DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.013

论著

文章编号:1000-5404(2003)19-1714-04

重庆地区人群 GSTT1 和 GSTM1 基因多态性与结直肠癌易感性研究

黄 萍[1],周紫垣[1],刘晋[illegible],马恒太[1],周燕虹[1],葛海燕[2],余佩武[3],Toshiro Takezaki[4],曹 佳[1] (第三军医大学:[1]军事预防医学院卫生毒理学教研室,重庆 400038;[2]附属新桥医院普通外科,重庆 400037;[3]附属西南医院普通外科,重庆 400038,[4]Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya, Japan)

提 要:目的 了解谷胱苷肽转硫酶GSTT1和GSTT1基因多态性与结直肠癌易感性的关系。方法 采用多重PCR技术对82例病例和82例对照GSTT1、GSTM1基因型进行了检测和分析。结果 GSTM1基因缺失频率在病例组和对照组之间有显著差异($P<0.01$, $OR=2.464$, 95%$CI=1.311\sim4.633$)。GSTM1和GSTT1基因同时缺失的个体在病例组和对照组之间有差异($P<0.05$, $OR=2.476$, 95%$CI=1.046\sim5.861$)。结论 GSTM1基因缺失可能是结直肠癌发生的易感基因型。GSTT1基因单独缺失与结直肠癌发生的危险性不相关,但在GSTM1缺失基础上再伴有GSTT1基因缺失的个体,患结直肠癌的危险性将会增加。

关键词:结直肠癌;谷胱甘肽硫转移酶;基因多态性;易感性;病例-对照研究
中图法分类号:R181.3;R735.3;R394 文献标识码:A

GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and colorectal cancer susceptibility in Chongqing people

HUANG Ping, ZHOU Zi-yuan, LIU Jin-yi, MA Heng-tai, ZHOU Yan-hong, GE Hai-yan, YU Pei-wu, Toshiro Takezaki, CAO Jia (Department of Hygiene Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the relationship between GSTM1 and/or GSTT1 polymorphisms and colorectal cancer susceptibility. Methods Multiplex PCR was used to analyze the polymorphisms of GSTT1 and GSTM1 genotypes in 82 cases and 82 controls. Results The frequency of the null GSTM1 genotype in patients showed a statistically significant increase as compared to that in the controls ($P<0.01$, $OR=2.464$, 95%$CI=1.311-4.633$). Significant difference in the frequency of null genotypes of both GSTM1 and GSTT1 was found between the cases and the controls ($OR=2.476$, 95%$CI=1.046-5.861$). Conclusion GSTM1 null genotype may be a genetic susceptibility factor for colorectal cancer. Individuals with only GSTT1 null genotypes are not associated with colorectal cancer, but those with both GSTT1 and GSTM1 null genotypes may be associated with an increased susceptibility to colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer; glutathione-S-transferase; genetic polymorphism susceptibility; case-control study

结直肠癌是消化道常见恶性肿瘤之一。近年来的大量流行病学研究表明结直肠癌是一种与营养膳食结构和饮食习惯密切相关的肿瘤疾病。食物在体内要经过复杂的生物转化,一些有毒化合物或中间产物需要通过解毒作用而排出体外[1]。谷胱甘肽转硫酶(Glutathione-S-transferase, GSTs)属于解毒酶超家族,是体内重要的解毒酶系,它可直接与亲电子化合物反应,增加其水溶性而有利于排出体外,从而达到解毒的目的[2]。GSTμ和/或GSTθ基因编码GSTM1和GSTT1两种重要酶,其等位基因缺失被认为是不同人群易感结直肠癌的重要遗传危险因子。有报道认为上述代谢酶基因多态性,决定了不同人群对食物中毒素代谢的不同。并认为这种多态性与胃癌[3]、膀胱癌[4]、肺癌[5]等多种肿瘤的易感性相关,而GSTT1和GSTM1基因缺失与结直

基金项目:日本文部省优先资助领域C科研基金资助项目(12218242)
作者简介:黄 萍(1975-),女,江苏省南京市人,硕士研究生,助教,主要从事肿瘤遗传学方面的研究。电话:(023)68752295。作者原单位:第四军医大学秦都口腔医学院检验科,西安 710032
通信作者:曹 佳,电话:(023)68752271;E-mail:caojia@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-05-13;修回日期:2003-08-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

肠癌的研究尚属初步阶段。对此, 我们对重庆地区的 GSTT1 和 GSTM1 基因遗传多态性与结直肠癌的相关性进行了初步研究。

1　材料与方法

1.1　研究对象

本研究为中、日、韩国际合作项目, 统一采用病例-对照研究方法进行研究。纳入本研究的病例与对照按 1∶1 配对共 82 例, 其中男性和女性分别为 47 例和 35 例。病例和对照均来自第三军医大学附属西南医院和新桥医院。病例全部为新发 6 个月内入院的结直肠癌患者, 由病理学诊断确诊, 纳入研究时均为第 1 次就诊未经任何化疗和放疗。对照的纳入条件是: ①与病例性别相同; ②与病例年龄相差小于 5 岁; ③非肿瘤患者并且无慢性疾病和营养代谢性疾病; ④与病例来自同一居住地(本研究控制在同一地及地区); ⑤与病例无血缘关系。病例组男性平均年龄为 51.4 岁, 女性平均年龄为 53.0 岁; 对照组男性平均年龄为 51.7 岁, 女性平均年龄为 51.8 岁。病例组与对照组年龄无差异。本研究使用中、日、韩国际合作小组统一设计的半定量食物频数调查表(Semi-quantitative food frequency questionnaire, SQFFQ), 内容包括个人生活习惯、详细饮食摄入情况、肿瘤遗传史等。从血凝块中提取 DNA, 具体方法参见文献[6]。DNA 保存于－20 ℃冰箱中备用。

1.2　试剂

反应的引物全部由上海 Sangon 公司合成。*Taq* 酶、dNTP 及 PCR 反应体系也均为 Sangon 产品。

1.3　GSTM1、GSTT1 基因型分析

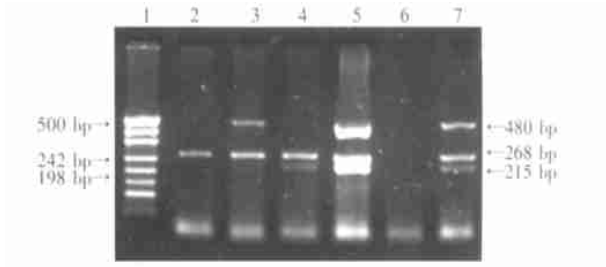
采用多重 PCR 的方法检测 GSTM1、GSTT1 基因缺失情况。50 μl 扩增体系: 200～300 ng 基因组 DNA, GSTM1、GSTT1 引物各 25 pmol, 同时扩增β-globin 基因作为内对照。2 mmol/L $MgCL_2$, 0.2 mmol/L dNTP, 2.5 U *Taq* 酶。引物序列[7]见表 1。

表 1　PCR 反应中的引物序列与扩增片段大小

Tab 1　Primer sequence and amplification fragment length used in the PCR reactions

Polymorphic gene		Sequence	Length
GSTT1	Sense	5′-TCT CCT TAC TGG TCC TCA CAT CTC-3′	480 bp
	Antisense	5′-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3′	
GSTM1	Sense	5′-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3′	215 bp
	Antisense	5′-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3′	
β-GLoBIN	Sense	5′- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3′	268 bp
	Antisense	5′-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3′	

PCR 反应条件为: 95 ℃ 5 min 预变性; 36 个循环: 94 ℃ 60 s, 58 ℃ 60 s, 72 ℃ 60 s; 72 ℃延伸 5 min, PCR 反应在 PE 9600 型 PCR 仪上进行。取 10 μl PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳(5 V/cm, EB: 250 ng/ml), 在紫外灯下观察条带位置, 电泳图谱见图 1。DNA 样品经 PCR 扩增后产生 215 bp 和 480 bp 片段者为 GSTM1(＋)和 GSTT1(＋), 而无相应的扩增产物者为纯和子缺失(即空白基因型), 分别为 GSTM1(－)和 GSTT1(－)。



1: DNA Marker; 2: β-globin; 3: β-globin, GSTT1; 4: GSTM1, β-globin; 5: GSTM1, β-globin, GSTT1; 6: Negative control; 7: Positive control GSTM1, β-globin, GSTT1

图 1　多重 PCR 方法检测结直肠癌患者 GSTT1 和 GSTM1 基因缺失情况

Fig 1　Detection of GSTT1 and GSTM1 genotype in colorectal cancer with mutiplex PCR

1.4　统计学分析

应用 SPSS10.0 统计软件对实验数据进行统计分析: ①χ^2 检验用于确定 GSTT1 和 GSTM1 基因型在病例组与对照组中分布差异的显著性。②比值比(*OR*)和 95% 可信区间(95% *CI*)用于评价研究因素与结直肠癌的相关强度。

2　结果

2.1　基因型的分布情况

本研究采用了多重 PCR 技术同时扩增 GSTT1、GSTM1 基因分析其多态性与结直肠癌易感性之间的关系。每个基因的扩增结果见表 2。病例组 GSTM1 基因缺失频率明显高于对照组, 差异非常显著 ($P<0.01$); 病例组 GSTT1 基因缺失频率与对照组无差异($P>0.05$)。

表 2　结直肠癌病人与对照组 GSTM1 和 GSTT1 基因型比较

Tab 2　Comparison of GSTT1 and GSTM1 genotypes among colorectal cancer affected and control population

Genotype	Case(%)	Control(%)	*OR*	95% *CI*	*P*
GSTM1(－)	46(56.0%)	28(34.1%)	2.464	1.311～4.633	$P<0.01$
GSTM1(＋)	36(44.0%)	54(65.9%)			
GSTT1(－)	41(50.0%)	40(48.9%)	1.050	0.569～1.937	$P>0.05$
GSTT1(＋)	41(50.0%)	42(51.1%)			

2.2　GSTM1 基因型和 GSTT1 基因型之间交互作用分析

从表 3 我们可以看到携带 GSTM1(－)和 GSTT1(＋)基因型者与携带 GSTM1(＋)和 GSTT1(＋)基因型者相比较在病例与对照之间无差异($P>0.05$), 携带 GSTM1(＋)和 GSTT1(－)基因型者与携带 GSTM1(＋)和 GSTT1(＋)基因型者在病例与对照之间相比较也无差异性($P>0.05$)。而携带 GSTM1(－)和 GSTT1(－)基因型者与携带 GSTM1(＋)和 GSTT1(＋)基因型者相比较在病例与对照之间有显著差异($P<0.05$, *OR*＝2.476, 95% *CI*＝1.046～5.861)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 3 结直肠癌病人与对照组 GSTT1/GSTM1 基因型联合作用分析

Tab 3 The analyses of GSTT1 and GSTM1 combinations among colorectal cancer affected and control populations

Genotype	Case(%)	Control(%)	*OR*	95%*CI*	*P*
GSTM1(+)/GSTT1(+)	21(25.6%)	28(34.1%)	1.0		
GSTM1(−)/GSTT1(+)	20(24.4%)	14(17.1%)	1.905	0.785~4.624	>0.05
GSTM1(+)/GSTT1(−)	15(18.3%)	26(31.7%)	0.769	0.328~1.801	>0.05
GSTM1(−)/GSTT1(−)	26(31.7%)	14(17.1%)	2.476	1.046~5.861	<0.05

3 讨论

目前普遍认为，结直肠癌的发生与营养膳食结构和饮食习惯密切相关。摄入过多“三高”食物（高脂肪、高蛋白、高热量）被认为是结直肠最重要的发病因素，而蔬菜、纤维以及水果被认为是结直肠癌的保护因子[8]。在西方发达国家结直肠癌发病率已居第三位[9]。在我国，随着经济的发展和人们生活水平的不断提高而带来的饮食结构的改变，结直肠癌的发病率正在逐年上升，结直肠癌调整死亡率已列恶性肿瘤第五位[10]。食物在体内分解过程中会产生部分有毒化合物，其在体内的代谢有两条途径：一是经过Ⅰ相代谢酶，如细胞色素氧化酶系（CYP450）代谢活化为终致癌物（亲电子物质）后，再与 DNA 等大分子结合启动致癌过程；另一条途径则由Ⅱ相代谢酶，如谷胱苷肽转硫酶系催化谷胱甘肽与亲电子物质结合，将之转化为亲水性物质，经尿液或胆汁排除体外，这一过程为解毒反应。GST 是体内重要的解毒酶超家族，有四种同工酶：α，μ，π，θ。其中 GSTμ，GSTθ 分别为 GSTM1 和 GSTT1 所编码。GSTM1 和 GSTT1 基因具有多态性，基因的改变可使 GST 活性降低或底物特性改变，可导致机体对一些致癌物作用的敏感性增高。

通过对 82 例结直肠癌患者和 82 例对照进行 GSTT1 和 GSTM1 基因型检测，我们首次报道了重庆地区人群中 GSTT1 和 GSTM1 基因的缺失频率。GSTM1 基因缺失频率在对照和结直肠癌病例中分别 34.1% 和 56.0%，GSTT1 基因缺失频率在对照和结直肠癌病例中分别为 48.9% 和 50.0%。文献[11，12] 报道的不同地区的正常华人 GSTM1 基因缺失频率为 41%～60%，GSTT1 基因缺失频率范围为 53%～64%[13]。我们所报道的重庆正常人群 GSTM1 基因缺失频率和 GSTT1 基因缺失频率均略低于文献报道的水平。这可能是由地理差异和环境因素不同暴露导致的。同处于亚洲的韩国人 GSTT1 和 GSTM1 基因缺失的频率分别为 60% 和 52%[14]，日本人 GSTT1 和 GSTM1 基因缺失的频率分别为 44% 和 41%～51%[11]，这一结果说明了不同人种 GSTT1 与 GSTM1 基因多态性也存在一定差异，而在国内不同地区 GSTT1 和 GSTM1 基因缺失的频率也存在较大差异。据报道：上海为 49.32% 和 48.86%[13]，东北与河南地区为 49% 和 57%[14]。

由表 2 我们可以看到 GSTM1 基因缺失型在结直肠癌病例组显著高于对照组（$P<0.01$），提示 GSTM1 基因缺失可导致患结直肠癌的易感性增高。而 GSTT1 缺失基因型在结直肠癌病例组与对照组无差异。表 3 基因联合作用分析发现携带 GSTM1（−）和 GSTT1（−）基因型者发生结直肠癌的危险性与携带 GSTM1（+）和 GSTT1（+）基因型者相比较有差异（$P<0.05$），而携带 GSTM1（+）/GSTT1（−）基因型或 GSTM1（−）和 GSTT1（+）基因型者与 GSTM1（+）和 GSTT1（+）基因型携带者相比较，发生结直肠癌的危险性无差异（$P>0.05$）。

我们的研究结果显示 GSTM1 纯合子缺失可能与结直肠癌易感性有关（$OR=2.464$），即 GSTM1 基因可能是结直肠癌发病的保护因素之一。但 GSTT1 基因单独缺失的个体不会增加患结直肠癌的危险性（$OR=1.050$），说明单个 GSTT1 基因缺失尚不足以增加患结直肠癌的危险。但当 GSTM1 与 GSTT1 基因同时发生缺失时个体患结直肠癌的危险性增加（$OR=2.476$）。其机制可能是 GSTM1 对致癌物多环芳烃环氧化物有很强的解毒作用，代谢酶基因等位基因缺失以及酶活力的改变，可导致宿主对一些毒物和致癌物的敏感性增高。单独 GSTT1 基因非缺失型者，因其大肠组织具有 GSTT1 酶的活性，可使结直肠癌的前致癌物活化[15]，从而亦增加了对结直肠癌前致癌物的易感性。而当 GSTM1 与 GSTT1 基因同时发生缺失时可能因为两个基因的协同作用导致 GST 活性进一步降低，从而亦导致宿主对一些毒物和致癌物的敏感性增高，增加了机体患癌易感性的增加。

国内外已有多项研究探讨了 GSTM1、GSTT1 基因多态性与肿瘤的关系，但与结直肠癌研究结果报道不一。Zhong 等[16] 报道 GSTM1 基因缺失与结直肠癌发病相关，Inouea[17] 和周建农[12] 的报道却未能证实 GSTT1 基因和 GSTM1 基因多态性与结直肠癌易患性的相关性。由于个体对环境致癌物的暴露因素及暴露程度不同，以及不同种族、地区之间的差异，所以大量文献报道结果有差异。下一步我们还将结合膳食结构、生活习惯等其它暴露因素进一步分析 GSTT1 和/或 GSTM1 基因多态性与结直肠癌的交互作用机制。

参考文献：

[1] Miller M C, Mohrenweiser H W, Bell D A. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants[J]. Toxicol Lett, 2001, 120(1-3): 269—280.

[2] Eaton D L, Bammler T K. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology[J]. Toxicol Sci, 1999, 49(2): 156—164.

[3] Saadat I, Saadat M. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

and the risk of gastric and colorectal cancers[J]. Cancer Lett, 2001, 169(1): 21—26.
[4] Lee S J, Cho S H, Park S K, *et al*. Combined effect of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes on bladder cancer risk[J]. Cancer Lett, 2002, 177(2): 173—179.
[5] Stewart V N, Vaughan T L, Stapleton P, *et al*. A population-based study of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 genotypes and risk for lung cancer[J]. Lung Cancer, 2003, 40(3): 247—258.
[6] 钮菊英, 沈洪兵. 从血凝块中提取染色体 DNA 的方法及其应用[J]. 南京医科大学学报, 2000, 20(5): 389—390.
[7] Wilson M H, Grant P J, Hardie L J, *et al*. Glutathione S-transferase M1 null genotype is associated with a decreased risk of myocardial infarction[J]. FASEB J, 2000, 14(5): 791—796.
[8] Potter J D. Colorectal cancer: molecules and populations[J]. J Nat Cancer Inst, 1999, 11(91): 916—930.
[9] Parkin D M. Global cancer statistics in the year 2000[J]. Lancet Oncol, 2001, 2(9): 533—543.
[10] 李连弟, 鲁凤珠, 张思维, 等. 中国恶性肿瘤死亡率 20 年变化趋势和近期预测分析[J]. 中华肿瘤杂志, 1997, 19(1): 3—9.
[11] Cotton S C, Sharp L, Little J, *et al*. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: A HuGE review[J]. Am J Epidemiol, 2000, 151(1): 7—32.
[12] 周建农, 许发培, 李忠佑, 等. 谷胱甘肽转硫酶 T1 和 M1 多态性与大肠癌易患性关系研究[J]. 江苏临床医学杂志, 2000, 4(2): 90—91.
[13] Shen J, Lin G, Yuan W, *et al*. Glutathione transferase T1 and M1 genotype polymorphism in the normal population of Shanghai[J]. Arch Toxicol, 1998, 72(7): 456—458.
[14] 冷曙光, 宋文佳, 王雅文, 等. 中国汉族人口三种谷胱甘肽 S 转移酶基因多态性分析[J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35(3): 159—162.
[15] 黄 萍. 结直肠癌相关基因改变的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2003, 30(1): 44—48.
[16] Zhong S, Wyllie A H, Barnes D, *et al*. Relationship between GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer[J]. Carcinogenesis, 1993, 14(9): 1821—1824.
[17] Inoue H, Kiyoharaa C, Marugame T, *et al*. Cigarette smoking, CYP1A1 MSP I and GSTM1 genotypes, and colorectal adenomas[J]. Cancer Res, 2000, 60(14): 3749—3752.

（编辑 汪勤俭）

文章编号: 1000-5404(2003)19-1717-01

个案与短篇

流式细胞仪对缺氧条件下大鼠肺动脉平滑肌细胞周期和细胞凋亡的测定

Determination of cell cycle and apoptosis of rat pulmonary arterial smooth muscle cells in hypoxia by flow cytometry

陈兆珍, 傅晓岚 （第三军医大学高原军事医学系中心实验室, 重庆 400038）

慢性阻塞肺病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)发展的一个重要病理进程就是肺血管结构改造, 表现为动脉平滑肌细胞异常的增生肥大, 导致血管中膜增厚血管肌化, 成纤维细胞增殖等变化。各种病因作用于机体最终导致缺氧。本实验通过培养大鼠肺动脉平滑肌细胞(Pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMC)来进行缺氧处理, 可以从细胞水平上探明缺氧在 COPD 中的作用。本实验是利用流式细胞技术对通过缺氧处理的培养 ASMC 细胞进行细胞周期和细胞凋亡可以方便快捷地检测各种细胞参数。

1 材料和方法

ASMC 细胞由新桥医院呼吸内科研究所提供。

细胞周期和细胞凋亡测定分常氧组, 低氧 12、24、48 h 组, 用流式细胞仪(FACsata, Decton dickinson 公司, USA), 用碘化丙啶 PI (Propidium iodielg)测定细胞周期 DNA 含量, PI 是一种插入性荧光染料, 能嵌入双链核酸(DNA、RNA)的碱基上。经 RNA 酶的消化处理后, PI 可以对 DNA 进行特异性染色。在 488 nm 的激发下, 发出 603～610 nm 的红光。结果采用总体率假设检验。

样品制备: 将培养细胞用 0.25% 胰酶消化 3～7 min, 弃去消化液, 加 PBS 液用吸管反复吹打, 使其成为单细胞悬液。并移入离心管中。1 000～1 500 r/min 离心 5 min, 去上清液, 留沉淀物 0.5 ml, 用振荡器使细胞分散。用吸液器或注射器将细胞注入 70% 冷乙醇中固, 至少固定 18 h, 最长可固定数月之久。有条件的可将细胞计数为 1×10^6 细胞/样品。测试前取用 70% 乙醇固定的细胞悬液。1 500 r/min 离心, 去固定液, 用 PBS 洗 1～2 次。加 RNA 酶 100 μl(50 μg/ml) 37 ℃恒温水浴消化 30 min, 立即放入冰浴中终止 RNA 酶的作用。加 1 ml PI 染液(50 μg/ml) 4 ℃避光。30 min 后上机测定。

统计学方法: 采用 χ^2 检验。

2 结果

缺氧对 ASMC 细胞周期及细胞凋亡的作用见表 1。流式细胞仪检测显示, 缺氧 12 h 细胞增殖指数明显增加, 缺氧 24 h 和 48 h 增殖指数虽保持在一个高水平上, 并且呈逐渐下降的趋势。细胞凋亡缺氧可使 ASMC 的细胞凋亡逐渐增加($P<0.01$)。

表 1 缺氧对 ASMC 细胞周期和细胞凋亡的影响

组别	细胞增殖指数(S+G_2/M)	细胞凋亡数
常氧组	32.65	3.7
缺氧 12 h	57.87	5.6
缺氧 24 h	56.67	7.67
缺氧 48 h	54.98	10.1

（下转 1721 页）

作者简介: 陈兆珍(1957—), 男, 山东省章丘市人, 实验师, 主要从事仪器分析方面的研究, 发表论文 10 余篇。电话: (023) 68752330

收稿日期: 2002-01-14; 修回日期: 2002-06-12

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net