

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)24-2256-03

P21 基因多态性与华北食管癌的相关性

马玉泉¹ 杨晓光¹ 刘 晖¹ 李保庆² 刘俊峰²

(¹ 邯郸市中心医院胸外科, 河北 邯郸 056001, ² 河北医科大学第四医院胸外科, 河北 石家庄 056370)

Association of P21 gene polymorphisms with esophageal squamous cell carcinoma in North China

MA Yu-Quan¹, YANG Xiao-Guang¹, LIU Hui¹, LI Bao-Qing², LIU Jun-Feng²

¹Department of Thoracic Surgery, Central Hospital of Handan, Handan 056001, China, ²Department of Thoracic Surgery, Fourth Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 056370, China

【Abstract】 AIM: To explore the influence of the single nucleotide polymorphism variants (SNPs) in the 3'-untranslated region (3'UTR) of P21 gene on the development and lymphatic metastases of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **METHODS:** The hospital-based case-control study included 202 ESCC patients and 265 healthy controls. Genomic DNA was extracted by using proteinase K digestion followed by a salting-out procedure. The SNPs of P21 were analyzed by polymerase chain reaction (PCR)-fragment length analysis and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP). **RESULTS:** The overall genotype and allelotype distributions of P21 3'UTR polymorphisms in ESCC patients were not significantly different from those in healthy controls ($P > 0.05$). Stratification analysis revealed that the P21 gene TT allele frequency in smoking patients (26.0%) was significantly higher than that in healthy smokers (12.0%, $\chi^2 = 8.60$, $P = 0.014$). Therefore, compared with P21 C/C genotype, smokers with the T/T genotype significantly had a higher risk to develop ESCC (sex and age adjusted $A = 3.36$, 95% CI = 1.45 - 7.75). However, P21 allele was not significantly different in both non-smoking ESCC group and healthy group ($P > 0.05$). The ESCC cases were further stratified according to the status of lymphatic metastasis at the time of diagnosis and the results showed that the p21 T/T allele (26.4%) was more common in ESCC patients with lymphatic metastasis than those without lymphatic metastasis (15.3%, $\chi^2 = 6.128$, $P = 0.013$). Compared with familiar monadelphous the C/C genotype, T/T genotype significantly increased the risk of lymphatic metastasis (sex and age adjusted $A = 3.11$, 95% CI = 1.28 -

7.52). **CONCLUSION:** The P21 T/T allele may increase the susceptibility to ESCC among smokers in North China and the risk of lymphatic metastasis in ESCC.

【Keywords】 esophageal neoplasms; carcinoma, squamous cell; genes, P21; polymorphism, genetic; disease susceptibility; lymphatic metastasis

【摘要】目的:探讨P21基因外显子的3'非翻译区(UTR)第20碱基对的单核苷酸多态性对食管鳞状细胞癌(ESCC)发生及淋巴结转移的影响。方法:选择202例ESCC患者和265例健康对照个体,采集静脉抗凝血5 mL,同时收集病史、个人及肿瘤家族史。以蛋白酶K消化-饱和氯化钠盐析法提取外周血白细胞DNA,分别采用PCR-片段长度分析和PCR-限制性片段长度多态性(RFLP)方法检测P21外显子的3'UTR第20碱基对单核苷酸多态性基因型。结果:ESCC患者的P21基因3'UTR的多态性基因型和等位基因型分布与健康对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。ESCC吸烟组患者P21的T/T基因型频率(26.0%)显著高于健康吸烟组(12.0%, $\chi^2 = 8.60$, $P = 0.014$)。与C/C基因型相比,携带T/T基因型可增加吸烟者的ESCC发病风险(经性别和年龄校正的OR值为3.36, 95% CI = 1.45 - 7.75)。而在非吸烟的患者和健康个体中, P21的基因型及等位基因型频率均差异无统计学意义($P > 0.05$)。有淋巴结转移组的P21的T/T基因型频率(26.4%)高于无淋巴结转移组(15.3%, $\chi^2 = 6.128$, $P = 0.013$)。与常见基因型C/C相比,携带T/T基因型可增加ESCC患者淋巴结转移的风险(经性别、年龄校正的OR值分别为3.11(95% CI = 1.28 - 7.52))。结论:P21 3'UTR的T/T基因型可能增加中国北方吸烟人群ESCC易感性并可能增加ESCC患者淋巴结转移的风险性。

【关键词】食管肿瘤;癌,鳞状细胞;基因,P21;多态现象,遗传;疾病易感性;淋巴转移

【中图分类号】R735.1 **【文献标识码】**A

0 引言

P21基因是近年来发现的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKI)家族中的重要成员。P21基因的多态性与一些恶性肿瘤的易感性有关^[1]。但P21基因的多态性与食管癌易感性的研究尚少见报道。我们采用病例-对照研究方法,以探讨P21基因型与食管癌发病及淋巴结转移的关系。

收稿日期 2007-10-09; 接受日期 2007-11-30

作者简介:马玉泉, 硕士, 主治医师。Tel: (0310) 2118322 Email: myq111234@163.com

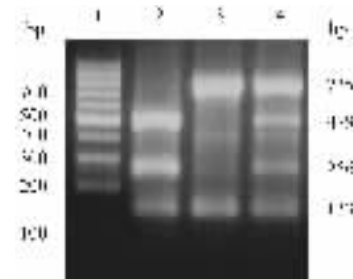
1 对象和方法

1.1 对象 2003/2005 选择河北医科大学第四医院行胃镜检查或住院手术治疗,经病理组织学证实的食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)患者 202(男 145,女 57)例,年龄 33~75(56.5±8.5)岁,其中 185 例有相关淋巴结转移资料记录的 ESCC 患者均经过外科手术。健康对照 265(男 198,女 67)例,年龄 33~69(55.9±7.4)岁,为同期在河北医科大学第四医院健康查体人员或河北省血站的献血员,无肿瘤及遗传病史。所有患者及健康对照均来自石家庄市或相邻市县,并均为汉族,无血缘关系。ESCC 患者的年龄、性别、吸烟状态、家族史、病理类型及淋巴结转移情况均来自住院病历,健康对照人员的以上信息由 2 名专门人员询问并记录。曾经吸烟或现在吸烟,每日 5 支以上并持续 2 a 以上者被定义为吸烟个体。家族中 1 名以上一级亲属或 2 名以上二级亲属患者属食管癌/贲门癌/胃癌者被定义为上消化道肿瘤(upper gastrointestinal cancers, UGIC)家族史阳性。两组间性别和年龄构成比均差异无统计学意义($P > 0.05$)。45 例健康对照和 7 例 ESCC 患者无相关吸烟资料记录。在有相关吸烟资料记录的研究对象中,ESCC 组吸烟者比例(49.2%)与健康对照组(49.1%)相比差异无统计学意义($\chi^2 = 0.01, P = 0.98$)。168 例健康对照个体无 UGIC 家族史记录或记载不清。ESCC 患者中 UGIC 家族史阳性者比例 26.2%,高于对照组(4.1%, $\chi^2 = 20.49, P = 0.000$)。因此,UGIC 家族史增加 ESCC 的发病风险,经年龄、性别调整后的 OR 值为 8.475(95% CI = 2.85~25)。185 例 ESCC 患者有临床资料,病理结果报告 87 人有淋巴结转移,98 人无淋巴结转移,没有远处转移。

1.2 方法 抽取外周静脉血 5 mL,经枸橼酸钠抗凝,于 4℃ 冰箱保存,并于采血后 1 wk 内提取外周血白细胞 DNA。P21 基因型检测按 PCR-RFLP 方法进行。P21 SNP 扩增引物 5'-GAATTTGCCGTTGGTCAAG-3'(上游引物)和 5'-AGGAGAACACGGATGAGGAG-3'(下游引物)。3'UTR 发生一个 C→T 的替代,从而产生一个 Pst I 限制性酶切位点, T 等位基因存在该识别位点。PCR 反应体系均为 25 μ L,其中模板 DNA 100 ng, 10×PCR 缓冲液 2.5 μ L, Taq-DNA 聚合酶(北京博大泰克生物基因技术有限公司) 2.5 U, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, 上、下游引物各 0.2 μ mol/L。P21 PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 64℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 60 s, 35 个循环后, 72℃ 继续延伸 5 min。取 PCR 产物

8 μ L 进行限制性内切酶消化,经 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析基因型。P21 基因的 PCR 产物为 868 bp (64℃)经限制性内切酶 Pst I 37℃ 过夜消化后, T/T 纯和基因型表现为 133 bp 和 735 bp 两个 DNA 片段,而 C/C 纯和基因型表现为 133, 256 和 479 bp 三个 DNA 片段, C/T 杂合型表现 133, 256, 479 和 735 bp 四个片段(图 1)。每一批 PCR 反应均以蒸馏水替代 DNA 作为阴性对照。1/10 的 DNA 标本进行了 2 次分型以证实分型方法的可靠性。

统计学处理:采用 SPSS 12.0 软件包进行,应用 χ^2 检验进行基因型频率的观察值与预期值的 Hardy-Weinberg 平衡检验。ESCC 组与对照组的基因型和等位基因型分布比较均采用 χ^2 检验。以非条件 Logistic 回归法计算经性别和年龄校正的比值比及其 95% 的可信区间。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。



1: 100 bp DNA 分子标记; 2: C/C; 3: T/T; 4: C/T.

图 1 P21 基因的单核苷酸基因多态性分型

2 结果

2.1 P21 基因 SNP 分布 所有 ESCC 组与健康对照组的 DNA 标本均经 PCR-RFLP 方法成功检测出 P21 基因的多态性基因型,经重复检测标本的基因型与原始结果 100% 吻合。P21 基因型分布在 ESCC 组及对照组中均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$)。ESCC 组和对照组 P21 等位基因 T, C 的频率分别为 42.3%, 57.7% 和 39.1%, 60.9%; T/T, C/T, C/C 基因型频率分别为 18.8%, 47.0%, 34.2% 和 14.4%, 49.4%, 36.2%。P21 等位基因型及基因型总体分布在 ESCC 组和健康对照组之间均无统计学差异($P > 0.05$)。

P21 的 T/T 基因型频率在 ESCC 吸烟组(26.0%)显著高于健康吸烟组的(12.0%, $\chi^2 = 8.60, P = 0.014$, 表 1)。与 C/C 基因型相比,携带 T/T 基因型可使吸烟人群 ESCC 的发病风险增加 3 倍,经性别和年龄校正的 OR 值为 3.36(95% CI = 1.45~7.75)。而在非吸烟的患者和健康个体中, P21 的基因型及等位基因型频率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 P21 基因 SNPs 与淋巴结转移的关系 有淋巴结转移组的 P21 的 T/T 基因型频率(26.4%)高于无淋巴结转移组(15.3%, $\chi^2 = 6.128, P = 0.013$, 表 2)。与常见基因型 C/C 相比,携带 T/T 基因型可使 ESCC 患者淋巴结转移的风险增高 3 倍,经性别、年龄校正的 OR 值为 3.11(95% CI = 1.28 ~ 7.52)。

表 1 P21 基因 SNP 分布分析

组别	P21 基因型 n(%)			OR(95% CI)
	T/T	C/C	C/T	
非吸烟				
正常人群	15(13.4)	55(49.1)	42(37.5)	1.15(0.52-2.55)
食管癌患者	13(13.1)	45(45.5)	41(41.4)	
吸烟				
正常人群	13(12.0)	51(47.2)	44(40.8)	3.36(1.45-7.75)
食管癌患者	25(26.0)*	46(48.0)	25(26.0)	

* $P < 0.05$ vs 正常人群。

表 2 P21 基因 SNPs 与淋巴结转移的关系

P21 基因型	淋巴结转移 n(%)		OR(95% CI)
	无	有	
C/C	39(39.8)	21(24.2)	1.0(ref)
C/T	44(44.9)	43(49.4)	0.67(0.37-1.25)
T/T	15(15.3)	23(26.4)*	3.11(1.28-7.52)

* $P < 0.05$ vs LM(-)。

3 讨论

食管癌是人类常见的恶性肿瘤之一,其发生与性别、年龄、种族有关。大多数食管癌患者年龄在 55 ~ 59 岁之间,35 岁以下的青年人很少发生,70 岁以后发病率逐渐降低,男女发病比例约为 2:1。降低食管癌发病率、死亡率最有效的途径就是预防,尤其是病因预防。近年研究表明,抑癌基因、代谢酶基因、DNA 修复基因等基因的多态性与个体对食管癌的易感性有关^[2-6]。P21 基因是近年来发现的 CDKI 家族中的重要成员,在许多肿瘤的发生发展中扮演着抑癌基因的角色。研究发现,在胃癌、结肠癌、膀胱癌、卵巢癌和胆管癌中 P21 基因的表达与肿瘤的预后明显相关^[7]。P21 基因的多态性决定了个体的差异性,在不同的环境因素作用下,可以表现出对疾病的不同易感性。P21 基因的多态性与一些恶性肿瘤如肺癌、乳腺癌、子宫内膜癌、前列腺癌^[1]的易感性有关。

我们的研究结果显示,病例总体分析并未发现

P21 基因 3'UTR 第 20 碱基对的多态性与 ESCC 的易感性相关。然而,根据吸烟状况分层分析发现,P21 的 T/T 基因型频率在 ESCC 吸烟组(26.0%)显著高于健康吸烟组(12.0%, $\chi^2 = 8.60, P = 0.014$)与 C/C 基因型相比,携带 T/T 基因型可使吸烟人群 ESCC 的发病风险增加 3 倍,经性别和年龄校正的 OR 值为 3.36(95% CI = 1.45 ~ 7.75)。而在非吸烟的患者和健康个体中,P21 的基因型及等位基因型频率均无显著性差异($P > 0.05$)。这说明 T/T 基因型可增加吸烟者患 ESCC 的风险,表明 T/T 基因型的过量表达可能与吸烟所诱导的代谢改变相互作用,从而影响 ESCC 的易感性。我们发现,与 C/C 基因型相比,携带 T/T 基因型可使 ESCC 患者淋巴结转移的危险性增高 3 倍。这表明携带 T/T 基因型的 ESCC 患者更容易发生淋巴结转移,提示携带该基因型的 ESCC 患者在临床治疗时应尽可能进行淋巴结清扫,并进行相应的术后综合治疗,以减少淋巴结转移病灶的残留。

综上所述,P21 基因 3'UTR 的多态性分析可作为预测中国北方吸烟人群 ESCC 易感性的分子指标之一,并可能用于 ESCC 患者淋巴结转移风险的预测。

【参考文献】

- [1] Kibel AS, Suarez BK, Belani J, et al. CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 2033-2036.
- [2] Miao X, Yu C, Tan W, et al. A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (-1306C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(14): 3987-3990.
- [3] Zhang ZW, Newcomb P, Hollowood A, et al. Age-associated increase of codon 72 arginine p53 frequency in gastric cardia and non-cardia adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(6): 2151-2156.
- [4] Zhang J, Li Y, Wang R, et al. Association of cyclin D1(G870) polymorphism with susceptibility to esophageal and gastric cardiac carcinoma in a northern Chinese population[J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(2): 281-284.
- [5] Wu MS, Wu CY, Chen CJ, et al. Interleukin-10 genotypes associate with the risk of gastric carcinoma in Taiwanese Chinese[J]. *Int J Cancer*, 2003, 104(5): 617-623.
- [6] Shen H, Xu Y, Qian Y, et al. polymorphisms of the DNA repair gene XRCCI and risk of gastric cancer in a Chinese population[J]. *Int J Cancer*, 2002, 88(4): 601-606.
- [7] Rose SL, Goodheart MJ, De Young BR, et al. p21 expression predicts outcome in p53-null ovarian carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(3): 1028-1032.

编辑 井晓梅