

· 现场调查 ·

肺癌易感性与 p73 基因多态性关系的研究

胡志斌 缪小平 马红霞 谭文 钮菊英 林东昕 沈洪兵

【摘要】 目的 探讨中国人群 p73 基因 5' UTR 区域两个单核苷酸多态性(G4C14, A4T14)与肺癌的关系。方法 采用病例对照研究;选择经组织学确诊的肺癌病例 425 例,地区、年龄和性别频数匹配的对照 588 名,以聚合酶链反应-单链构象多态性方法进行多态性检测。结果 此两个多态性之间具备完全的连锁不平衡,AT(A4T14)单倍型在病例组显著少于对照组(0.225 vs. 0.287, $P=0.0018$),提示变异的 AT 单倍型对肺癌具有保护作用。与携带 p73 GC/GC 单倍型基因型者比较,携带 GC/AT 单倍型基因型者肺癌风险降低 30% ($OR=0.70, 95\% CI:0.53\sim0.92$),而携带 AT/AT 单倍型基因型者肺癌风险降低 55% ($OR=0.70, 95\% CI:0.26\sim0.80$)。结论 p73 基因多态改变可能与中国汉族人群肺癌遗传易感性有关。

【关键词】 肺肿瘤; p73 基因; 流行病学,分子

Association of two genetic polymorphisms in the 5' untranslated region of exon 2 of the p73 gene and risk of lung cancer HU Zhi-bin*, MIAO Xiao-ping, MA Hong-xia, TAN Wen, NIU Ju-ying, LIN Dong-xin, SHEN Hong-bing. *Department of Epidemiology & Biostatistics, Nanjing Medical University School of Public Health, Nanjing 210029, China

Corresponding author: SHEN Hong-bing, Email: Hbshen@njmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the relationship between two potential functional polymorphisms in exon 2 of the p73 gene and the susceptibility of lung cancer. **Methods** Genotypes were determined by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) method in 425 histologically-confirmed lung cancer cases and 588 cancer-free controls, frequency-matched by age and sex. **Results** The two polymorphisms were in complete linkage disequilibrium and the frequencies of variant p73 AT haplotype (A4T14) were less commonly seen in the cases (0.225) than in the controls (0.287) ($P=0.0018$). Compared with the p73 GC/GC homozygotes, both the AT/AT variant homozygotes and GC/AT heterozygotes were associated with a significantly decreased risk [adjusted odds ratio (OR) = 0.45, 95% confidence interval (CI) = 0.26-0.80 and $OR=0.70, 95\% CI=0.53-0.92$, respectively]. **Conclusion** These results suggested that this p73 dinucleotide polymorphism might have had a role to play in the susceptibility of lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms; p73 gene; Epidemiology, molecular

人类基因组处于不断的损伤和修复动态平衡之中,过量的损伤则借助细胞周期停顿和凋亡机制的启动来维持基因组的完整性^[1]。因此,个体间 DNA 修复能力、细胞周期和凋亡调控能力的差异极有可能决定着个体对肿瘤的遗传易感性。p73 是 p53 家族成员之一,位于人类染色体 1p36 位置^[2]。过量表达的 p73 蛋白可以模拟 p53 蛋白的功能,引起细胞

凋亡和周期停顿,并转录激活 p53 的一些下游基因^[3,4]。在 p53 突变的人类恶性肿瘤中,我们同样可以观察到 p73 基因的过量表达,提示 p73 基因可能部分补偿 p53 由于突变带来的功能丧失^[5]。研究发现在 p73 启动子上游 5' 端非转录区域(5' UTR)存在两个连锁的单核苷酸多态性(G4A 和 C14T),可以形成茎环结构而影响基因的表达^[2]。已有一些病例对照研究探讨了这两个多态性与多种肿瘤的关联,但结论缺乏一致性,并且先前的研究所包含的病例都较少(<200 例)^[6-12],本研究拟通过一个相对较大的样本含量来探讨中国人群中这两个多态性与肺癌易感性的关系。

基金项目:国家“973”重大基础研究基金资助项目(2002CB512902);国家自然科学基金资助项目(30371240)

作者单位:210029 南京医科大学流行病与卫生统计学系(胡志斌、马红霞、钮菊英、沈洪兵);中国医学科学院协和医科大学肿瘤医院研究所肿瘤医院病因及癌变研究室(缪小平、谭文、林东昕)

通讯作者:沈洪兵,Email: Hbshen@njmu.edu.cn

对象与方法

1. 研究对象: 病例组为原发性肺癌患者 425 例, 1997 年 1 月至 2003 年 12 月在中国医学科学院肿瘤医院和江苏省肿瘤医院进行手术治疗(北京市 320 例、江苏省 105 例)。所有患者为无亲缘关系的汉族人群, 经组织病理学确诊, 术前未经放射和抗癌药物治疗。其中鳞癌 185 例、腺癌 121 例、小细胞肺癌 41 例, 其他组织类型肺癌 78 例。无肿瘤病史和体征的人群作为对照组, 选自北京市和江苏地区健康普查的正常人群, 按地区、性别和年龄(± 5 岁)与病例频数匹配。在收集血液标本的同时, 由预先培训的调查员使用统一的调查表记录每名研究对象详细的人口学资料以及吸烟情况等。

2. p73 多态性的聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)分析: 我们使用 PCR-SSCP 方法同时分析 p73 基因 G4A 和 C14T 多态性。引物为 5'-AGGGTGCTCAGGTGTCATTCC-3' (对应于反义的 GenBank 序列 AL136528 碱基 86932-86912) 和 5'-GCTCCAGAGGTGCTCAAACG-3' (碱基 86825-86806), 扩增片段长 127 个碱基。Taq 酶套装为南京博飞科技有限公司产品 (Promega), 使用 MJ PTC-200 型 PCR 扩增仪, 反应条件: 95°C 5 min, 95°C 30 s, 56°C 40 s, 72°C 40 s, Goto 2, 34 times; 72°C 10 min。取 5 μ l 产物与 5 μ l 上样缓冲液(95% 甲酰胺, 0.03% 二甲苯青, 0.05% 溴酚蓝和 20 mmol/L EDTA)混匀, 98°C 变性 5 min, 迅速冰浴, 混合液 8 μ l 上样于 10% 聚丙烯酰胺凝胶, 使用 Bio-Rad 公司 Protean II Xi Cell 型垂直电泳槽循环水冷 35 W 恒功率电泳 3~4 h。将胶浸入固定液(10% 冰醋酸)中固定至二甲苯青和溴酚蓝颜色褪净, 银染液(0.1% 硝酸银, 0.15% 甲醛)中染色 30 min 后在显影液(3% 无水碳酸钠, 0.15% 甲醛, 0.0002% 硫代硫酸钠)中显影至条带清晰, 定影液(10% 冰醋酸)定影 5 min, 用 Bio-Rad 公司 Model 583 型干胶机干燥, 照相。整个实验过程采取盲法(实验员不清楚标本的病例与对照情况)进行质量控制, 并随机重复了约 10% 的样本, 获得了 100% 的一致结果。

3. p73 多态性的基因分型: 取不同电泳带型的原 PCR 产物用 QIAEX II 凝胶回收试剂盒(Qiagen, Chatsworth, CA)纯化后用 ABI 377 型(PE Biosystems, Foster City, CA)自动测序仪进行双向测序。对比电泳带型, 我们得到如下基因型: G4A

(GG、GA 和 AA)、C14T(CC、CT 和 TT)。并且发现这两个位点处于完全连锁不平衡, 仅具有两种单倍型 G4C14 和 A4T14, 分别构成 GC/GC, GC/AT 和 AT/AT 三种单倍型基因型。

4. 统计学分析: 以 χ^2 检验比较人口学特征、吸烟状况和 p73 基因各单倍型基因型在病例与对照组之间分布的差异。单因素和多因素 logistic 回归计算比值比(OR)及其 95% 可信区间(CI)表示相对风险度。所有的统计检验均为双侧概率检验。累计吸烟剂量“包/年”的定义为: 每日吸烟支数 \div 20 \times 吸烟年数。所用统计软件为 SAS 8.0 版。

结 果

病例组和对照组的性别构成与平均年龄差异无统计学意义。病例组吸烟人数比例显著高于对照组(58.1% vs. 37.6%, $P < 0.001$)。大约有 36.9% 的肺癌患者累积吸烟量超过 28 包/年, 显著高于对照组的 12.3% (表 1)。

表 1 病例组和对照组间一般性状和吸烟情况的差异

变 量	病例组 ($n = 425$)		对照组 ($n = 588$)		P 值*
	例数	构成比 (%)	人数	构成比 (%)	
年龄 (岁)					0.693
≤ 60	247	58.1	349	59.4	
> 60	178	41.9	239	40.6	
性别					0.376
男	291	68.5	387	65.8	
女	134	31.5	201	34.2	
吸烟状况					< 0.001
不吸	178	41.9	367	62.4	
吸	247	58.1	221	37.6	
累计吸烟剂量(包/年)					< 0.001
0	178	41.9	367	62.4	
1~28	90	21.2	149	25.3	
> 28	157	36.9	72	12.3	

* 双侧 χ^2 检验

在所有 588 名对照组中, p73 G4C14-A4T14 复合多态性基因型的频率分布与基于 Hardy-Weinberg 公式的计算结果差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.518$, $df = 1$, $P = 0.472$), 说明对照组具有人群代表性。p73 基因基因型的分布及其与肺癌风险的关系归纳于表 2。425 例肺癌患者中 60.0% 为 GC/GC, 35.1% 为 GC/AT, 仅 4.9% 为 AT/AT, 而对照组 GC/GC、GC/AT 和 AT/AT 3 种单倍型基因型频率分别为 50.2%、42.2% 和 7.7%, 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 10.36$, $P = 0.006$)。AT 单倍型在病例组显著少于对照组 ($P = 0.0018$), 提示变异的 AT 单倍

型对肺癌具有保护作用。多因素 logistic 回归分析调整吸烟、年龄和性别后,与携带 p73 GC/GC 单倍型基因型者比较,携带 GC/AT 单倍型基因型者肺癌风险降低 30% (95% CI: 0.53~0.92),携带 AT/AT 单倍型基因型者肺癌风险降低 55% (95% CI: 0.26~0.80),合并 GC/AT 和 AT/AT 基因型,则校正 OR 为 0.66(95% CI: 0.51~0.86)(表 2)。

分层分析的结果显示于表 3, p73 基因 AT 单倍型的保护作用在年轻者(≤60 岁)、男性和重度吸烟者(>28 包/年)中尤为明显,但与肺癌组织学类型无关。运用分层 logistic 回归模型,我们并没有发现 p73 基因变异和吸烟具有交互作用。然而,在调整了年龄和性别后,重度吸烟者携带 GC/GC 单倍型基因型与非吸烟者携带 GC/AT 或 AT/AT 单倍型基因型者相比较,患肺癌的风险增加高达 6.26 倍(95% CI: 3.78~10.36)。

讨 论

本研究首次发现 p73 基因 5' UTR G4C14-

A4T14 复合多态性与中国人群的肺癌易感性有关,并用 PCR-SSCP 证实这两个位点处于完全的连锁不平衡。

p73 蛋白与 p53 蛋白具有 63% 的序列同源性,并拥有几乎所有 p53 蛋白的功能结构域^[2],研究表明 p73 蛋白过量表达可以通过诱导凋亡来抑制细胞生长^[3],然而,最近的研究发现了多个 p73 蛋白氨基端缺失的同形异构体,发挥着截然不同的癌基因功能^[13,14]。因此,p73 蛋白极有可能通过剪切异构体现了“一个基因,两种功能”。由于 p73 G4C14-A4T14 复合多态处于 2 号外显子的 5' UTR(1 号外显子不编码蛋白),而 p73 氨基端同形异构体多缺乏第二或第三外显子^[13,14],这一变异很有可能通过影响 mRNA 剪切而发挥生物学功能。

有些病例对照研究在不同种族人群中分析了 p73 G4C14-A4T14 多态性与多种肿瘤的关系^[6-10]。其中最早的是一个基于爱尔兰人群的研究,分析了 84 例食管癌患者和 152 名正常对照,发现变异的 AT/AT 单倍型基因型对食管癌的发生同样具有保

表2 p73 单倍型和单倍型基因型分布与肺癌的患病风险

G4C14-A4T14	病例组 (n = 425)		对照组 (n = 588)		OR 值(95% CI)	OR 值(95% CI)*
	例数	构成比 (%)	人数	构成比 (%)		
GC/GC	255	60.0	295	50.2	1.0	1.0
GC/AT	149	35.1	248	42.2	0.70(0.53~0.90)	0.70(0.53~0.92)
AT/AT	21	4.9	45	7.7	0.54(0.31~0.93)	0.45(0.26~0.80)
GC/AT + AT/AT	170	40.0	293	49.8	0.67(0.52~0.86)	0.66(0.51~0.86)
AT 单倍型	0.225		0.287		P = 0.0018	

* 多因素 logistic 回归分析,以年龄、性别和累计吸烟量校正

表3 p73 单倍型基因型分布与肺癌危险性的分层分析

变 量	病例组 (n = 425)				对照组 (n = 588)				OR 值(95% CI)*	
	GC/GC		GC/AT + AT/AT		GC/GC		GC/AT + AT/AT		GC/GC	GC/AT + AT/AT
	例数	构成比 (%)	例数	构成比 (%)	人数	构成比 (%)	人数	构成比 (%)		
年龄(岁)										
≤60	147	59.5	100	40.5	166	47.6	183	52.4	1.00	0.60(0.42~0.85)
>60	108	60.7	70	39.3	129	54.0	110	46.0	1.00	0.75(0.50~1.14)
性别										
男	174	59.8	117	40.2	188	48.6	199	51.4	1.00	0.60(0.43~0.83)
女	81	60.5	53	39.5	107	53.2	94	46.8	1.00	0.83(0.53~1.31)
累计吸烟剂量(包/年)										
0	105	59.0	73	41.0	182	49.6	185	50.4	1.00	0.68(0.48~0.99)
1~28	56	62.2	34	37.8	83	55.7	66	44.3	1.00	0.75(0.45~1.28)
>28	94	59.9	63	40.1	30	41.7	42	58.3	1.00	0.47(0.27~0.84)
肿瘤类型										
鳞癌	110	59.5	75	40.5					1.00	0.69(0.48~0.97)
腺癌	71	58.7	50	41.3	295	50.2	293	49.8	1.00	0.71(0.47~1.07)
小细胞癌	25	61.0	16	39.0					1.00	0.64(0.30~1.28)
其他肿瘤#	49	61.6	29	38.4					1.00	0.60(0.39~1.00)

* 多因素 logistic 回归分析,以年龄、性别和累计吸烟量校正;# 其他肿瘤指大细胞癌、混合细胞癌和未分化癌等

护作用^[6]。在这一研究中,对照组 GC/GC、GC/AT 和 AT/AT 3 种单倍型基因型频率分别为 47.3%、42.8% 和 9.9%, 与本研究的对照人群较为一致^[6]。之后,一个日本的研究小组对该多态性和多种肿瘤(包括消化道肿瘤、肺癌、乳腺癌和宫颈癌)的关联进行一些较小样本的病例对照分析,但结论并不一致,尤其是这四个研究的各对照组间基因型频率并不均衡可比,提示选择偏倚可能存在^[7-10]。另外,值得一提的是,所有之前的关联分析是在假设这两个位点完全连锁不平衡的基础上,仅选择其中一个位点进行基因分型来代替双位点的结果。其中爱尔兰的研究选择了 PCR-限制性长度片段多态性(RFLP)方法来分析 p73 C14T 位点的改变,日本的研究小组则采用了他们提出的所谓 PCR-CTPP 方法(使用两对引物直接扩增不同的等位基因)来检测 p73 G4A 位点的变异^[15],而本研究采用了灵敏度和可靠性都比较强的 PCR-SSCP 方法,并进行了重复和直接测序,分析手段的不同也可能是导致结果不一致的原因。当然,由于本研究的病例和对照分别来自医院和人群,选择偏倚可能存在,但通过对年龄、性别、地区和种族等因素的匹配,以及进一步在数据分析中对于这些因素进行了调整,混杂因素的影响应该已经降到了最小。此外,由于病例和对照分别来自北京市和江苏省两地,也可能存在信息偏倚,但本研究病例均经过病理诊断,且分析中仅使用了吸烟这一较易定量的暴露因素,因此,即使两地的调查员不同,信息偏倚对本研究的影响也较小。

综上所述,本研究通过一个相对大样本的病例对照研究发现 p73 基因 5' UTR 两个完全连锁不平衡的多态改变可能与中国汉族人群肺癌遗传易感性有关,这一相关性在得到进一步的功能学研究证实后可望作为肺癌的易感性标志物之一。

参 考 文 献

- 1 Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 2000, 408: 433-439.
- 2 Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, 1997, 90: 809-819.

- 3 Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr. p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*, 1997, 389: 191-194.
- 4 Zhu J, Jiang J, Zhou W, et al. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res*, 1998, 58: 5061-5065.
- 5 Cai YC, Yang GY, Nie Y, et al. Molecular alterations of p73 in human esophageal squamous cell carcinomas: loss of heterozygosity occurs frequently; loss of imprinting and elevation of p73 expression may be related to defective p53. *Carcinogenesis*, 2000, 21: 683-689.
- 6 Ryan BM, McManus R, Daly JS, et al. A common p73 polymorphism is associated with a reduced incidence of oesophageal carcinoma. *Br J Cancer*, 2001, 85: 1499-1503.
- 7 Hamajima N, Matsuo K, Suzuki T, et al. No associations of p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 and p53 Arg72Pro polymorphisms with the risk of digestive tract cancers in Japanese. *Cancer Lett*, 2002, 181: 81-85.
- 8 Huang XE, Hamajima N, Katsuda N, et al. Association of p53 codon Arg72Pro and p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 genetic polymorphisms with the risk of Japanese breast cancer. *Breast Cancer*, 2003, 10: 307-311.
- 9 Hiraki A, Matsuo K, Hamajima N, et al. Different risk relations with smoking for non-small-cell lung cancer: comparison of TP53 and TP73 genotypes. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2003, 4: 107-112.
- 10 Niwa Y, Hamajima N, Atsuta Y, et al. Genetic polymorphisms of p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 and p53 Arg72Pro and the risk of cervical cancer in Japanese. *Cancer Lett*, 2004, 205: 55-60.
- 11 Mai M, Yokomizo A, Qian C, et al. Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res*, 1998, 58: 2347-2349.
- 12 Nomoto S, Haruki N, Kondo M, et al. Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers. *Cancer Res*, 1998, 58: 1380-1383.
- 13 Concin N, Becker K, Slade N, et al. Transdominant delta TAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res*, 2004, 64: 2449-2460.
- 14 Stiewe T, Tuve S, Peter M, et al. Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 626-633.
- 15 Hamajima N, Saito T, Matsuo K, et al. Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers for polymorphism genotyping. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91: 865-868.

(收稿日期: 2004-06-10)

(本文编辑: 尹廉)