文章编号:1000-5404(2008)07-0603-03

论著

人端粒酶催化亚单位基因单核苷酸多态性与胃癌的关系

万顺梅,房殿春,杨仕明,汪荣泉,彭贵勇,陈文生 (第三军医大学西南医院全军消化病研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨人端粒酶催化亚单位基因(human telomerase catalytic subunit,hTERT) Ex2-659A/G 位点单核苷酸多态性与胃癌患者发病风险的关系。方法 对甘肃西部三家医院外科手术切除 168 例胃癌患者(病例组)和同期在上述医院查体的健康人群 156 例(对照组)进行病例对照研究;采用聚合酶链反应和限制性片段长度多态性技术(PCR-RFLP)对 2 组进行基因型分析,比较各基因型分布频率和发病风险的关系。结果 病例组 hTERT Ex2-659A/G 位点 AA、AG、GG 基因型的频率与对照组相比无显著差异。病例组 A、G 等位基因频率分别为 44.74% 和 55.26%,对照组为 43.42% 和 56.58%,2 组 A、G 等位基因型频率比较有显著性差异($\chi^2=5.373\,4$, $P=0.020\,4$)。与 G/G 基因型相比,A/G 和 A/A 2 种基因型的个体患胃癌的危险度(*OR*)分别为 0.519 (95% *CI*:0.310 ~ 0.870, $P=0.013$)、0.550(95% *CI*:0.255 ~ 1.188, $P=0.128$)。结论 hTERT Ex2-659A/G 单核苷酸多态性可能为胃癌的保护因素。

关键词:胃癌;端粒酶催化亚单位基因;多态性;单核苷酸
中图法分类号:R345;R394.3;R735.2 文献标识码:A

Association of single nucleotide polymorphism of hTERT candidate genes with gastric carcinoma

WAN Shun-mei, FANG Dian-chun, YANG Shi-ming, WANG Rong-quan, PENG Gui-yong, CHEN Wen-sheng (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the association of single nucleotide polymorphism (SNP) of Ex2-659A/G of human telomerase catalytic subunit (hTERT) with the incidence of gastric carcinoma. Methods Totally 168 patients of gastric carcinoma and 156 cancer-free controls were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Results The frequency of AA, AG, GG genotypes of hTERT Ex2-659A/G was 10.63%, 47.5%, and 41.88% in gastric carcinoma patients and 15.13%, 56.58% and 28.29% in controls, respectively. The OR for AG and AA genotypes was 0.519 (95% *CI*: 0.310 – 0.870, $P=0.013$), 0.550 (95% *CI*: 0.255 – 1.188, $P=0.128$) in comparison with GG genotype, respectively. There was significant difference in genotype distribution and allele frequency of Ex2-659A/G polymorphism ($\chi^2=5.373\,4$, $P=0.020\,4$) between the 2 groups. Conclusion Our results indicate that Ex2-659A/G SNP of hTERT gene may be associated with reduced risk for gastric carcinoma.

Key words: gastric carcinoma; human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene; polymorphism; single nucleotide

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,严重危害人类健康。我国胃癌高发区主要集中在甘肃、宁夏,以及东北地区。胃癌为多基因疾病,其发生与多种因素相关。人端粒酶催化亚单位基因(human telomerase catalytic subunit,hTERT)是端粒酶逆转录酶基因,为端粒酶调节亚单位,依赖于端粒酶的活性而发挥调节端粒作用,并诱发细胞无限增殖参与肿瘤发生,在肿瘤的发生中起着至关重要的作用。hTERT 单核苷酸多态性在中国人群胃癌中的研究少见报道,故本研究从文献[1]公布的 hTERT46 个 SNP 位点中,选择其中等位

基金项目:国家自然科学基金(30470796)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470796)
作者简介:万顺梅,女,甘肃省兰州市人,博士研究生,副主任医师,主要从事胃癌的临床与基础方面的研究。电话:(023)68765191
通信作者:房殿春,电话:(023)68754480,E-mail:fangdianchun@hotmail.com
收稿日期:2007-11-14;修回日期:2007-12-24

基因频率大于5%，且有酶切位点的hTERT Ex2-659A/G（ID：rs2736098）位点为研究对象，采用PCR-RFLP方法检测了我国甘肃胃癌高发区正常人和胃癌患者中上述SNP位点多态性，并探讨其与胃癌易感性的关系。

1 对象与方法

1.1 对象及分组

选取168例从2005年12月至2006年7月在甘肃省西部武威市三家医院行外科手术切除的胃癌患者，作为病例组。术前未进行放疗和化疗，所有病例均经组织病理学确诊。156例正常对照组同期在三家医院查体并行胃镜检查，且均经病理检查排除慢性萎缩性胃炎、肠化、增生、溃疡和癌变。病例组男性128例，女性40例，年龄31～76岁，平均55.69岁；对照组男性118例，女性38例，年龄28～73岁，平均54.63岁。经统计学分析，2组年龄（$\chi^2=0.070\ 2$，$P=0.791\ 0$）、性别（$\chi^2=0.013\ 4$，$P=0.908\ 0$）均无显著差异。所有受试者均签署知情同意书。胃癌组均记录肿瘤家族史、吸烟和饮酒情况。全部检查对象均抽静脉血5 ml，分离淋巴细胞，－70℃冰箱冻存备用。

1.2 方 法

1.2.1 基因组DNA提取和鉴定 采用常规酚、氯仿/异戊醇抽取法提取外周血和胃癌组织DNA。提取DNA采用紫外分光光度仪测量每个$D(260)/D(280)$值及DNA浓度后立即使用或在－20℃冰箱保存。

1.2.2 PCR扩增 引物的序列参照数据库中SNP位点周围的序列[1]，由作者设计，上海生工合成。引物序列：FEx2-659A/G：5′-GACCGAGTGACCGTGGTTTC-3′；REx2-659 A/G：5′-CCAGAAAGATGGTCTCCACGA-3′，扩增片段长度311 bp。PCR扩增反应体系总体积25 μl，包括DNA模板300 ng，引物各10 μmol/L，*Taq* DNA聚合酶0.1 U，dNTP 500 μmol/L，Tris-HCl 20 mmol/L（pH＝8.3），KCl 20 mmol/L，$MgCl_2$ 3 mmol/L。PCR扩增条件：94℃预变性3 min，94℃ 30 s，59℃ 30 s，72℃ 1 min，共30个循环，最后72℃延伸5 min。PCR扩增反应完成后，取8 μl PCR扩增产物，2%琼脂糖凝胶电泳观察扩增情况，若出现311 bp清晰条带，则进行*Apa* Ⅰ内切酶酶切分析。

1.2.3 酶切与基因分型 酶切反应体系10 μl，取TERTEx2-659A/GPCR扩增产物8 μl，10×Buffer 1.0 μl，BSA 0.1 μl，限制性内切酶*Apa* Ⅰ 10 U，于37℃共同温浴3 h。3%琼脂糖凝胶电泳分析酶切产物。

1.3 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件处理。采用χ^2检验比较病例组和对照组吸烟史、饮酒史家族史，hTERTEx2-659A/G的基因型分布和等位基因频率。采用Hardy-Weinberg平衡检验两位点基因型和等位基因频率分布是否具有群体代表性。两基因间比较及基因型和等位基因相对风险度采用比值比（odds ratios，*OR*）和95%可信区间（*CI*），*OR*和95% *CI*以非条件Logistic回归模型计算，所有检验为双侧概率检验。

2 结果

2.1 病例组与对照组基本情况分布

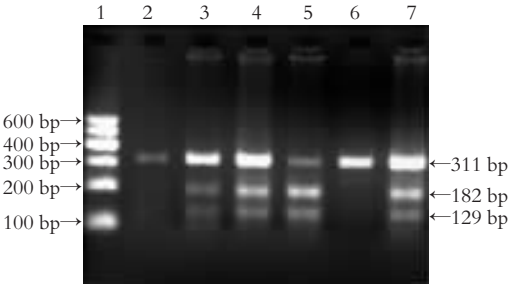
病例组与对照组基本情况分布显示，病例组有吸烟史比率显著高于对照组（$P<0.01$）；病例组有饮酒史者比率与对照组相比无显著性差异（$P>0.05$）；病例组有肿瘤家族史比率显著高于对照组（$P<0.01$）（表1）。

表1 病例组与对照组一般特征

组别	n	吸烟史（%）	饮酒史（%）	肿瘤家族史（%）
病例组	168	106（63.10）	76（45.24）	46（27.38）
对照组	156	75（48.08）	60（38.46）	12（7.69）
χ^2		7.399 6	1.525 1	21.335 4
P		0.006 5	0.216 8	0.000 0

2.2 2组hTERT Ex2-659A/G各基因型及等位基因分布情况

hTERT Ex2-659A/G基因分型电泳图见图1。hTERT Ex2-659A/G可分为3种基因型，即纯合未开型AA，为311 bp大小条带，杂合型切开型AG，分别为311、182、129 bp大小的3条带；纯合切开型GG，分别为182、129 bp大小的2条带。



1：DNA标准；2，6：AA型；3、4、7：AG型；5：GG型

图1 hTERTEx2-659A/G位点经*Apa* Ⅰ酶切电泳图

病例组hTERT Ex2-659 AA、AG、GG基因型的频率分别为10.63%、47.5%、41.88%，A、G等位基因频率分别为34.38%、65.63%，对照组基因型的频率分别为15.13%、56.58%、28.29%，A、G等位基因频率为43.42%、56.58%，2组A、G等位基因型频率比较有显著性差异（$\chi^2=5.373\ 4$，$P=0.020\ 4$）。与G/G基因型相比，A/G和A/A 2种基因型的个体患胃癌的危险度（*OR*）分别为0.519（95% *CI*：0.310～0.870，$P=0.013$）、0.550（95% *CI*：0.255～1.188，$P=0.128$）（表2）。经Hardy-Weinberg平衡检验，得到的hTERT Ex2-659A/G基因型的研究对象符合Hardy-Weinberg平衡的群体。

表2 hTERT Ex2-659A/G各基因型在2组中的分布及与胃癌的关系

组别	例数	基因型			等位基因	
		G/G	A/G	A/A	G	A
病例组	168	67（41.88）	76（47.5）	17（10.63）	210（65.62）	110（34.38）
对照组	156	43（28.29）	86（56.58）	23（15.13）	172（56.58）	132（43.42）
OR		1.00	0.519	0.550	－	－
95% *CI*		－	0.310～0.870	0.255～1.188	－	－
P		－	0.013	0.128	－	－

2.3　hTERT Ex2-659A/G 位点多态性与各因素的关系

hTERT Ex2-659A/G 位点多态性与性别、吸烟、饮酒及家族史无显著差异（表 3）。

表 3　hTERT Ex2-659A/G 位点多态性与各因素的关系（例数）

因素	hTERT Ex2-659A/G（病例/对照）			*OR*	95% *CI*	χ^2	*P*
	AA	AG	GG				
性别							
男	10/14	59/70	52/31	1.008	0.527～1.927	0.001	0.982
女	7 /9	17/16	15/12				
吸烟史							
有	10/15	49/58	40/25	0.817	0.458～1.460	0.464	0.496
无	7/8	27/28	27/18				
饮酒史							
有	3/10	31/37	38/19	1.112	0.662～1.868	0.161	0.688
无	14/13	45/49	29/24				
家族史							
有	7/0	22/25	16/15	0.952	0.563～1.611	0.033	0.856
无	10/23	54/61	51/28				

3　讨论

端粒酶活性是细胞永生化的关键，人体绝大多数恶性肿瘤平均 85% 以上存在端粒酶活性，而在正常组织中无端粒酶活性[2]。王国安等[3,4]研究结果显示 hTERT 在癌前病变组织及胃癌组织中表达水平随着端粒酶活性的增加而呈递增趋势，提示端粒酶活化不仅维持胃癌细胞永生化，而且在胃癌演变过程中起重要作用。hTERT 基因位于 5p15. 33，是端粒酶调节亚单位，对端粒酶活性有限速效应，hTERT 依赖于端粒酶的活性，并诱发细胞无限增殖参与肿瘤发生，在肿瘤的发生中起着至关重要的作用[5]。日本学者 Tahara 等[6]认为胃癌发生是癌基因、抑癌基因、DNA 修复基因、遗传不稳定及端粒酶活化等多种因素共同作用所致，在肠化生阶段由幽门螺杆菌感染诱导 hTERT 阳性细胞异常增生衍进为癌。Brachner 等[7]用 16 个非小细胞癌细胞株研究端粒的稳定性与肿瘤侵袭性的关系，结果表明不论在体内或体外，除染色体不稳定外，hTERT 表达可促进肿瘤的侵袭性生长，进一步提供了 hTERT 致癌活性并非基于染色体不稳定的抑制作用。SNP 研究对揭示多基因复杂疾病及个体间、不同群体或个体对肿瘤患病风险，以及对药物反应有重要意义[8]。Hsu 等[9]研究 66 例非小细胞肺癌的患者 hTERT 基因启动子区 Ets2 结合位点（-245 bp 上游）的 SNP，发现 C/T、T/T 纯合子的 TRFLR 比值较低，但表达较强的端粒酶活性，提示 Ets2 结合位点正性调控 hTERT 基因。本研究对 hTERT 基因单核苷酸多态性与胃癌的关系进行研究，发现病例组与对照组相比，TERT Ex2-659A/G 位点的各基因型频率分布有显著性差异，病例组含有较高比例的 G/G、A/G 基因型，而 A/A 型无统计学差异，提示 A/G 可能与胃癌的易感性降低有关。

在分析性别、吸烟、饮酒及肿瘤家族史与胃癌发生时发现，吸烟者胃癌危险性显著高于不吸烟者，有肿瘤家族史者胃癌危险性显著高于无家族史者。而多因素 Logistic 回归分层分析显示，hTERTEx2-659A/G 位点多态性与性别、吸烟、饮酒及家族史无关，提示吸烟和史肿瘤家族史者发生胃癌的易感性与 hTERT Ex2-659 A/G 基因位点的多态性无关。

总之，本研究表明，hTERT Ex2-659 A/G 位点单核苷酸多态性与胃癌有关，可能为胃癌的保护因素。但本研究仅分析了甘肃西部这一地区基因多态性，因样本量相对较少，并其中仍然存在混杂因素及选择偏倚对结果的影响，对于这些研究结果尚需大样本的病例对照研究、队列研究等加以验证。

参考文献：

[1] Packer B R, Yeager M, Burdett L, *et al*. SNP500Cancer：a public resource for sequence validation, assay development, and frequency analysis for genetic variation in candidate genes[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(Database Issue)：D617－D621.

[2] Savage S A, Chanock S J, Lissowska J, *et al*. Genetic variation in five genes important in telomere biology and risk for breast cancer[J]. Br J Cancer, 2007, 97(6)：832－836.

[3] 王国安，刘海峰，房殿春，等. 胃黏膜端粒酶活化与细胞凋亡的关系[J]. 解放军医学杂志，2005，30(9)：785－787.

[4] 王国安，刘海峰，房殿春，等. 幽门螺杆菌感染对胃黏膜上皮细胞端粒酶活性的影响及其与细胞凋亡的关系[J]. 消化外科，2006，5(3)：215－219.

[5] Yamaguchi H, Calado R T, Ly H, *et al*. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia[J]. N Engl J Med, 2005, 352(14)：1413－1424.

[6] Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer[J]. IARC Sci Publ, 2004, (157)：327－349.

[7] Brachner A, Sasgary S, Pirker C, *et al*. Telomerase- and alternative telomere lengthening-independent telomere stabilization in a metastasis-derived human non-small cell lung cancer cell line：effect of ectopic hTERT[J]. Cancer Res, 2006, 66(7)：3584－3592.

[8] Jiang R, Duan J, Windermuth A, *et al*. Genome-wide evaluation of the public SNP databases[J]. Pharmacogenomics, 2003, 4(6)：779－789.

[9] Hsu C P, Hsu N Y, Lee L W, *et al*. Ets2 binding site single nucleotide polymorphism at the hTERT gene promoter--effect on telomerase expression and telomere length maintenance in non-small cell lung cancer[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(10)：1466－1474.

（编辑　薛国文）