

细胞色素 P450 1A1 基因多态性与肺癌易患性的研究^{*}

章龙珍, 王 绪, 史艳侠

(徐州医学院肿瘤研究所, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 探讨致癌物代谢酶细胞色素 P450 1A1(CYP1A1)基因多态性与肺癌易患性的关系。方法 利用限制性片段长度多态性—聚合酶链反应方法检测 40 例原发性肺癌和 30 例非肿瘤病人 CYP1A1 基因,再用 NcoI 及 HinfI 两种内切酶区分 CYP1A1 基因的亚型,并分析各基因亚型与肺癌之间的相关性。结果 CYP1A1 野生型(Ile/Ile) 肺癌组的频率为 42.5%(17/40),对照组为 60%(18/30);CYP1A1 突变杂合型(Ile/Val) 肺癌组的频率为 32.5%(13/40),对照组为 33.3%(10/30); CYP1A1 突变纯合型肺癌组为 25%(10/40),对照组为 6.7%(2/30); Ile/Ile 型与 Ile/Val 型相比两组无显著性差异($P > 0.05$),Ile/Ile 型与 Val/Val 型相比两组有显著性差异($P < 0.05$)。以携带 Ile/Ile 型的个体发生肺癌的风险度比值比(OR)为 1.00,Ile/Val 型的个体发生肺癌的风险度 OR 为 1.38,95%CI(可信区间)为 0.49~4.0,Val/Val 型的个体发生肺癌的风险度 OR 为 5.29,95%CI 为 1.12~24.9。结论 CYP1A1(Val/Val)是肺癌的易患性因素,携带此基因的个体能增加肺癌的易患性。

关键词:细胞色素 P450(CYP1A1);基因多态性;肺癌易患性

中图分类号:R734.202 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-2065(2001)01-0008-03

Susceptibility to lung cancer is associated with genetic polymorphism of cytochrome P450 (CYP1A1)

ZHANG Longzhen, WANG Xu, SHI Yanxia

(Cancer Research Institute of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: **Objective** To investigate the genetic polymorphism of cytochrome P450 (CYP1A1) as a susceptibility factor of lung cancer. **Methods** The study was conducted on 70 surgical and biopsied specimens, including 40 cases of lung cancer and 30 cases of benign lesions. The genetic polymorphisms were identified by examining the products obtained first from restriction fragment length polymorphism—polymerase chain reaction (RFLP—PCR), and then after incubating with restriction enzymes NcoI and HinfI. **Results** The frequencies of CYP1A1 wild-type (Ile/Ile, ww), heterozygous mutant (Ile/Val, wm) and homozygous mutant (Val/Val, mm) were found to be 42.5%(17/40), 32.5%(13/40) and 25%(10/40) respectively in lung cancer group, and 60%(18/30), 33.3%(10/30) and 6.7%(2/30) respectively in benign lesion group. Analysis of the genetic polymorphism showed the frequency of CYP1A1 mm genotype was significantly higher in lung cancer group than in benign lesion group [$P < 0.05$, OR 5.29, 95%CI(1.12—24.9)]. **Conclusion** The CYP 1A1(Val/Val) genotype is a susceptibility factor for the development of lung cancer.

Key words: P450(CYP1A1);genetic polymorphism;lung cancer susceptibility

肺癌的发病是一个多因素、多阶段与多基因变异积累的复杂病理演变过程,可概括为始动、促进和进展三个阶段^[1]。人们通过 10 余年的努力,已经认识到肺癌发病的始动阶段是外部环境中的致癌因素(辐射、化学致癌剂等)引起人体细胞基因突变的过程。在始动阶段,基因的变化是关键性步骤。它干扰了细胞遗传信息的传递,引起遗传特性的改变而使细胞发生转化。香烟及环境中的化学致癌物质多为无活性的间接致癌物,它们需经 I 相酶如细胞色

素 P450 酶代谢,将无活性前致癌物激活转变为有活性的亲电子化合物,最终引起癌基因激活和抑癌基因失活,从而导致癌变^[2]。近年来的研究表明,这些基因都存在遗传多态性^[3]。它们的产物往往具有不同的生物学活性,从而表现为机体对同一化学致癌物的敏感性不同。本实验采用病例—对照研究,利用限制性片段长度多态性—聚合酶链反应(reaction—restriction fragment length polymorphism—PCR, RFLP—PCR)技术检测原发性肺癌病人手术切除及纤维

^{*} 基金项目:江苏省卫生厅资助课题(H9808)。

支气管镜活检标本癌组织细胞色素 P4501A1 (CYP1A1)基因多态性,并分析其与肺癌易患性的关系,旨在为肺癌的病因研究提供理论依据。

1 资料和方法

1.1 病例及临床资料 1999 年 9 月至 2000 年 5 月,收集徐州医学院附属医院胸外科及呼吸内科手术切除标本 30 例、纤维支气管镜活检标本 40 例,均经病理确诊。其中肺癌 40 例(鳞状细胞癌 17 例、腺癌 20 例、小细胞癌 3 例),良性病变 30 例(机化性肺炎 5 例、肺结核 11 例、肺脓肿 4 例、肺部慢性浸润性炎症 10 例)。

1.2 标本采集 取新鲜手术切除及纤维支气管镜标本,于 30 min 内置-80℃冰箱冻存待用。

1.3 DNA 制备 基因组 DNA 提取试剂盒、工具酶及内切酶 Nco1 和 Hinf1 均购自 Promega 公司,按说明书操作提取组织中的 DNA,用紫外分光光度计测定 DNA 的纯度,加入 0.1×TE, -20℃保存。

1.4 PCR 扩增 引物由 Gibco 公司设计,基因型为 CYP1A1MspI 型,引物序列为: 5'-GAAAGGCTGGGTCCACCCTCT-3', 5'-CCAGGAAGAGAAAGACCTCCCAGCGGCCA-3'。复性温度 60℃,扩增片段长度 340 bp。

PCR 反应总体积为 50 μl。缓冲液 5 μl(Tris 100 mmol/L, pH=8.3, KCl 500 mmol/L, MgCl₂ 20 nmol/L),三磷酸腺苷(dNTP) 2 μl(100 nmol/L),样品 DNA 5 μl, CYP1A1 引物各 5 μl, Tag 酶 2 μl, 加去离子水至总体积为 50 μl。最后加入 25 μl 的矿物油。CYP1A1 PCR 扩增的条件为: 94℃预变性 4 min, 进入热循环 94℃ 30 s、63℃ 30 s、72℃ 60 s, 共 35 个循环, 72℃延伸 4 min。

1.5 基因的测定 操作方法参考 Ambrosone 等^[4]的方法:PCR 扩增产物,经 2%的琼脂糖电泳,可清晰地见到 340 bp 的条带(见图 1)。然后取 PCR 产物 17 μl、缓冲液 B 2 μl、Nco1 0.5 μl、Hinf1 0.5 μl, 37℃恒温消化 7~8 h。酶切产物经 4%琼脂糖电泳, CYP1A1 等位基因野生型纯合子被切成 2 个片段: 232 bp、32 bp; 突变型杂合子被切成 4 个片段: 263 bp、232 bp、69 bp、32 bp; 突变型纯合子被切成 2 个片段: 263 bp、69 bp。根据片段的多少及长度来判断 CYP1A1 基因的亚型(见图 2)。

1.6 数据统计分析 用 χ^2 检验比较病例组与对照组各基因之间的差异,以比值比 OR(odds ratio)及 95% CI(可信区间)表示相对风险度。

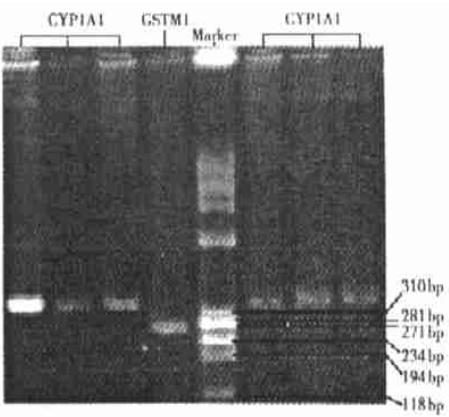


图 1 CYP1A1 基因产物经 2%琼脂糖电泳后的 DNA 条带
图中可清晰地看到 6 条长度为 340 bp 的 CYP1A1 基因产物, 270 bp 为 GSTM1(谷胱甘肽-S 转移酶)的基因产物

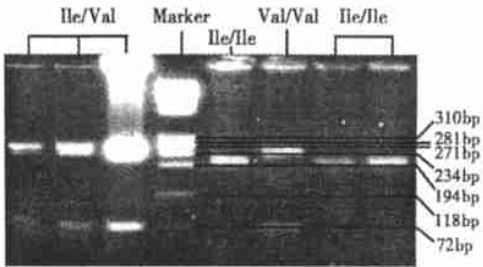


图 2 CYP1A1 基因产物经 Nco1、Hinf1 两种酶内切后
各基因亚型的 DNA 条带
经 4%琼脂糖电泳后可见,第 1、2、3 泳道基因产物被切成 3 个片段,分别为 264 bp、232 bp、69 bp;第 4 泳道为 Marker (phi×174/HaeIII), 各片段见图标记;第 5、7、8 泳道被切成 1 个片段为 232 bp;第 6 泳道被切成 2 个片段,分别为 264 bp、69 bp。因琼脂糖的分辨率有限,未显示 32 bp

2 结果

CYP1A1 野生型肺癌组的频率为 42.5% (17/40), 对照组为 60.0% (18/30); CYP1A1 突变杂合型肺癌组的频率为 32.5% (13/40), 对照组为 33.3% (10/30), 两组相比无显著性差异 ($P > 0.05$); CYP1A1 突变纯合型为 25.0% (10/40), 对照组为 6.7% (2/30), 与野生型相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。以携带 Ile/Ile 的个体发生肺癌的风险度 OR 为 1.00; 则携带 Ile/Val 的个体发生肺癌的风险度 OR 为 1.38, 95% CI 为 0.49~4.0; 携带 Val/Val 的个体发生肺癌的风险度 OR 为 5.29, 95% CI 为 1.12~24.9; Ile/Val 与 Val/Val 的个体发生肺癌的风险度 OR 为 2.03, 95% CI 为 0.35~5.27, 但 χ^2 为 2.10, $P > 0.05$ 。见表 1。

表 1 CYP1A1 基因多态性分布

基因型	病例组 〔例(%)〕	对照组 〔例(%)〕	合计(例)	OR	95%CI
Ile/Ile	17(42.5)	18(60.0)	35	1.00	—
Ile/Val	13(32.5)	10(33.3)	23	1.38	0.49~4.0
Val/Val	10(25.0)	2(6.7)	12	5.29	1.12~24.9
Ile/Val+Val/Val	23(57.5)	12(40.0)	35	2.03	0.35~5.27

Ile/Val 与 Ile/Ile 比较: $\chi^2=0.36$, $P>0.05$;Val/Val 与 Ile/Ile 比较: $\chi^2=4.42$, $P<0.05$;
Ile/Val+Val/Val 与 Ile/Ile 比较: $\chi^2=2.10$, $P>0.05$

3 讨 论

CYP1A1 酶是代谢内外源性化合物的重要酶系,主要代谢多环芳香类致癌物。烟草及环境中的多环芳烃类化学致癌物多为无活性的间接致癌物,进入人体后,首先需经该酶系氧化成亲电子化合物,从而与细胞内的生物大分子结合,启动致癌过程。CYP1A1 基因位于人类第 15 对染色体,有 7 个外显子。目前研究发现,CYP1A1 有 2 个多态位点,一是在其 DNA 结构的 3'端 PolyA 的下游碱基 264 处 T→C 突变形成 MspI 酶切位点^[5];另一个是第 7 外显子 4 889 处碱基 A→G 的置换,导致蛋白产物第 462 位氨基酸(异亮氨酸 Ile→缬氨酸 Val)的不同,从而形成野生型(Ile/Ile)、突变杂合型(Ile/Val)、突变纯合型(Val/Val)3 种不同等位基因遗传型^[6]。日本学者研究发现 CYP1A1 Val/Val 基因型个体酶的活性显著增高,Val/Val 型个体患肺癌的危险性是 Ile/Ile 型和 Ile/Val 型的 2~5 倍,提示 Val/Val 型可能是肺癌易感性的遗传标志^[7],国内也有相关的报道。本实验直接取材于活体组织标本,直接反映瘤体组织 CYP1A1 基因亚型的多态性。实验结果显示:①肺癌患者突变纯合型的频率为 25%,OR 为 5.29,95% CI (1.12~24.9),明显高于肺部良性病变患者 6.7%,($P<0.05$);②肺癌组突变纯合型与突变杂合型总的频率为 57.5%,OR 为 2.03,95% CI (0.35~5.27),但统计学无显著性差异($P>0.05$)。以上结果说明携带 Val/Val 亚型 CYP1A1 基因的个体,对致癌物较敏感,与肺癌的发生有一定的相关性;Ile/Val

亚型 CYP1A1 基因与肺癌发生的相关性不明显,可能与病例数少有关,有待进一步研究。对基因型多态性的分析有助于寻找肺癌高易感的遗传标志,对肺癌的早期预防和病因诊断有重要意义。

参考文献:

[1] Faber E. The multistep nature of cancer development [J]. Cancer Res, 1984, 44(10):4217—4223.

[2] Guengerich FP, Shimada T. Oxidation of toxic carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzymes [J]. Chem Res Toxicol, 1991, 4(4):391—407.

[3] Nebert DW, Nelson DR, Adesnik M, et al. The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci [J]. DNA, 1989, 8(1):1—13.

[4] Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, et al. Cytochrome P450 1A1 and glutathione S—transferase (M1) genetic polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk [J]. Cancer Res, 1995, 55(8):3483—3485.

[5] Schoket B, Phillips DH, Kostic S, et al. Smoking—associated bulky DNA adducts in bronchial tissue related to CYP1A1 MspI and GSTM1 genotypes in lung patients [J]. Carcinogenesis (England), 1998, 19(5):841—846.

[6] Hirvonen A, Husgafvel—Pursiainen K, Karjalainen A, et al. Pointmutationa lMspI and ile—val polymorphisms closely linked in the CYP 1A1 gene:luck of association with susceptibility to lung cancer in a fin—ish study population [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1992, 1(6):485—489.

[7] Nakchi K, Hayashi S, Kawajiri K, et al. Association of cigarette smoking and CYP1A1 polymorphisms with adenocarcinoma of the lung by grades of differentiation [J]. Carcinogenesis, 1995, 16(9):2209—2213.

收稿日期:2000—09—26 修回日期:2001—01—04
本文编辑:孙立杰

声 明

本刊已入编《中国学术期刊(光盘版)》,同时加入“中国期刊网”,作者稿酬已一次付清。如不同意文章上网,请来函声明,本刊将做适当处理。