

应用等位基因特异性 PCR 和多重差别 PCR 检测肺癌患者 CYP1A1 和 GSTM1 的遗传多态性

陈森清 许 林 马国建 吴建中 薛开先
江苏省肿瘤防治研究所 南京 210009

摘要 本文对等位基因特异性 PCR (Allele-specific, AS) 和多重差别 (Multiplex differential, MD) PCR 技术进行了优化,并用此法联合检测了 105 例江苏地区健康人群及 68 例肺癌患者 CYP1A1、GSTM1 的等位基因型。结果表明:AS-PCR 及 MD-PCR 采用的设立双参照扩增体系,可一次同时检测 CYP1A1 和 GSTM1 的等位基因型。在肺癌患者组中,CYP1A1 的突变型 Val/Val 的频率 12/68 (17.6%) 约为健康组 9/105 (8.57%) 的 2.05 倍,而 GSTM1 纯合缺失的频率,肺癌组为 39/68 (57.3%),与健康对照组 42/105 (40%) 相比,亦有显著增加 ($P < 0.05$)。

关键词 等位基因特异性 PCR;多重差别 PCR;遗传多态;肺癌

IDENTIFICATION OF GENETIC POLYMORPHISM OF CYP1A1 AND GSTM1 IN LUNG CANCER PATIENTS BY USING ALLELE-SPECIFIC PCR AND MULTIPLEX DIFFERENTIAL PCR

Chen Senqing, Xu Lin, Ma Guojian, Wu Jianzhong, Xue Kaixian
Jiangsu Institute of Cancer Research, Nanjing 210009

Abstract Allele-specific PCR (AS-PCR) and multiplex differential PCR (MD-PCR) were used to identify the genotypes of CYP1A1 and GSTM1 in 68 lung cancer patients and 105 healthy controls. The results showed that genotypes of CYP1A1 and GSTM1 could be detected simultaneously with AS-PCR and MD-PCR; The frequency of CYP1A1-Val/Val in lung cancer patients group was 12/68 (17.6%), about 2.05-fold than that in healthy controls 9/105 (8.57%), and the frequency of GSTM1 0/0 was 39/68 (57.4%), remarkably higher compared with 42/105 (40%) in healthy controls ($P < 0.05$).

Key Words allele-specific PCR; multiplex differential PCR, polymorphism; CYP1A1; GSTM1

30% 的癌症与吸烟有关,其中吸烟是最强的肺癌危险因素⁽¹⁾。近年来,肺癌一直呈上升趋势,其发病率在肿瘤中已占前几位。研究表明,不同的 CYP1A1 等位基因型个体对烟草中多环芳烃的代谢活化密切相关,如 CYP1A1 同工酶第 462 氨基酸残基的缬氨酸 (Val) 突变型 [野生型为异亮氨酸 (Ile)], 其患肺癌的风险提高^(2,3);而 GSTM1 纯合缺失的吸烟者患肺癌的危险也提高^(3,4)。对两种基因型进行联合检测,则有利于检出危险性更高的个体。因此,联合检测

CYP1A1、GSTM1 等位基因型,探讨其与吸烟者患肺癌的风险的关系,从而对肺癌进行针对性预防有重要的经济和社会效益。

近年来,有许多检测基因突变型的方法,如 PCR-RFLP⁽⁵⁾、PCR-SSCP⁽⁶⁾ 等,但它们处理过程复杂,条件要求较高,结果判断比较复杂。我们采用等位基因特异性 PCR (Allele-specific PCR, AS-PCR) 和多重差别 PCR (Multiplex differential PCR, MD-PCR) 联合检测 CYP1A1、GSTM1 遗传多态性,较以往诸法更为

简便、易于推广,为进一步临床应用提供了可能,因此,本文在引物设计、PCR 体系优化等方面对这一技术作了较详细的研究。并对肺癌患者的 CYP1A1、GSTM1 等位基因型作了检测。

材料与amp;方法

1 DNA 提取:105 例正常人群对照组分别来自如皋市及本所体检人员,68 例肺癌病人均来自自我所胸外科手术肺癌患者。取静脉血 0.5ml,按微量血 DNA 提取法⁽⁷⁾提取 DNA,-20 保存。

2 引物设计

2.1 AS-PCR:设计 CYP1A1 的两个等位基因特异性引物:5'-AA GACCTCCCA GCGGGCAA T-3'与 5'-AA GACCTCCCA GCGGGCAA G-3',两者的 3 端有不同的末端碱基,分别对应于该位点的碱基多态(A/G),然后两者分别与一条共同引物 5'-CTCTGGT-TACA GGAA GCTA T-3 配对,对每个被检血样分别做两份 PCR 检测两个等位基因。若分别仅在使用 CYP1A1-Ile 或 CYP1A1-Val 特异性引物时才出现 PCR 产物,则为 CYP1A1-Ile 纯合子(野生型)或 CYP1A1-Val 纯合子(突变型);如果两种等位基因引物的 PCR 均出现反应产物,则为 CYP1A1-Ile/Val 杂合子。

2.2 MD-PCR:设计两对引物:5'-GAACTCCCT-GAAAA GCTAAA GC-3'与 5'-GTTGGGCT-CAAATATACGGTGG 3'; 5'-CAACTTCA TC-CACGTT CACC-3'与 5'-GAAGA GCCAAG-GACAGGTAC-3',分别特异性扩增 GSTM1 基因片段(215bp)及参照基因 β -珠蛋白(268bp),结合 CYP1A1 的 PCR 产物(215bp)荧光强度,可 GSTM1 基因型:无 GSTM1 带出现,则为 GSTM1 基因缺失纯合子(GSTM1 0/+);出现 SGTM1 带,则为 GSTM1 基因纯合子(GSTM1 +/+)或缺失杂合子(GSTM1 +/0)。以上引物由上海 Sangon 生物工程公司合成。

3 PCR:PCR 试剂主要来自华美生物工程公司,而其中缓冲系统按 Bell, D. A⁽⁴⁾另行配置。为探讨 AS-PCR 及 MD-PCR 反应的最佳条件,dNTPs 分别设为 200 μ mol/L、100 μ mol/L、50 μ mol/L,引物浓度设三个梯度:0.9 μ mol/L、0.5 μ mol/L、0.25 μ mol/L,取一例已

知为 CYP1A1-Ile 纯合子的血样本的 DNA 提取液作 DNA 模板,每个反应加 5 μ l,反应总体积为 50 μ l。95 预变性 5min 后,然后 94 变性 1min、60 退火 1min、72 延伸 2min,35 个循环,最后 72 延伸 5min。

4 PCR 产物的检测:取 10 μ l 扩增产物,8%聚丙烯酰胺凝胶电泳,电压 150V,2.5h,溴已锭染色,紫外灯下观察、摄影。

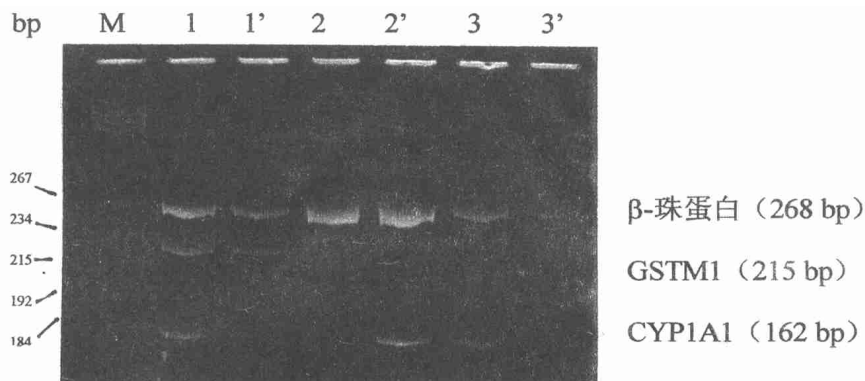
结果与amp;讨论

1 AS-PCR:不同浓度的 dNTPs 及引物间的组合对检测 CYP1A1 遗传多态性的 AS-PCR 的影响如下:PCR 体系中,dNTPs 为 200 μ M,引物为 0.5 μ M 时,AS-PCR 特异性最好,能清楚判定出已知的 CYP1A1-Ile 纯合子。引物浓度过高,则易于与模板非特异性结合,引物浓度过低,则提供不了足够引物与模板结合,同样,dNTPs 浓度过低,也没有足够的 dNTPs 供引物延伸之用,这些都影响 AS-PCR 的结果。

为提高 PCR 的特异性,我们还在以下几个方面作了改进:(1)鉴于 PCR 系统欠稳定以及扩增时杂带较多的情况,PCR 缓冲系统由华美公司提供的缓冲液调整为 Bell, D. A 等⁽⁴⁾的缓冲液;(2)提高退火温度至 60,而在低于 55 时,反应特异性不好,这是因为特异性引物 3'末端碱基在较高的退火温度下,不易与模板非特异性结合,从而保证了 PCR 的特异性;(3)在进行 PCR 各反应物加样时,反应管置于冰盒中,与其它一些措施⁽⁸⁾一样,可减少非特异性扩增的可能。

本文在设定 β -珠蛋白作为参照基因的同时,还把 CYP1A1 基因作为参照基因,用来检测 GSTM1 等位基因型,而在检测 CYP1A1 等位基因型时,采用两对特异性引物,则可快速敏感地检出 CYP1A1 的等位基因型,克服了 PCR-RFLP⁽⁵⁾,PCR-SSCP⁽⁶⁾等扩增后处理过程复杂等不利因素,为进一步临床应用提供了可能。

在上述优化 PCR 条件下,对 105 例正常人群对照及 68 例肺癌患者的 CYP1A1 等位基因型进行了检测。AS-PCR 可清楚地判定 CYP1A1 的各种等位基因型(附图)。其中,正常对照组及肺癌组的 CYP1A1 各种等位基因型的频率见附表。



附图 等位基因特异性和多重差别 PCR 显示的 CYP1A1、GSTM1 的遗传多态性

1,2,3,4 栏,PCR 引物为 CYP1A1-Ile 特异性引物;1',2',3',4 栏为 CYP1A1-Val 特异性引物

M-DNA Markers

1,1'-CYP1A1-Ile 纯合子(野生型),GSTM1 +/+ 或 GSTM1 +/-

2,2'-CYP1A1-Val 纯合子(突变型),GSTM1 0/0

3,3'-CYP1A1-Ile/Val 杂合子(杂合型),GSTM1 +/+ 或 GSTM1 +/-

附表

肺癌患者及健康人群对照 CYP1A1、GSTM1 等位基因型的分布

	总例数	CYP1A1 等位基因型			GSTM1 等位基因型	
		Ile/Ile	Val/Val	Ile/Val	+/+ 及 +/-	0/0
正常对照组	105	66(62.9%)	9(8.57%)	30(28.6%)	63(60.0%)	42(40.0%)
肺癌患者组	68	35(51.5%)	12(17.6%)	21(30.9%)	29(42.6%)	39(57.4%)

2 MD-PCR:应用 MD-PCR 可检测出 GSTM1 不同的等位基因型(附图)。在 215bp 处未见扩增产物的为 GSTM1 基因缺失纯合子(GSTM1 0/0),有扩增带出现的为 GSTM1 基因纯合子(GSTM1 +/+)或缺失杂合子(GSTM1 +/-)。对照组及肺癌组中 GSTM1 的基因型频率分布见附表。

由附表可知,江苏地区正常人群的 CYP1A1 的基因型频率:CYP1A1-Ile/Ile(野生型)为 62.9%,CYP1A1-Val/Val(突变型)为 8.57%,CYP1A1-Ile/Val(杂合型)为 28.6%;GSTM1 0/0 频率为 40.0%,这一结果与日本健康人群的基因型频率分布相近⁽⁹⁾。与肺癌组相比,CYP1A1 基因型频率总体分布未见有明显差异($P > 0.05$),但是肺癌组中 CYP1A1 突变型的频率 12/68(17.6%)为对照组 9/105(8.57%)的 2.05 倍;GSTM1 基因纯合缺失的比例,肺癌组为 39/68(57.4%),与对照组 42/105(40.0%)相比,有显著增加($P < 0.05$, $\chi^2 = 4.99$, d. f = 1),提示 CYP1A1 基因突变型合并 GSTM1 纯合缺失与肺癌发生可能有一定的相关性。

需要指出的是,附图中显示的 CYP1A1 野生型或突变型,理论上讲,在平行的两份检测等位基因的 PCR 中,162bp 处应只有一份出现扩增带,而在实验

中,另一也有非常弱的一条带(如栏 2 的 162bp 处),这考虑为 AS-PCR 的两份特异性引物间因只在 3' 端存在一个碱基的差异,仍有少量引物与 DNA 非特异性结合,因而出现了较浅的非特异性扩增带,但这一现象不影响对结果的判定。AS-PCR 及 MD-PCR 的建立,以及对健康人群与肺癌患者基因型频率的检测,为进一步研究 CYP1A1、GSTM1 遗传多态性与吸烟者肺癌易感性的关系提供了可靠的方法学基础及参考数据。

参考文献

- Hirayama T. Health effects of active and passive smoking. In: Aoki M, Hisamichi S and Tominaga, eds. Smoking and health 1987. Amsterdam: Elsevier, 1988:75
- Ahunde JAG, Martinez C, Ladero JM, et al. Debrisoquin oxidation genotype and susceptibility to lung cancer. *Clin Pharmacol Ther*, 1994;55:10
- Nakachi K, Imai K, Hayashi SI, et al. Polymorphisms of CYP1A1 and Glutathione transferase gene associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Res*, 1993;53:2994
- Bell DA, Thompson CL, Taylor JA, et al. Genetic monitoring of human polymorphic cancer susceptibility genes by polymerase chain reaction: Application to glutathione transferase mu. *Environ Health Per*

结晶型硫化镍诱发 BALB/c - 3 T3 细胞恶性转化

刘云岗 陈家 吴中亮

广州医学院化学致癌研究所 广州 510182

摘要 采用细胞灶法测定结晶型硫化镍对 BALB/c - 3 T3 诱发细胞转化的活性,结果表明当硫化镍浓度 $0.25\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时转化率增高 ($P > 0.05$),且有剂量反应关系。各剂量组转化灶细胞共 6 份经软琼脂培养试验均获阳性结果,而对照细胞则为阴性,提示硫化镍诱发的转化细胞具有锚着不依赖性,即恶性特征。

关键词 结晶型硫化镍;BALB/c - 3 T3 细胞;细胞转化;恶性

MALIGNANT TRANSFORMATION IN BALB/c - 3 T3 CELLS INDUCED BY CRYSTALLINE NICKEL SULFIDE

Liu Yungang, Chen Jiakun, and Wu ZhongLiang

Institute of Chemical Carcinogenesis, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182

Abstract Focus system was used to assay the cell transforming activity of crystalline nickel sulfide (NiS) in BALB/c - 3 T3 cells. The results indicated that at the concentrations equal to or above $0.25\mu\text{g}/\text{cm}^2$, NiS induced increases in transformation frequency ($P < 0.05$), in a concentration-dependent manner. The transformed cells from 6 different foci all grew to colonies on soft agar ccultures while control cells appeared negative. This result showed the anchorage-independence of the transformed cells from various foci which is one of the features of malignancy.

Key words crystalline nickel sulfide; BALB/c-3 T3 cells; cell transformation; malignancy

镍化合物于 1987 年被国际癌症研究机构 (IARC) 确认为第一类致癌物⁽¹⁾,其致癌机制正在研讨中,细胞转化是一常用体外诱癌模型。已有叙利亚

地鼠胚胎(Syrian hamster embryo, SHE) 细胞等用于检测镍化合物诱发细胞转化的活性及其作用机制^(2,3),但镍化合物对 BALB/c - 3 T3 细胞的作用多

- spect, 1992;98:113
- 5 Pan JP, Chiang AN, Tai JJ, et al. Restriction fragment length polymorphisms of apolipoprotein B gene in Chinese population with coronary heart disease. *Clin Chem*, 1995;41:424
 - 6 Orita MS, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gelelectrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989;86:2766
 - 7 Linnet K and wiborg O. Steady-state serum concentrations of the neuroleptic perphenazine in relation to CYP2D6 genetic polymorphism. *Clin Pharmacol Ther*, 1996;60:41
 - 8 Hoelxel AR. Molecular genetic analysis of populations: A practical approach, 1st ed. New York: Oxford University Press, 1992:171
 - 9 Hayashi SI, Watanabe J and Kaqajiri K. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and mur class glutathione s-transferase gene. *Jpn J Cancer Res*, 1992;83:866
 - 10 Kihara M, Kihara M, and Noda K. Lung cancer risk of GSTM1 null genotype is dependent on the extent of tobacco smoke exposure. *Carcinogenesis*, 1994;15:415

(1999 - 02 - 28 收稿;1999 - 03 - 12 接受)