

食管癌病人运铁蛋白(Tf)和组特异性成份(Gc) 亚型分布的研究^①

刘鸿禧 张奎芳 林珏龙 张少英

(广东省汕头大学医学院生物学教研室, 汕头 515031)

陆振虞 冯 波 陈仁彪

(上海第二医科大学医学遗传学教研室 200025)

摘要 应用超薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳法,分析了潮汕地区 216 例无血缘关系、临床上诊断为食管癌的病人和 216 例健康人的运铁蛋白(Tf)亚型分布情况,结果发现:食管癌病人组 TfC1C1 纯合子频率为 0.2639, Tf* C1 基因频率为 0.4745, 显著低于正常人组(分别为 0.4352 和 0.6227, 均为 $P < 0.001$); 同时,食管癌病人组 TfC2C2 纯合子频率为 0.2278, Tf* C2 基因频率为 0.4977, 显著高于正常对照组(分别为 0.1852, $P < 0.05$, 和 0.3634, $P < 0.001$)。应用超薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦结合免疫固定法,分析了潮汕地区 217 例无血缘关系的临床上诊断为食管癌病人和 217 例健康人的组特异性成份(Gc)亚型的分布,发现两组间无显著性差异。

关键词 运铁蛋白, 组特异性成份, 遗传多态性, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 等电聚焦

Study on Distribution of Subtype of Transferrin and Group-specific Component in Esophageal Cancer Patients

Liu Hongxi Zhang Kuifang Lin Juelong Zhang Shaoying

(Department of Biology, Medical College of Shantou University, Guangdong 515031)

Lu Zhenyu Feng Bo Chen Renbiao

(Department of Medical Genetics, Shanghai Second Medical University, 200025)

血清运铁蛋白(Transferrin, Tf)是 β 血清蛋白组中的一种分子量为 76kd 左右的糖蛋白。其功能是将铁离子运输到骨髓和肝脏等贮藏器官中去。组特异性成份(Group-specific Component, Gc)是人体血浆中的一种 α 球蛋白,其主要生物学功能是结合和转运维生素 D, 它能与维生素 D 结合,参与维生素 D 及其衍生物的输送,故也称维生素 D 结合蛋白(Vitamin D-Binding Protein, DBP)。自从 Smithies(1957)⁽¹⁰⁾ 用淀粉凝胶电泳首次发现 Tf 遗传多态性和 Hrischfeld(1959)⁽⁷⁾ 首先用免疫电泳法分析人类群体中 Gc 的遗传多态性以来,随着方法学的不断改进,特别是等电聚焦电泳技术的应用, Tf 和 Gc 遗传多态性已被广泛研究,并用于研究与癌肿之间的可能关联。Frohlander 等(1986)⁽⁶⁾ 报道肾细胞癌女患者中组特异性成份 Gc1F 频率显著增高,而男性患者中运铁蛋白 TfC1 频率显著增高。Mitchell 等(1988)⁽⁹⁾ 发现多发性骨髓瘤病人中 TfC1C1 明显上升,相对危险率达 2.6。王晓明报道,肝癌患者 TfC2 基因频率增高(王晓明,1990. 哈尔滨医科大学硕士研究生毕业论文)。陆振虞等(1992)⁽¹⁾ 报

^①本研究在采集标本过程中,得到了汕头大学医学院第一附属医院检验科黄让云主治医师、郑典梅副主任医师以及中心医院黄邦信副主任医师的大力协作,有关实验工作是在中国科学院遗传所完成的,特此致谢!

道,上海地区胃癌患者 Tfc2C2 纯合子频率显著增高,相对危险率达 1.71,胃癌患者 Gc1F 频率也显著增高。由此可见,运铁蛋白和组特异性成份多态性遗传标志与特定的癌肿之间存在着某种关联,即关联的蛋白质亚型可能直接导致某种程度的癌肿易感性。本文用超薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦技术,首次研究了潮州地区汉族食管癌患者及正常对照组的运铁蛋白(Tf)和组特异成份(Gc)的亚型分布,以期发现与食管癌可能关联的亚型,进而探讨食管癌发生与患者遗传素质之间的关系以及为本地区食管癌的早期诊断、预防积累基本数据。

1 材 料 和 方 法

1.1 材 料

1.1.1 血浆标本 食管癌患者的血浆标本采自汕头大学医学院肿瘤医院和汕头市中心医院,共 217 例。这些患者均经病理检查确诊或 X 线检查诊断(中晚期患者),其中经病理检查确诊的为 172 例,经 X 线检查有典型 X 线征而诊断的有 47 例。在 172 例中,鳞癌 169 例,腺癌 1 例,粘液表皮样癌 2 例。患者年龄在 33—74 岁之间,汉族,无血缘关系。健康人 217 例,汉族,其籍贯、性别和年龄与每一例食管癌患者严格配对(籍贯为同一地区,年龄 ± 5 岁),采自汕头大学医学院第一附属医院体检健康者,均无食管疾患史,全血加肝素(500U/ml)抗凝,离心分离血浆,-70℃冰箱保存直至使用。

1.1.2 仪器及主要试剂 应用瑞典 LKB 公司多功能电泳系统(LKB₂₁₉₇Multitemp 和 LKB₂₁₉₇Power supply)。两性载体电解质是 LKB 的 Ampholine, pH5—7 和 pH4—6。抗 Gc 血清采用丹麦产品。

1.2 应用超薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳 (ULPAGIF)

1.2.1 凝胶板制备 将事先配制好的丙烯酰胺凝胶制备液分别注入 LKB225 × 100mm 模板中,其中 Tf 胶板厚度为 0.2mm,所用两性电解质 Ampholine 为 pH5—7 及 pH4—6;Gc 胶板厚为 0.5mm,所用两性电解质 Ampholine 为 pH4—6,室温下聚合 2—3 小时后放入 4℃ 冰箱内过夜,次日使用。

1.2.2 样本预处理 (1) Tf 样本处理:用 0.5% 硫酸亚铁胺溶液 1:4 稀释血浆样本;(2) Gc 样本处理:用 0.9% 生理盐水按 1:5 稀释血浆样本。

1.2.3 等电聚焦电泳 (1) 运铁蛋白(Tf)亚型:阳极液为 0.04 mol/L L-Glu,阴极液 1 mol/L NaOH,最大电压为 1500V,电流一直小于 10mA。电泳后,将凝胶板放入考马斯亮蓝(Coomassie Blue R₂₅₀)染液中染色⁽²⁾;(2) 组特异性成份(Gc)亚型:阳极液用 0.5%(V/V)磷酸溶液,阴极液为 0.5%(V/V)乙二胺溶液,电压维持在 1200V,电流一直小于 20mA,电泳结束后,在醋酸纤维素膜上用抗 Gc 血清(丹麦产品)免疫固定,用 Coomassie Blue R₂₅₀ 染色⁽³⁾。

1.3 数据处理

用 μ 检验和相对危险率(RR)对食管癌组和对照组频率差异进行显著性检验和关联亚型、风险程度的计算。

2 实 验 结 果

2.1 运铁蛋白(Tf)亚型测定

2.2.1 Tf 表型频率分布 在食管癌组和对照组中,我们均检测到了 Tfc1C1、C2C2、C1C2 等 3 种常见的表型。在病人组中还检测到 Tfc1C3、C1C4、C2C3、C1DChi、C2DChi 和 Tfb-C2;在对照组中,也检测到 Tfc1C3、C1DChi 和 C2DChi。

由表 1 可见,食管癌组 Tfc1C1 频率为 26.39%,低于对照组(43.52%), μ 检验表明,两者有非常显著性差异($\mu=3.7873, P<0.001$)。食管癌组 Tfc2C2 纯合子频率为 27.78%,高于对照组(18.52%),两者有显著性差异($\mu=2.3138, P<0.05$)。这提示,Tfc1C1 纯合子不易得食管癌(RR=0.44),而 Tfc2C2 纯合子患食管癌的风险增高

($RR=1.65$), 对潮汕地区汉族食管癌组和对照组的 Tf 表型分布, 经 χ^2 检验, 均符合 Hardy-Weinberg 法则。

表1 食管癌组和对照组 Tf 表型分布

人 群			食 管 癌 组	对 照 组
调 查 人 数			216	216
Tf 表 型	C1C1*	人 数 (%)	57 (26.39)	94 (43.52)
	C2C2**	人 数 (%)	60 (27.78)	40 (18.52)
	C1C2	人 数 (%)	87 (40.27)	76 (35.19)
	C1C3	人 数 (%)	1 (0.46)	2 (0.93)
	C1C4	人 数 (%)	2 (0.93)	0 (0)
	C2C3	人 数 (%)	1 (0.46)	0 (0)
	C1DCh1	人 数 (%)	1 (0.46)	3 (1.38)
	C2DChi	人 数 (%)	6 (2.87)	1 (0.46)
	B-C2	人 数 (%)	1 (0.46)	0 (0)

注: 食管癌病人与对照组频率比较, C1C1 $u=3.7873$, $P<0.001$; C2C2 $u=2.3138$, $P<0.005$ 。

2.1.2 Tf 基因频率分布 按食管癌组和对照组的 Tf 表型数计算了 Tf 位点 C1、C2、C3、C4、DChi 和 B-C2 基因频率(表 2)。

表2 食管癌组和对照组 Tf 基因频率

人 群	调 查 人 数	Tf 基 因 频 率					
		C1 ¹⁾	C2 ²⁾	C3	C4	C1dchi	B-C2
食 管 癌 组	216	0.4745	0.4977	0.0046	0.0046	0.0162	0.0023
对 照 组	216	0.6227	0.3634	0.0046	0.0046	0.0093	0.0000

注: 食管癌组与对照组 Tf 基因频率比较, TfC1 $u=4.2117$, $P<0.001$; TfC2 $u=3.8357$, $P<0.001$ 。

由表 2 可见, 食管癌组 TfC1 基因频率为 0.4745, 低于对照(0.6227), u 检验结果表明, 两者具有非常显著的差异($u=4.2117$, $P<0.001$)。食管癌组 TfC2 基因频率为 0.4977, 高于对照组(0.3634), 两者也具有极其显著的差异($u=3.8357$, $P<0.001$)。这提示, TfC1 基因与食管癌的发生呈负相关, TfC2 基因与食管癌的发生呈正相关。

2.2 组特异性成份(Gc)亚型测定

2.2.1 Gc 表型频率分布 我们在食管癌组和对照组中都检测到了 Gc 的 1F, 1S, 2, 2-1F, 2-1S, 1F-1S 等 6 种常见的表型。此外, 在食管癌组中还检测到变异型 1S-1A_s, 1F-1A_s, 2-1A, 在对照组中也检测到 1F-1C, 1F-1A, 2V 等变异型。表 3 示食管癌组和对照组中 Gc 表型频率。 u 检验结果表明, 食管癌组和对照组 Gc 各表型频率之间均无显著性差异($P>0.05$)。此外, 经 χ^2 检验证明, 两组 Gc 表型分布也均符合 Hardy-Weinberg 法则。

表3 食管癌组和对照组 Gc 表型频率分布

人 群	调 查 人 数	Gc 表 型													
		1F		1S		2		2-1F		2-1S		1F-1S		其 他	
		人数	%	人数	%	人数	%	人数	%	人数	%	人数	%	人数	%
食 管 癌 组	217	31	14.29	19	8.76	14	6.45	44	20.28	41	18.89	63	29.03	5	2.30
对 照 组	217	41	18.98	17	7.83	17	7.83	40	18.43	39	17.97	60	27.65	3	1.38

2.2.2 Gc 基因频率分布 根据食管癌组和对照组的 Gc 表型数据, 估计了 Gc 位点的 1F、1S、2 等的基因频率(表 4)。 u 检验表明, 两组的 Gc 各等位基因频率之间无显著性差异($P>0.05$)。

表 4 食管癌组和对照组 Gc 基因频率

人 群	调 查 人 数	Gc 基 因 频 率			
		1F	1S	2	其 他
食 管 癌 组	217	0.3894	0.3272	0.2604	0.0230
对 照 组	217	0.4194	0.3065	0.2604	0.0137

3 讨 论

众所周知, 癌肿的发生机制是很复杂的, 环境中各种致癌因子在一定条件下可诱发肿瘤, 但远非都发生肿瘤, 这表明, 肿瘤的发生是环境因素和遗传因素共同作用的结果。环境因素只有在改变遗传物质的结构或功能的情况下才能使正常细胞转变为癌细胞, 只是对不同的肿瘤, 环境因素和遗传因素所起的作用不尽相同。因此, 癌肿的遗传素质问题理所当然地成为医学家、遗传学家们共同注目的问题。近年来, 不少学者采用包括蛋白质和酶等遗传多态性探讨肿瘤的遗传素质。本文报道潮汕地区汉族 216 例食管癌与 Tfc1 呈负关联($RR=0.44$), 却与 Tfc2 呈正关联($RR=1.65$)。本结果与陆振虞等(1992)报道⁽²⁾的上海地区汉族胃癌与 Tfc1 呈负关联($RR=0.56$), 与 Tfc2 呈正关联($RR=1.7$)的结果相近。黎钧耀等(1989)曾报道⁽⁸⁾, 双亲或双亲之一为食管癌或胃癌患者时, 子代发生食管癌或胃癌的相对危险率为 1.70(95%可信限为 1.4—2.0)。他们的研究结果证明食管癌有遗传倾向。本文报道的 216 例中有病理检查确诊的 172 例食管癌中, 169 例为鳞癌, 非鳞癌 3 例。前者的相对危险率, Tfc1 是 0.44, Tfc2 为 1.65; 后者的相对危险率, Tfc1 是 0.65, Tfc2 为 2.2, 提示这些病理类型的食管癌的发生均有相似的遗传倾向。

食管癌与血清蛋白质多态性关联的机理尚未明了, 有待进一步研究。据推测, 关联的蛋白质亚型可能直接导致某种程度的癌肿易感性。Beckman 等^(4,5)通过对辐射诱导淋巴细胞染色体损伤的研究, 认为 Tfc2 的产物是作为染色体损伤的促进因子起作用的, 其机理是 Tfc2 亚型能更有效地催化 H_2O_2 和 O_2 形成含有活性氧的羟基, 而活性氧能攻击 DNA 分子, 导致染色体损伤。我们的结果表明, Tfc2 与食管癌呈正相关, 这说明 Tfc2 亚型作为一种促进因子, 有可能诱发食管粘膜上皮组织 DNA 损伤, 从而导致食管癌的发生。然而, 并非 Tfc2C2 个体都会患食管癌, 这表明 Tfc2 亚型本身也许并非导致食管癌易感性增高的直接原因。很可能还有另一种机制, 已知 Tf 位点定位于 3q2.1—2.6, 某种食管癌易感基因与 Tf 位点的某一等位基因可能存在着连锁不平衡(Linkage disequilibrium), 从而导致食管癌风险增高。总之, 癌肿的遗传素质无疑是非常复杂的。本文的结果再次说明, 癌肿的发生是一种多因子遗传的多步骤过程。

参 考 文 献

- (1) 陆振虞等, 1992. 遗传学报, 19(5): 390—396.
- (2) 徐玖瑾等, 1987. 人类学学报, 6: 306.
- (3) 徐玖瑾等, 1987. 人类学学报, 6: 96.
- (4) Beckman L, *et al*, 1988. Hum. Hered., 35(2): 89—94.
- (5) Beckman L, *et al*, 1988. Hum. Hered., 38(1): 56—58.
- (6) Frohlander N, and Ljunburg B, 1986. Hum. Hered., 36(2): 119—122.
- (7) Hirschfeld J, 1959. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 47: 160—168.
- (8) Li J Y(黎钧耀), *et al*, 1989. Int. J. Cancer, 43: 755—761.
- (9) Mitchell R J, *et al*, 1988. Hum. Hered., 38(2): 117—121.
- (10) Smithies O, 1957. Nature, 180: 1482—1483.

本文于 1993 年 6 月 3 日收到。