

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00971

细胞色素 P4501A1 基因多态与肾癌遗传易感性的关系

王国萍,许敏,张鹏,顾春英,曹广文*

第二军医大学卫生勤务学系流行病学教研室,上海 200433

[摘要] 目的:探讨细胞色素 P4501A1(CYP1A1)酶的基因多态与肾癌易感性的关系。方法:采用病例对照设计,以 175 名肾癌患者为病例组,200 名未患任何肿瘤的健康人为对照组。应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术,检测 CYP1A1 基因 A4889G(M2)、C4887A(M4)的多态性。结果:病例组 M2、M4 各基因型分布与对照组相比无统计学差异。携带 M2/M2 基因型者与肾癌的发生呈正相关($OR=2.225, 95\%CI:1.134\sim4.365, P=0.020$)。结论:CYP1A1 基因 M2/M2 基因型可能是肾癌的遗传危险因素。

[关键词] 细胞色素 P4501A1;单核苷酸多态性;肾肿瘤;疾病遗传易感性

[中图分类号] R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)08-0971-04

Relationship between CYP1A1 gene single nucleotide polymorphism and genetic susceptibility of renal cancer

WANG Guo-ping, XU Min, ZHANG Peng, GU Chun-ying, CAO Guang-wen*

Department of Epidemiology, Faculty of Health Services, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate the relationship between the polymorphism of CYP1A1 gene and the genetic susceptibility to renal cancer. **Methods:** A case-control study was conducted in 175 renal cancer patients and 200 healthy control subjects to investigate the role of CYP1A1 gene A4889G(M2) and C4887A(M4) polymorphisms in renal cancer. PCR-RFLP was used to identify the genotypes of polymorphism. **Results:** The frequencies of A4889G and C4887A genotypes were not significantly different between RCC cases and healthy controls. M2/M2 genotype was positively correlated with the incidence of renal cancer ($OR=2.225 [95\%CI=1.134-4.365, P=0.020]$). **Conclusion:** M2/M2 genotype of CYP1A1 gene may be a risk factor for renal cancer.

[KEY WORDS] cytochrome P450 1A1; single nucleotide polymorphism; kidney neoplasms; genetic predisposition to disease
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(8):971-974]

肾癌在世界范围内发病呈普遍上升的趋势,有报道显示,目前肾癌占成人全部恶性肿瘤的 2%~3%,致死率亦已占据肿瘤的第七位^[1]。细胞色素 P450 酶系是外来化学物生物活化过程中的关键酶系,CYP1A1 是目前研究较多的一个,该酶催化外来化合物进入体内,将无活性的前致癌物激活转变为亲电子化合物,此化合物可攻击细胞内的生物大分子,与 DNA 或蛋白质形成加合物,最终导致癌基因和抑癌基因的改变,从而引起癌变。目前已确定的 CYP1A1 基因多态有多种。其中, M2 在第 7 外显子 4889 碱基的差异(A 转变为 G),在酶蛋白水平表现为第 462 密码子从 Ile 变为 Val; M4 在第 7 外显

子 4887 碱基 C 转变为 A,第 461 密码子从 Thr 变为 Asn。研究表明,CYP1A1 基因多态与癌症的易感性相关^[2]。

本研究采用病例-对照方法,利用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术,探讨 M2、M4 单核苷酸多态性分布情况以及对肾癌风险的影响,旨在为确定肾癌易感性遗传标记,同时为寻找肾癌早期诊断的分子标记物提供依据。

1 对象和方法

1.1 研究对象 175 例肾癌病例来自长海医院和长征医院的住院病例,临床诊断依据欧洲泌尿学协

[收稿日期] 2008-01-18 **[接受日期]** 2008-03-07

[基金项目] 国家自然科学基金(30571609)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30571609)。

[作者简介] 王国萍,硕士生,助教, E-mail:gpw121@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel:021-25070420, E-mail:gwcao@smmu.edu.cn

会(EAU)肾癌诊断综合指南,并经病理学最终确诊。征得患者同意后,在其施行肾癌根治术时收集患者远离肾肿瘤组织部位3 cm以上的癌旁正常组织1 cm³,采集后立即液氮冻存。同时采用封闭式调查表问卷调查,收集实验对象的人口学资料、吸烟史、饮酒史、疾病史等资料。200例健康对照来自长海医院体检中心未患任何肿瘤的健康体检者。病例和对照在性别、年龄、民族等人口学特征方面无显著性差异。知情同意后采集研究对象血液3 ml,并进行问卷调查,获取研究对象的一般信息。采用NaCl高盐沉淀法提取对照血液样本中的DNA^[3],病例组织样本的DNA提取则用改良裂解法^[4]。

1.2 CYP1A1基因型分析 PCR扩增含M2、M4多态位点DNA片段,引物采用Primer Premier 5.0软件设计,上游引物5'-CTG TCT CCC TCT GGT TAC AGG AAG C-3',下游引物5'-TTC CAC CCG TTG CAG CAG GAT AGC C-3',由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR反应体系总体积为50 μ l,其中含引物10 μ mol/L各1 μ l,2.5 mmol/L dNTP(上海生工)4 μ l,模板DNA 0.1~0.5 μ g, *Taq* Plus DNA聚合酶(天根生化科技有限公司)2 U,10 \times Buffer(含MgCl₂,天根生化)5 μ l;在Mastercycler ep PCR仪(德国Eppendorf公司)上进行PCR,反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性5 min,然后95 $^{\circ}$ C变性60 s,61 $^{\circ}$ C退火55 s,72 $^{\circ}$ C延伸60 s,进行35个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min,产物长度为204 bp。酶切总反应体积为10 μ l, *Bsr*D I (Bio Basic Inc.)体系为:5 μ l PCR产物、缓冲液1 μ l,酶1 U,60 $^{\circ}$ C水浴2 h; *Bsa* I (Bio Basic Inc.)体系为:5 μ l PCR产物、缓冲液1 μ l,1 mg/ml BSA 0.1 μ l,酶1 U,55 $^{\circ}$ C水浴2 h。取5 μ l酶切产物用2%琼脂糖凝胶电泳,EB染色后分析。

1.3 统计学处理 用SAS 8.2软件,对数据进行Hardy-Weinberg平衡检验、 χ^2 检验、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 本研究共调查肾癌患者175例,其中男105例、女70例,年龄28~78岁,平均年龄(53.79 \pm 11.63)岁。健康对照200例,其中男130例、女70例,年龄23~85岁,平均年龄(51.21 \pm 15.60)岁。一些指标定义如下:吸烟为每天至少1支、持续或累积6个月以上,饮酒为每周至

少1次、持续6个月以上。病例组吸烟者比例为36.57%,饮酒者比例为19.43%;对照组分别为30.5%、23%。两组人群的性别构成以及平均年龄差异无显著性($P>0.05$);吸烟者与不吸烟者、饮酒者与不饮酒者比较,患肾癌的危险性均无差异($P>0.05$)。

2.2 M2 PCR产物经*Bsr*D I限制性内切酶酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果 PCR产物经*Bsr*D I消化后,产生3种不同的电泳条带。野生型Wt/Wt含有酶切识别位点,电泳产物有149、55 bp两个片段,突变型M2/M2不含酶切识别位点,只有204 bp一个片段,杂合型Wt/M2则有204、149、55 bp三个片段(图1)。

图1 CYP1A1 M2、M4型产物鉴定结果

Fig 1 Results of restriction digestion of amplified products 1,4:Wt/M4 genotype;2,8:Wt/M2 genotype;3,6,9: Amplified product;5: M2/M2;7: M4/M4;M: Marker 1

2.3 M4 PCR产物经*Bsa* I限制性内切酶酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果 PCR产物经*Bsa* I消化后,产生3种不同的电泳条带。野生型Wt/Wt含有酶切识别位点,电泳产物有139、65 bp两个片段,突变型M4/M4不含酶切识别位点,只有204 bp一个片段,杂合型Wt/M4则有204、139、65 bp三个片段(图1)。

2.4 M2、M4基因型与肾癌发病风险 经遗传平衡吻合度 χ^2 检验,病例组和对照组中各等位基因频率处于Hardy-Weinberg平衡状态($P>0.05$),该人群具有代表性。Wt/Wt、Wt/M2和M2/M2 3种基因型在病例组、对照组的分布频率分别为43.67%、41.77%、14.56%和40.29%、34.53%、25.18%,差异无统计学意义。Wt/Wt、Wt/M4、M4/M4 3种基因型在两组间的分布频率分别为:3.13%、43.13%、53.75%和4.49%、34.62%、60.90%,经统计学检验差异无意义。校正性别后,检验显示CYP1A1基因两个基因型在病例和对照间的分布差异无统计学意义。具体结果见表1。

2.5 肾癌危险性的多因素非条件Logistic回归分

析 多因素非条件 Logistic 回归分析结果显示,随着年龄的增加,肾癌发生的危险性也随着增加($OR=1.025,95\%CI:1.007\sim1.043,P=0.005$);携带 M2/M2 基因型者与肾癌的发生呈正相关($OR=$

$2.225,95\%CI:1.134\sim4.365,P=0.020$)。对其他因素的分析结果显示,差异无统计学意义($P>0.05$,表 2)。

表 1 肾癌病例和对照组中 CYP1A1 基因型分布

Tab 1 Genotype frequencies of CYP1A1 in renal cancer patients and control subjects

Genotype	Cases ^a		Controls ^a		OR(95%CI)	OR _{adj} (95%CI) ^b
	n	Frequency(%)	n	Frequency(%)		
M2						
Wt/Wt	69	43.67	56	40.29	-	-
Wt/M2	66	41.77	48	34.53	1.116(0.669-1.863)	1.122(0.672-1.874)
M2/M2	23	14.56	35	25.18	0.533(0.283-1.005)	0.534(0.284-1.006)
M4						
Wt/Wt	5	3.13	7	4.49	-	-
Wt/M4	69	43.13	54	34.62	1.789(0.538-5.949)	1.850(0.549-6.239)
M4/M4	86	53.75	95	60.90	1.267(0.388-4.142)	1.281(0.390-4.212)

^a: Total number of subgroups is not equal for the unsuccessful amplification; ^b: Adjusted by gender

表 2 肾癌危险性多因素非条件 Logistic 回归分析

Tab 2 Multivariate regression analysis of factors independently associated with risk of renal cancer

Group	β	P	OR(95%CI)
Sex	0.395	0.196	1.484(0.816-2.700)
Age	0.025	0.005	1.025(1.007-1.043)
Smoke	0.557	0.082	1.745(0.932-3.266)
Drink	-0.130	0.696	0.878(0.456-1.688)
M2 Wt/Wt	-	0.067	-
M2 Wt/M2	0.522	0.123	1.686(0.868-3.272)
M2 M2/M2	0.800	0.020	2.225(1.134-4.365)
M4 Wt/Wt	-	0.215	-
M4 Wt/M4	-0.087	0.898	0.917(0.243-3.453)
M4 M4/M4	0.439	0.088	1.551(0.937-2.567)
Constant	-2.537	0.001	0.079

3 讨论

CYP1A1 多态性与肾癌易感性关系的研究目前暂不多见,仅 Longuemaux 等^[5]发现 CYP1A1 包含至少 1 个突变等位基因的基因型,可显著增加肾癌的患病风险($OR=2.1,95\%CI=1.1\sim3.9$)。而其与其他癌症的关系研究报道较多,研究结果常相互矛盾。Aktas 等^[6]发现 M2/M2 基因型较 Wt/Wt 基因型可显著增加前列腺癌的发病风险($OR=2.846,95\%CI=1.004\sim8.064$),这与 Yang 等^[7]在中国南方地区汉族人群中进行的病例对照研究的结果一致。Gra 等^[8]在对慢性淋巴细胞性白血病和非霍奇金淋巴瘤的研究中发现,慢性 B 淋巴细胞白血病患者 M2、M4 突变等位基因的携带率比正常人高

($OR=1.76,95\%CI=1.0\sim3.1$)。Yeh 等^[9]对台湾地区直肠癌的患病风险研究结果显示,携带 CYP1A1 M2/M2 及其他基因型的人群能增加患病危险性(男性: $OR=3.1,95\%CI=1.8\sim5.2$;女性: $OR=3.1,95\%CI=1.3\sim7.0$)。McGrath 等^[10]在研究 CYP1A1、吸烟与子宫内膜癌的关系时并未观察到 M2、M4 基因型和患癌危险性之间有统计学意义;Leichsenring 等^[11]采用病例对照对口腔癌研究时发现,CYP1A1 M2 基因型与患病风险之间亦无显著性差异($OR=1.06,95\%CI=0.49\sim2.29$)。

本研究结果未提示 M2、M4 基因型与患肾癌风险有相关性,导致此结果的影响因素有很多,有待进一步探讨。多因素联合分析结果提示随着年龄的增加,肾癌发生的危险性也随着增加,究其原因主要是随着年龄的增长,身体各器官逐渐出现退行性改变,机体对内外环境的适应能力逐步减低,患病危险性相应增加^[12];携带 M2/M2 基因型者与肾癌的发生呈正相关,目前已经证实 M2/M2 基因型不仅提高酶的活性,同时也提高了酶的诱导性,进而加速前致癌物的活化^[6],此结果还需更多的研究来证实。

此外,本研究中还有一些不足之处。首先,PCR 过程中部分样品的扩增失败可能会对实验结果产生一定的偏倚;其次,未对 CYP1A1 基因不同单倍型进行研究,缺少多个多态位点的组合分析;最后,未对吸烟、饮酒进行定量分析,同时,也未考虑其他环境因素的影响,其在肾癌发生中的作用有待进一步研究。

综上所述,本研究发现 CYP1A1 基因 M2 单核苷酸多态性可能与肾癌易感性相关,M2/M2 基因型可能是肾癌的遗传危险因素之一。肾癌是多因素疾病,单纯的遗传因素不会引起肾癌,某些遗传因素可以增加宿主对肾癌的易感性。相信随着科学技术的发展,将来一定能够明确遗传因素在肾癌中的作用。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari R C, Ghafoor A, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55: 10-30.
- [2] Cascorbi I, Brockmoller J, Roots I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and lung cancer susceptibility[J]. Cancer Res, 1996, 56: 4965-4969.
- [3] 吴清敏,刘巧红,腾云,沈凌汛,王慧,陈燕,等. 外周血 DNA 提取方法的比较[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27: 445-446.
- [4] 尹华,赵强元,赵洪宁. 改良裂解法提取微量组织 DNA 的研究[J]. 解放军医学高等专科学校学报, 1999, 27: 3-6.
- [5] Longueux S, Deloménie C, Gallou C, Méjean A, Vincent-Viry M, Bouvier R, et al. Candidate genetic modifiers of individual susceptibility to renal cell carcinoma: a study of polymorphic human xenobiotic-metabolizing enzymes[J]. Cancer Res, 1999, 59: 2903-2908.
- [6] Aktas D, Hascicek M, Sozen S, Ozen H, Tuncbilek E. CYP1A1 and GSTM1 polymorphic genotypes in patients with prostate cancer in a Turkish population [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2004, 154: 81-85.
- [7] Yang J, Qian L X, Wu H F, Xu Z Q, Sui Y G, Wang X R, et al. Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 1A1 and 2E1 genes, smoking, drinking and prostate cancer susceptibility: a case-control study in a Han nationality population in Southern China[J]. Int J Urol, 2006, 13: 773-780.
- [8] Gra O A, Glotov A S, Nikitin E A, Glotov O S, Kuznetsova V E, Chudinov A V, et al. Polymorphisms in xenobiotic-metabolizing genes and the risk of chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adult Russian patients[J]. Am J Hematol, 2008, 83: 279-287.
- [9] Yeh C C, Sung F C, Tang R, Chang-Chieh C R, Hsieh L L. Association between polymorphisms of biotransformation and DNA-repair genes and risk of colorectal cancer in Taiwan[J]. J Biomed Sci, 2007, 14: 183-193.
- [10] McGrath M, Hankinson S E, De Vivo I. Cytochrome P450 1A1, cigarette smoking, and risk of endometrial cancer (United States)[J]. Cancer Causes Control, 2007, 18: 1123-1130.
- [11] Leichsenring A, Losi-Guembarovski R, Maciel M E, Losi-Guembarovski A, Oliveira B W, Ramos G, et al. CYP1A1 and GSTP1 polymorphisms in an oral cancer case-control study[J]. Braz J Med Biol Res, 2006, 39: 1569-1574.
- [12] 卢祖洵. 社会医学[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 92-93.

[本文编辑] 李丹阳

· 书 讯 ·

《2008-主管护师职称考试强化训练习题集》已出版

本书由李春德编著,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-8106-0811-4,753页,16开,定价:85.00元。本书是根据卫生部考试中心编写的考试大纲和考试指南,组织了多名具有多年辅导经验的老师,结合了近几年来的考试题型和考试内容编写而成的,旨在帮助护士在晋升主管护师的考试中取得好成绩。本习题集适合参加主管护师职称考试者使用,主要内容包含内科护理学、外科护理学、妇产科护理学、儿科护理学、护理健康教育、社区护理、医院感染护理七大部分,每部分包含有考试中的基础知识、相关专业知识和专业知识和专业实践能力4个部分。

本书题量大,范围广,与考试指南编排的章节完全一致,读者在经过学习、复习、考试指导后,通过本书的题目练习可检验复习效果。根据考试题型,本书将题型归纳为A型、B型、X型题3类。A型题为最佳选择题,每题只有一个最佳参考答案;B型题即配伍题,指若干组考题共同使用5个备选答案,从中选择一个最佳答案;X型题即多重选择题,每题有多个答案。本书每篇末备有参考答案,以便读者检验复习情况。为了配合考生最后冲刺,本书还增加了模拟试题和主管护师全真试题,考生可最后检验复习成果,及时弥补不足。本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595 <http://www.smmup.com>