 0.006, P = 0.997$), SNP rs7552670 位点与直肠癌的发病风险具有相关性,统计分析结果显示携带 TC 基因型者与携带 TT 基因型人群比较,直肠癌的发病风险会提高 2.653 倍 (TT vs TC: $OR = 2.653, 95\% CI = 1.501 \sim 4.690$), rs7540041、rs3737972 两位点 SNP 基因型与直肠癌发病风险没有关联 ($P > 0.05$)。如表 3 所示。

3 讨论

结直肠癌发病率在持续增加,是临床最常见的消化道恶性肿瘤之一。结直肠癌有着发病初期症状不明显,不易察觉的特点,患者易耽误治疗,结直肠癌患者在就诊时已多为中、晚期,术后 5 年存活率较低,仅为 30% ~ 50%。而早期发现并切除癌前病变

能够较为有效的降低结直肠癌的发生率和病死率^[15]。因此,寻找早期、高效的筛查方法对于结直肠癌的早期诊断和治疗具有重要意义。

ZBED6 是一个新发现的定位于细胞核内的转录调控因子,在细胞周期调控、发育及分化等方面发挥作用,其信号通路多与人类疾病有关^[16]。ZBED6 具有多种生物学功能,有广泛的组织特异性分布,参与调控细胞的生长发育和生物大分子的合成代谢。研究^[17-18]表明,敲减 ZBED6 基因后会增加细胞增殖和迁移速率,且 ZBED6 基因对人结直肠癌细胞的增殖和分化速率也有显著影响,表明 ZBED6 基因表达水平与结直肠癌的发生发展具有密切关联。而 ZBED6 的表达受多种因素影响,包括碱基突变、组蛋白修饰、DNA 甲基化等^[19-20],因此,ZBED6 基因碱基突变可能会通过影响其表达水平,从而影响结直肠癌发生发展。同时多项研究^[9-13]表明 SNP 与结直肠癌发生具有密切关联性,目前有关 ZBED6 基

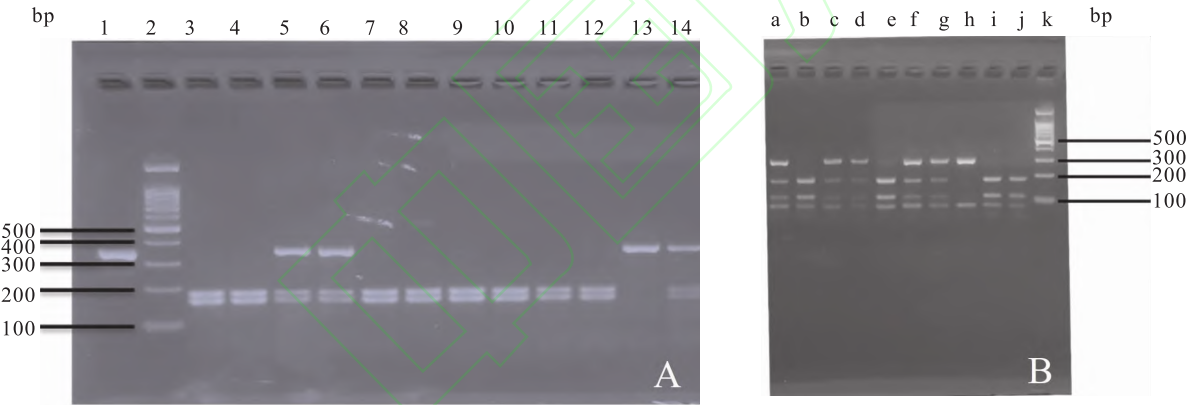


图1 ZBED6 位点基因分型电泳图

Fig.1 Gel electrophoresis result of ZBED6 loci genotyping

A,B;ZBED6 gene rs7552670 (T/C) and rs7540041 (G/A) loci genotyping electrophoresis;1;PCR products;2;100 bp DNA ladder marker;3,4,7-12;TT;5,6,14;TC;13;CC;a,c,d,f,g: AG; b,e,i,j;GG;h: AA;k;100 bp DNA ladder marker.

表3 各 SNP 位点基因型与直肠癌的关联分析[n(%)]

Tab.3 Association analysis between genotypes of various SNP loci and rectal cancer[n(%)]

SNP	Genotype	Control group	Case group	OR(95% CI) ^a
rs7552670	TT	62(56.4)	42(38.5)	1
	TC	36(32.7)	66(60.6)	2.653(1.501-4.690)
	CC	12(10.9)	1(0.9)	0.122(0.015-0.980)
rs7540041	GG	60(54.5)	59(54.1)	1
	GA	44(40.0)	48(44.0)	1.103(0.637-1.908)
	AA	6(5.5)	2(1.8)	0.331(0.064-1.718)
rs3737972	AA	55(50.0)	40(36.7)	1
	AG	46(41.8)	58(53.2)	1.720(0.973-3.042)
	GG	9(8.2)	11(10.1)	1.675(0.627-4.478)

^a:Balancing gender and age factors.

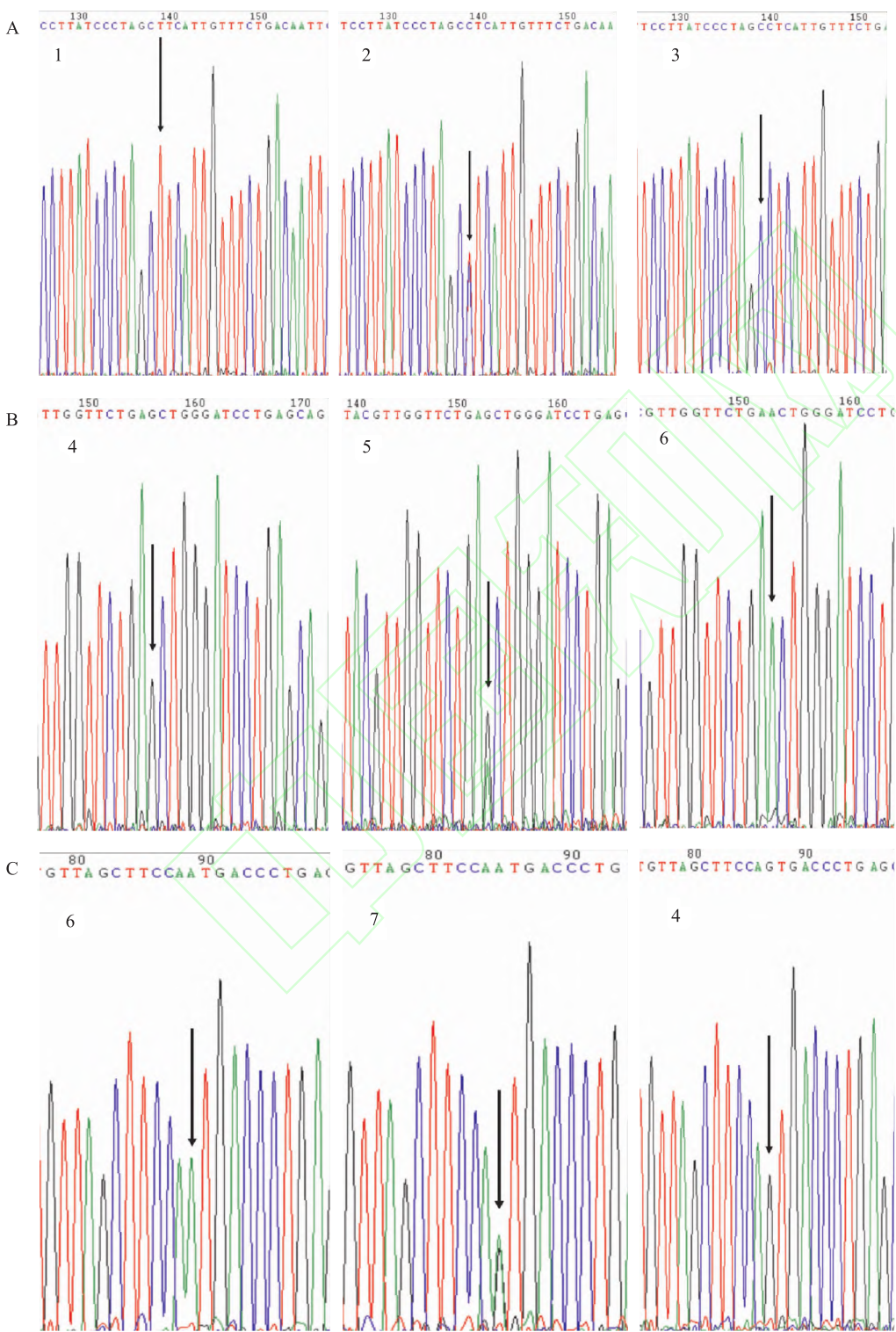


图2 ZBED6 基因三位点 PCR 扩增产物测序结果

Fig.2 Sequencing results of PCR amplification products at the three loci of ZBED6 gene

A,B,C;Sequencing results of PCR amplification products at the rs7552670 (T/C),rs7540041(G/A) and rs3737972(A/G) loci of ZBED6 gene;
1:TT;2:TC;3:CC;4:GG;5:GA;6:AA;7:AG.

因 SNP 与结直肠癌关联研究尚无报道。故该研究筛选了 ZBED6 基因的三个 SNP 位点进行基因多态性研究,初步探讨了三位点基因多态性与直肠癌发病的相关性。

该研究筛选了三个 MAF 大于 0.05 的 SNP 位点,结果显示 ZBED6 基因 rs7552670、rs7540041、rs3737972 三位点基因型在所有样本中均存在多态性,表明 ZBED6 基因在人群中具有多态性。进一步将这三个 SNP 位点与直肠癌发生进行关联性分析,发现 SNP rs7552670 位点与直肠癌的发病风险有相关性,统计结果显示携带 TC 基因型者与携带 TT 基因型人群比较,直肠癌的发病风险会提高 2.653 倍。目前关于该 SNP 与疾病发生的关联性尚无报道,因此,其如何影响结直肠癌的发生还有待于进一步研究。根据先前文献^[17-18]报道,ZBED6 基因碱基突变会影响其基因表达水平,而基因表达水平又会影响结直肠癌细胞的增殖和分化,因此,推测该 SNP 可能会通过影响 ZBED6 基因表达,从而影响直肠癌的发生,但还需要检测相关个体 ZBED6 基因表达水平对该假设进行验证。同时该研究样本量较小,故课题组今后将进一步扩大样本量,筛选更多该基因 SNP 进行进一步研究验证,为结直肠癌早期诊断提供新的分子标记。

参考文献

- [1] Hnisz D, Abraham B J, Lee T I, et al. Super-enhancers in the control of cell identity and disease[J]. Cell, 2013, 155(4): 934 - 47. doi:10.1016/j.cell.2013.09.053.
- [2] Dekker E, Tanis P J, Vleugels J L A, et al. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467 - 80. doi:10.1016/s0140-6736(19)32319-0.
- [3] Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers[J]. Science, 2004, 304(5670): 554. doi:10.1126/science.1096502.
- [4] Ericson K, Gan C, Cheong I, et al. Genetic inactivation of AKT1, AKT2, and PDPK1 in human colorectal cancer cells clarifies their roles in tumor growth regulation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(6): 2598 - 603. doi:10.1073/pnas.0914018107.
- [5] Yoshie S, Suzuki Y, Wada K, et al. Estimation of mutagenic effects of intermediate frequency magnetic field using mammalian cells[C]//2011 XXXth URSI General Assembly and Scientific Symposium. August 13 - 20, 2011, Istanbul, Turkey. IEEE, 2011: 1 - 4. doi:10.1109/URSIGASS.2011.6051339.
- [6] Calderari S, Gangnerau M N, Thibault M, et al. Defective IGF2 and IGF1R protein production in embryonic pancreas precedes beta cell mass anomaly in the Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes[J]. Diabetologia, 2007, 50(7): 1463 - 71. doi:10.1007/s00125-007-0676-2.
- [7] 解文雅, 张传海, 潘登科, 等. 锌指蛋白 6 (ZBED6) 研究进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34(11): 50 - 5. doi:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2018-0449.
- [8] Xie W Y, Zhang C H, Pan D K, et al. Research progress on zinc finger protein 6[J]. Biotechnol Bull, 2018, 34(11): 50 - 5. doi:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2018-0449.
- [9] Akhtar Ali M, Younis S, Wallerman O, et al. Transcriptional modulator ZBED6 affects cell cycle and growth of human colorectal cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(25): 7743 - 8. doi:10.1073/pnas.1509193112.
- [9] 刘 照. 结直肠癌相关功能性单核苷酸多态性的鉴定及调控机制研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2023. doi:10.27149/d.cnki.ghdsu.2023.004158.
- [10] Liu Z. Identification of functional single nucleotide polymorphisms associated with colorectal cancer and study on its regulatory mechanism[D]. Shanghai: East China Normal University, 2023. doi:10.27149/d.cnki.ghdsu.2023.004158.
- [10] 李迎泽, 高 芳, 卫星如, 等. 大肿瘤抑制激酶 2 基因多态性与原发性结直肠癌的关联性[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(12): 1927 - 32. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.014.
- [10] Li Y Z, Gao F, Wei X R, et al. Associations of polymorphism in large tumor suppressor kinase 2 gene with colorectal cancer[J]. Acta Univ Med Anhui, 2022, 57(12): 1927 - 32. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.014.
- [11] 马立聪, 阎小霞, 高 芳, 等. 哺乳动物不育系 20 样激酶 1 基因多态性与结直肠癌的关联分析[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(3): 547 - 53. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.028.
- [11] Ma L C, Yan X X, Gao F, et al. Association study between mammalian sterile 20-like kinase 1 SNPs and colorectal cancer[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(3): 547 - 53. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.028.
- [12] 张 洁, 胡伟国, 宋启斌. 单核苷酸多态性的遗传变异与结直肠癌相关性研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2023, 29(8): 646 - 51. doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2023.08.B003.
- [12] Zhang J, Hu W G, Song Q B. Research progress on the relationship between single nucleotide polymorphisms and colorectal cancer[J]. J Chin Oncol, 2023, 29(8): 646 - 51. doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2023.08.B003.
- [13] 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 - 91, 296. doi:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.03.001.
- [13] Sun C J, Ding W F. Association analysis of MICA gene TagSNPs detection in colorectal cancer[J]. Lab Med Clin, 2022, 19(3): 289 - 91, 296. doi:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.03.001.
- [14] Huang Y Z, Sun Y J, Zhan Z Y, et al. Expression, SNP identification, linkage disequilibrium, and haplotype association analysis of the growth suppressor gene ZBED6 in Qinchuan beef cattle[J]. Anim Biotechnol, 2014, 25(1): 35 - 54. doi:10.1080/10495398.2013.814572.
- [15] 康 倩, 李 娜, 金 鹏, 等. 外周血 SEPT9 基因甲基化检测在老年结直肠癌筛查中的意义[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2019, 28(5): 503 - 7. doi:10.3969/j.issn.1006-5709.2019.05.005.

- Kang Q, Li N, Jin P, et al. The significance of peripheral blood SEPT9 gene methylation in screening of colorectal cancer in a senile cohort[J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2019, 28(5): 503–7. doi:10.3969/j.issn.1006–5709.2019.05.005.
- [16] Markljung E, Jiang L, Jaffe J D, et al. ZBED6, a novel transcription factor derived from a domesticated DNA transposon regulates IGF2 expression and muscle growth[J]. *PLoS Biol*, 2009, 7(12): e1000256. doi:10.1371/journal.pbio.1000256.
- [17] Huang Y Z, Zhang L Z, Lai X S, et al. Transcription factor ZBED6 mediates IGF2 gene expression by regulating promoter activity and DNA methylation in myoblasts[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 4570. doi:10.1038/srep04570.
- [18] Akhtar Ali M, Younis S, Wallerman O, et al. Transcriptional modulator ZBED6 affects cell cycle and growth of human colorectal cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(25): 7743–8. doi:10.1073/pnas.1509193112.
- [19] Jiang L, Wallerman O, Younis S, et al. ZBED6 modulates the transcription of myogenic genes in mouse myoblast cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94187. doi:10.1371/journal.pone.0094187.
- [20] Huang Y Z, Zhang Z J, He H, et al. Correlation between ZBED6 Gene Upstream CpG Island methylation and mRNA expression in cattle[J]. *Anim Biotechnol*, 2017, 28(2): 104–11. doi:10.1080/10495398.2016.1212060.

Association of Zinc finger protein 6 gene polymorphism with the occurrence of rectal cancer

He Shan¹, Gao Fang¹, Rong Songhao¹, Ma Shuyi¹, Gao Li²

(¹*School of Medical Technology and Anesthesiology, Baotou Medical College, Baotou 014040;*

²*College of Ecology and Environment, Baotou Teacher's College, Baotou 014030)*

Abstract Objective To investigate the relationship between the risk occurrence of rectal cancer and the single nucleotide polymorphisms (SNP) of zinc finger protein 6 (ZBED6), and to provide the experimental basis for early diagnosis and treatment of rectal cancer. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technology was used to genotype the ZBED6 gene in 109 randomly selected rectal cancer patients and 110 unrelated healthy controls. To evaluate the relationship between alleles, genotypes and the risk of rectal cancer, unconditional Logistic regression analysis was used to *OR* and 95% *CI*. **Results** The SNP rs7552670 of ZBED6 had significant correlation with the risk of rectal cancer. Compared with the population carrying the TT genotype, those carrying the TC genotype had a 2.653 fold increased risk of rectal cancer (TT vs TC: *OR* = 2.635, 95% *CI* = 1.501–4.690). Other SNPs had no significant correlation with the risk of rectal cancer. **Conclusion** There is an interaction between the polymorphisms of ZBED6 (rs7552670) and rectal cancer. The population carried ZBED6 rs7552670 TC genotype had an growing risk of rectal cancer.

Key words rectal cancer; ZBED6; single nucleotide polymorphism; unconditional Logistic regression; rs7552670; correlation

Fund programs Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 2020MS08075); Innovation Team Development Plan Project of Baotou Medical College (No. bycxt-d-14)

Corresponding authors Gao Li, E-mail: gaoli8905@163.com; Ma Shuyi, E-mail: mashuyi-2008@163.com