基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1636-04

mdr1C3435T 基因多态性与卵巢癌遗传易感性关系研究

马丽芳[1],周 琦[1],徐建业[1],李少林[2]

(1.重庆市肿瘤研究所妇瘤科,重庆 400030;2.重庆医科大学基础医学院放射医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 mdr1 基因多态性与卵巢癌遗传易感性的关系。方法:采用病例对照,应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术分析 135 例经病理确诊的卵巢癌病人(病例组)和 146 例同一地区的健康汉族女性(对照组)的 mdr1C3435T 基因型进行对照研究。结果:卵巢癌病例组 C/C 型(30.37%)明显低于对照组(47.95%),而病例组 T/C 型(44.44%)和 T/T 型(25.19%)均明显高于对照组 T/C(38.35%)和 T/T(13.7%),病例组和对照组各基因表型之间差异有显著统计学意义(χ^2= 10.930,P= 0.004)。卵巢癌 mdr1C3435T 基因纯合缺失率(25.19%)高于对照组(13.7%),差异有统计学意义(χ^2 =5.961,P =0.015),与对照组相比,T/T 型患卵巢癌的危险度提高了 2.121 倍。mdr1C3435T 的基因纯合缺失型和非纯合缺失型在病例组与对照组间年龄比较差异均有明显统计学意义(P <0.05),其中在 50 岁以上年龄段,病例组与对照组 mdr1C3435T 的基因纯合缺失率差异有统计学意义(χ^2 =4.984,P =0.026),病例组(20.41%)高于对照组(5.1%),T/T 型患卵巢癌的危险度增加 2.533 倍。结论:mdr1C3435T 基因突变可增加卵巢癌发病风险,mdr1C3435T 基因多态性与卵巢癌遗传易感性密切相关。50 岁以上女性,T/T 型增加卵巢癌的发病风险。

【关键词】卵巢癌;mdr1C3435T 基因多态性;疾病遗传易感性

【中国图书分类法分类号】R730.54; R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-08

Association of single nucleotide polymorphism in mdr1C3435T with susceptibility to ovarian cancer

MA Li-fang, et al

(*Department of Gynecology, Chongqing Canner Research Institute*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the association of single nucleotide polymorphism in mdr1C3435T with susceptibility to ovarian cancer. ***Methods***: mdr1C3435T gene was determined by PCR- RFLP method in 135 ovarian cancer patients(cases group) and 146 healthy women(control group). Results: The frequency of C/C genotype in cases group (30.37%) was significantly lower than that in controls(47.95%), and the frequencies of T/C(44.44%)and T/T (25.19%) respectively in cases group were significantly higher than those in controls (T/C38.35%, T/T13.7%). The frequency of

作者介绍:马丽芳(1981-),女,硕士,研究方向:妇科肿瘤。

通讯作者:周 琦,女,教授,E-mail:qizhou9128@163.com。

基金项目:重庆市卫生局 2007 年度医学科研项目(编号:07-2-191)。

有潜在的临床意义。

参 考 文 献

[1] Tsai Y F, Shyu J F, Chen T H, et al. Effect of preoperative biliary drainage on surgical outcome after pancreaticoduodenectomy[J]. Hepatogastroenterology, 2006, 53(72): 823-827.

[2] Roggin K K, Kim J C, Kurkchubasche A G, et al. Macrophage phenotype during cholestatic injury and repair: the persistent inflammatory response[J]. J Pediatr Surg, 2001, 36(1): 220-228.

[3] Clements W D, Erwin P, McCaigue M D, et al. Conclusive evidence of endotoxemia in biliary obstruction[J]. Gut, 1998, 42(2): 293-299.

[4] Kountouras J, Billing B H, Scheuer P J. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cholestasis in the rat[J]. Br J Exp Pathol, 1984, 65 (3): 305-311.

[5] Duch B U, Andersen H L, Smith J, et al. Structural and mechanical remodeling of the common bile duct after obstruction[J]. Neurogastroenterol Motility, 2002, 14 (2): 111-122.

[6] Gujral J S, Liu J, Farhood A, et al. Functional importance of ICAM-1 in the mechanism of neutrophil-induced liver injury in bile duct-ligated mice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 286(3): 499-507.

[7] Hofmann A F. Cholestatic liver disease: pathophysiology and therapeutic options[J]. Liver, 2002, 22(2): 14-19.

[8] Li Z, Mizuno S, Nakamura T. Antinecrotic and antiapoptotic effects of hepatocyte growth factor on cholestatic hepatitis in a mouse model of bile-obstructive diseases [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(2): 639-646.

[9] Jonsson H, Peng S L. Forkhead transcription factors in immunology[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(4): 397-409.

[10] Ling L, Brody S L, Peng SL. Restraint of B cell activation by Foxj1-mediated antagonism of NF-kB and IL-6[J]. J Immunology, 2005, 175(2): 951-958.

[11] 刘祥德,何振平,梗阻性黄疸肾脏损伤机制实验研究[J].第三军医大学学报,2006,28(8):788-791.

(责任编辑:关蕴良)

mdr1C3435T null genotype in cases group(25.19%) was higher than that in control group(13.7%).Compared with controls, the susceptibility of ovarian cancer with the T/T genotype was increased by 2.121-fold.There was significant difference in frequency of mdr1C3435T null and nonnull genotype between cases and controls of average age(P<0.05). In more than 50 year age group, the frequency of *mdr1C3435T null genotype in cases*(20.41%)*was higher than that in controls*(5.1%). *Compared with controls*, the susceptibility to ovarian cancer with the T/T genotype was increased by 2.533-fold. *Conclusion*:mdr1C3435T gene mutation genotype could increase risk of ovarian cancer. mdr1C3435T polymorphism is an important risk factor for susceptibility to ovarian cancer. Age increases the risk of ovarian cancer.In women older than 50 years, T/T genotype increases the risk of ovarian cancer.

【Key words】Ovarian cancer; mdr1C3435T gene polymorphism; Genetic predisposition to disease

卵巢癌是女性生殖器官常见的恶性肿瘤之一，发病率仅次于宫颈癌居第二位，死亡率为妇科肿瘤的首位，对妇女健康造成严重威胁。到目前为止，就国内外临床资料统计，其五年生存率仅 25%~30%。卵巢癌的病因尚不清楚，与遗传易感性关系的研究也很少。P-糖蛋白(P-gp)是由多药耐药基因(mdr1)基因编码的、分子量为 170 kD 的跨膜运载体，它对药物在体内的分布和药物之间的相互作用起着重要的作用。mdr1 基因的变异可导致个体之间对药物敏感性和疾病易感性的差异[1]。本研究旨在探讨mdr1基因多态性与卵巢癌发病风险的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例来源 135 例卵巢癌病人(病例组)为 2007 年 3 月至 2008 年 8 月，在重庆市肿瘤医院诊治的重庆地区汉族病人，均有组织病理学确诊。年龄 26~79 岁，平均年龄 47.92 岁，中位年龄 48 岁。146 例健康汉族女性(对照组)，标本采自重庆市肿瘤医院体检正常人群，均为重庆地区汉族人，年龄 26~75 岁，平均年龄 43.75 岁，中位年龄 42 岁。所有研究对象均有知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 DNA 提取试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司，Taq 聚合酶及 *Mbo* Ⅰ内切酶购自大连宝生物工程公司，PCR 仪为 PE 2400，由美国 PE 公司生产，水平板电泳槽为北京六一仪器厂生产。

1.1.3 引物的设计及合成 引物设计参照相关文献[2]，其序列为：上游引物 P1 5'-TGTTTTCAGCTGCTTGATGC-3'，P2 5'-AAGGCATGTATGTTGGCCTC-3'由大连宝生物工程公司合成。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 提取 取 2%EDTA 抗凝的外周血 0.5 ml，按试剂盒操作说明进行。

1.2.2 PCR 扩增 参照 Carcorbi 等[2]的方法进行，略有改进。PCR 反应体系总体积为 50 μl，DNA 5μl，引物各 10 pmol，Taq 聚合酶 2.5 U。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min，94℃ 45 s，60℃ 30 s，72℃ 45 s，共 35 个循环，72℃延伸 5 min，25℃ 2 min。

1.2.3 RFLP 分析 (1)*Mbo* Ⅰ内切酶消化产物：取 10 μl PCR 反应产物，10×K buffer 2 μl，ddH_2O 8 μl，*Mbo* Ⅰ内切酶 1.5 U，37℃水浴过夜。(2)PCR 酶切产物分析：1)琼脂糖电泳：配制 2%琼脂糖，电泳 1 h 后溴乙锭染色，紫外光下观察结果。2)聚丙烯酰胺凝胶 DNA 水平电泳：①电泳槽的准备：用胶纸齐电泳槽两端封口，灌胶后迅速用封口膜罩住整个电泳槽，隔绝空气让凝胶聚合。②制胶：交联度 29:1，凝胶浓度 7.5%，40%过硫酸胺 70 μl，四甲基乙二胺(TEMED)30 μl，总量 10 ml。充分混匀后倒于微型水平板电泳槽，备用。③聚丙烯酰胺凝胶电泳：取 20 μl *Mbo* Ⅰ酶切消化产物，以溴酚蓝为指示剂，室温，80 V 恒压，电泳 90 min。(3)银染：参照 Ji YT 等[3]的方法进行。显色温度控制在 25℃效果较好。可用普通数码相机照像以保存结果。

1.2.4 统计学处理 数据分析采用 SPSS 11.5 统计软件进行处理。基因表型频率和基因频率采用基因计数法计算。比较用 t 检验和卡方检验。

2 结 果

2.1 mdr1C3435T 表型及基因频率分布

从表 1 可见观察值与理论值差异无显著性，说明其表型分布符合 Hardy-Weinberg 遗传定律。病例组和对照组各基因表型之间差异有显著统计学意义(χ^2= 10.930，P= 0.004)。

2.2 两组女性的 mdr1C3435T 基因多态性分析

如表 2 所示，卵巢癌 mdr1C3435T 基因纯合缺失率(25.19%)，高于对照组(13.7%)，2 组差异有显著性，有统计学意义(χ^2=5.961，P=0.015)。

2.3 mdr1C3435T 基因型的年龄分布

分别计算病例组与对照组 mdr1C3435T 基因型分布的平均年龄以及 mdr1C3435T 基因型的 2 组各年龄段的分布，进行统计学 t 检验和 χ^2 检验，详见表 3~5。

由表 3 可见，mdr1C3435T 的基因纯合缺失型和非纯合缺失型在病例组与对照组间年龄比较差

表 1 mdr1C3435T 表型及基因频率分布[例(%)]

		基因表型			基因频率			
		C/C	T/C	T/T	C	T	χ^2	P
病例组	观察数	41(30.37)	60(44.44)	34(25.19)	0.525 9	0.4741	0.955	0.620
	预期数	37(27.41)	68(50.37)	30(22.22)				
对照组	观察数	70(47.95)	56(38.35)	20(13.70)	0.6712	0.3288	1.095	0.578
	预期数	66(45.21)	64(43.84)	16(10.95)				
	χ^2		10.930					
	P		0.004					

表 2 病例组与对照组 mdr1C3435T 基因型分布比较[例(%)]

mdr1C3435T	病例组	对照组	OR(95%CI)
nonnull	101(74.81)	126(86.30)	2.121(1.151 ~ 3.908)
null	34(25.19)	20(13.70)	
χ^2	5.961		
P	0.015		

注:nonnull:基因非纯合缺失型,null:基因纯合缺失型

表 3 mdr1C3435T 在病例组与对照组的平均年龄比较

mdr1C3435T	病例组		对照组		t	P
	n	$\bar{x} \pm s$	n	s		
nonnull	101	47.01 ± 12.21	126	43.98 ± 9.20	2.134	0.034
null	34	50.62 ± 12.26	20	42.30 ± 9.08	2.634	0.011
t	1.488		0.758			
P	0.139		0.449			

表 4 mdr1C3435T 基因型的两组年龄段分布[例(%)]

mdr1C3435T		年龄分组		χ^2	P
		<5	>50		
病例	nonnull	61(45.19)	40(29.63)		
	null	14(10.37)	20(14.81)	3.805	0.051
对照	nonnull	93(63.70)	33(22.60)		
	null	15(10.27)	5(3.43)	0.013	0.910

表 5 大于 50 岁病例组与对照组 mdr1C3435T 基因型分布比较[例(%)]

mdr1C3435T	病例组	对照组	OR(95%CI)
nonnull	40(40.82)	33(33.67)	0.768(0.618 ~ 0.954)
null	20(20.41)	5(5.10)	2.533(1.038 ~ 6.180)
χ^2	4.984		
P	0.026		

异均有明显统计学意义(P<0.05),病例组及对照组基因纯合缺失型和非纯合缺失型间年龄的比较无统计学差异(t=1.488,P=0.139; t=0.758,P=0.449)。由表 4 可见,无论病例组或对照组,mdr1C3435T 的基因纯合缺失型和非纯合缺失型在各年龄段分布,差异均无统计学意义。由表 5 可见在 50 岁以上年龄段,病例组与对照组 mdr1C3435T 的基因纯合缺失率差异有统计学意义(χ^2 =4.984,P =0.026),病例组(20.41%)高于对照组(5.10%)。

3 讨 论

3.1 mdr1 基因的主要作用

mdr1 基因定位于染色体 7q21.1,包含 28 个内含子,mdr1mRNA 大小 4.7 kb,共编码 1 280 个氨基酸,编码的蛋白产物为 P-gp。P-gp 是分子量为 170

kD 的跨膜运载体,属于 ATP 连接盒超家族成员,它可介导药物外排作用增强。P-gp 在正常人体肝、肾、肠道、胎盘、血脑屏障、血睾屏障及淋巴细胞系和心脏内小动脉、毛细血管等部位均有表达。P-gp 分子上有多个药物结合位点,故其底物范围非常广泛。由于 P-gp 底物和分布的广泛性,在合用药物时,可能发生竞争性或非竞争性的药物相互作用,影响药动学过程,引起临床疗效的改变或产生毒性。mdr1 基因的变异可导致个体之间对药物敏感性和疾病易感性的差异。这种 mdr1 单核苷酸多态性(Single nucleotide polymonphism,SNPs)造成的 P-gp 将药物从细胞内转运到细胞外能力的差异,势必会影响药物的治疗效果。Eichelbaum 等[6]认为,P-gp 在药物的吸收,组织靶向作用和排除过程中是重要的决定因子,其表达和功能除与生理的和环境的因素有关外,还与 mdr1 基因的遗传多态性有关。

3.2 mdr1C3435T 基因多态性与卵巢癌发病风险

C3435T 是 26 位外显子上 3435 位点的 C 被 T 所替代,氨基酸的组成没有发生改变。Jamroziak 等[7]发现 mdr1C3435T SNPs 与儿童急性淋巴性白血病易感性及临床疗效有关。TT 基因型更具有发生该病的危险性,而 CC 基因型较其他型预后更差。有关 mdr1C3435T SNPs 与卵巢癌发病风险的关系目前尚未见报道,本研究结果显示卵巢癌 MDR1C3435T 基因表型的分布与对照组之间有显著差异(χ^2= 10.930, P=0.004),病例组 C/C 型(30.37%)低于对照组(47.95%),而病例组 T/C 型(44.44%)和 T/T 型(25.19%)均高于对照组 T/C(38.35%)和 T/T(13.7%),说明 mdr1C3435T 基因缺失使卵巢癌发病风险增加。

本研究结果还显示卵巢癌 mdr1C3435T 基因纯合缺失率为 25.19%,高于对照组 13.7%,两组差异有统计学意义(χ^2 =5.961,P =0.015),OR 值为 2.121 (1.151~3.908),提示 mdr1C3435T 基因纯合缺失使卵巢癌的发病风险增加了 2.121 倍,即 T/T 基因型增加了卵巢癌发病的危险性。

3.3 mdr1C3435T 基因多态性在不同年龄分布的意义

有学者提出,年龄可能与肿瘤发生危险性有一定关系。Kurzawski 等[8]对结肠癌患者与健康对照进行了 mdr1SNPs 分析,发现 50 岁前诊断为结肠癌的患者 3435TT 或 3435T 与健康对照相比,分别为 2.17 倍(P<0.05)或 1.7 倍(P<0.05),研究者认为对小于 50 岁的患者进行 mdr1C3435T SNPs 分析可能是一个合适的评价结肠癌危险性的方法。本研究显示,mdr1C3435T 的基因纯合缺失型在病例组平均年龄(47.01 岁)高于对照组(43.98 岁),差异有统计学意义(t=2.134,P =0.034);非纯合缺失型在病例组平均年龄(50.62 岁)高于对照组(42.30 岁),差异有统计学意义(t=2.634,P =0.011)。其中在 50 岁以上年龄组,病例组基因纯合缺失率(20.41%)明显高于对照组(5.1%),差异有统计学意义(χ^2=4.984,P =0.026),与对照组相比,T/T 型者患卵巢癌的危险度增加 2.533 倍。提示随年龄增大,卵巢癌患病风险将增加,对于 50 岁以上女性,T/T 型可增加卵巢癌的发病风险。

近年来,随着手术技巧的提高,新型化疗药物的问世给卵巢癌的治疗带来多重生机,但 5 年生存率并无明显提高,其重要原因是没有敏感的患病风险监测和早期诊断方法,本研究提示可以通过基因检测,筛选易感人群,为卵巢癌早期诊断提供条件。

参 考 文 献

[1] Wang D X, Wolfgang S.Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1(MDR1)[J].The AAPS Journal, 2006, 8(3): 61.

[2] Carcorbi I, Gerloff T, Johne A, et al.Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects[J]. Clin Pharmacol Ther, 2001, 69(3): 169-174.

[3] Ji Y T, Qu C Q, Cao B Y.An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels[J]. Electrophoresis, 2007, 28(8): 1173-1175.

[4] Gottesman M M, Fojo T, Bates S E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(1): 48-58.

[5] Jin S, Zhong G H, Gang C, et al.Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction[J].Med Sci Monit, 2004, 10(1): 5-14.

[6] Eichelbaum M, Fromm M F, Schwab M. Clinical aspects of the MDR1 (ABCB1) gene polymorphism[J].Ther Drug Monit, 2004, 26(2): 180-185.

[7] Jamroziak K, Mlynarski W, Balcercazk E, et al.Funtional C3435T polymorphism of MDR1 gene: an impact on genetic susceptibility and clinical outcome of children acute lymphoblastic leukemia[J]. Eur J Haematol, 2004, 72(5): 314-321.

[8] Kurzawski M, Drozdzik M, Sucky T, et al.Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in colon cancer patients[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2005, 61(5-6): 389-394.

[9] Kafka A, Saner G, Jaeger C, et al. Polymorphism C3435T of the MDR1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer[J].Int J Oncol, 2003, 22(5): 1117-1121.

(责任编辑:冉明会)