

I、II 相代谢酶基因多态性与肺癌易感性关系的研究

李伟英 赖百塘 湛秀萍

【摘要】 目的 探讨 I 相代谢酶 CYP1A1、2E1、2D6 和 II 相 GSTM1 基因多态性与肺癌遗传易感性的关系及吸烟与基因之间的交互作用。方法 采用病例对照研究和聚合酶链反应-限制性片段长度多态性等技术,检测 217 例肺癌患者和 200 例对照 CYP1A1、2E1、2D6 和 GSTM1 基因型频率分布以及与吸烟的关系。结果 肺癌组 GSTM1 缺陷型频率为 58.5%,与对照组(47.5%)比较差异有统计学意义($P=0.02$);CYP1A1、2E1、2D6 在肺癌组和对照组分布差异无统计学意义($P>0.05$)。吸烟与 GSTM1 有协同作用,与 CYP1A1、2E1、2D6 未见明显的协同作用。结论 吸烟和 GSTM1 缺陷型均是肺癌的危险因素,GSTM1 缺陷型有吸烟行为的人更易患肺癌,是肺癌的高危人群。

【关键词】 肺肿瘤; 代谢酶; 基因多态性; 易感性

The relationship between genetic polymorphism of metabolizing enzymes and the genetic susceptibility to lung cancer LI Wei-ying, LAI Bai-tang, ZHAN Xiu-ping. Beijing Thoracic Tumor and Tuberculosis Research Institute, Beijing 101149, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the gene polymorphism of metabolizing enzymes and the genetic susceptibility to lung cancer as well as to study the synergistic effects between smoking and the genes. **Methods** A case-control study (case=217, control=200) was carried out to compare the frequent distribution of CYP1A1, 2E1, 2D6 and GSTM1 genotypes between the lung cancer group and the control group with a polymerase chain reaction-restriction fragment polymorphism (PCR-RFLP) method and to analyze the relationship between these genes and smoking. **Results** GSTM1-null genotype frequency was 58.5% in the lung cancer group and 47.5% in the control group with significant difference ($P=0.02$). The frequent distribution of CYP1A1, 2E1, 2D6 genotypes was not significantly different in the two groups ($P>0.05$). Synergistic effects were found between smoking and GSTM1 but not between smoking and CYP1A1, 2E1, 2D6. **Conclusion** Smoking and GSTM1-null genotype seemed to be the risk factors of lung cancer. Those who carrying GSTM1-null genotype and smoking cigarettes were prone to suffer from lung cancer to become the high-risk population of the disease.

【Key words】 Lung neoplasms; Metabolizing enzymes; Genetic polymorphism; Susceptibility

肿瘤的发生是环境暴露与遗传因素复杂交互作用的结果。外源性致癌物多为前致癌物,其能否启动癌变的过程,与两类代谢酶“解毒”和“致毒”作用密切相关。I 相代谢酶将前致癌物活化成为终致癌物;活化的终致癌物也可经 II 相代谢酶的作用而失活。代谢酶多具有基因多态现象,某些基因多态性可引起酶活性的改变,从而导致个体肿瘤易感性的差异。研究发现 I 相代谢酶细胞色素 P450 (CYP) 1A1、2E1、2D6 和 II 相代谢酶谷胱甘肽硫转移酶 M1 (GSTM1) 可能与肺癌有关^[1]。本研究采用病例对照研究及聚合酶链反应-限制性片段长度多态性

(PCR-RFLP) 等技术,分析了 CYP1A1、2E1、2D6 和 GSTM1 基因多态性与肺癌易感性的关系,以及吸烟与基因之间的交互作用,旨在为确定肺癌易感性遗传标志提供依据。

材料与方 法

1. 研究对象的选择与标本的收集:病例组为肺癌患者 217 例,对照组 200 例均取自北京市胸部肿瘤结核病医院。肺癌组为病理学确诊的原发性肺癌,无其他部位肿瘤,未经放疗和化疗;对照组为与肺癌患者同期住院的非肿瘤患者,如肺结核、肺炎等,均与 I、II 相代谢酶基因多态性无关。收集研究对象的人口学资料、吸烟史、职业史等,两组的年龄、

性别、居住地等分布均衡。

2. DNA 的提取:收集两组患者非抗凝外周血,经研磨后用蛋白酶 K 消化,酚-氯仿抽提,乙醇沉淀,溶解后于 -20℃ 保存。

3. 基因分型:所有引物由赛百盛生物公司合成,引物序列见表 1。

表1 CYP1A1、2E1、2D6 和 GSTM1 基因多态性检测引物序列

基因	引物序列
GSTM1	P1:5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'
	P2:5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'
	β1:5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'
	β2:5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'
CYP1A1	P1:5'-TAGGAGTCTTGTCATGCCT-3'
	P2:5'-CAGTGAAGAGGTGTAGAAGCT-3'
CYP2E1	P1:5'-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3'
	P2:5'-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3'
CYP2D6	P1:5'-CCATTGGTAGTGAGGCAGGTAT-3'
	P2:5'-CACCATCCATGTTGCTTCTGGT-3'

(1)GSTM1 基因分型:β-球蛋白为内对照,25 μl 扩增体系:200 μmol/L dNTPs,10× buffer 2.5 μl、1.5 mmol/L Mg²⁺、模板 0.1 μg、引物各 0.4 μmol/L、Taq 酶 0.6 U。反应参数:94℃ 7 min,94℃ 1 min,59℃ 1 min,72℃ 1 min,30 个循环,72℃ 延伸 10 min,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

(2)CYP1A1 基因分型:60℃ 退火,其余条件同前。取 12.8 μl 扩增产物,加 4 U Msp I 内切酶,37℃ 3 h,1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

(3)CYP2E1 基因分型:扩增体系为 50 μl:10× buffer 5 μl、模板 0.2 μg、Taq 酶 1.5 U,58℃ 退火,其余条件同 GSTM1。取 17 μl 扩增产物,加 3 U Rsa I / Pst I 内切酶,37℃ 3 h,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

(4)CYP2D6 基因分型:扩增条件同 GSTM1,取 13 μl 扩增产物,加 3 U Hph I 内切酶,37℃ 16 h,4% 琼脂糖凝胶电泳检测。

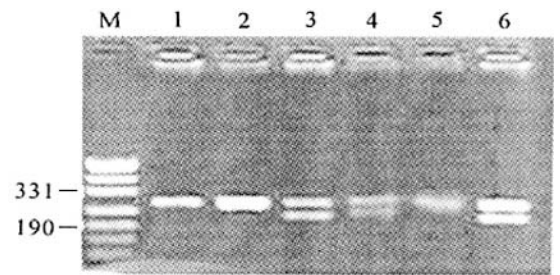
4. 统计学分析:采用 SPSS 10.0 统计学软件进行 χ² 检验及交互作用分析。

结 果

1. 4 种基因电泳结果:GSTM1、CYP1A1、CYP2E1、CYP2D6 基因分型结果分别见图 1~4。

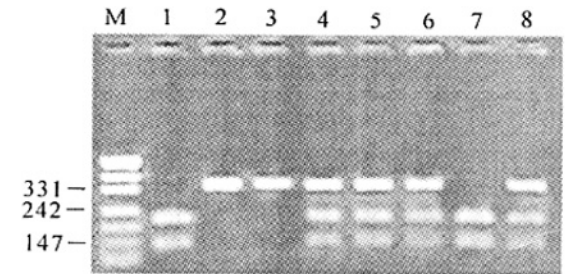
2. 基因和吸烟与肺癌的关系:表 2 显示有统计学意义的因素为 GSTM1 (P = 0.02) 和吸烟 (P = 0.00);CYP1A1、2E1、2D6 三种基因型在病例组和

对照组分布差异无统计学意义 (P > 0.05)。



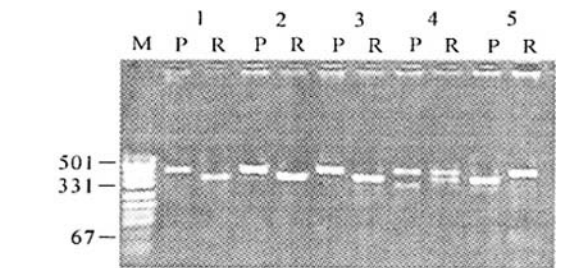
1、2、5:缺陷型 268 bp; 3、4、6:功能型 268、215 bp

图1 GSTM1 多态性检测图谱



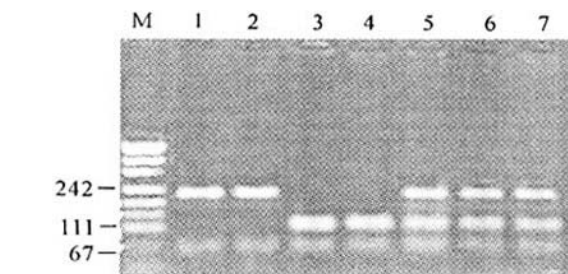
2、3:野生型(A),340 bp; 4~6、8:杂合型(B),340、200、140 bp; 1、7:突变纯合型(C),200、140 bp

图2 CYP1A1 多态性检测图谱



1~3:A型[Rsa I (+/+)/Pse I (-/-)],P 泳道 410 bp,R 泳道 360、50 bp; 4:B型[Rsa I (+/-)/Pst I (+/-)],P 泳道 410、290、120 bp,R 泳道 410、360、50 bp; 5:C型[Rsa I (-/+)/Pst I (+/+)] : P 泳道 290、120 bp, R 泳道 410 bp

图3 CYP2E1 多态性检测图谱



1、2:野生型,213、59 bp; 3、4:突变纯合型,112、101、59 bp; 5~7:杂合型,213、112、101、59 bp

图4 CYP2D6 多态性检测图谱

3. 吸烟和基因之间的交互作用:首先对病例组与对照组的性别和年龄进行分层分析,两组分布均衡。将吸烟和 4 种基因引入 logistic 回归模型,发现

吸烟和 4 种基因之间存在联合作用,基因和基因之间未见联合作用。

表2 4 种基因多态性和吸烟与肺癌的关系

分析因素	肺癌组		对照组		χ^2 值	P 值
	例数	构成比(%)	例数	构成比(%)		
GSTM1						
+	90	41.5	105	52.5	5.08	0.02*
-	127	58.5	95	47.5		
CYP1A1						
A	93	42.9	85	42.5	1.29	0.53
B	88	40.6	89	44.5		
C	36	16.5	26	13.0		
CYP2E1						
A	116	53.5	114	57.0	4.78	0.09
B	76	35.0	75	37.5		
C	25	11.5	11	5.5		
CYP2D6						
W	63	29.0	48	24.0	3.11	0.21
w/m	64	29.5	52	26.0		
m	90	41.5	100	50.0		
是否吸烟						
吸	121	55.8	65	32.5	22.79	0.00*
不吸	96	44.2	135	67.5		

* P<0.05

(1)吸烟与 GSTM1 的联合作用:由表 3 可知 GSTM1 功能型(+)且吸烟者患肺癌的危险性是 1.94,GSTM1 缺陷型(-)且吸烟者患肺癌的危险性则提高到 4.57,进一步计算协同作用指数 $S = 3 > 1$,提示吸烟和 GSTM1 缺陷型具有协同作用。

表3 吸烟与 GSTM1 的联合作用

GSTM1	吸烟	病例组	对照组	OR 值(95% CI)
+	不吸	41	65	-
+	吸	49	40	1.94(1.10~3.43)*
-	不吸	55	70	1.25(0.73~2.14)
-	吸	72	25	4.57(2.55~8.20)*

* P<0.05

(2)吸烟与 CYP1A1、CYP2E1、CYP2D6 的联合作用:吸烟与 3 个基因同时作用与单独作用比较均有增加,但与单独作用之和比较,未见明显增加,提示吸烟和 CYP1A1 B/C 型、CYP2D6 野生型/杂合型及 CYP2D6 野生型/杂合型之间没有明显的协同作用(此结果未列出)。

4. 肺癌病理类型的转变:在本次研究中肺癌组腺癌占 37.33% (81/217),鳞癌占 29.49% (64/217);在男性肺癌患者中,腺癌占 26.35% (39/148),鳞癌占 39.19% (58/148);而女性肺癌患者中腺癌占 60.87% (42/69),鳞癌占 8.70% (6/69)。此外,我们对四种基因和肺癌病理分型之间作相关性的分析,

发现 CYP2D6 与鳞癌有关,其余基因和各病理分型间均无关系。

讨 论

肿瘤流行病学研究证实吸烟是导致肺癌的最主要原因。在本次研究中,肺癌组的吸烟者明显多于对照组($P = 0.00$),其中吸烟量 ≥ 20 包·年者在肺癌病例中占 46.54% (101/217),对照中占 20.50% (41/200),吸烟量 ≥ 20 包·年者患肺癌的风险是不吸烟者的 3.46 倍($OR = 3.46$)。欧洲一项研究发现,在肺癌病例中吸烟量 ≥ 20 包·年者占 73.8%,对照中占 30%,吸烟量 ≥ 20 包·年者患肺癌的风险是不吸烟者的 11.95 倍^[2],这可能与欧洲国家和我国人们的行为差异有关,欧洲女性吸烟的比例高于我国,文献报道女性肺癌患者中有 44% 的吸烟量 ≥ 20 包·年^[2],在本研究中只有 10.14% (7/69)。

GSTM1 是 II 相代谢酶,多态性分为缺陷型和功能型。一些研究提示 GSTM1 缺陷型可增加肺癌的危险性,是肺腺癌的敏感性标记。但有关 GSTM1 多态性与肺癌易感性的研究亦有一些阴性结果报告^[3-5]。本研究发现 GSTM1 缺陷型与肺癌有关,GSTM1 缺陷型个体患肺癌的相对危险性是 1.56,与大多数研究结果一致。

CYP1A1 编码芳烃羟化酶,在 3' 端 PolyA 下游碱基 264^{T→C} 突变形成为 Msp I 酶切点。日本研究发现 Msp I 等位基因型 C 型的个体酶活性显著增高,C 型患肺癌的危险性是 A 型和 B 型的 2~5 倍^[6]。但胡毅玲、张桥^[7] 研究发现 Msp I C 型患肺癌的风险降低了 63%。本研究显示 C 型在病例组有升高的趋势,但 A、B、C 三种基因型频率分布在两组中差异无统计学意义。

CYP2E1 存在 Rsa I 和 Pst I 多态位点。野生型有 Rsa I 酶切位点,突变型 Rsa I 酶切位点消失并产生一个新的 Pst I 酶切位点。在对美籍墨西哥人和瑞典人研究中发现 C2 等位基因型对吸烟致肺癌来讲是一个保护性因素^[6]。但 Hirvonen 等研究芬兰人中未发现显著性结果^[8]。本研究也未显示 CYP2E1 与肺癌有关。

CYP2D6 编码异喹啉羟化酶,参与 NNK 及尼古丁的代谢,激活烟草中亚硝胺等前致癌物。CYP2D6ch 型多态可分为三种基因型:野生型、杂合型、突变型,认为突变型可降低肿瘤易感性。本研究检测了两组的 CYP2D6ch 基因型,发现野生型和杂

合型可使患肺癌的风险性升高 1.41 倍,但三型在病例组和对照组分布差异无统计学意义。

近年来肺癌的病理类型正在发生转变,腺癌的发 病呈逐年上升趋势,并逐渐取代鳞癌成为肺癌中最常见的病理类型,本研究肺癌组中腺癌占 37.33%、鳞癌占 29.49%,其中男性肺癌病例中腺癌占 26.35%,女性肺癌病例腺癌则高达 60.87%,性别差异导致两者患肺癌病理类型差别之大原因可能如下:被动吸烟也是肺癌的诱因之一,纸烟烟尘的主流与侧流含有相同的致癌成分,其中一些致癌物(苯、亚硝胺等)在侧流中的浓度比主流的浓度还要高。由于烟尘侧流能被吸入肺的深部,同时大气污染、厨房油烟以及代谢过程中性别差异和激素对肿瘤的影响等可能是引起女性患者中腺癌更为多见的原因。

各因素间交互作用分析显示,吸烟且 GSTM1 缺陷型者患肺癌的危险性增加到 4.57 倍,两者协同作用指数 $S > 1$,提示吸烟和 GSTM1 缺陷型具有协同作用,携带 GSTM1 缺陷型且有吸烟行为者会大大地提高患肺癌的风险。吸烟和 CYP1A1、2E1、2D6 3 个基因中任一个同时存在时,均未显示有明显的协同作用。此外,吸烟和 GSTM1 与 CYP1A1、2E1、2D6 3 个基因之间作交互作用分析,发现吸烟和 GSTM1 缺陷型同时具备时,无论 CYP1A1、2E1、2D6 是否是易感基因型,患肺癌的风险与只具备吸烟且 GSTM1 缺陷型者比较均未见明显的增加,这

是否与此分析后例数的减少有关,需要进一步证实,但至少提示我们吸烟和 GSTM1 缺陷型同时具备者是肺癌的高危人群。

参 考 文 献

- 1 Raaumio H, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, et al. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility—a review. *Gene*, 1995, 159: 113.
- 2 Simonato L, Agudo A, Ahrens W, et al. Lung cancer and cigarette smoking in Europe: An update of risk estimates and an assessment of inter-country heterogeneity. *Int J Cancer*, 2001, 91: 876-887.
- 3 McWilliams JE. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1995, 4: 589.
- 4 高扬,张桥. GSTM1 和 CYP2D6 基因多态性与肺癌敏感性的关系. *中国公共卫生*, 1999, 15: 488-490.
- 5 Nazar-Stewart V. The glutathione S-transferase M1 (GSTM1) as a marker for susceptibility to lung carcinoma. *Cancer Res*, 1993, 53: 2313.
- 6 Persson I, Johansson I, Bergling H, et al. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population: relationship to P53 gene mutation. *Anticancer Research*, 1997, 17: 583.
- 7 胡毅玲,张桥. 细胞色素 P4501A1 基因多态性与肺癌遗传易感性的研究. *中华遗传学杂志*, 1999, 16: 26-28.
- 8 Vematsu F, KiKuchi H, Motomiya M, et al. Association fragment length polymorphism of the human cytochrome P4502E1 gene and susceptibility to lung cancer. *Jpn J Cancer Res*, 1991, 82: 254.

(收稿日期:2003-10-28)

(本文编辑:尹廉)

· 征文通知 ·

全国人用疫苗研究及临床应用专题学术会议征文通知

由中华医学会中华预防医学杂志编辑委员会主办的全国人用疫苗研究及临床应用专题学术会议拟于 2005 年第二季度召开(具体时间、地点另行通知)。所投稿件均编入会议论文集。会后中华预防医学杂志编辑部将组织出版一期以疫苗为重点号的杂志。

征文内容:(1)各种人用疫苗的免疫效果观察;(2)疫苗临床应用过程中副反应的防治;(3)各种疫苗制备中存在的问题及改进措施;(4)各种新型疫苗的基础研究及开发;(5)各种基因工程疫苗的研制与应用;(6)与疫苗相关的免疫学、分子生物学等研究;(7)各种疫苗研制和使用过程中出现的问题及处理原则。

征文要求:(1)请寄 800~1000 字中文摘要及全文各一份;(2)请寄软盘(用 WORD 格式)或发电子邮件到 cjpm@cma.org.cn,注明“疫苗会议”;(3)务必注明作者姓名、单位、地址、邮政编码及有效电话;(4)投稿同时请寄 20 元稿件审理费,信封和审理费请注明“疫苗会议”字样;(5)截稿时期:2005 年 3 月 15 日。不退稿,请自留底稿。(6)稿件请寄:北京东四西大街 42 号(100710)中华预防医学杂志编辑部周佩珍收。

参加会议者可获得国家级继续教育学分。

中华医学会

中华预防医学杂志编辑委员会