

广西肝癌家族 CYP3A5 基因多态性的研究[▲]

李永标 胡洪波 唐超莉 秦胜军 吴晓秋

(广西崇左市人民医院,崇左市 532200, E-mail: Liyongbiao@sohu.com)

【摘要】 目的 探讨 CYP3A5 基因多态性与广西肝癌遗传易感性的关系。**方法** 在广西肝癌高发区选取 18 个肝癌高发家族成员 178 例(高发组)及与之相对应的 18 个无肿瘤家族成员 178 例(对照组)为研究对象,用流行病学问卷调查方法收集两组相关资料,同时现场采集空腹外周静脉血 10 ml,用多聚酶链-限制性片段长度多态性技术(PCR-RFLP)检测 CYP3A5 基因型。**结果** 高发组 GG 基因型比例低于对照组($P < 0.01$), GA + AA 基因型比例高于对照组($P < 0.05$)。高发组 A 等位基因比例高于对照组($P < 0.05$)。**结论** CYP3A5 基因多态性与广西肝癌的遗传易感性密切相关。

【关键词】 肝癌;CYP3A5;基因多态性;遗传易感性;广西

【中图分类号】 R 735.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2014)09-1199-03

DOI:10.11675/j.issn.0253-4304.2014.09.03

A Study on Gene Polymorphism of Cyp3a5 in Guangxi Liver Cancer Family

Li Yong-biao, HU Hong-bo, TANG Chao-li, QIN Sheng-jun, WU Xiao-qiu

(The People's Hospital of Chongzuo City, Chongzuo 532200, China)

【Abstract】 Objective Objective To investigate the relationship between genetic polymorphism of CYP3A5 and genetic susceptibility of hepatocellular carcinoma(HCC) in Guangxi. **Methods** One hundred and seventy-eight cases were collected from 18 HCC area of the high HCC incidence in Guangxi as high-risk group, and another 178 cases from 18 families with non-tumor history as control group. The relevant data of two groups were obtained through the epidemiological questionnaires. Concurrently, 10 ml fasting peripheral blood was collected. The genotype of CYP3A5 was analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP). **Results** The genotype ratio of GG was lower but of GA + AA was higher in the high-risk group in contrast with those in the control group($P < 0.05$). There was statistical difference in the A allele ratio between high-risk group and control group($P < 0.05$). **Conclusion** The gene polymorphism of CYP3A5 is closely associated with genetic susceptibility of HCC in Guangxi.

【Key words】 Liver cancer;CYP3A5;Gene polymorphism;Genetic susceptibility;Guangxi

目前肝癌在恶性肿瘤中发病率居第 5 位,死亡率居第 3 位,仅次于肺癌和胃癌^[1]。广西是我国主要的肝癌高发地区。原发性肝癌的病因和发病机制尚未完全肯定,可能与多种因素的综合作用有关。流行病学调查普遍认为肝癌的发生与乙型肝炎病毒、黄曲霉毒素、饮酒等因素有关,同时肝癌家族具有 HBV 感染及肝癌高发倾向性^[2]。因此,肝癌的发生与环境因素有关,同时也与遗传有关联,在一定程度上与个体间基因型的遗传多态性差异有关。

CYP3A 家族成员(主要包括 CYP3A4 和 CYP3A5)既参与黄曲霉毒素 B1 活化,生成具有 DNA 结合活性的活性代谢产物黄曲霉毒素环氧化物,又参与黄曲霉毒素 B1 的 I 相解毒,生成无遗传毒性的代谢产物黄曲霉毒素 Q1^[3]。CYP3A5 与肿瘤发生的研究越来越多,

其原因是 CYP3A5 可活化前致癌物、致突变物。研究表明^[4],大多数化学致癌物需经代谢活化后才表现致癌性,被活化后的致癌物称终致癌物。终致癌物通常有亲电子性,能与 DNA 分子起作用,这种 DNA 的修饰如发生在原癌基因或肿瘤抑制基因,则很可能诱发肿瘤。因此 CYP3A5 被发现与各种肿瘤的遗传易感性有关。

本研究选取肝癌高发家族成员及相对应的无肿瘤家族成员为研究对象,从家系的角度出发,采用现场流行病学调查与分子生物学实验相结合的方法,分析 CYP3A5 基因型及等位基因的分布频率,以探讨其与原发性肝癌遗传易感性的潜在关系,从遗传易感性方面探讨原发性肝癌发生的内在原因。

▲基金项目:广西医药卫生科研课题(Z2011093);广西崇左市科学研究与技术开发计划项目(2011001)

作者简介:李永标(1976~),男,硕士,副主任医师,研究方向:肿瘤基础与临床、肿瘤流行病学。

1 资料和方法

1.1 肝癌高发家族及对照组选择标准 本研究中的肝癌高发家族定义是指在先证者的血缘直系亲属成员中,至少还有1例(或1例以上)的肝癌患者,要求所有肝癌患者均分布在三代之内(含先证者)。本研究中的对照家族是指与肝癌高发家族居住在同一个村庄(街道),家庭成员构成与经济状况相似的家族,要求两组间无血缘关系。并且对照家族中的家庭成员(包括已故)未出现过癌症死亡或癌症现症病例,调查范围不小于三代。

1.2 研究对象 按上述高发家族及对照家族的标准,于2010年5月至2011年11月在广西崇左市江州区及扶绥县肝癌高发现场,基于人群的肿瘤登记资料中确定先证者(均有医院病理诊断),首先对其家族成员进行知情同意签字及流行病学问卷调查,要求以先证者为核心将其一、二、三级亲属列入研究对象[一级亲属为先证者的父母、子女以及兄弟姐妹(同父母);二级亲属为先证者的叔、伯、姑、舅、姨、祖父母、外祖父母;三级亲属为先证者的表兄妹或堂兄妹]。共选取了18个肝癌高发家系作为高发家族组共178例。按照对照组的标准在每个肝癌高发家族所在的自然村(街道)对应选取1个无肿瘤家族作为对照组,要求其家庭成员构成与高发组相似,共选取18个对照家族共178例。所有研究对象均要求为壮族人口,在当地居住时间不少于10年。

1.3 流行病学调查方法及内容 根据问卷调查表对所有研究对象进行入户面对面调查,流行病学问卷调查表内容包括:调查对象的一般情况(性别、年龄、教育程度及婚姻状况等)、吸烟史、饮酒史、饮水类型(池塘水或自来水等)、饮食情况、肝病史、乙肝病毒暴露史及恶性肿瘤家族史等共40项指标。

1.4 CYP3A5 基因分型检测

1.4.1 仪器和试剂:采用北京博奥生物有限公司 Sequenom Mass ARRAY SNP 基因型分析技术。芯片点样采用 SEQUENOM 公司 MassARRAY Nanodispenser RS1000 点样仪;质谱检测及分析使用 SEQUENOM 公司 MassARRAY Analyzer Compact 系统。使用 Promega 公司 Wizard Genomic DNA purification Kit 提取基因组 DNA。SNP 分型检测的主要试剂均购自 SEQUENOM 公司的 iPLEX[®] Gold Reagent Kit,该试剂盒内包含 5 U/L Hotstar Taq 及 buffer、25 mM dNTP、1.7 U/l SAP (shrimp alkaline phosphatase) 及 buffer, iPLEX 酶, iPLEX 延伸混合物,纯化树脂及 SpectroCHIP 质谱芯片。

1.4.2 DNA 提取:按 Promega 公司 Wizard Genomic DNA purification Kit 试剂盒提取基因组 DNA。

1.4.3 S 基因型检测:采用聚合酶链反应-限制性片

段长度多态性技术(PCR-RFLP)检测基因型。引物由上海英骏生物公司合成。CYP3A5 上游引物:5'-CTT TAA AGA GCT CTT TTG TCT CTC A-3';下游引物:5'-GAA CAG TTA CTC ACA GAT AGA GGA GTA TC-3'。扩增片段长度为 200 bp,采用 10 μ l 的反应体系。CYP3A5 反应混合物循环条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 15 min;接着 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,和 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,进行 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min。将 PCR 产物纯化,SAP 纯化体系采用 7 μ l 体系,37 $^{\circ}$ C 反应 40 min,85 $^{\circ}$ C 反应 5 min。随后进行单碱基延伸,延伸反应为 9 μ l 体系。单碱基延伸由 2 阶段双循环组成,每 40 个周期大循环均需在 52 $^{\circ}$ C 退火 5 s 及 80 $^{\circ}$ C 扩展 5 s 进行 5 个小循环,然后返回 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s 并进入下一大循环。总循环数为 5 \times 40 = 200 循环。每个延伸反应产物用 6 mg Clean Resin 树脂纯化。将纯化产物移至 384 孔 Spectro CHIP 芯片上,上机测定。Spectro CHIP 芯片使用 ALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析,检测结果使用 TYPER 4.0 软件分型并输出结果。

1.5 统计学分析 采用统计软件 SPSS 13.0 对本研究数据进行相关分析及统计。两组间的 CYP3A5 基因型和等位基因分布比较用 χ^2 检验,计算相对危险度(OR)及其 95% 可信区间(95% CI)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床资料比较 共收集到广西西南地区肝癌高发家系 18 个 178 例及相应对照无癌家系 18 个 178 例,所有研究对象均为壮族农村人口。高发组和对照组在性别、年龄构成、吸烟、主食玉米方面比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。高发组 HBsAg 阳性率显著高于对照组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组临床资料比较(n,%)

项目	高发组 (n=178)	对照组 (n=178)	χ^2 值	P 值
性别	男性	107(60.1)	0.766	0.381
	女性	71(39.9)		
年龄(岁)	0~	48(27.0)	5.162	0.076
	20~	63(35.4)		
	40~	67(37.6)		
吸烟	有	41(23.0)	1.092	0.296
	无	137(77.0)		
饮酒	有	52(29.2)	1.446	0.229
	无	126(70.8)		
HBsAg	阳性	74(41.6)	24.976	0.000
	阴性	104(58.4)		
主食玉米	有	121(68.0)	2.391	0.122
	无	57(32.0)		

2.2 CYP3A5 基因型及等位基因分布 两组基因型及等位基因分布比较,差异均有统计学意义($\chi^2 = 9.396$, $P = 0.009$; $\chi^2 = 9.274$, $P = 0.002$)。高发组 GG 基因型比例低于对照组 ($P < 0.05$), GA + AA 基因型、A 等位基因比例均高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 CYP3A5 基因多态性在肝癌高发组及对照组之间的分布 ($n, \%$)

CYP3A5	高发组 ($n = 178$)	对照组 ($n = 178$)	OR(95% CI)
基因型			
GG	71(39.9)	94(52.8)	1.000
GA	80(44.9)	72(40.4)	1.471 (0.944 ~ 2.291)
AA	27(15.2)	12(6.7)	2.979(1.412 ~ 6.285)
GA + AA	107(60.1)	84(47.2)	1.686(1.108 ~ 2.567)
等位基因			
G	222(62.4)	260(73.0)	
A	134(37.6)	96(27.0)	1.635 (1.190 ~ 2.245)

3 讨论

CYP3A5 的表达与活性呈高度多态性,存在广泛的个体及种族之间差异。CYP3A5 在 10% ~ 97% 的人群中表达, CYP3A5 代谢活性相对高水平的见于 30% 的白种人、日本人、墨西哥人、40% 的中国人、大于 50% 的非洲裔美国人、东南亚人、太平洋岛人及西南美洲印第安人^[5]。它在儿童和青少年中显著高表达(约 50% 表达)^[6]。CYP3A5 活性的差异由单核苷酸的多态性(SNPs)所致。CYP3A5 基因多态性与很多肿瘤的发生有关。研究表明, CYP3A5 基因多态性与食管癌^[7]、前列腺^[8]、乳腺癌^[9]、结肠癌^[10]等恶性肿瘤的易感性相关。肝脏 CYP3A5 含量占 CYP3A 总量的一半以上^[11]。CYP3A5 是 CYP3A 的主要肝外表达形式, CYP3A5 的多态性表达决定了 CYP3A 的表达量。CYP3A5 可在肝脏中将黄曲霉毒素 B1 活化为致突变物黄曲霉毒素 B1-外-8,9-环氧化物^[3], 而黄曲霉毒素是肝细胞癌的主要危险因素, 所以 CYP3A5 基因的遗传多态性可影响个体患肝细胞癌的风险。

本研究中,广西肝癌高发家族组和正常对照组在一般人口学特征上具有良好的均衡性,而 CYP3A5 A、G 基因型及等位基因的构成分布上存在差异。高发家族基因型 GG 比例低于对照组,基因型 GA + AA 比例高于对照家族 ($P < 0.05$), A 等位基因比例也高于对照家庭 ($P < 0.05$), 说明 CYP3A5 野生纯合型 GG 基因型及野生纯合型 AA 联合杂合型 AG 基因型与肝癌易感性有关。高发家族 CYP3A5 A 等位基因的比率明显高于对照组。CYP3A5 A 等位基因与肝癌的易感性密切相关。

由于 CYP3A5 基因是通过黄曲霉毒素 B1 起作用,因此对于长期暴露于黄曲霉毒素 B1 的污染环境中的肝癌高发家族成员,通过 CYP3A5 基因可使黄曲

霉毒素 B1-外-8,9-环氧化物增加,肝癌发生危险增加。因此原发性肝癌的发生是遗传因素和环境因素长期协同作用的结果,是在个体遗传易感性的基础上,在各种环境致癌因子的作用下,导致体内基因发生突变,肝癌细胞增值和分化。本研究认为 CYP3A5 基因多态性与肝癌的遗传易感性密切相关,这为肝癌高发地区人群的发病原因及原发性肝癌的防治提供相关理论依据。

参 考 文 献

- [1] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2557-2576.
- [2] 陈钦艳,王学燕,方钟燎,等. 广西隆安县 HBsAg 与原发性肝癌家系调查研究[J]. 广西医学, 2012, 34(4): 385-387.
- [3] Wojnowski L, Turner PC, Pedersen B, et al. Increased levels of aflatoxin-albumin adducts are associated with CYP3A5 polymorphisms in the Gambia, West Africa[J]. Pharmacogenetics, 2004, 14(10): 691-700.
- [4] Poulsen HE, Loft S, Wassermann K. Cancer risk related to genetic polymorphisms in carcinogen metabolism and DNA repair[J]. Pharmacol Toxicol, 1993, (Suppl 1): 93-103.
- [5] Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression[J]. Nat Genet, 2001, 27(4): 383-391.
- [6] Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, et al. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450 III A5 (HLp3)[J]. Mol Pharmacol, 1990, 38(2): 207-213.
- [7] Dandara C, Ballo R, Parker MI. CYP3A5 genotypes and risk of oesophageal cancer in two South African populations[J]. Cancer Letters, 2005, 225(2): 275-282.
- [8] 李振华,孔垂泽,王立忠. 前列腺癌发生风险与 CYP3A5 基因多态性的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(12): 1098-1099.
- [9] Tucker AN, Tkaczuk KA, Lewis LM, et al. Polymorphisms in cytochrome P450A5 (CYP3A5) may be associated with race and tumor characteristics, but not metabolism and side effects of tamoxifen in breast cancer patients[J]. Cancer Lett, 2005, 217(1): 61-72.
- [10] Bethke L, Webb E, Sellick G, et al. Polymorphisms in the cytochrome P450 genes CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1 and colorectal cancer risk[J]. BMC Cancer, 2007, (7): 123.
- [11] Lin YS, Dowling AL, Quigley SD, et al. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism[J]. Mol Pharmacol, 2002, 62(1): 162-172.

(收稿日期:2014-01-28 修回日期:2014-04-28)