

胃癌易感性与诱导型一氧化氮合酶基因多态性关系的研究

沈靖 王润田 王理伟 王朝曦 邢厚恂 王滨燕 李茂森 华召来
王建明 郭春华 王心如 徐希平

【摘要】 目的 探讨中国人诱导型一氧化氮合酶(iNOS)基因多态性与胃癌易感性的关系。方法 以社区为基础的病例对照研究。病例经胃镜及病理确诊,有效分析样本包括肠型胃癌 93 例,胃贲门癌 50 例,对照 246 人。结果 iNOS 基因第 16 外显子存在 C→T 多态性(产生 *Tsp* 509 I 内切酶的识别位点),使编码的氨基酸由丝氨酸(Ser)改变为亮氨酸(Leu),对照人群 T 等位基因频率为 13.21%。单独存在 C→T 多态性与肠型胃癌、胃贲门癌易感性增加无统计学关联,但与吸烟因素同时存在,对肠型胃癌、胃贲门癌产生明显的 2 型超相乘交互作用;与缺乏 CagA 抗体同时存在,对胃贲门癌产生明显的相加交互作用。结论 iNOS 基因 C→T 多态性可能是胃癌的易感基因,特别与吸烟、缺乏幽门螺杆菌 CagA 抗体的肠型胃癌、胃贲门癌发生密切相关。

【关键词】 一氧化氮合酶;基因;多态性;胃肿瘤

Study on the Relationship between susceptibility of stomach neoplasm cancer and polymorphism of inducible Nitric Oxide Synthase gene SHEN Jing*, WANG Runtian, WANG Liwei, WANG Zhaoxi, XING Houxun, WANG Binyan, LI Maosen, HUA Zhaolai, WANG Jianming, GUO Chunhua, WANG Xinru, XU Xiping.
*Department of Epidemiology & Biostatistics, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

【Abstract】 Objective To study the relationship between polymorphism of inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) gene and the susceptibility of intestinal type stomach cancer and stomach cardia cancer in Chinese people. **Methods** A community-based case-control study was designed. Ninety-three intestinal type of stomach cancer and 50 stomach cardia cancer patients with endoscopy and pathology diagnosis were identified as cases. Two hundred and forty-six controls served as controls. **Results** C→T polymorphism was found in exon 16 of iNOS gene, which changed the coding amino acid from serine to leucine, and formed a recognition site identified by *Tsp* 509 I restriction enzyme (we called it C→T polymorphism). The T allele gene frequency in the control group was 13.21%. No statistically significant difference was found between C→T polymorphism alone and the increased susceptibility to intestinal stomach cancer or stomach cardia cancer. A significant type 2 multiplicative interaction was found in increasing both the risk of intestinal stomach cancer and stomach cardia cancer when both C→T polymorphism and tobacco smoking exposure existed. An additive interaction model, which showed statistically significant difference, was found to increase only the risk of stomach cardia cancer when CagA antibody shared negative but C→T polymorphism occurred. **Conclusion** C→T polymorphism of iNOS gene was considered as one of the possible susceptible genes, which specifically increased the risk of tobacco-related but CagA negative types of intestinal stomach cancer and stomach cardia cancer.

【Key words】 Nitric-oxide synthase; gene; Polymorphism; Stomach neoplasms

幽门螺杆菌(*H. Pylori*, Hp)感染后造成的炎

症反应,可刺激诱导型一氧化氮合酶(iNOS)产生大量的 NO。NO 除了作为介导免疫细胞和上皮细胞间信号传导的因子,具有保护胃黏膜作用外,还同时具有促炎、损伤胃黏膜等病理作用,其致突变性和致癌性在启动和促进胃癌发生、发展中起重要作用^[1,2]。iNOS 是体内参与 NO 代谢、与致癌性亚硝基化合物形成有密切联系的关键酶,其基因位于人类染色体 17cen-q11.2,有 27 个外显子,26 个内含子^[3,4]。本研究利用在江苏省扬中胃癌高发区获得的病例对照

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170827 和 30070671)

作者单位:210029 南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系(沈靖、邢厚恂、王心如);北京大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系(王润田);江苏省扬中市肿瘤防治研究所流行病室(王理伟、李茂森、华召来、王建明、郭春华);北京大学生态遗传与生殖卫生研究中心(王朝曦、徐希平);安徽医科大学生物医学研究所(王滨燕)

研究资料,对 iNOS 基因多态性与中国人群胃癌易感性的关系进行了探讨。

材料与方 法

1. 研究对象:以 1997 年 1 月至 1998 年 12 月间,经江苏省扬中市人民医院胃镜及病理确诊的现患胃癌为研究病例总体,在得到研究对象知情同意后签署知情同意书,共获得肠型胃癌 112 例,胃贲门癌 61 例,健康对照 284 名,作为本研究 iNOS 基因多态性的总体,均为汉族人群,其中 19 例肠型胃癌、11 例胃贲门癌和 38 名对照标本,经两次重复检测,均未获得基因型结果而删除,最终分析的有效样本包括肠型胃癌 93 例,胃贲门癌 50 例,对照 246 名。比较有效分析样本与删除样本的年龄、性别等人口学特征,差异未见显著性。研究对象的其他特征和入选标准见文献 [5,6]。

2. 调查内容及检测指标:病例与对照通过流行病学家访调查,获得个人健康状况、职业暴露、肿瘤家族史、吸烟、饮酒、饮茶、饮食等资料。其中既往吸烟史的定义为:确诊胃癌前或调查前一年,每天至少吸 1 支烟,已经连续吸 1 年。同时采集 10 ml 抗凝静脉血,分离血浆,以自制 CagA 单克隆,建立双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆 CagA 抗原。用 ELISA 法检测血浆 CagA 的 IgG 抗体(试剂盒由上海晶莹生物技术有限公司提供,批号 0052)。

3. iNOS 基因多态性分析:根据测序结果,在 iNOS 基因第 16 外显子第 14 个碱基发现 C→T 多态性,产生 *Tsp* 509 I 限制性内切酶的识别位点^[7] 5'...AATT...3' 3'...TTAA...5',简称 C→T 多态性,导致编码氨基酸由丝氨酸(Ser)改变为亮氨酸(Leu),即 TCG→TTG。据此设计了多聚酶链反应(PCR)-限制性片段长度多态性(RFLP)方法,进行基因型检测。上游引物:F5'-TGTAACCAACTTC CGTGGTG-3'(T_m = 60.82℃),下游引物:R5'-GTCTCTCGGGTCTGAGAAG-3'(T_m = 60.14℃)。加模板 DNA(10 ng/μl)5 μl 后烘干,10 μl PCR 体系中含有:10×PCR 缓冲液 1 μl,Hot Taq DNA 聚合酶(Promega 公司产品,5 U/μl)0.045 μl,dNTP(1.25 μmol/L)1.6 μl,MgCl₂(25 mmol/L)0.2 μl,引物各 0.15 μl(Resgen 公司产品,20 μmol/L),去离子水 6.885 μl,热封膜覆盖。运行 Touch Down PCR 程序,

循环参数为 94℃预变性 15 min,然后 94℃30 s,61℃复性 45 s,72℃延伸 45 s,10 个循环,再开始 94℃变性 30 s,56℃复性 45 s,72℃延伸 45 s,35 个循环后 72℃延伸 7 min。反应结束后,在 10 μl PCR 产物中加入:10×酶切反应缓冲液 2 μl(NEB 公司产品),100×小牛血清(BSA)0.15 μl,*Tsp* 509 I 限制性内切酶(NEB 公司产品,10 U/μl)0.2 μl,2.65 μl 去离子水,酶切反应总体积为 15 μl,置 PCR 仪 65℃酶切 15 h 以上。由于在正常扩增的 PCR 产物内还存在另一 *Tsp* 509 I 限制性内切酶识别位点,因此,最终酶切产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 μg/ml 溴化乙锭),电压 250 V,电流 20 mA,1×TAE 电泳 30 min,分为 3 种基因型:野生型 Ser/Ser:113 bp、175 bp,杂合突变基因型 Ser/Leu:33 bp、113 bp、142 bp、175 bp,纯合突变基因型 Leu/Leu:33 bp、113 bp、142 bp,而 33 bp 的片段在电泳图中无法观察到。

4. 统计分析方法与指标:全部资料用 EPI-6 软件两人、双轨录入计算机,经逻辑检错、纠错后,应用 SAS 软件进行统计分析。除分析各因素单独作用的 OR 值,主要根据多因素 logistic 回归模型,计算调整混杂因素后,C→T 多态性与环境因素的交互作用系数 $\gamma = \beta_{eg}/\beta_e$ 和交互作用 OR_{eg} 值等指标,判断交互作用的方式。

结 果

1. 基因型检测的质量控制结果:对基因型分析进行了盲法质控措施,由质控人员在待测标本中随机间隔穿插已知基因型的 DNA 永生细胞系标本,共检测质控标本 22 份,除 3 份因酶切产物太少无法判断外,其他基因型检测的结果完全相符,重复检测符合率达 100%。病例和对照基因型分布经 Hardy-Weinberg 遗传平衡检测,P 值均 > 0.05,说明人群中该基因和基因型频率符合遗传平衡定律(表 1)。

2. C→T 多态性与肠型胃癌、胃贲门癌的关系:本研究共对 389 例扬中人群进行了 C→T 多态性的检测,结果发现:对照人群 T 等位基因频率为 13.21%。对照人群 Ser/Leu 基因型频率为 19.92%(49/246),肠型胃癌组为 21.51%,两者间差异无显著性(表 1)。由于肠型胃癌组 Leu/Leu 基因型例数为 0,我们又分析了调整各种混杂因素后,T 等位基因频率与肠型胃癌的关系,也未见病例与对照 C→T 多态性频率的差异有显著性。

表1 iNOS 基因 C→T 多态性与肠型胃癌的关系

研究对象	基因型频率(%)			等位基因频率(%)	
	Ser/Ser	Ser/Leu	Leu/Leu	C	T
肠型胃癌观察数 [#]	73(78.49)	20(21.51)	0(0.00)	166(89.25)	20(10.75)
肠型胃癌预期数	74.08(79.66)	17.85(19.19)	1.07(1.16)	166.01(89.26)	19.99(10.74)
对照组观察数 ^{##}	189(76.83)	49(19.92)	8(3.25)	427(86.79)	63(13.21)
对照组预期数	185.30(75.33)	56.41(22.93)	4.29(1.75)	427.01(86.79)	64.99(13.21)
OR 值(95% CI)	1.00	1.06(0.59~1.90)*	0.00	1.00	0.79(0.45~1.39)*

$\chi^2 = \sum \frac{观察数 - 预期数}{预期数} = 1.34, df = 2, P > 0.05$, 肠型胃癌组 3 种基因型频率符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律;

$\chi^2 = \sum \frac{观察数 - 预期数}{预期数} = 4.10, df = 2, P > 0.05$, 对照组 3 种基因型频率符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律;

* $\chi^2 = 0.03, P = 0.85$; ** $\chi^2 = 0.74, P = 0.39$

C→T 多态性与胃贲门癌的关系显示: Ser/Leu 基因型频率以胃贲门癌组高于对照组, 分别为 30.0% 和 23.17%, 但差异无显著性。

3. C→T 多态性与既往吸烟史对肠型胃癌的交互作用: 调整年龄、性别、细胞色素 P4501A1 (CYP1A1) 基因型、谷胱甘肽转硫酶 M1 (GSTM1) 基因型等因素后, 仅有既往吸烟史者患肠型胃癌的估计相对危险性 OR_e 为 5.40, C→T 多态性与既往吸烟史同时存在, 可产生明显的交互作用, $\gamma = 1.54$, 交互作用 OR_{eg} 值达 13.62, 为 2 型交互作用中的超相乘模型, 但由于对照有一格数据为 1, 因此, 未继续分析 C→T 多态性与吸烟量交互作用的剂量反应关系(表 2)。

表2 iNOS 基因 C→T 多态性与既往吸烟史对肠型胃癌发生的交互作用

C→T 多态性	既往吸烟史 (n=93)	病例 (n=246)	对照 (n=246)	OR 值*	95% CI
Ser/Ser	无	55	178	1.00	
Ser/Leu + Leu/Leu	无	15	56	0.78	0.40~1.57
Ser/Ser	有	18	11	5.40	2.17~13.43
Ser/Leu + Leu/Leu	有	5	1	13.62	1.45~128.36

* 调整年龄、性别、CYP1A1、GSTM1 基因型, $\chi^2_{趋势} = 18.62, df = 1, P = 0.00; \gamma = 2.61/1.69 = 1.54$

4. C→T 多态性与既往吸烟史对胃贲门癌的交互作用: 调整年龄、性别、CYP1A1、GSTM1 等因素后, 既往吸烟史者患贲门癌的估计相对危险性 OR_e 为 12.16, C→T 多态性与既往吸烟史同时存在, 可产生明显的交互作用, $\gamma = 1.34$, 交互作用 OR_{eg} 值高达 28.93, 为 2 型交互作用中的超相乘模型(表 3)。

5. C→T 多态性与 CagA 抗原、抗体对胃贲门癌的交互作用: 调整年龄、性别后, CagA 抗原阳性且 C→T 多态性存在时的交互作用 OR_{eg} 值为 4.20, 高于单独 CagA 抗原阳性的 OR 值 2.68, 但统计学检验尚未达到显著性水平(表 4)。

表3 iNOS 基因 C→T 多态性与既往吸烟史

对胃贲门癌发生的交互作用

C→T 多态性	既往吸烟史 (n=50)	病例 (n=246)	对照 (n=246)	OR 值*	95% CI
Ser/Ser	无	23	178	1.00	
Ser/Leu + Leu/Leu	无	11	56	1.45	0.64~3.27
Ser/Ser	有	12	11	12.16	4.10~36.02
Ser/Leu + Leu/Leu	有	4	1	28.93	2.88~290.35

* 调整年龄、性别、CYP1A1、GSTM1, $\chi^2_{趋势} = 30.76, df = 1, P = 0.00; \gamma = 3.36/2.50 = 1.34$

表4 iNOS 基因 C→T 多态性与 CagA 抗原对胃贲门癌发生的交互作用

C→T 多态性	CagA 抗原	病例 (n=50)	对照 (n=25)	OR 值*	95% CI
Ser/Ser	阴性	32	173	1.00	
Ser/Leu + Leu/Leu	阴性	14	53	1.34	0.65~2.75
Ser/Ser	阳性	3	7	2.68	0.60~12.04
Ser/Leu + Leu/Leu	阳性	1	2	4.20	0.33~52.83

* 调整年龄、性别, $\chi^2_{趋势} = 2.57, df = 1, P = 0.11; \gamma = 1.43/0.99 = 1.44$

在调整年龄、性别后, C→T 多态性与 CagA 抗体阴性对胃贲门癌的发生产生明显的交互作用, 为 2 型交互作用中的相加模型(表 5)。

表5 iNOS 基因 C→T 多态性与 CagA 抗体阴性对胃贲门癌发生的交互作用

C→T 多态性	CagA 抗体	病例 (n=50)	对照 (n=178)	OR 值*	95% CI
Ser/Ser	阳性	9	73	1.00	
Ser/Leu + Leu/Leu	阳性	4	22	1.20	0.33~4.39
Ser/Ser	阴性	26	64	3.13	1.33~7.35
Ser/Leu + Leu/Leu	阴性	11	19	4.73	1.65~13.60

* 调整年龄、性别, $\chi^2_{趋势} = 12.42, df = 1, P = 0.00; \gamma = 1.55/1.14 = 1.36$

未见 C→T 多态性与 CagA 抗原或 CagA 抗体对肠型胃癌有明显的交互作用。

讨 论

本研究显示, 单独 C→T 多态性与肠型胃癌的

联系无统计学显著性意义,但与吸烟之间存在明显的、超相乘效应的交互作用,在调整 CYP1A1 和 GSTM1 等因素后仍有显著性意义。虽然这不是本研究需要检验的主要假设,但仍可为我们从另一角度研究该多态性与胃癌的关系提供线索,即该基因的多态性可能与吸烟中致癌物代谢的分子作用机理有联系,或在这一区域附近存在与 iNOS 基因连锁不平衡的胃癌易感基因;分析 C→T 多态性与既往吸烟史对胃贲门癌产生的交互作用也有同样发现,而本研究胃贲门癌的病例数只是 50 例的小样本,在如此少的样本中就能发现与吸烟因素明显的交互作用,说明两者交互作用的强度较大,这种差异由于机会或偏倚造成的可能性极小。由于样本量较少,未进一步分析交互作用的剂量反应关系。我们认为,本研究是国内外首次在中国人中发现该基因的 C→T 多态性,并提出可能与吸烟因素结合,增加肠型胃癌发生的危险性,但这一结果尚有待其他研究证实。

C→T 多态性与 CagA 抗体对胃贲门癌发生有明显的相加交互作用,即在感染 Hp 但却未产生抗体的人群中,如果存在 C→T 多态性,将对胃贲门癌发生的危险性起明显的增强作用,为此,我们提出 Hp CagA 毒株感染并最终导致胃贲门癌发生的可能假说:即在宿主处于免疫缺陷状态或 Hp CagA 毒株能逃避某些宿主的免疫监视时,再加上宿主存在诸如 C→T 多态性等遗传背景,将明显增加患胃贲门癌的危险性。这一假说用目前对 Hp 感染后诱导 iNOS 过度表达,并产生基因毒作用的认识和生物学机制是可以解释的^[8-11],但要进一步阐明这一假说,需同时分析 CagA 抗原、CagA 抗体和宿主易感基因多态性三者之间联合的交互作用,而本研究目前的结果尚不足以说明此问题,主要障碍来源于对 CagA 抗原检测方法的灵敏度较低。我们正在利用已经建立的方法,检测胃液中的 CagA 抗原,以提高其灵敏度。

我们认为,虽然单独 iNOS 基因 C→T 多态性与胃癌的联系无统计学显著意义,但其与吸烟等环境因素之间存在明显的交互作用,对增加胃癌危险性有重要的病因学意义,因此,也是胃癌可能的易感基因之一,值得深入研究。

本研究作为探索胃癌、胃贲门癌易感基因多态

性,并进行分子流行病学评价的一次尝试,尚存在一些策略和技术上的问题和难点,如发现基因新的多态性,为评价其与疾病之间的相关性,仅能够根据其是否位于编码区或是否改变氨基酸序列,来决定多态性的意义和重要性,而检验多态性是否对酶的活性有直接影响,还是通过对其他受体、介质的作用而间接影响酶的活性,尚需进一步研究;在对新的多态性进行检测时,常因没有已知的杂合或纯合突变标本,而影响基因型分析的顺利进行,均是值得深入探讨的问题。

参 考 文 献

- 1 Pignatelli B, Bancel B, Esteve J, et al. Inducible nitric oxide synthase, anti-oxidant enzymes and *Helicobacter pylori* infection in gastritis and gastric precancerous lesions in humans. *Eur J Cancer Prev*, 1998, 7: 439-447.
- 2 Maeda H, Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Mosc)*, 1998, 63: 854-865.
- 3 Tanaka H, Kijima H, Tokunaga T, et al. Frequent expression of inducible nitric oxide synthase in esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Oncol*, 1999, 14: 1069-1073.
- 4 Kojima M, Morisaki T, Tsukahara Y, et al. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. *J Surg Oncol*, 1999, 70: 222-229.
- 5 沈靖,王润田,徐希平,等. 细胞色素 P4501A1 基因多态性在胃癌发生中的交互作用. *中华预防医学杂志*, 2001, 35: 167-170.
- 6 沈靖,王润田,徐希平. 代谢酶基因多态性与环境暴露交互作用的分析方法及其应用. *中华流行病学杂志*, 2001, 22: 61-64.
- 7 Shen J, Wang RT, Wand LW, et al. *Tsp* polymorphism of iNOS gene was found and identified in Chinese by denaturing high performance liquid chromatography. *J Peking University (Health Science)*, 2001, 33: 486-492.
- 8 Wolford JK, Blunt D, Ballecer C, et al. High-throughput SNP detection by using DNA pooling and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *Hum Genet*, 2000, 107: 483-487.
- 9 Tschugguel W, Pustelnik T, Lass H, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression may predict distant metastasis in human melanoma. *Br J Cancer*, 1999, 79: 1609-1612.
- 10 Arroyo PL, Hatch-Pigott V, Mower HF, et al. Mutagenicity of nitric oxide and its inhibition by antioxidants. *Mutat Res*, 1992, 281: 193-202.
- 11 沈靖,王润田,徐希平. *H. Pylori* 感染后氧化应激损伤与胃癌关系的研究进展. *中国肿瘤*, 2001, 10: 621-623.

(收稿日期 2002-02-01)

(本文编辑 段江娟)