

广西肝癌高、低发区CYP3A5基因多态性的对比

卢凤美, 刘东璞, 孟庆媛, 郭梦凡, 冯震博

■背景资料

广西西南部为肝癌高发区, 在相同水平AFB1暴露和HBV感染的情况下, 肝癌的发病风险存在很大的个体差异, 提示遗传因素也可能是肝癌重要的病因。本课题组通过研究广西肝癌高发区和低发区人群中的CYP3A5基因多态性, 以探讨CYP3A5基因多态性与肝癌易感性的关系。

卢凤美, 刘东璞, 孟庆媛, 郭梦凡, 黑龙江省佳木斯大学司法鉴定中心 佳木斯大学基础医学院病理法医学教研室 黑龙江省佳木斯市 154007

冯震博, 广西医科大学基础医学院病理教研室 广西壮族自治区南宁市 530021

作者贡献分布: 卢凤美、冯震博与刘东璞对此文所作贡献均等; 此课题由冯震博与卢凤美共同设计; 研究过程由卢凤美、刘东璞、孟庆媛及郭梦凡操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由冯震博提供; 数据分析由卢凤美与刘东璞完成; 本论文写作由冯震博、卢凤美与刘东璞完成。

通讯作者: 冯震博, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学基础医学院病理教研室。
lufengmei200520136@163.com

电话: 0454-8618292

收稿日期: 2009-03-03 修回日期: 2009-04-08

接受日期: 2009-04-13 在线出版日期: 2009-05-28

Comparative analysis on the genetic polymorphisms of CYP3A5 between hepatocellular carcinoma high and low incidence area in Guangxi Zhuang Autonomous Region

Feng-Mei Lu, Dong-Pu Liu, Qing-Yuan Meng, Meng-Fan Guo, Zhen-Bo Feng

Feng-Mei Lu, Dong-Pu Liu, Qing-Yuan Meng, Meng-Fan Guo, Forensic Science Right Expertise Center of Jiamusi University, Department of Pathology of Basic Medical College of Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China

Zhen-Bo Feng, Department of Pathology of Basic Medical College of Guangxi Zhuang Autonomous Region Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Professor Zhen-Bo Feng, Department of Pathology of Basic Medical College of Guangxi Zhuang Autonomous Region Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lufengmei200520136@163.com

Received: 2009-03-03 Revised: 2009-04-08

Accepted: 2009-04-13 Published online: 2009-05-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship between genetic polymorphism of CYP3A5 and HCC affectability through analysis of two groups of patients coming from Guangxi HCC high-incidence area and HCC low-incidence area.

METHODS: We had collected 72 cases of HCC tissues and HCC-adjacent tissues from the

First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University during 2005-12/2006-09, and all the cases, who came from Guangxi HCC high-incidence area and HCC low-incidence area respectively, had been pathologically confirmed. At the same time, we used 12 cases of hepatic angioma-surrounding tissue as the normal control group. PCR-RFLP assay was used to analyze CYP3A5 genetic polymorphism of the above-mentioned samples.

RESULTS: There were statistic differences between the population with CYP3A5*1 allele frequency and the proportion of (CYP3A5*1/*1 + CYP3A5*1/*3) genotypes of Guangxi HCC high-incidence area and the population of Guangxi HCC low-incidence area ($P < 0.05$). There were statistic differences between the population of Guangxi HCC high-incidence area and the population of the normal control group ($P < 0.05$). There were no statistic differences between Guangxi HCC low-incidence area population and the normal control group.

CONCLUSION: CYP3A5 might take part in the morbidity of AFB1 related HCC.

Key Words: CYP3A5; Genetic polymorphism; Aflatoxin B1; Hepatocellular carcinoma; Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

Lu FM, Liu DP, Meng QY, Guo MF, Feng ZB. Comparative analysis on the genetic polymorphisms of CYP3A5 between hepatocellular carcinoma high and low incidence area in Guangxi Zhuang Autonomous Region. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(15): 1570-1574

摘要

目的: 研究广西肝癌高发区和低发区人群中CYP3A5基因多态性, 以探讨CYP3A5基因多态性与肝癌易感性的关系。

方法: 收集广西医科大学第一附属医院2005/12-2006/09经病理确诊的72例肝细胞癌(HCC)患者的肝癌组织及其癌旁组织, 患者分

■同行评议者

李增山, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学病理教研室

别来自于肝癌高发区(黄曲霉素高污染区)和低发区. 12例血管瘤的瘤旁肝组织作为正常对照. 用PCR-RFLP法检测CYP3A5在上述标本中的多态性.

结果: 广西肝癌高发区患者CYP3A5*1等位基因频率和基因型比(CYP3A5*1/*1+CYP3A5*1/*3)与广西肝癌低发区患者比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 肝癌高发区人群与正常对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 低发区与正常对照组之间比较, 差异无统计学意义.

结论: CYP3A5可能参与黄曲霉毒素B1(AFB1)相关性HCC的发生.

关键词: CYP3A5; 遗传多态性; 黄曲霉毒素B1; 肝癌; 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性

卢凤美, 刘东璞, 孟庆媛, 郭梦凡, 冯震博. 广西肝癌高、低发区CYP3A5基因多态性的对比. 世界华人消化杂志 2009; 17(15): 1570-1574

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1570.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是严重威胁人类生命健康及生活质量的重要消化系统恶性肿瘤之一, 慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是导致HCC最主要的原因之一^[1]. 广西西南部为HCC高发区, 与江苏启东和非洲撒哈拉以南地区共同成为世界上HCC最高发地区, HBV感染和AFB1的暴露是造成这些地区HCC高发的主要原因^[2]. 而且, AFB1与HBV有协同致癌作用^[3]. CYP3A家族成员(主要包括CYP3A4和CYP3A5)一方面参与AFB1的代谢活化生成具有DNA结合活性的活性代谢产物AFBO, 同时又参与AFB1的I相解毒, 生成无遗传毒性的代谢产物AFQ1^[4]. CYP3A5由于个体间表达水平差别很大, 而且他们的基因多态性较大程度上影响表达水平^[5], CYP3A5*1是蛋白表达水平较高的主要原因^[6]. 研究显示, 最常见的人类遗传多态形式是基因组中散在的单个碱基的不同-单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNPs), 肿瘤患者个体治疗敏感性和与治疗相关的不良反应等均与SNPs有关^[7].

为了检测遗传因素在肝癌发生中的作用, 我们在广西肝癌高发区和低发区肝癌人群中以聚合酶链反应-限制性片段长度多态性

(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法研究CYP3A5的基因多态性, 以探讨他们与HCC遗传易感性的潜在关系. 从遗传易感性方面探讨HCC发生的内在原因, 并期望以他们的多态性为依据帮助识别HCC易感基因和易感人群, 为HCC的防治提供进一步的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 取2005-12/2006-09广西医科大学第一附属医院肝胆外科肝癌患者手术切除的标本共72例, 其中广西肝癌高发区(黄曲霉素高污染区)组40例肝癌及癌旁组织(广西肝癌高发地区-南宁地区之扶绥县、宁明县); 低发区(黄曲霉素低污染区)组32例肝癌及其癌旁组织(广西肝癌低发地区-玉林地区及柳州地区几个县); 取其癌组织和与癌相距 ≥ 2 cm的癌旁组织. 其中, 男62例, 女10例. 另取肝血管瘤旁肝组织12例作为正常对照组, 标本均取自与肿瘤相距 ≥ 2 cm的瘤旁组织. 其中男10例, 女2例. 所有正常对照人员均无肿瘤家族史. 对照组的性别、年龄和民族与疾病组进行频数匹配, 以病例记录和直接调查方式获取相关资料. Taq DNA聚合酶, 购自大连宝生物工程公司; dDNA混合液、琼脂糖、 $50\times$ TAE电泳缓冲液, DNA提取试剂: 北京天根公司DNA提取试剂盒血液/细胞/组织基因组, 购自恒因生物公司; 溴酚蓝、溴化乙锭(EB), 购自恒因生物公司; 限制性内切酶Dde I 购自美国Promega公司.

1.2 方法

1.2.1 DNA提取: 肝癌组织基因组DNA的制备及定量: 北京天根公司血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒进行抽提, 实验步骤按DNA提取试剂盒说明书进行提取DNA.

1.2.2 PCR反应: 引物合成与设计: 由上海Sangon生物工程公司合成. 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25 μ L的反应体系. CYP3A5反应混合物循环条件: 94℃预变性4 min; 接着94℃变性40 s, 56℃退火40 s, 和72℃延伸1 min, 进行30个循环; 最后72℃延伸7 min.

1.2.3 RFLP: 取PCR 扩增产物3 μ L, 加入 $10\times$ restriction Buffer、 $10\times$ BSA和Dde I 3 U, 终体

■ 研发前沿

有些肝癌往往发展到中晚期出现临床症状, 手术机会少, 化疗效果差, 5年生存率极低. 可见, 进一步开展相关基因的遗传多态性与肝癌易感性关系的研究对肝癌高危个体的筛查和早期预防以及寻找肝癌药物防治的潜在靶点具有重要的理论和现实意义.

■ 相关报道

多项研究显示, CYP3A5在肝脏组织中的检出率与CYP3A5*1/*1和CYP3A5*1/*3基因型比例的总和相近, 即*1/*1和*1/*3基因型CYP3A5蛋白表达水平高, 而*3/*3基因型CYP3A5表达低, CYP3A5*1携带者CYP3A5表达高.

■创新盘点

在本研究中,发现广西肝癌高发区CYP3A5高表达个体百分比明显高于广西肝癌低发区,提示广西AFB1高污染区人群由于长期暴露于AFB1的污染环境中,以致与AFB1代谢相关的酶表达增加,对AFB1的易感性增加,导致HCC高发。

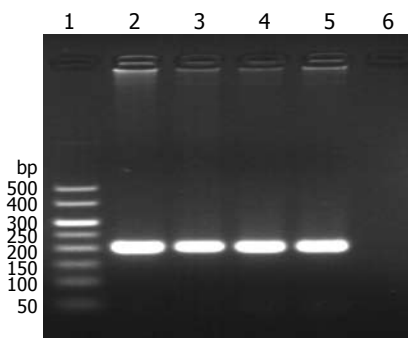


图1 CYP3A5 PCR产物电泳结果。1: DNA Marker; 2-5: PCR产物; 6: 空白对照。

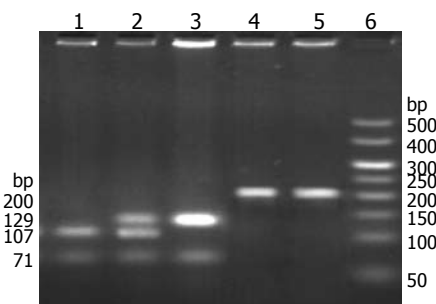


图2 CYP3A5 PCR产物酶切电泳结果。1-3: 酶切产物; 4-5: PCR产物; 6: DNA Marker; 1: 基因型CYP3A5*3/*3; 2: 基因型CYP3A5*1/*3; 3: 基因型CYP3A5*1/*1。

积12 μ L, 37 $^{\circ}$ C至少消化2 h。

统计学处理 实验结果用SPSS13.0进行分析。

计量资料用mean \pm SD, 计数资料用整数表示, 统计方法采用 χ^2 检验(Chi-square test)两两比较、t检验。

2 结果

2.1 CYP3A5 PCR产物电泳结果 CYP3A5 PCR产物片段长度为200 bp(图1)。

2.2 CYP3A5 PCR产物酶切电泳结果 CYP3A5 PCR产物基因型为CYP3A5*3/*3酶切片段长分别为107 bp、71 bp和22 bp; 基因型为CYP3A5*1/*3酶切片段长分别为129 bp、107 bp、71 bp和22 bp; 基因型为CYP3A5*1/*1酶切片段长分别为129 bp和71 bp(图2)。

2.3 研究对象观察指标 经 χ^2 检验结果显示, 三组在年龄、性别、民族、饮塘水、肿瘤家族史, 差异无统计学意义($P>0.05$); 但在饮酒、AFB1暴露和乙肝感染情况这三方面有差异($P<0.05$)。提示饮酒、AFB1暴露和乙肝感染是HCC一个危险因素。尽管我们在实验过程中尽力控制所有因素, 以期达到三组间这些影响因素在频数上相配, 但未能如愿(表1)。

表1 研究对象观察指标n(%)

分组	高发区肝癌组	低发区肝癌组	正常对照
性别			
男	34(85)	28(87.5)	10(83.3)
女	6(15)	4(12.5)	2(16.7)
平均年龄(岁)	47.6	47.1	53.3
民族			
汉族	25(62.5)	23(71.5)	8(66.7)
壮族及其他	15(37.5)	9(28.5)	4(33.3)
饮酒			
频繁	12(30)	9(28.13)	1(9)
不频繁	28(70)	23(71.87)	11(91)
饮塘水			
有	2(5)	1(3)	0(0)
无	38(95)	31(97)	12(100)
HBV			
+	38(95)	31(96)	1(8)
-	2(5)	1(4)	11(92)
AFB1暴露 ¹			
频繁	12(30)	4(12.5)	0(0)
不频繁	28(70)	28(87.5)	12(100)
肿瘤家族史			
有	7(17.5)	2(6)	0(0)
无	33(82.5)	30(94)	12(100)

¹: 主要根据玉米的食用情况作一粗略估计, 每年多于2 mol以玉米为主食的研究对象定为AFB1暴露频繁。

2.4 CYP3A5*1、*3基因型及等位基因分布 高发区HCC组、低发区HCC组和正常对照组CYP3A5*1/*1、*1/*3和*3/*3基因型比例分别为25.0%、45.0%和30.0%; 6.25%、31.5%和62.25%; 4.8%、33.3%和61.9%, 差异有统计学意义($\chi^2=9.937, P<0.05$)。三组间进行高表达基因型(*1/*1+*1/*3)和低表达基因型(*3/*3)构成比比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。两两比较的结果, 3组间高表达基因型(*1/*1+*1/*3)与低表达基因型(*3/*3)构成比 χ^2 检验, 差异有统计学意义($P<0.05$); 肝癌高发区人群与肝癌低发区人群比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 肝癌高发区人群与正常对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 肝癌低发区人群与正常对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。三组的*1、*3等位基因频率分别为40.0%和60.0%; 21.5%和78.5%; 20.9%和79.1%, 差异有统计学意义($P<0.05$, 表2)。

3 讨论

人体肝脏和小肠中的CYP3A主要由CYP3A4和

表 2 肝癌高、低发区及正常肝组织中CYP3A5的基因型及等位基因分布 *n*(%)

CYP3A5	基因型			等位基因	
	*1/*1	*1/*3	*3/*3	*1	*3
HCC高发区	10(25.0)	18(45.0)	12(30.0)	28(40.0)	42(60.0)
HCC低发区	2(6.25)	10(31.5)	20(62.25)	14(21.5)	51(78.5)
正常组	1(4.8)	4(33.3)	7(61.9)	5(20.9)	19(79.1)

CYP3A5这两种同工酶组成, 其中CYP3A5在这两种组织中的表达存在多态性. CYP3A5*1携带者CYP3A5表达高, 可占肝脏CYP3A的17%-50%, Kuehl *et al*^[8-9]提出甚至超过50%. 在白种人、黄种人和黑种人的有关研究中, CYP3A5在肝脏组织中的检出率与CYP3A5*1/*1和CYP3A5*1/*3基因型比例的总和相近^[10]. AFB1经细胞色素P450(CYP450)酶氧化为AFB1-外-8, 9-环氧化物(AFBO)才有诱变作用, AFBO与DNA共价结合成AFB1-DNA加合物, 引起DNA改变, 从而导致个体HCC发生^[11]. CYP3A5主要介导AFB1生成毒性代谢产物AFBO^[12], 因此, 体内高水平的CYP3A5可通过增加AFBO的生成, 从而增加患肝癌的风险. Bethke *et al*^[13]研究表明, CYP3A基因多态性能增加结肠癌的风险性. Wojnowski *et al*^[14]对冈比亚人群的进行的一项研究结果表明, 携带与该酶高酶活性相关的CYP3A5单倍型的个体血浆AFB1-白蛋白加合物的水平显著增加, 体内表达高水平CYP3A5的个体肝脏生成AFBO的能力增强.

在本研究中, 广西肝癌高发区人群、肝癌低发区人群、正常对照组CYP3A5*1、*3基因型及等位基因分布存在差异. 我们在3组间进行高表达基因型(*1/*1+*1/*3)和低表达基因型(*3/*3)构成比比较, 两两比较的结果, 3组间高表达基因型(*1/*1+*1/*3)与低表达基因型(*3/*3)构成比 χ^2 检验, 差异有统计学意义($P<0.05$); 高发区肝癌组CYP3A*1的比率明显高于低发区和正常对照组, CYP3A*3的纯合子的比率在肝癌高发区明显低于低发区和正常肝组织.

本实验通过对CYP3A5遗传多态性与肝癌的遗传易感性进行关联研究, 发现广西肝癌高发区CYP3A5高表达个体百分比明显高于广西肝癌低发区, 提示广西AFB1高污染区人群由于长期暴露于AFB1的污染环境中, 以致与AFB1代谢相关的酶表达增加, 对AFBO的易感性增加,

导致HCC高发, CYP3A5基因型和等位基因分布在高发区HCC组与低发区肝癌组及正常对照组之间存在差异, 但在本研究中尚未发现低发区与正常对照组之间存在差别, 这有待于扩大样本进一步深入研究.

总之, HCC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, 体细胞遗传物质多种癌基因激活和/或抑癌基因失活等多方面改变, 最终使细胞增殖及分化发生紊乱所致.

4 参考文献

- 1 侯全玲, 唐红, 黄飞骏. 乙型肝炎病毒X蛋白与原发性肝癌. 世界华人消化杂志 2008; 16: 50-55
- 2 Groopman JD, Wang JS, Scholl P. Molecular biomarkers for aflatoxins: from adducts to gene mutations to human liver cancer. *Can J Physiol Pharmacol* 1996; 74: 203-209
- 3 Lunn RM, Zhang YJ, Wang LY, Chen CJ, Lee PH, Lee CS, Tsai WY, Santella RM. p53 mutations, chronic hepatitis B virus infection, and aflatoxin exposure in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Res* 1997; 57: 3471-3477
- 4 Macé K, Aguilar F, Wang JS, Vautravers P, Gómez-Lechón M, Gonzalez FJ, Groopman J, Harris CC, Pfeifer AM. Aflatoxin B1-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1291-1297
- 5 Kamdem LK, Meineke I, Gödtel-Armbrust U, Brockmöller J, Wojnowski. Dominant contribution of P450 3A4 to the hepatic carcinogenic activation of aflatoxin B1. *Chem Res Toxicol* 2006; 19: 577-586
- 6 Sim SC, Edwards RJ, Boobis AR, Ingelman-Sundberg M. CYP3A7 protein expression is high in a fraction of adult human livers and partially associated with the CYP3A7*1C allele. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 625-631
- 7 许玲, 孙大志, 余志红. 关于肿瘤基因单核苷酸多态性研究及个体化医疗的思考的问题. 世界华人消化杂志 2005; 13: 592-595
- 8 Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; 27: 383-391
- 9 Daly AK. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45: 13-31
- 10 Balram C, Zhou Q, Cheung YB, Lee EJ. CYP3A5*3 and *6 single nucleotide polymorphisms in three distinct Asian populations. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59: 123-126
- 11 陆海霞, 冯震博, 冯小兰. 广西黄曲霉毒素B1高污染区肝细胞癌与细胞色素P3A5基因多态性的相关性. 中华肝脏病杂志 2007; 15: 705-706
- 12 Burk O, Tegude H, Koch I, Hustert E, Wolbold R, Glaeser H, Klein K, Fromm MF, Nuessler AK, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M, Wojnowski

■名词解释

1 多态性: 是指在一个生物群体中, 同时和经常存在2种或多种不连续的变异型或基因型或等位基因, 亦称遗传多态性或基因多态性.

2 单核苷酸多态性: 主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性, 只涉及单个碱基的变异, 这种变异可由单个碱基的转换或颠换所引起, 也可由碱基的插入或缺失所致.

■同行评价

本研究实验设计合理, 结论明确, 具有一定的学术价值.

- 13 L. Molecular mechanisms of polymorphic CYP3A7 expression in adult human liver and intestine. *J Biol Chem* 2002; 277: 24280-24288
- 14 Bethke L, Webb E, Sellick G, Rudd M, Penegar S, Withey L, Qureshi M, Houlston R. Polymorphisms in the cytochrome P450 genes CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1 and colorectal cancer risk. *BMC Cancer* 2007; 7: 123
- 15 Wojnowski L, Turner PC, Pedersen B, Hustert E, Brockmüller J, Mendy M, Whittle HC, Kirk G, Wild CP. Increased levels of aflatoxin-albumin adducts are associated with CYP3A5 polymorphisms in The Gambia, West Africa. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 691-700

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与世界华人消化杂志的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须经得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录. (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-28)