基础研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1816-04

eNOS G894T 基因多态性与胃癌发生发展关系的研究

陈淑勤[1],洪斌斌[2],林贤东[2],朱进伟[2],唐 阳[2],林建银[2]

(1. 福建医科大学基础医学院病理学系肿瘤研究室,福州 350004;2. 福建医科大学教育部消化道恶性肿瘤教育部重点实验室分子医学研究中心,福州 350004)

【摘 要】目的:探讨内皮型一氧化氮合酶(Endothelial NOS,eNOS)基因多态性与胃癌发生发展的关系。方法:采用 PCR-RFLP 技术,检测福建地区汉族 324 例胃癌患者(病例组)和 200 例健康对照者(对照组)eNOS 基因 G894T 多态性。结果:(1)在病例组和对照组中,eNOS G894T SNP 基因型频率 G/G 分别为 76.5%(248/324) 和 73.0%(146/200),G/T+T/T 分别为 23.5%(76/324) 和 27.0%(54/200),等位基因频率 G 分别为 88.0%(570/648)和 86.3%(345/400),T 分别为 12.0%(78/648)和 13.7%(55/400)。eNOS G894T SNP 基因型和等位基因频率在病例组与对照组的分布差异无统计学意义(均 $P>0.05$);弥漫型胃癌和肠型胃癌分别与对照组比较,任一基因型或等位基因亦未增加患癌风险(均 $P>0.05$)。(2)eNOS G894T 基因型频率分布与胃癌的临床病理特征无明显关系(均 $P>0.05$)。结论:福建地区汉族人群 eNOS 基因 G894T 多态性与胃癌的发生和发展无关。

【关键词】胃癌;eNOS G894T 基因多态性;疾病遗传易感性

【中国图书分类法分类号】R735.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-11

作者介绍:陈淑勤(1972-),女,副教授,博士,研究方向:肿瘤病理学。

通讯作者:林建银,男,教授,E-mail:jylin@mail.fjmu.edu.cn。

基金项目:卫生部科学研究基金(编号:WKJ2008-2-43);福建医科大学重大科研项目基金(编号:09ZD020);福建医科大学教授基金(编号:JS060001)。

统的存在。本研究发现 Artemin 在不影响胰腺癌细胞增殖的情况下却增加其侵袭性。这一发现意味着 Artemin 的嗜神经侵袭导致胰腺癌患者预后极差。随着癌细胞对细胞外基质消化活性的增加,Artemin 可能会促进胰腺内/胰腺外神经的侵袭性。

总之,对 Artemin 在胰腺癌中的深入研究,将有助于明确胰腺癌神经浸润转移的发生机制。同时可能通过对 Artemin 的表达调控或基因转染方法,与其他方法共同干预胰腺癌细胞内环境和宿主微环境,达到抑制胰腺癌浸润转移、改善胰腺癌预后的目的。

参 考 文 献

[1] Jemal A,Murray T,Samuels A,et al. Cancer statistics[J].CA Cancer J Clin,2003,53(1):5-26.

[2] 胡先贵.胰腺癌的神经侵犯和外科处理[J].外科理论和实践,2005,10(3):210-211.

[3] Hirai I,Kimura W,Ozawa K,et al. Perineural invasion in pancreatic cancer [J]. Pancreas,2002, 24(1):15-25.

[4] Veit C,Genze F,Menke A,et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase is required for glial cell line-derived neurotrophic factor-induced migration and invasion of pancreatic carcinoma cells[J]. Cancer Res,2004,64(15):5291-5300.

[5] Andres R,Forgie A,Wyatt S,et al. Multiple effects of artemin on sympathetic neurone generation,survival and growth[J].Development,2001,128(19):3685-3695.

[6] Gill S S,Patel N K,Hotton G R,et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease[J].Nat Med,2003,9(5):589-595.

[7] Takahashi M. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases[J].Cytokine Growth Factor Rev,2001,12(4):361-373.

[8] Okada Y,Eibl G,Duffy J P,et al. Glial cell-derived neurotrophic factor upregulates the expression and activation of matrix metalloproteinase-9 in human pancreatic cancer[J]. Surgery,2003,134(2):293-299.

[9] Quartu M,Serra M P,Manca A,et al. Neurturin, persephin, and artemin in the human pre-and full-term newborn and adult hippocampus and fascia dentata [J]. Brain Res,2005,1041(2):157-166.

[10] Leitner M L,Wang L H,Osborne P A,et al. Expression and function of GDNF family ligands and receptors in the carotid body[J].Exp Neurol,2005,191(s1):68-79.

[11] Ducray A,Krebs S H,Schaller B,et al. GDNF family ligands display distinct action profiles on cultured GABAergic and serotonergic neurons of rat ventral mesencephalon [J]. Brain Res,2006,1069(1):104-112.

[12] 朱栋良,罗地来,罗 刚,等. Artemin、GFRα3 在胰腺癌中的表达及其与胰腺癌神经浸润转移的相关性[J].南方医科大学学报,2009,29(3):428-431.

[13] Baloh R H,Tansey M G,Johnson E M J,et al. Functional mapping of receptor specificity domains of glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF) family ligands and production of GFRalpha1 RET-specific agonists[J].J Biol Chem,2000,275(5):3412-3420.

[14] Baloh R H,Tansey M G,Lampe P A,et al. Artemin,a novel member of the GDNF ligand family,supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex[J].Neuron,1998,21(6):1291-1302.

(责任编辑:张学颖)

Association of the eNOS G894T polymorphism with the development and progression of gastric cancer

CHEN Shu-qin, et al

(*Department of Pathology, Pre-clinical College, Institute of Oncology, Fujian Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the association of eNOS gene G894T polymorphism and the development and progression of gastric cancer. *Methods*: PCR-RFLP method was used to determine the genotypes of eNOS G894T gene polymorphism in 324 gastric cancer patients and 200 cancer-free controls in Han Population of Fujian Province. *Results*: (1)In the case and control group, G/G genotype frequencies were 76.5%(248/324) and 73.0%(146/200) respectively; G/T+T/T genotype frequencies were 23.5%(76/324) and 27.0%(54/200) respectively; G allele frequencies were 88.0%(570/648)and 86.3%(345/400) respectively; T allele frequencies were 12.0%(78/648) and 13.7%(55/400) respectively. The comparisons between the case group and control group showed no significant difference in genotype and allele frequencies (all $P>0.05$); When case group was subdivided as diffuse-type and intestinal-type, the comparisons between the two subgroups and control group respectively also showed that not any genotype or allele increased the risk of gastric cancer (all $P>0.05$). (2)No statistically significant correlations existed between eNOS G894T polymorphism and several clinicopathological features of gastric cancer (all $P>0.05$). *Conclusion*: No association is found between eNOS gene G894T polymorphism and the development and progression of gastric cancer in Han Population of Fujian Province.

【Key words】Gastric cancer; eNOS G894T gene polymorphism; Genetic predisposition to disease

胃癌是我国常见的一种恶性肿瘤，其病因和发病机制尚未阐明，但大量的流行病学和分子遗传学研究结果表明环境因素和遗传因素的相互作用在胃癌的发生和发展中起着重要作用。近年来，胃癌遗传易感基因和易感位点的研究成为该领域新的研究热点。一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)催化左旋精氨酸使之生成一氧化氮(Nitric oxide, NO)，NO 具有扩张血管、诱导恶性肿瘤新生血管生成、抑制血小板凝集等作用。研究表明：内皮型一氧化氮合酶(Endothelial NOS, eNOS)第 7 外显子 894 位碱基 G→T 多态性(G894T)导致密码子 298 处谷氨酸(Glu)被天门冬氨酸(Asp)替代，可能影响 eNOS 蛋白的功能及活性，从而影响 NO 的生成量[1,2]。此前的研究显示 eNOS G894T(rs1799983)的多态性与高血压[3]、冠心病[4]、乳腺癌[5]等疾病相关，但与胃癌是否相关，文献未见报道。本研究应用聚合酶链反应－限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法对福建地区 324 例胃癌患者和 200 例正常对照者进行 eNOS 基因 G894T(rs1799983)多态性的检测，旨在探讨这一单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)位点与福建地区胃癌发生发展的关系，筛选可能的胃癌遗传易感基因靶点，为胃癌的病因和发病机制研究提供理论基础，为临床进行针对性防治提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

收集 2005 年至 2008 年间在福建医科大学附属协和医院、附属第一医院和福建省肿瘤医院就诊的福建汉族无亲缘关系的 324 例原发性胃癌患者以及 200 例正常对照者。所有病例在手术前均未接受过化学或放射治疗，术后均经过组织病理学确诊。病例组中，男性 246 例(76.0%)，女性 78 例(24.0%)，平均年龄(58.89 ± 7.87)岁；对照组中，男性 143 例(71.5%)，女性 57 例(28.5%)，平均年龄(57.74 ± 8.19)岁。病例组与对照组性别和年龄构成均衡可比。本研究的调查和取样均征得受试者知情同意，并获得福建医科大学伦理道德委员会的批准。

1.2 样本收集和 DNA 的提取

收集正常对照者外周静脉血 5 ml，EDTA 抗凝，血液基因组 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA(Takara，中国大连)。收集胃癌患者距癌组织 5 cm 以上的正常胃黏膜，常规酚/氯仿/异戊醇方法提取基因组 DNA，Eppendorf 紫外分光光度计(德国)测定 DNA 浓度，A_{260}/A_{280} 的比值保持于 1.7~1.9 以保证 DNA 的纯度。

1.3 基因型分析

应用 PCR-RFLP 技术检测 eNOS 基因第 7 外显子 SNP G894T(Glu298Asp, rs1799983)基因型。引物由唐阳设计，博尚生物技术有限公司合成。上游引物序列为：5'-AAGGCAG GAGACACTGGATG－3'，下游引物序列为：5'-CAGTCAATC CCTTTGGTGCT-3'，PCR 反应体系为：模板 DNA 100 ng，2× Taq PCR MasterMix(天根，中国北京) 12.5 μl，引物(10 μm/μl)各 1 μl，加 ddH_2O 补足至 25 μl。2×Taq PCR MasterMix 主要成分包括：0.1 U Taq 聚合酶/μl，500 μmol/L dNTP，20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3)，100 mmol/L KCl，3 mmol/L $MgCl_2$ 以及其它稳定剂和增强剂。PCR 反应循环参数：94℃预变性 5 min，94℃变性 30 s，64.5℃复性 30 s，72℃延伸 30 s，共 35 个循环，72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳，EB 染色检测扩增结果。

限制性内切酶反应在 20 μl 反应体系中进行，其中包括 PCR 产物 10 μl，*Mbo* Ⅰ限制性内切酶(Takara 公司)2.5 U(10 U/μl)及 10×K buffer 2 μl，于 37℃水浴消化，过夜。酶切产物在 3.5%琼脂糖凝胶中电泳，EB 染色，凝胶成像系统拍照并判读基因型(图 1)。

随机选取 10%的 DNA 样品进行重复基因分型，前后结果 100%吻合，确保了基因分型的准确性。

1.4 数据分析

用 SPSS11.5 软件包进行统计分析。基因型和等位基因

频率采用直接计数法计算，以 Hardy-Weinberg 平衡定律检验对照样本的群体代表性。各组间基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验，以非条件 logistic 回归法计算表示相对风险度的比值比及其 95%可信区间，并经性别和年龄校正。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 eNOS G894T 基因分型电泳结果

PCR 扩增产物长 246 bp，经限制性内切酶 *Fba* Ⅰ酶切后产生 3 种基因型：G/G 型(246 bp)，G/T 型(246 bp、161 bp 和 85bp)，T/T 型(161 bp 和 85 bp)(图 1)。



1. DNA marker D2000；2,3. G/G 基因型；
4,5. G/T 基因型；6,7. T/T 基因型；8. 空白

图 1 PCR-*Mbo* Ⅰ酶切的 eNOS G894T 基因型电泳结果

2.2 遗传平衡检验

在正常对照组中，G/G、G/T、T/T 基因型频率分别为 73.0%(146/200)，26.5%(53/200)和 0.5%(1/200)，符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($\chi^2=1.952$，$P=0.377$)，并且与 SNP 数据库中中国北京汉族人的频率分布较为相似，如表 1 所示。

表 1 对照组和中国北京汉族人群 eNOS G894T 基因型和等位基因频率分布比较

基因型/等位基因	对照组例数(%)(N=200)	中国北京汉族人例数(%)(N=45)*	χ^2	P
基因型				
G/G	146(73.0)	35(77.8)	0.435	0.510
G/T+T/T	54(27.0)	10(22.2)		
等位基因				
G	345(86.3)	80(88.9)	0.445	0.505
T	55(13.7)	10(11.1)		

注：*SNP 数据库中已公布的数据

2.3 eNOS G894T 与胃癌发生的关系

病例组和对照组中 T/T 基因型分别只有 2 例和 1 例，故将 G/T 与 T/T 基因型合并计算，结果如表 2 所示，在病例组和对照组中，eNOS G894T SNP 基因型频率 G/G 分别为 76.5%(248/324)和 73.0%(146/200)，G/T+T/T 分别为 23.5%(76/324)和 27.0%(54/200)，等位基因频率 G 分别为 88.0%(570/648)和 86.3%(345/400)，T 分别为 12.0%(78/648)和 13.7%(55/400)。eNOS G894T SNP 基因型和等位基因频率在病例组与对照组的分布差异无统计学意义(均 $P>0.05$)；按 lauren 分类[6]将病例组分为弥漫型和肠型胃癌，其中 T/T 基因型 2 例均为肠型胃癌。结果如表 3 所示，不同类型的胃癌在该多态位点的基因型和等位基因频率分别与对照组比较，并无明显差异，任一基因型或等位基因并未增加患胃癌风险(表 3，均 $P>0.05$)。综上所述说明 eNOS G894T 与胃癌的发生无关。

2.4 eNOS G894T 与胃癌临床病理特征的关系

eNOS G894T 与病例组临床病理特征的关系总结在表 4 中。其中，G/G 型患者发生淋巴结转移的风险是至少携带 1 个 T 等位基因(G/T 或 T/T 型)的患者的 1.695 倍(Adjusted OR=1.695，95%CI=0.95~2.78)，但统计学检验差异无显著性意义($P=0.067$)。eNOS G894T 多态性与胃癌的分化、淋巴结转移和 TNM 分期均无明显关系(表 4，均 $P>0.05$)。

3 讨 论

3.1 eNOS 基因的作用及 G894T 多态与疾病的关系

NO 是重要的血管源性细胞因子，具有松弛血管平滑肌、抗血小板凝集、扩张血管、增加血流量等作用。NO 在体内的合成是通过 1 条“精氨酸—NOS—瓜氨酸”途径来完成的，其中 NOS 是该途径的限速酶，它在体内存在 3 种亚型。eNOS 是由血管内皮细胞产生，在生理条件下 NO 的来源主要是由 eNOS 催化产生的。eNOS 表达量的变化及蛋白结构的改变都会影响到酶的活性，从而影响体内 NO 的合成，引起一系列的病理变化。eNOS 基因位于染色体 7q35～36，有 26 个外显子和 25 个内含子，长 21 Kb，eNOS 基因存在多种多态性。1993 年 Marsden 等首次报道在 eNOS 基因第 7 号外显子上 894 位碱基 G 突变成 T(G894T)，使第 298 位密码子序列由 GAC 变为 GAT，导致其编码的相应蛋白产物谷氨酸被替换成天冬氨酸(Glu298Asp)[1]，Yoshimura 等揭示 G894T 多态使 eNOS 蛋白的构型改变，由螺旋变为紧密折叠，提示此突变可能使其酶活性改变，从而影响 NO 的合成[2]。此前的研究结果提示eNOS

表 2 eNOS 基因 G894T 多态与胃癌发生风险的关系

基因型/等位基因	病例组例数(%)(N=324)	对照组例数(%) (N=200)	OR(95%CI)*	P
基因型				
G/G	248(76.5)	146(73.0)	1.00(参照)	
G/T+T/T	76(23.5)	54(27.0)	0.84(0.67~1.31)	0.372
等位基因				
G	570(88.0)	345(86.3)	1.00(参照)	
T	78(12.0)	55(13.7)	0.87(0.62~1.43)	0.423

注：* OR 及 95%CI 均经性别和年龄校正

表 3 eNOS 基因 G894T 多态与弥漫型或肠型胃癌发生风险的关联

基因型/等位基因	对照组例数(%) (*N*=200)	弥漫型胃癌例数 (%)(*N*=104)	OR(95%CI) *	对照组例数(%) (*N*=200)	肠型胃癌例数(%) (*N*=220)	OR(95%CI) *
基因型						
G/G	146(73.0)	74(71.2)	1.00(参照)	146(73.0)	174(79.1)	1.00(参照)
G/T+T/T	54(27.0)	30(28.8)	1.12(0.66~1.83)	54(27.0)	46(20.9)	0.73(0.48~1.24)
等位基因						
G	345(86.3)	178(85.6)	1.00(参照)	345(86.3)	392(89.1)	1.00(参照)
T	55(13.7)	30(14.4)	1.08(0.67~1.74)	55(13.7)	48(10.9)	0.78(0.53~1.18)

注：* OR 及 95%CI 均经性别和年龄校正，*P* 值均 >0.05

表 4 eNOS G894T 与胃癌临床病理特征的关系

临床病理特征	G/G 例数(%)	G/T+T/T 例数(%)	OR (95% CI) *	*P*
分化				
中高分化	130(75.6)	42(24.4)	1.00 (参考)	
低分化	118(77.6)	34(22.4)	0.91 (0.55~1.52)△	0.678
TNM 分期☆				
0+Ⅰ+Ⅱ期	75(72.8)	28(27.2)	1.00 (参考)	
Ⅲ+Ⅳ期	173(78.3)	48(21.7)	0.77 (0.46~1.29)▼	0.275
淋巴结转移				
无转移	58(69.0)	26(31.0)	1.00 (参考)	
转移	190(79.2)	50(20.8)	1.695 (0.95~2.78)▲	0.067

* OR 及 95%CI 均经性别和年龄校正；☆肿瘤 TNM 分期根据 AJCC 制定的标准；△低分化与中高分化比较所得的相对危险度，G/T+T/T 与 G/G 比较；▼Ⅲ+Ⅳ期与 0+Ⅰ+Ⅱ期比较所得的相对危险度，G/T+T/T 与 G/G 比较；▲淋巴结转移与无转移比较所得的相对危险度，G/G 与 G/T+T/T 比较

基因 G894T 多态与冠心病、高血压、乳腺癌等相关。Mei K 等[7]学者研究结果提示 eNOS 通过介导产生 NO，可能影响肿瘤新生血管生成，并参与肿瘤的侵袭转移。林建银等[8]发现 eNOS 表达与胃癌进展程度呈正相关，血管/淋巴管内皮细胞上 eNOS 的阳性表达提示患者预后不良。eNOS 基因 G894T 多态是否参与了胃癌的发生发展，国内外未见相关研究。

3.2 eNOS G894T 多态与福建地区汉族人群胃癌发生发展的关系

本研究应用 PCR-RFLP 方法对福建地区胃癌患者和健康人进行了病例－对照研究，研究结果证实了中国福建汉族胃癌人群和对照组中 eNOS 基因 G894T 多态性的存在，其中 T/T 基因型极少，分别仅占 0.62%(2/324)和 0.5%(1/200)，两组基因型和等位基因频率分布差异无统计学意义(均 *P*>0.05)，将胃癌按 lauren 分类后，分别与对照组比较仍无明显差异，说明 eNOS 基因 G894T 多态性与胃癌的发生风险无关。将病例组按若干临床病理特征(包括分化、淋巴结转移和 TNM 分期)进行分层分析后，亦未发现组间基因型和等位基因频率分布的差异(均 *P*>0.05)，说明 eNOS 基因 G894T 多态性与胃癌的进展无关。

肿瘤(包括胃癌)的发生是一个多阶段和多步骤的积累过程，先前的研究提示基因多态性与胃癌遗传易感性的确存在一定程度的关系。但 eNOS 基因多态性与胃癌之间的关系此前未有研究。本文的首次研究结果表明，至少在中国福建汉族人群中 eNOS G894T 多态性并不参与胃癌的发生和发展。

参 考 文 献

[1] Marsden P A, Heng H H, Scherer S W, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene[J]. J Biol Chem, 1993, 268(23): 17478-17488.

[2] Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, et al. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786-->C and missense Glu298Asp variants[J]. J Investig Med, 2000, 48(5): 367-374.

[3] Tang W, Yang Y, Wang B, et al. Association between a G894T polymorphism of eNOS gene and essential hypertension in Hani and Yi minority groups of China[J]. Arch Med Res, 2008, 39(2): 222-225.

[4] 彭瑾瑜，彭怀燕，聂新民. 汉族人内皮型一氧化氮合酶基因 G894T 多态性与冠心病关系的研究[J]. 重庆医科大学学报，2009，34(1)：20-23.

[5] Schneider B P, Radovich M, Sledge G W, et al. Association of polymorphisms of angiogenesis genes with breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 111(1): 157-163.

[6] Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification[J]. Acta Pathol Microbiol Scand, 1965, 64: 31-49.

[7] Mei K, Cai X H, Du L, et al. Effect of nitric oxide derived from endothelial nitric oxide synthase on tumor angiogenesis[J]. Ai Zheng, 2010, 29(1): 32-37.

[8] 林建银，张 声，李 莉，等. 组成型一氧化氮合酶的表达与胃癌的侵袭转移和预后的关系[J]. 解剖学报，2002，33(4)：384-390.

(责任编辑：关蕴良)