

CYP2D6 基因 G4268C 单核苷酸多态性与肺癌遗传易感性

燕 贞, 吴拥军, 吴逸明*

(郑州大学公共卫生学院劳动卫生学教研室, 郑州 450001)

[摘要] **目的:** 研究 CYP2D6(cytochromes P450 2D6)基因 G4268C 单核苷酸多态性与肺癌遗传易感性的关系。**方法:** 应用病例-对照研究及聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)方法检测肺癌患者和按性别、年龄频数匹配的正常对照各 118 例的 CYP2D6 基因 G4268C 多态性,并应用 Logistic 回归分析各基因型与肺癌发病危险的关系。**结果:** 肺癌组和对照组人群发生 G4268→C 的频率可高达 69.49%和 75.00%;非 C4268/C(即 G4268/G+G4268/C)基因型与肺癌风险升高相关,经年龄、性别、吸烟情况调整 OR=1.80(95%CI=1.06~3.06),尤其在腺癌中 OR=2.95(95%CI=1.39~6.23);对吸烟情况进行分层分析并经年龄、性别调整后发现,不吸烟者及轻度吸烟者中携带非 C4268/C 基因型的个体患肺癌的风险显著增高,其 OR 值分别为 2.12(95%CI=1.03~4.36)和 3.75(95%CI=1.15~12.22)。**结论:** CYP2D6 C4268/C 基因型可能是肺腺癌的遗传保护因素,并可降低不吸烟者、轻度吸烟者患肺癌的危险度。

[关键词] 细胞色素 P450CYP2D6;多态性,单核苷酸;肺肿瘤;疾病遗传易感性

[中图分类号] R 734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)02-0139-04

CYP2D6 gene G4268C single nucleotide polymorphism and genetic susceptibility to lung cancer

YAN Zhen, WU Yong-jun, WU Yi-ming* (Department of Occupational Medicine, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate the relation between the single nucleotide polymorphism of CYP2D6 gene G4268C and the genetic susceptibility to lung cancer. **Methods:** A case-control study was conducted among 118 lung cancer patients and 118 control subjects (matched for sex, age) to investigate the role of CYP2D6 gene G4268C polymorphism in lung cancer; PCR-RFLP was used to identify the genotypes of polymorphism. Logistic regression was used to analyze the relationship between polymorphism and genetic susceptibility to lung cancer. **Results:** The frequency of G4268→C mutation in case and control group were 69.49% and 75.00%, respectively. Non-C4268/C genotype (including G4268/G and G4268/C genotype) was correlated to the high risk of lung cancer, with OR adjusted by gender, age and smoking being 1.80 (95% CI=1.06-3.06), especially to lung adenocarcinoma (OR being 2.95 [95% CI=1.39-6.23]). After stratified analysis of smoking history and adjusting by gender and age, it was revealed that non-C4268/C genotype was associated with significantly increased risk of lung cancer in non-smokers and light-smokers group, with OR = 2.12 (95% CI=1.03-4.36) and OR = 3.75 (95% CI=1.15-12.22), respectively. **Conclusion:** C4268/C genotype may be a protective factor in lung adenocarcinoma patients and may decrease the risk of lung cancer in non-smokers and light-smokers.

[KEY WORDS] cytochrome P-450 CYP2D6; polymorphism, single nucleotide; lung neoplasms; genetic susceptibility

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(2): 139-142]

近年来,肺癌的遗传易感性机制在肺癌发病中的意义引起人们的重视。肺癌的基因易感性主要包括代谢酶基因多态性、抑癌基因多态性、DNA 修复酶基因多态性,以及某些基因的突变缺失^[1]。细胞色素 P450 2D6 (cytochromes P450 2D6, CYP2D6)为肝脏中重要的 I 相代谢酶,烟草中特异性亚硝胺类如 4-甲基亚硝胺-1,3-吡啶基-1-丁酮(NNK)及烟碱等前致癌物在体内经 CYP2D6 代谢活化成为终致癌物,形成 DNA 加合物,造成细胞损伤,可能涉及吸烟引起的肺癌变过程。CYP2D6 表型和基因型有显著的种族差异^[2],亚洲人常见的单核苷酸多态之一是外显子 9 G4268→C 突变^[3],造成 Ser486→

Thr 氨基酸取代,导致表达的酶活性降低^[4],可能降低个体肺癌易感性,但国内外未见到 G4268C 单核苷酸多态性与肺癌易感性关系的报道。本研究采用病例-对照方法,探讨 G4268→C 单核苷酸多态性分布情况及对肺癌风险的影响,旨在为确定肺癌易感性遗传标记提供依据。

[基金项目] 国家自然科学基金(30571552);郑州市科技发展计划(052SGY33212)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30571552) and Zhengzhou Science and Technology Development Program(052SGY33212)。

[作者简介] 燕贞,博士生。

* Corresponding author. E-mail: wuyem@zzu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 研究对象 肺癌患者和正常对照各 118 例,标本取自 2004 年 12 月至 2005 年 7 月郑州大学第一附属医院的经组织病理学确诊的原发性肺癌患者和体检的正常个体,均为河南汉族人,并排除患神经系统疾病的患者及风湿患者。同时用问卷调查方法收集病例及对照的基本资料,包括性别、年龄、民族、籍贯和吸烟状况等。采外周血 3 ml 于 EDTA 抗凝管中,使用全血基因组 DNA 小量制备试剂盒(杭州维特洁生化技术有限公司产品)提取基因组 DNA,冻存储备用。

1.2 CYP2D6 基因型分析 PCR 扩增含 G4268C 多态位点 DNA 片段,引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计,上游引物 5'-CAT GGA GCT CTT CCT CTT CT-3',下游引物 5'-CAA GGG TAA CTG ACA TCT GC-3',由北京奥科生物技术有限责任公司合成。25 μ l PCR 反应体系含有:上下游引物各 0.3 μ mol/L, dNTP 0.2 μ mol/L (TaKaRa), TaqDNA 聚合酶 1.0 U (TaKaRa), 10 \times 反应缓冲液(含 MgCl₂, TaKaRa) 2.5 μ l, 模板 5 μ l; 在 Biometra Tgradient PCR 扩增仪上进行 PCR, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 于 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s 进行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 产物长度为 360 bp。取 5 μ l PCR 产物加入限制性核酸内切酶 *Bst*E II (MBI) 5 U, 酶切缓冲液 2.0 μ l, 并加双蒸水补充总体积至 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 3 h。取 10 μ l 酶切产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后分析。

1.3 统计学处理 用 SPSS 13.0 软件, 对数据进行 Hardy-Weinberg 平衡检验、 χ^2 检验、*t* 检验或非条件 Logistic 回归分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 研究对象基本资料 本研究共调查肺癌患者 118 例(肺癌组), 年龄 33~79 岁, 平均年龄(57.40 \pm 11.39)岁, 男/女为 80/38; 健康体检者 118 例(对照组), 年龄 38~86 岁, 平均年龄(56.64 \pm 9.66)岁, 男/女为 72/46。本研究中吸烟者定义为每天吸烟超过 1 支持续半年以上(WHO), 累计吸烟量(支·年)=每天吸烟支数 \times 吸烟年数。吸烟轻重度分界以对照组吸烟人群累计吸烟量中位数 400 支·年为标准, 累计吸烟量 \geq 400 支·年为重度吸烟, 累计吸烟量<400 支·年为轻度吸烟。肺癌组吸烟者 64 例, 轻度吸烟 12 例, 重度吸烟 52 例; 对照组吸烟者 43 例, 轻度吸烟 21 例, 重度吸烟 22 例。

两组人群性别构成和平均年龄差异无显著性($P>0.05$), 但肺癌组吸烟人数比例及重度吸烟人数比例均高于对照组($P<0.05$)。吸烟者与不吸烟者比较, 患肺癌的危险性增高[OR=2.07(95%CI=1.23~3.48)]。

2.2 G4268C PCR 产物经 *Bst*E II 限制酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果 PCR 产物经 *Bst*E II 消化后, 产生 3 种不同的电泳条带。野生型 G4268/G 不含酶切识别位点, 电泳产物只有 360 bp 一个片段, 突变型 C4268/C 因碱基 G 被碱基 C 替换产生一个 *Bst*E II 酶切位点, 酶切产物有 103、257 bp 2 个片段, 杂合型 G4268/C 则有 360、103 和 257 bp 3 个片段(图 1)。

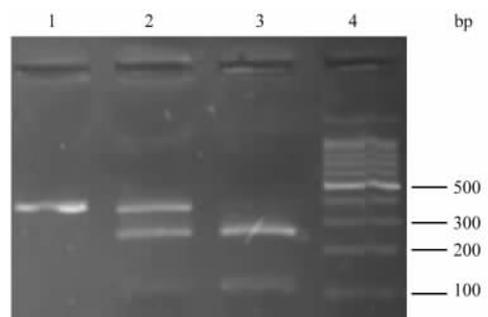


图 1 G4268C 位点扩增产物的酶切分析

Fig 1 Results of restriction digestion of amplified products containing G4268C

1: G4268/G genotype; 2: G4268/C genotype; 3: C4268/C genotype; M: 100 bp DNA ladder

2.3 G4268C 基因型与肺癌发病风险 对照组等位基因频率处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($\chi^2=2.23, P>0.50$), 该人群具有代表性。G4268/G、G4268/C 及 C4268/C 3 种基因型在肺癌组和对照组的分布频率分别为 0.85%、59.32%、39.83% 和 3.39%、43.22%、53.39%; 两组人群 G4268C 等位基因频率分别为 69.49% 和 75.00%, 差异无统计学意义。因突变型 C4268/C 编码低代谢活性的不稳定酶, 代谢能力低于野生型 G4268/G 和杂合型 G4268/C 表达的酶, 故将 G4268/G 和 G4268/C 基因型合并为非 C4268/C 基因型, 与 C4268/C 基因型进行比较, 并对病理类型分层分析, 结果显示非 C4268/C 基因型的个体发生肺癌的风险是 C4268/C 基因型个体的 1.80 倍(95%CI=1.06~3.06), 尤其在腺癌中 OR=2.95(95%CI=1.39~6.23)。见表 1。

2.4 吸烟和 CYP2D6 G4268C 多态性对肺癌危险度的联合作用 以携带 C4268/C 基因型而又不吸烟者为参照, C4268/C 基因型吸烟者调整 OR=2.76(95%CI=1.17~6.47), 非 C4268/C 基因型不吸烟

者调整 $OR = 2.12$ ($95\%CI = 1.03 \sim 4.36$), 非 C4268/C 基因型与吸烟的联合作用调整 $OR = 4.10$ ($95\%CI = 1.77 \sim 9.49$), 高于两者单独作用程度。

经交互作用分析, 两者之间不具有相乘交互作用 ($\chi^2 = 0.43, P = 0.512$)。见表 2。

表 1 肺癌患病风险与 G4268C 基因型的关系

Tab 1 Risk of lung cancer related to G4268C genotypes

Group	C4268/C	G4268/G+G4268/C	OR(95%CI) ^a	P
Control	63	55	1.00	
Lung cancer	47	71	1.80(1.06-3.06)	0.029
Squamous carcinoma	26	24	1.26(0.59-2.65)	0.543
Adenocarcinoma	13	33	2.95(1.39-6.23)	0.005
Others ^b	8	14	1.98(0.77-5.09)	0.156

^a: Adjusted by gender, age and smoking history; ^b: Adenosquamous carcinoma, small cell lung cancer, etc.

表 2 G4268C 基因型与吸烟联合作用与肺癌患病风险

Tab 2 Combined effect of G4268C genotypes and smoking on risk of lung cancer

Group	Control	Lung cancer	OR(95%CI) ^a	P
Nonsmoker				
C4268/C mutant	40	19	1.00	
Non-C4268/C mutant	35	35	2.12(1.03- 4.36)	0.041
Smoker				
C4268/C mutant	23	28	2.75(1.17- 6.47)	0.020
Non-C4268/C mutant	20	36	4.10(1.77- 9.49)	0.000
Light-smoker				
C4268/C mutant	15	2	0.31(0.06- 1.54)	0.150
Non-C4268/C mutant	6	10	3.75(1.15-12.22)	0.028
Heavy-smoker				
C4268/C mutant	8	26	7.37(2.63-20.60)	0.000
Non-C4268/C mutant	14	26	4.25(1.68-10.71)	0.002

^a: Adjusted by gender and age

在轻度吸烟人群中 C4268/C 基因型调整 OR 值为 0.31 ($95\%CI = 0.06 \sim 1.54$), 非 C4268/C 基因型调整 OR 值为 3.75 ($95\%CI = 1.15 \sim 12.22$), 与肺癌具有强关联; 重度吸烟者均与肺癌发生有强度的关联, 重度吸烟人群中携带 C4268/C 基因型者肺癌危险度的调整 OR 值为 7.37 ($95\%CI = 2.63 \sim 20.60$), 携带非 C4268/C 基因型者调整 OR 为 4.25 ($95\%CI = 1.68 \sim 10.71$), 未发现 C4268/C 基因型的保护作用。

3 讨论

CYP2D6 多态性与肺癌易感性关系的研究结果常常相互矛盾。有研究^[5]显示 CYP2D6 多态性与肺癌危险性相关, 随着 CYP2D6 活性增加, 烟草对肺癌危险度的作用也增加, 而且这种作用随烟草消耗的增加而增加, 从而证实了 CYP2D6 活性可修饰烟草对肺癌危险度的作用, 但也有研究否认这种相关性的存在^[6-7]。

肺癌组中吸烟人数比例及重度吸烟人数比例均高于对照组, 累计吸烟量越大, 患肺癌的危险性越高, 这与肺癌的发生与烟草致癌物暴露剂量呈正相关的结论一致, 说明吸烟是肺癌发生的一个高危因素。

本研究结果提示 CYP2D6 非 C4268/C 基因型与肺癌具有中等程度的关联, 非 C4268/C 基因型使腺癌风险升高约 1.95 倍。实验结果反映了不同组织学类型肺癌病因学差异, 大量动物实验表明烟草特异亚硝胺(如 NNK)主要诱发肺腺癌发生^[8-9], 这与本研究中病理类型与基因型关联研究中, 风险主要发生在腺癌组是一致的。CYP2D6 C4268/C 型在不吸烟者及轻度吸烟者中可作为保护因素而降低肺癌的易感性, 而在重度吸烟者组中未发现其保护作用。肺癌是由环境暴露和个体遗传因素相互作用所导致的多因素多阶段的慢性疾病, 在肺癌发生过程中, 吸烟这一暴露因子作为肺癌的高危因素所产生的主效应有可能掩盖个体 G4268C 突变基因对肺癌

易感性所产生的影响。非 C4268/C 基因型与吸烟的联合作用高于两者单独作用程度,但在肺癌的发生过程中两者不具有协同性,吸烟与非突变体之间的具体联合作用模式及机制需要进一步深入研究。

总而言之,本研究发现河南汉族人 CYP2D6 基因 G4268C 单核苷酸多态性可能与肺癌易感性相关,C4268/C 基因型可能是肺癌的遗传保护因素。开展致肺癌物代谢酶基因多态性与肺癌遗传易感性关系的研究,寻找肺癌遗传易感性标记,对肺癌的病因学研究、早期预防、诊断以及治疗具有极其重要的意义。

[参考文献]

[1] 李代蓉,周清华. 肺癌遗传易感性的研究进展[J]. 中国肺癌杂志,2003,6:158-162.

[2] Roberts R L,Kennedy M A. Rapid detection of common cytochrome P450 2D6 alleles in Caucasians[J]. Clin Chim Acta, 2006,366:348-351.

[3] Bradford L D. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants[J]. Pharmacogenomics,2002,3:229-243.

[4] Kawanishi C, Furuno T, Onishi H, et al. Lack of association in Japanese patients between neuroleptic malignant syndrome and a debrisoquine 4-hydroxylase genotype with low enzyme activity[J]. Psychiatr Genet,2000,10:145-147.

[5] Benhamou S, Bouchardy C, Paoletti C, et al. Effects of CYP2D6 activity and tobacco on larynx cancer risk[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,1996,5: 683-686.

[6] Rostami-Hodjegan A, Lennard M S, Woods H F, et al. Meta-analysis of studies of the CYP2D6 polymorphism in relation to lung cancer and Parkinson's disease[J]. Pharmacogenetics, 1998,8:227-238.

[7] Laforest L, Wikman H, Benhamou S, et al. CYP2D6 gene polymorphism in caucasian smokers: lung cancer susceptibility and phenotype-genotype relationships[J]. Eur J Cancer,2000, 36:1825-1832.

[8] Hecht S S. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines[J]. Chem Res Toxicol,1998 ,11: 559-603.

[9] Schuller H M, Porter B, Riechert A. Beta-adrenergic modulation of NNK-induced lung carcinogenesis in hamsters[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2000,126:624-630.

[收稿日期] 2006-10-10

[修回日期] 2006-11-22

[本文编辑] 孙岩

· 读者 作者 编者 ·

《第二军医大学学报》在线投稿系统说明

为了加快稿件的处理速度,提高办刊效率,《第二军医大学学报》从 2007 年 1 月开始正式启用在线投稿和在线审稿系统。为了系统的正常运行和规范投稿行为,现就作者投稿作如下说明。

1. 作者请先登陆我刊网站(<http://journals.smmu.edu.cn/>),初次投稿者,请先进行权限注册,注册成功后,用该帐号登陆。点击“在线投稿”菜单,开始在线投稿的步骤。
2. 仔细阅读投稿声明,然后根据页面提示填写并上传稿件。
3. 上传的文稿必须是 WORD 文档或 RAR 文件,文件大小不超过 10 M。如文中有图片,请将图片插入文中上传。
4. 在上传文稿的过程中,如遇网络不畅、无法上传的情况,请将稿件通过电子邮件发送到编辑部,由编辑部代为上传。在 E-mail 中,请写明已注册的用户名和密码(上传成功后,作者可自行修改密码)。
5. 稿件成功上传后,系统将自动弹出稿件回执。请保存此回执,以备查询。
6. 在确定编辑部未将稿件送专家审阅前,如对已上传的文稿有修改,修改后的文稿务必通过电子邮件发送到编辑部,并说明情况。切不可通过“在线投稿系统”上传,以免造成管理上的混乱。
7. 作者投稿后,用已注册帐号登陆系统后方可查询稿件,按“稿件编号”或“作者姓名”方式查询稿件的审稿及编辑加工情况。
8. 稿件上传成功后请将单位介绍信及审稿费(个案报告 50 元,其他栏目 100 元)直接邮寄至本刊编辑部。

如有疑问请直接与本刊编辑部联系。

地址:上海市翔殷路 800 号,第二军医大学学报编辑部,邮编 200433

电话:021-25074341 转 826,或 021-25074344

E-mail:bxue@smmu.edu.cn,bxue304@yahoo.com.cn

《第二军医大学学报》编辑部