

CYP1A1、GSTM1 基因多态性与食管癌遗传易感性的关系

邵根泽 苏艳蓉 黄革 温博贵

【摘要】 目的 探讨 CYP1A1、GSTM1 基因多态性与食管癌遗传易感性的可能关系。方法 采用 PCR 法对正常人和食管癌患者基因组 DNA 进行 CYP1A1、GSTM1 基因分型。结果 食管癌组 GSTM1 (-/-)型频率(64%)高于正常对照组(50%)($P < 0.05$)；食管癌 CYP1A1 基因 L/L、L/V、V/V 基因型频率与正常组相比差异无显著性,尽管食管癌 CYP1A1 基因 L/V、V/V 型频率(60%)稍高于正常对照组(50%)($P = 0.16$)。当研究对象按 CYP1A1(L/L)和 GSTM1 基因分类时,发现:①在 GSTM1(+)人群中,食管癌组 CYP1A1(L/V、V/V)基因型频率(64%)高于正常组(41%)($P < 0.05$)。②在 CYP1A1(L/L)型人群中,食管癌组 GSTM1(-/-)型频率(67%)显著高于正常对照组(40%)($P < 0.01$)。结论 GSTM1、CYP1A1 基因多态性与食管癌易感性相关,GSTM1(-/-)型个体食管癌易感性增高;GSTM1(+)/CYP1A1(L/V、V/V)型和 GSTM1(-/-)/CYP1A1(L/L)型个体比 GSTM1(+)/CYP1A1(L/L)基因型个体具有更高的食管癌的易感性。

【关键词】 食管肿瘤；细胞色素 P450 酶；谷胱甘肽硫转移酶；多态现象

Relationship between CYP1A1 ,GSTM1 genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma SHAO Genze , SU Yanrong , HUANG Ge , et al. Biochemistry Department , Shantou University Medical College , Guangdong 515031 , China

【Abstract】 Objective To investigate the association between susceptibility of esophageal squamous cell carcinoma and the genetic polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1. **Methods** Subjects were comprised of 107 esophageal cancer patients and 111 healthy controls. Genotyping of both CYP1A1 and GSTM1 were performed in cancer tissues of all 107 patients and peripheral blood leukocytes taken from the controls by polymerase chain reaction. **Results** There were no significant differences in the frequency distribution of CYP1A1 polymorphisms between esophageal cancer patients and healthy controls although the frequency of CYP1A1 with at least one allele of Val showed slightly higher in individuals with esophageal cancer. However , significant difference was observed in the frequency of GSTM1-nulled individuals with esophageal cancer comparing with the controls ($P < 0.05$). When subjects were categorized by both CYP1A1 genotype and GSTM1 genotype , GSTM1(-) became markedly expressed in patients with CYP1A1(L/L) than in the corresponding controls (67% versus 40% , $P < 0.01$). The frequency of CYP1A1 genotype with at least one allele of Val (L/V and V/V) was also statistically higher in patients with GSTM1(+), comparing to the corresponding controls(64% versus 41% , $P < 0.05$). **Conclusions**

It was suggested that : genetic polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 were susceptible to esophageal cancer ; individuals who are GSTM1-null have an increased risk of developing esophageal cancer ; individuals with combined CYP1A1(L/L) and GSTM1(-) or with combined CYP1A1(L/V , V/V) and GSTM1(+) were more susceptible , when comparing to those with combined CYP1A1(L/L) and GSTM1(+).

【Key words】 Esophageal neoplasm ; Cytochrome P450 ; Glutathione S-transferase ; Polymorphism

细胞色素 P450 酶(CYP450)和谷胱甘肽硫转移酶(GST)分别是细胞内重要的 I 相和 II 相代谢酶,在致癌物的活化和解毒过程中起重要作用。人类

GST 基因家族分为 α 、 μ 、 π 、 θ 四型^[1],GSTM1 基因是其中的一个亚型,定位于染色体 1p13,有 GSTM1a、GSTM1b、GSTM1(-)三个等位基因,其中 GSTM1(-)是空白等位基因。GSTM1 负责对苯并芘代谢的活性产物-环氧或羟化物的解毒,GSTM1(-/-)基因型个体缺乏 GST 酶活性,失去了解毒功能,增加个体患癌的危险性^[2]。CYP1A1 定位于染色体 15q²²-q¹⁴,编码芳烃羟化酶(AHH)^[3]。该基因第 7

基金项目 广东省卫生厅青年科学基金资助项目(B1997077)

作者单位 515031 汕头大学医学院生物化学与分子生物学教研室

外显子的点突变导致第 462 号密码子 Ile→Val 的改变,引起三种多态性:CYP1A1(I/I)、CYP1A1(I/V)、CYP1A1(V/V)。研究表明,其多态性与多种肿瘤易感性相关。在肺癌,CYP1A1(V/V)基因型个体肿瘤易感性增高^[4]。

食管癌是严重危害人类健康的疾病,流行病学调查表明,它不但与环境因素,而且与遗传背景相关。潮汕地区是南方沿海食管癌高发区,对该地区人群进行 CYP1A1、GSTM1 基因的分子流行病学调查研究,将有利于揭示食管癌发生的病因,提高对肿瘤易感者预测的水平。

材料与方法

一、标本

经临床病理检查确诊为食管鳞状细胞癌患者 107 例,其中男 74 例,女 33 例,年龄 30~70 岁,平均年龄(55±5.4)岁。标本取自汕头大学医学院附属肿瘤医院,为新鲜手术癌组织标本。正常对照血液标本 111 例取自汕头市职业病防治所,其中男 80 例,女 31 例,平均年龄(53±4.8)岁,为正常体检标本。所有标本均取自潮汕籍人群,部分患者有吸烟史。病例组和对照组在年龄、性别、民族构成上均均衡可比。

二、DNA 提取

取患者癌组织匀浆或提取正常人外周血白细胞,加入适量 DNA 抽提液和蛋白酶 K(80 μg/ml),55°C 消化 3 h。酚、酚/氯仿、氯仿各抽提一次,乙醇沉淀、70%乙醇洗涤晾干后,溶于适量 10 mmol/L Tris-Cl,1 mmol/L EDTA(pH 8.0)溶液中。

三、基因分型

1. GSTM1 基因分型^[5]:合成以下引物 P₁:5'-CGCCATCTTGTGCTACATGCCCCG-3', P₂:5'-ATCTTCTCTCTTCTGTCTC-3', P₃:5'-TTCTG GATTGTAGCAGATCA-3'。PCR 扩增:反应总体积 50 μl,其中 200 μmol/L dNTPs;10×PCR Buffer 5 μl;1.5 mmol/L MgCl₂;基因组 DNA 0.2 μg;引物 P₁ 600 ng, P₂ 300 ng, P₃ 300 ng;矿物油 30 μl。96°C 预变性 6 min,加入 Taq DNA 聚合酶 1.5 U 后,置于 GTC-2 热循环仪上反应 94°C 40 s,52°C 60 s,72°C 50 s,35 个循环,72°C 6 min。琼脂糖凝胶电泳检测。

2. CYP1A1 基因分型^[6]:引物 P₄:5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-3', P_{5a}:5'-AAGACCTCCAGCGGGCAAT-3', P_{5b}:5'-AAGACCTCCAG

CGGGCAAC-3'。96°C 预变性 6 min,加入 Taq DNA 聚合酶 1.5 U 后,置于 GTC-2 热循环仪上反应 95°C 50 s,70°C 60 s,30 个循环。琼脂糖凝胶电泳检测。

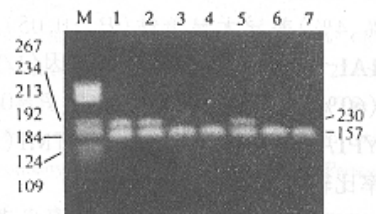
四、统计学分析

以 χ^2 检验分析 GSTM1、CYP1A1 基因多态性与食管癌遗传易感性的关系,以比值比(OR)及其 95% 可信区间(CI)表示相对危险度。用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律拟合, χ^2 检验分析对照组 CYP1A1 各基因型频率,评估其代表性。

结 果

一、基因分型

P₁、P₃ 是 GSTM1 基因型特异性引物,扩增 GSTM1 基因外显子 4 与外显子 5 间—230 bp DNA 片段,P₁、P₂ 扩增产物为—157 bp DNA 片段,作为实验内对照。凡 GSTM1 基因阳性[GSTM1(+/+)]和 GSTM1(+/-)标本均可同时扩增出 157 bp、230 bp 两 DNA 片段,而 GSTM1(-/-)基因型标本只扩增 157 bp DNA 片段,无 230 bp 特异 DNA 片段(图 1)。CYP1A1 有 Ile 纯合子(I/I)、杂合子(I/V)以及 Val 纯合子(V/V)三种基因型:只扩增引物 P₄、P_{5a} 的标本,其基因型为 I/I;只扩增引物 P₄、P_{5b} 的标本,其基因型为 V/V;二对引物均扩增者为 I/V 型(图 2)。



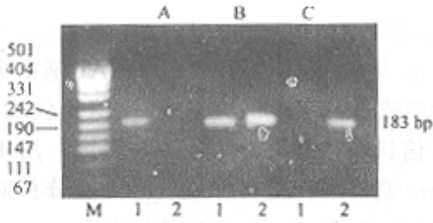
M: pBR322DNA/HaeIII 泳道 1、2、5 为 GSTM1(+)型个体;泳道 3、4、6、7 为 GSTM1(-/-)型个体

图1 GSTM1 基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳(2%)图谱

二、正常对照人群各基因频率及基因型频率

CYP1A1 Ile 基因频率为 0.725, Val 基因频率为 0.275。CYP1A1 I/I、I/V、V/V 基因型频率分别为 0.50、0.46、0.04,预期基因型频率为 0.526、0.399、0.076 经 χ^2 检验差异无显著性($\chi^2 = 2.584$, $P > 0.1$),符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律,因此该人群具有代表性。GSTM1(-/-)基因型频率为 0.495,GSTM1(+)基因型[GSTM1(+/+)]和 GSTM1

(+ / -) 频率为 0.505。



泳道 1 为引物 P₄、P_{5a} 扩增产物 泳道 2 为引物 P₄、P_{5b} 扩增产物

A : Ile/Ile 纯合子 ; B : Ile/Val 杂合子 ; C : Val/Val 纯合子 ; M : pUC19 DNA/MspI

图2 CYP1A1 基因分型

三、食管癌患者 GSTM1、CYP1A1 基因型频率

食管癌和正常人 GSTM1、CYP1A1 基因分型结果见表 1。在 107 例食管癌患者中, 39 例(36%) GSTM1 基因阳性, 68 例(64%) 为 GSTM1(- / -) 基因型; 而对照组 111 例正常人标本中检测到 56 例(50%) GSTM1 基因阳性, 55 例(50%) 为 GSTM1(- / -) 基因型。经统计学分析, 两组 GSTM1(- / -) 基因型频率差异存在显著性($P = 0.0384 < 0.05$, $OR = 1.76$, 95% CI : 1.027 ~ 2.737)。食管癌 CYP1A1 I/I、I/V 和 V/V 基因型频率分别为 40%、52% 和 8% ; 与正常对照组相比(50%、46%、4%) 差异无显著性($P > 0.05$)。但食管癌 CYP1A1 含至少一个 Val 等位基因(I/V + V/V) 的频率(60%) 比正常对照高(50%) ($P = 0.16$)。

四、CYP1A1(I/I) 基因型人群 GSTM1(- / -) 基因型频率比较

43 例 CYP1A1(I/I) 基因型食管癌患者中, 29 例(67%) 为 GSTM1(- / -) 基因型; 而 55 例 CYP1A1(I/I) 基因型正常人中只有 22 例(40%) 为 GSTM1(- / -) 基因型, 两组 GSTM1(- / -) 基因型频率差异存在显著性(表 2)。

五、GSTM1(+) 基因型人群 CYP1A1(I/V + V/V) 型频率比较

39 例 GSTM1(+) 型食管癌患者中, 64% 为 CYP1A1(I/V + V/V) 型; 56 例正常对照中 41% 为 CYP1A1(I/V + V/V) 型, 两组 CYP1A1(I/V + V/V) 型频率差异存在显著性(表 3)。

讨 论

研究表明, 约 90% 的肿瘤发生可能与环境致癌

因素有关, 人群对各种致癌因子的反应存在明显的差异。这种个体肿瘤易感性差异主要是由于肿瘤易感基因(包括代谢酶基因) 的遗传多态性所决定^[7]。

本文研究了 GSTM1、CYP1A1 基因多态性与食管癌易感性的关系。结果表明, GSTM1(- / -) 基因型在食管癌组频率显著升高($P < 0.05$, $OR = 1.76$) ; 当研究对象的基因型为 CYP1A1(I/I) 时, 这种差异更加显著($P < 0.01$, $OR = 3.11$)。以上提示 GSTM1(- / -) 基因型个体食管癌易患性增高。GSTM1 基因产物可能参与致癌物的解毒, GSTM1(- / -) 基因型个体缺乏 GSTM1 酶活性, 不能代谢这些致癌物, 从而导致肿瘤易感性增高。目前研究已经证实, GSTM1 基因多态性与肺癌、结肠癌、膀胱癌、皮肤癌等肿瘤的易感性相关, GSTM1(- / -) 基因型个体患癌的危险性明显增加, 尤其是那些重度吸烟患者^[5,7,8]。

本文对 CYP1A1 的研究表明, 食管癌组 CYP1A1 各基因型(I/I、I/V、V/V) 频率分布与对照组相比差异无显著性, 尽管 CYP1A1“ 异常 ” 基因型(I/V、V/V) 频率在食管癌组有升高的趋势(50% → 60%, $P = 0.16$) 这与 Nimura^[9] 对日本食管癌的研究结果较为一致。但当研究对象按 GSTM1 基因分类时, 发现在所有 GSTM1(+) 型个体中, 食管癌组 CYP1A1(I/V、V/V) 基因型频率显著高于正常对照组($P < 0.05$, $OR = 2.56$) 提示同为 GSTM1(+) 时, CYP1A1(I/V、V/V) 型个体患食管癌的风险比 CYP1A1(I/I) 型个体高, 表明 CYP1A1 基因的多态性与个体肿瘤易感性有一定关系。CYP1A1 是细胞内重要的 I 相代谢酶, 编码芳烃羟化酶(AHH) 催化底物的氧化, 可能引起一些原致癌物的活化。此基因第 7 外显子的点突变导致第 462 号密码子 Ile → Val 的改变, 引起酶活性的改变。目前研究已证实, CYP1A1(V/V) 基因产物比 CYP1A1(I/I) 型产物具有更高的催化和“ 致癌 ” 活性, 使原致癌物活化, 增加个体患癌风险^[6]。

表1 CYP1A1 和 GSTM1 基因分型结果

组 别	例数	GSTM1 阳性			合计	GSTM1 阴性			合计
		Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val		Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	
食管癌组	107	14(13)	21(19)	4(4)	39(36)	29(27)	35(33)	4(4)	68(64)*
对照组	111	35(29)	20(18)	3(3)	56(50)	22(20)	31(28)	2(2)	55(50)*

* $P < 0.05$, $OR = 1.76$, $95\% CI : 1.027 \sim 2.737$ 括号内数字为构成比

表2 CYP1A1(L/I) 基因型人群 GSTM1(- / -) 基因型频率比较

组 别	例数	GSTM1 阳性	GSTM1 阴性	P 值	OR 值	95% CI
食管癌组	43	14(33)	29(67)	0.007	3.11	1.35 ~ 7.16
对照组	55	35(60)	20(40)			

注 括号内数字为百分比

表3 GSTM1(+) 基因型人群 CYP1A1(L/V + V/V) 型频率比较

组 别	例数	CYP1A1 (L/I)	CYP1A1 (L/V + V/V)	P 值	OR 值	95% CI
食管癌组	39	14(36)	25(64)	0.027	2.56	1.10 ~ 5.96
对照组	56	33(59)	23(41)			

注 括号内数字为百分比

肿瘤的易感性取决于原致癌物能否被活化,活化的致癌物在多大程度上被灭活以及两者相互作用的净结果。CYP1A1 和 GSTM1 基因的多态性是影响肿瘤易感性的重要因素,因此同时检测鉴定其型别对预测、比较个体的肿瘤易感性具有重要意义。本文研究发现,CYP1A1(L/I)/GSTM1(- / -) 型个体以及 CYP1A1(L/V ,V/V)/GSTM1(+ / +) 型个体食管癌易患风险比 CYP1A1(L/I)/GSTM1(+ / +) 型个体分别高3.11和2.56倍,提示肿瘤易感性与 CYP1A1、GSTM1 的相关性。

与本文研究不同的是,对河南、日本食管癌的研究表明,食管癌易感性似乎与 GSTM1 基因多态性无关^[10,11]。这种不同甚至矛盾的研究结果不只见于食管癌,在其他肿瘤中也同样存在(如肺癌)^[7]。目前尚不清楚这种差异的原因所在,但反映出肿瘤易感性的复杂性。它除涉及解毒过程中其他代谢酶基因及其相互作用,还与环境致癌因素有关。潮汕地区是南方沿海食管癌高发区,从地理环境到居民的生活习惯都有别于河南林县等其他食管癌高发区,较高的 GSTM1(- / -) 型频率可能提示本地区存在 GSTM1(- / -) 型个体敏感的某种致癌因子,致癌因子暴露下的 GSTM1(- / -) 基因型个体肿瘤易感

性增高。吸烟被证实是多种肿瘤重要的危险因素之一,但与食管癌的相关性尚不清楚,有报道 GSTM1 基因缺陷与重度吸烟者食管癌易感性相关。但本文的研究并未证实吸烟、喜饮浓茶(功夫茶)等习惯与食管癌 GSTM1、CYP1A1 基因多态性及食管癌遗传易感性的关系。

参 考 文 献

- 1 Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, et al. Nomenclature for human glutathione transferase. *Biochem J*, 1992, 282:305-306.
- 2 Raunio H, Pursiainen KH, Anttila S, et al. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility-a review. *Gene*, 1995, 159:113-121.
- 3 Wolf CR, Smith CA, Forman D, et al. Metabolic polymorphisms in carcinogen metabolizing enzymes and cancer susceptibility. *Br Med Bull*, 1994, 50:718-731.
- 4 Nakachi K, Imai K, Hayashi S, et al. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res*, 1991, 51:5177-5180.
- 5 Zhong S, Wylie AH, Barnes D, et al. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis*, 1993, 14:1821-1824.
- 6 Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, et al. Genetic linkage of lung cancer-associated Msp I polymorphisms with amino acid replacement the heme binding region of human cytochrome P4501A1 gene. *J Biochem*, 1991, 116:407-411.
- 7 Smith G, Stanley LA, Sim E, et al. Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility. *Cancer Surv*, 1996, 25:27-65.
- 8 Ketterer B, Harris JM, Talaska G, et al. The glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect*, 1992, 98:87-94.
- 9 Nimura Y, Yokoyama S, Fujimori M, et al. Genotyping of the CYP1A1 and GSTM1 genes in esophageal carcinoma patients with special reference to smoking. *Cancer*, 1997, 80:852-857.
- 10 林东昕,唐永明,陆士新,等. 谷胱甘肽转硫酶 M1 和 T1 基因型与食管癌危险性. *中华流行病学杂志*, 1998, 19:195-198.
- 11 Morita S, Yano M, Shiozaki H, et al. CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 polymorphisms are not associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer*, 1997, 71:192-195.

(收稿日期 2000-05-29)