

结果显示 5-FU 组, 5-FU+L-Arg 组 iNOS 表达均有增加, 而后者增加更加明显, 表明诱导 iNOS 的表达是 5-FU 抗肿瘤的一种方式, 在 iNOS 表达增高的情况下, 补充底物 L-Arg, 会使 NO 的生成增加, 从而引起肿瘤细胞的凋亡和坏死. L-Arg 同时可能通过正反馈机制使 iNOS 的表达进一步增加.

L-Arg 可以肝脏中合成, 在肝癌患者中一般肝功能较差, 合成功能减弱, 加之肿瘤患者食欲较差, L-Arg 摄入减少, 因此体内 L-Arg 不足. 对肝癌患者应用 5-FU 进行化疗时, 肝癌中的 iNOS 的表达增强, 辅 L-Arg, 增加 NO 的生成, 可能会提高 5-FU 的化疗效果和患者的抗癌能力. 因此, L-Arg 可为治疗肝癌的有效辅剂.

4 参考文献

- 1 Papapetropoulos N, Zhou Z, Roussos C, Goumas P, Papapetropoulos A. Effects of modulation of the NO/cGMP pathway in tumor cell lines derived from the upper airway tract. *Pharmacology* 2004;72:167-176
- 2 Chan MH, Chien TH, Lee PY, Chen HH. Involvement of NO/cGMP pathway in toluene-induced locomotor hyperactivity in female rats. *Psychopharmacology* 2004;29[Epub ahead of print]
- 3 Perrotta C, Falcone S, Capobianco A, Camporeale A, Sciorati C, De Palma C, Pisconti A, Rovere-Querini P, Bellone M, Manfredi AA, Clementi E. Nitric oxide confers therapeutic activity to dendritic cells in a mouse model of melanoma. *Cancer Res* 2004;64:3767-3771
- 4 Jiang J, Liu J, Zhu J, Yang C, Zhang A. Mechanism of apoptotic effects induced by 5-fluorouracil on human liver carcinoma Bel7402 cell line. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:968-971
- 5 Li XH, Li XK, Cai SH, Tang FX, Zhong XY, Ren XD. Synergistic effects of nimesulide and 5-fluorouracil on tumor growth and apoptosis in the implanted hepatoma in mice. *World J Gastroenterol* 2003;9:936-940
- 6 Yi TB, Yang LY. Caspase-8 in apoptosis of hepatoma cell induced by 5-fluorouracil. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:98-101
- 7 邵宏伟, 齐清会. 几种抗癌药物诱导胰腺癌细胞凋亡能力的比较. *世界华人消化杂志* 2002;10:187-192
- 8 Lind DS. Arginine and cancer. *J Nutr* 2004;134(Suppl 10):2837S-2841S
- 9 张剑, 何生, 李茂德. L-精氨酸在肝癌细胞生长增生中的作用. *贵阳医学院学报* 2003;28:5-8
- 10 孟玫, 姜军梅, 尹晓燕, 朱菊人. 内毒素联合精氨酸对肝癌细胞 Bel-7402 增生及凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:2053-2056
- 11 van Bokhorst-De Van Der Schueren MA, Quak JJ, von Blomberg-van der Flier BM, Kuik DJ, Langendoen SI, Snow GB, Green CJ, van Leeuwen PA. Effect of perioperative nutrition, with and without arginine supplementation, on nutritional status, immune function, postoperative morbidity and survival in severely malnourished head and neck cancer patients. *Am J Clin Nutr* 2001;73:323-332
- 12 郝悦, 周新民. 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:1636-1638
- 13 Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem* 2002;277:21123-21129
- 14 杨道贵, 李复领, 随永领, 李蕊, 魏发才. 术前精氨酸强化 PN 对结、直肠癌细胞对凋亡和增生的影响. *肠外与肠内营养* 2002;9:18-20
- 15 陈会松, 柳利明, 黄华, 杨晋辉. 小鼠实验性肝损伤中 NO 的动态检测及意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:838-840
- 16 Gong JP, Tu B, Wang W, Peng Y, Li SB, Yan LN. Protective effect of nitric oxide induced by ischemic preconditioning on reperfusion injury of rat liver graft. *World J Gastroenterol* 2004;10:73-76
- 17 Hussain SP, Trivers GE, Hofseth LJ, He P, Shaikh I, Mechanic LE, Doja S, Jiang W, Subleski J, Shorts L, Haines D, Laubach VE, Wilttrout RH, Djurickovic D, Harris CC. Nitric oxide, a mediator of inflammation, suppresses tumorigenesis. *Cancer Res* 2004;64:6849-6853
- 18 Chang CS, Chen WN, Lin HH, Wu CC, Wang CJ. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in *Helicobacter pylori*-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:2232-2240
- 19 Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res* 2002;12:311-320
- 20 Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Cai WJ, Yi Z. Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite. *World J Gastroenterol* 2002;8:40-43
- 21 Yung HW, Bal-Price AK, Brown GC, Tolkovsky AM. Nitric oxide-induced cell death of cerebrocortical murine astrocytes is mediated through p53- and Bax-dependent pathways. *J Neurochem* 2004;89:812-821
- 22 Wang X, Zalcenstein A, Oren M. Nitric oxide promotes p53 nuclear retention and sensitizes neuroblastoma cells to apoptosis by ionizing radiation. *Cell Death Differ* 2003;10:468-476
- 23 Qiu LQ, Sinniah R, Hsu SI. Coupled induction of iNOS and p53 upregulation in renal resident cells may be linked with apoptotic activity in the pathogenesis of progressive IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2066-2078

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

食管癌 p53 基因第 5 外显子突变影响因素的病例对照研究

王波, 张艳, 徐德忠, 王安辉, 张磊, 孙长生, 李良寿

王波, 徐德忠, 王安辉, 张磊, 孙长生, 李良寿, 中国人民解放军第四军医大学预防医学系流行病学教研室 陕西省西安市 710032
张艳, 陕西省血液中心血型室 陕西省西安市 710061
项目负责人: 王波, 710032, 陕西省西安市长乐西路 17 号, 中国人民解放军第四军医大学, wbfmmu@263.net
电话: 029-83374872 传真: 029-83374872
收稿日期: 2004-07-23 接受日期: 2004-08-25

摘要

目的: 探讨 p53 基因第 5 外显子基因突变的影响因素.

方法: 应用 DNA 序列分析技术和病例对照研究方法, 分析西安和林州食管癌 p53 基因第 5 外显子的突变情况及其影

响因素.

结果: 西安和林州 $p53$ 基因第5外显子突变率分别为 14.3% (6/42) 和 18.6% (8/43), 两地突变率比较差异无显著性. 西安不经常食用新鲜蔬菜者突变率 (37.5%) 显著高于经常食用新鲜蔬菜者 (8.8%, $P < 0.05$), $P = 6.20 (0.97-39.7)$. 林州食用酸菜者突变率 (38.5%) 显著高于不食用酸菜者 (17.1%, $P < 0.05$), $P = 5.63 (1.10-28.84)$. 其余因素与 $p53$ 基因第5外显子突变未见显著性差异.

结论: 在西安经常食用新鲜蔬菜可减少 $p53$ 基因第5外显子突变发生, 在林州经常食用酸菜可增加 $p53$ 基因第5外显子突变的机率.

王波, 张艳, 徐德忠, 王安辉, 张磊, 孙长生, 李良寿. 食管癌 $p53$ 基因第5外显子突变影响因素的病例对照研究. 世界华人消化杂志 2004; 12(10): 2478-2480

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2478.asp>

0 引言

$p53$ 基因作为食管癌发生发展过程中的重要分子学变化已被多项研究证实^[1-3]. 对 $p53$ 基因突变谱的分析有助于从分子水平探索危险因素引起肿瘤的机制^[4-6]. 如在肺癌 $p53$ 基因突变中 G \rightarrow T 颠换较多见, 据认为与烟草中的苯并芘有关^[7]; 肝癌中 $p53$ 基因第7外显子249密码子的改变多发生在曾经食用被黄曲霉菌B1污染的粮食病例^[8]. 众所周知, 食管癌存在着显著的地理分布差异, 也就是说外源性致癌物在各地暴露的程度可能不同, 分析不同地区基因水平的改变是否能揭示造成这种差异的原因? 为此我们对属于食管癌高发区的河南省林州和中发区的西安食管癌组织 $p53$ 基因第5外显子基因突变进行了病例病例对照研究.

1 材料和方法

1.1 材料 分别选择西安(42例)和林州(43例)某综合性医院入院治疗的新发食管癌病例, 为连续病例, 均经病理学确诊, 术前未进行化疗和放疗, 且在当地居住 20a 以上. 由研究者按统一制订的调查表直接询问患者本人, 多在术前进行. 调查内容包括一般人口学特征(年龄、性别、职业和文化程度等)、烟酒嗜好、饮食习惯(食用酸菜、水果和新鲜蔬菜摄入情况、热烫饮食等)和食管癌家族史等.

1.2 方法 标本取自手术切除的癌组织, 捣碎, 蛋白酶 K 消化, 37 °C 过夜, 常规酚: 氯仿抽提 DNA. PCR 扩增目的基因片段, $p53$ 第5外显子引物序列为 P1: 5' -GTT TCT TTG CTG CCG TGT TC-3'; P2: 5' -AGG CCT GGG GAC CCT GGG CA-3', 扩增片段长度为 323 bp^[2]. PCR 反应条件为: 反应总体积 100 μ L, 其中含引物 25 pmol/L 各 1 μ L, 10 nmol/L 4 \times dNTP 6 μ L, 10 \times Buffer 25 mmol/L 10 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 模板 DNA 0.1-0.5 μ g, Taq 酶 3U. 94 °C 预变性 5 min 后加 Taq 酶 3 U, 94 °C 1 min, 66 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环后于 72 °C 延伸 10 min, 取 8 μ L 产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外

灯下照相分析. PCR 产物纯化回收, 应用 ABI 基因测序分析仪(ABI 公司)完成 DNA 序列检测.

统计学处理 建立 Foxbase 数据库, 将所有调查表信息核对无误后录入微机备用. 首先对西安和林州病例的年龄、性别进行均衡性检验. 然后进行单因素分析, 计算 χ^2 , OR 及 OR95%CI. 所有数据处理采用 SPSS10.0 软件完成.

2 结果

2.1 西安与林州食管癌 $p53$ 基因第5外显子突变率比较 西安和林州食管癌标本 $p53$ 基因第5外显子 DNA 序列测定结果显示, 西安 42 例标本中有 6 例(6 个位点)发生突变, 突变率为 14.3%; 林州 43 例食管癌标本中, 有 8 例 10 个位点发生突变, 其中有 2 例各检出 2 种突变, 突变率为 18.6%, 两地突变率比较无显著性差异($\chi^2 = 0.28$, $P = 0.59$).

2.2 病例病例对照研究 按年龄(<60 岁和 \geq 60 岁)、性别分组比较, 西安和林州 $p53$ 基因第5外显子突变病例在 < 60 岁和 \geq 60 岁组, 男性和女性组间分布均未见显著性差异($P > 0.05$, 表 1).

西安吸烟、饮酒、食用酸菜和食管癌家族史等食管癌主要危险因素与 $p53$ 基因第5外显子突变无显著性联系($P > 0.05$). 不经常食用新鲜蔬菜者 $p53$ 基因第5外显子突变率为 37.5%, 显著高于经常食用新鲜蔬菜者的 8.8% ($P < 0.05$, OR = 6.20, (0.97-39.7)). 林州吸烟、饮酒、不食用新鲜蔬菜、食管癌家族史等因素与林州食管癌 $p53$ 基因第5外显子突变未见显著性联系, 食用酸菜者 $p53$ 基因第5外显子突变率为 38.5%, 显著高于不食用酸菜者的 17.1% ($P < 0.05$, OR = 5.63 (1.10-28.84), 表 2).

3 讨论

本研究所有对象均为病理学确诊的食管癌患者, 两地病例均为当地常住居民, 年龄、性别无显著性差异, 具有可比性. 标本取自手术切除的癌组织, 所有调查信息通过直接询问患者本人而获得, 减少了选择偏倚和信息偏倚. DNA 序列测定是目前检测基因结构、序列变异最直接、最可靠的方法. 在实验中采取了质量控制措施, 因此本文结果较为可信和真实.

$p53$ 基因是迄今发现与人类相关性最高的基因, 大约 50% 的人类肿瘤中发现 $p53$ 基因突变. 吸烟肺癌 $p53$ 突变较多发生于 157、248 和 273 密码子, 主要为 G \rightarrow T 颠换, 认为与烟草中的致癌物苯丙萘有关, 而非吸烟患者为 G : C \rightarrow A : T 转换^[9]. 既吸烟又饮酒发生肺癌 $p53$ 突变的 OR 值为 18.6, 且有剂量 - 效应关系^[10]. 口腔部肿瘤 $p53$ 基因突变认为与咀嚼槟榔和烟草有联系, 有人认为 $p53$ 第5外显子是经常咀嚼萎叶引起口腔癌的靶基因^[11]. 因此, 对 $p53$ 基因突变谱的分析有助于识别不同肿瘤的致癌因子. $p53$ 基因突变在食管癌中也较常见, 但多数研究集中于突变率与癌病理组织学分型关系、预后等方面^[12-13]. 现有的文献报道多无详细的环境暴露资料, 故难以与环境致病因子进行综合分析. 本

表1 西安和林州 p53 基因第5外显子突变与无突变病例年龄和性别分布

| 因素 | 西安市 | | | | 林州市 | | | |
|---------|-----|-----|----------|------|-----|-----|----------|------|
| | 突变 | 未突变 | χ^2 | P | 突变 | 未突变 | χ^2 | P |
| <60 yr | 2 | 17 | 0.40 | 0.53 | 4 | 22 | 0.45 | 0.50 |
| ≥ 60 yr | 4 | 19 | | | 4 | 13 | | |
| 男 | 4 | 30 | 0.93 | 0.34 | 7 | 28 | 1.57 | 0.21 |
| 女 | 2 | 6 | | | 1 | 15 | | |

表2 西安和林州 p53 基因第5外显子突变与食管癌主要危险因素的关系

| 因素 | 西安市 | | | | | | 林州市 | | | | |
|--------|-----|-----|----------|------|-----------|-------------|-----|-----|----------|------|--------------|
| | 突变 | 未突变 | χ^2 | P | OR(95%CI) | | 突变 | 未突变 | χ^2 | P | OR(95%CI) |
| 吸烟 | + | 3 | 25 | 0.87 | 0.35 | 0.44 | 6 | 20 | 0.87 | 0.35 | 2.25 |
| | - | 3 | 11 | | | (0.08-2.53) | 2 | 15 | | | (0.40-12.75) |
| 饮酒 | + | 2 | 25 | 2.92 | 0.09 | 0.22 | 1 | 5 | 0.02 | 0.89 | 0.86 |
| | - | 4 | 11 | | | (0.08-2.53) | 7 | 30 | | | (0.09-8.54) |
| 酸菜 | 食用 | 2 | 10 | 0.08 | 0.78 | 1.30 | 5 | 8 | 4.85 | 0.03 | 5.63 |
| | 不食用 | 4 | 26 | | | (0.21-8.25) | 3 | 27 | | | (1.10-28.84) |
| 新鲜蔬菜 | 不食用 | 3 | 5 | 4.35 | 0.04 | 6.20 | 2 | 6 | 0.27 | 0.61 | 1.61 |
| | 食用 | 3 | 31 | | | (0.97-39.7) | 6 | 29 | | | (0.26-10.00) |
| 食管癌家族史 | + | 1 | 15 | 1.36 | 0.24 | 0.28 | 4 | 18 | 0.01 | 0.94 | 0.94 |
| | - | 5 | 21 | | | (0.03-2.67) | 4 | 17 | | | (0.20-4.39) |

研究结果显示, 西安和林州食管癌 p53 基因第5外显子突变与性别、年龄均无关. 西安吸烟、饮酒、食用酸菜和食管癌家族史等食管癌主要危险因素与 p53 基因第5外显子突变未见显著性联系. 不经常食用新鲜蔬菜 p53 基因第5外显子突变率为 37.5%, 显著高于经常食用新鲜蔬菜者的 8.8% ($P < 0.05$), $OR = 6.20 (0.97-39.7)$. 新鲜蔬菜含有 VitA, VitC 等大量维生素. 研究表明, 新鲜蔬菜、水果和维生素等有抗突变的作用, 维生素C在体内能阻断胺类的亚硝基化^[14]. 本研究表明, 在西安地区, 经常食用新鲜蔬菜可对抗 p53 基因突变而减少食管癌的发生.

林州单因素分析未发现吸烟、饮酒、食管癌家族史和食用新鲜蔬菜与 p53 基因第5外显子有显著性联系, 但与食用酸菜有明显联系, 其 OR 值为 5.63 (1.10-28.84), 食用酸菜者 p53 基因第5外显子的突变率 38.5% 显著高于不食用酸菜者的 17.1% ($P < 0.05$). 酸菜中含有包括亚硝酸胺在内的多种致癌亚硝基化合物. 有人用甲基苄基亚硝酸胺(NMBzA)诱发的人胎儿食管癌组织发现有抑癌基因 *Rb*, *p53*, *APC* 和 *MCC* 的突变^[15]. 林州居民有食用酸菜的习俗, 酸菜中致癌物的量积累到一定程度, 可能诱发包括 p53 基因在内的癌基因发生突变而诱导食管癌的形成.

4 参考文献

- 1 Biramijamal F, Allameh A, Mirbod P, Groene HJ, Koomagi R, Hollstein M. Unusual profile and high prevalence of p53 mutations in esophageal squamous cell carcinomas from northern Iran. *Cancer Res* 2001;61:3119-3123
- 2 邹建湘, 王立东, Shi ST, Yang GY, Xue ZH, 高珊珊, 李永欣, Yang CS. 河南食管癌高发区居民多灶性食管癌前病变和癌组织 p53 基因的突变分析. *世界华人消化杂志* 1999;7:280-284

- 3 Putz A, Hartmann AA, Fontes PR, Alexandre CO, Silveira DA, Klug SJ, Rabes HM. TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high risk area (Southern Brazil): role of life style factors. *Int J Cancer* 2002;98:99-105
- 4 Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. *Mutat Res* 2000;462:311-322
- 5 王立东, 刘宾, 郑树. 林州居民食管癌 P53 基因突变谱分析与不同地区食管癌和其他类型肿瘤的比较. *中华流行病学杂志* 2003;24:202-205
- 6 Kato H, Yoshikawa M, Miyazaki T, Nakajima M, Fukai Y, Tajima K, Masuda N, Tsukada K, Fukuda T, Nakajima T, Kuwano H. Expression of p53 protein related to smoking and alcoholic beverage drinking habits in patients with esophageal cancers. *Cancer Lett* 2001;167:65-72
- 7 Pfeifer GP, Hainaut P. On the origin of G → T transversions in lung cancer. *Mutat Res* 2003;526:39-43
- 8 Staib F, Hussain SP, Hofseth LJ, Wang XW, Harris CC. TP53 and liver carcinogenesis. *Hum Mutat* 2003;21:201-216
- 9 Hainaut P, Pfeifer GP. Patterns of p53 G → T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis* 2001;22:367-374
- 10 Ahrendt SA, Chow JT, Yang SC, Wu L, Zhang MJ, Jen J, Sidransky D. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000;60:3155-3159
- 11 Hussain SP, Hollstein MH, Harris CC. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and human risk assessment. *Ann N Y Acad Sci* 2000;919:79-85
- 12 Chen H, Wang LD, Guo M, Gao SG, Guo HQ, Fan ZM, Li JL. Alterations of p53 and PCNA in cancer and adjacent tissues from concurrent carcinomas of the esophagus and gastric cardia in the same patient in Linzhou, a high incidence area for esophageal cancer in northern China. *World J Gastroenterol* 2003;9:16-21
- 13 陶仪声, 武世伍, 宗永生. 抑癌基因 p53 在不同地区食管癌中的表达及临床预后分析. *肿瘤学杂志* 2002;8:79-80
- 14 陆建邦, 连士勇, 孙喜斌, 张中兴, 戴涤新, 李变云, 程兰平, 魏建荣, 段文杰. 林州食管癌发病因素病例对照研究. *中华流行病学杂志* 2000;21:434-436
- 15 Lu SH. Alterations of oncogenes and tumor suppressor genes in esophageal cancer in China. *Mutat Res* 2000;462:343-353