

## 食管组织中代谢酶相关基因的异常表达与食管癌的发病关系研究

刘 冉<sup>1</sup>, 尹立红<sup>1</sup>, 浦跃朴<sup>1</sup>, 王 仪<sup>2</sup>, 潘恩春<sup>2</sup>

(1. 东南大学公共卫生学院, 江苏南京 210009; 2. 淮安市疾病预防控制中心, 江苏淮安 223001)

[摘 要] 目的 研究与环境致癌物活化、解毒有关的 Ⅰ 相和 Ⅱ 相代谢酶的 mRNA 水平与食管癌发病的关系。方法 收集 93 例淮安地区食管癌新发病例的食管癌组织及远端癌旁组织, 应用 SYBR Green 实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 CYP2E1、GSTP1、MTHFR 和NQO1 等基因的 mRNA 水平; 应用 t 检验和 logistic 回归分析评价基因的表达水平与食管癌的关系。结果 CYP2E1 和 MTHFR 的 mRNA 水平在癌组织和配对癌旁组织之间有显著差异; 条件 logistic 逐步回归分析结果显示 CYP2E1、MTHFR 表达水平异常与食管癌发病风险升高有关联[OR 值(95%CI)分别为 1.890(1.439~2.481)和 1.362(1.107~1.677)]。结论 CYP2E1 和 MTHFR 的表达水平改变与食管癌发病风险密切相关, 在食管癌的高危人群筛查和早期诊断中具有重要意义。

[关键词] 食管癌; 代谢酶; 基因表达; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R735.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2008)06-0401-05

Association between metabolism gene expression in esophageal tissues and the risk for esophageal carcinomas

LIU Ran<sup>1</sup>, YIN Li-hong<sup>1</sup>, PU Yue-pu<sup>1</sup>, Wang Yi<sup>2</sup>, Pan En-chun<sup>2</sup> (1. School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu, China; 2. Huai'an Center for Disease Control and Prevention, Huai'an 223001, Jiangsu, China)

[Abstract] Objective To investigate the relation between the mRNA expression levels of genes that involved in Ⅰ and Ⅱ phase of metabolism and activation of environmental carcinogens and the risk for ESCC. Methods Tumor and no-cancer tissues from 93 patients of newly diagnosed, untreated ESCC were collected in Huai'an County. The relative expression levels of four metabolism genes (CYP2E1, GSTP1, MTHFR and NQO1) were determined in cancer and no-cancer tissues by quantitative real-time RT-PCR using SYBR Green I. The expression of  $\beta$ -actin was used as an internal control. T-test and logistical regression analysis were used to test the differences of gene expression between cancer tissues and tissues adjacent to the tumors at a significance level of 5%. Results Compared with tissues adjacent to the tumors, the relative expression levels of CYP2E1 and MTHFR were significantly altered in esophageal cancer tissues. The conditional logistic regression analysis exhibited that the increased risk for esophageal cancer were significantly associated with aberrant expression of CYP2E1 and MTHFR [OR (95%CI) = 1.890 (1.439~2.481), OR (95%CI) = 1.362 (1.107~1.677), respectively]. Conclusion The increased expression of CYP2E1 and the reduced expression of MTHFR in esophagus were significantly associated with the risk for ESCC. Our data suggest an important etiology clue to CYP2E1 and MTHFR expression for the early progression of ESCC.

[Key words] Esophageal carcinomas; Metabolism gene; Gene expression; Quantitative real time RT-PCR

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571540, 30671732); 江苏省预防医学基金项目(Y2006007)

作者简介: 刘 冉(1974-), 女, 山东平原人, 博士, 讲师, 从事肿瘤环境基因组学研究。

食管癌作为一种环境暴露相关肿瘤,其发生发展与环境和遗传因素均有着密切的关系。与外源化合物的活化和解毒有关的代谢酶是影响个体患病风险的重要因素<sup>[1-2]</sup>。环境中的致癌物绝大多数为前致癌物,需被 相代谢酶激活才呈现致癌性,而机体的相代谢反应则使 相反应代谢活化所产生的亲电子中间体与体内的化合物进行结合反应,从而使其失活并增加其水溶性。活化的致癌物可被 相酶解毒。因此不同个体表现的代谢反应的差异可能由于对前致癌物的激活和解毒代谢失衡而影响个体对肿瘤的发病风险。现有部分研究发现 CYP 1A 1、CYP 2E 1、GST P 1、MTHFR 和NQO 1 等多种代谢酶基因的功能异常与肿瘤的发病有关<sup>[3-6]</sup>。因此,本课题组采用实时荧光定量PCR 技术测定CYP2E1、GSTP1、MTHFR、NQO1 等基因在93例淮安地区食管癌新发病例的食管癌组织及远端癌旁组织中的mRNA 表达水平,以探讨这些代谢酶基因的转录水平与食管癌发病风险的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象 在江苏省淮安市辖区内居住20年以上的汉族人群。收集93例经淮安市第一人民医院病理或内窥镜诊断明确的2006年原发性食管鳞癌新发病例,未经放、化疗治疗。平均年龄(57.89±7.47)岁,男女比例1.34:1。

1.2 样品采集 在取得被调查人员的知情同意后,收集肿瘤患者新鲜手术组织,包括癌组织和远端癌旁组织各2块,RNA bcker 保存。

1.3 试剂及仪器 总RNA 抽提试剂 Trizol 为

Invitrogen 公司产品,逆转录体系采用Promega 公司产品,SYBR Green IMasterMix 为Toyobo 公司产品,DNase I 为Takara 公司产品,应用仪器有Gene Quant DNA RNA 浓度测定仪(Pharmacia Biotech)、ChemimagerTM 5500 凝胶成像分析仪(A lpha Innotech)、ABI 7300 荧光定量PCR 仪。

1.4 方法

1.4.1 食管癌及癌旁组织RNA 提取及纯化 在采集的食管癌组织和远端癌旁组织样本中加入1ml Trizol 变性裂解液,吹打混匀后提取总RNA,取总RNA 20~50 μg,加入10U 的DNase I降解基因组DNA,纯化总RNA,测定浓度和A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>比值;取2 μl 总RNA 行1% 琼脂糖电泳,鉴定RNA 的完整性。

1.4.2 cDNA 合成 取上述总RNA 1~2 μg 进行逆转录,RNA 与OligodT (18) 0.5 μg 及适量DEPC 水混合 70 ℃ 5 min,再加入5×MMLV buffer 5 μl、10 mmol/L dNTP 1.25 μl、RNasin 20 U、MMLV 200 U,加DEPC 水补足体积至25 μl;42 ℃ 1 h 后95 ℃ 5 min 降解DEPC,-20 ℃ 保存备用。

1.4.3 实时荧光定量PCR 参考比较域值法<sup>[7]</sup>,以β-actin 为内参照基因,测定CYP2E1、GSTP1、MTHFR 和NQO1 等基因的mRNA 水平。PCR 扩增应用的引物序列如表1。PCR 反应体系包括:SYBR Green IMasterMix 12.5 μl、10 μmol/L 引物各1 μl、cDNA 2 μl,加去离子水补足体积至25 μl。反应条件:50 ℃ 2 min,95 ℃ 预变性10 min 后,94 ℃ 30 s,优化的退火温度60 s 并采集荧光信号,40 个循环;自60 ℃ 至99 ℃ 缓慢升温进行熔解曲线分析。目的基因的相对表达水平用ΔCt 表示。

表1 用于实时荧光定量分析的代谢酶基因引物序列

基因	引物	序 列	扩增子(bp)	优化退火温度(℃)	参考文献
CYP 2E 1	Forward	5'-ACCT GCCCCA T GAA GCA ACC-3'	246	58	[8]
	Reverse	5'-GAAACAA CTCCA TGC GA GCC-3'			
GST P 1	Forward	5'-CC TGTACCA GTCCAA TACCA TCCT-3'	71	64	*
	Reverse	5'-CCTGCTGGTCC TTCCCA TA G-3'			
NQO 1	Forward	5'-TCA T TCTCTGGCCAA T TCA GA GT-3'	91	64	*
	Reverse	5'-GGA GT GT GCCCA A T GC TA TA T G-3'			
MTHFR	Forward	5'-GGCCA TCTGCA CAAA GCTAA G-3'	140	60	*
	Reverse	5'-AACTCA CT TC GGA TGTGCT TCAC-3'			
β-actin	Forward	5'-CCTGGCACCCCA GCACAA T-3'	70	64	*
	Reverse	5'-GCCGA TCCA CACGGA GTA CT-3'			

注: \* 采用 Primer Express 2.0 软件设计

1.5 统计学处理 应用 t-test 和条件 logistic 回归进行基因定量表达数据的分析。所有统计分析过程

采用 SAS 8.2 软件。

## 2 结果

2.1 各代谢酶基因 mRNA 水平的箱式分布图 应用实时荧光定量 RT-PCR 技术, 测定了 CYP2E1、GSTP1、MTHFR、NQO1、 $\beta$ -actin 等基因在 93 例食管癌患者癌组织和癌旁组织中的 mRNA 相对表达水平, 结果表示为目的基因的 Ct 与内参基因  $\beta$ -actin 的 Ct 的差值 ( $\Delta$ Ct)。图 1 显示了各目的基因 mRNA 的  $\Delta$ Ct 值在癌组织和癌旁组织的分布情况。

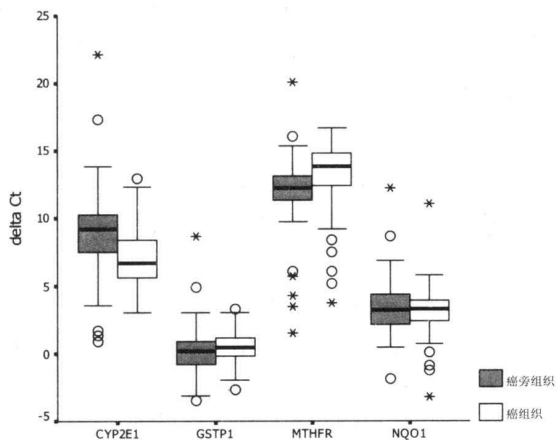


图 1 代谢酶基因 mRNA ( $\Delta$ Ct) 在食管癌组织和癌旁组织中分布的箱式图

表 2 食管癌组织和癌旁组织代谢酶基因的 mRNA 相对表达水平

基因	癌旁组织 $\Delta$ Ct <sup>a</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	癌组织 $\Delta$ Ct <sup>a</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	$\Delta\Delta$ Ct <sup>a</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}	t 值	P 值 <sup>b</sup>
CYP2E1	9.015 $\pm$ 2.940	7.013 $\pm$ 1.916	2.003 $\pm$ 3.148	4.008	6.101	< 0.000 1
GSTP1	0.248 $\pm$ 1.588	0.399 $\pm$ 1.109	0.151 $\pm$ 1.779	0.901	0.817	0.416
NQO1	3.325 $\pm$ 1.973	3.101 $\pm$ 1.268	0.224 $\pm$ 2.028	1.168	1.046	0.298
MTHFR	12.034 $\pm$ 2.410	13.261 $\pm$ 2.347	1.227 $\pm$ 3.327	0.427	3.555	0.000 6

注: <sup>a</sup>  $\Delta$ Ct = Ct<sub>目的基因</sub> - Ct<sub>管家基因</sub>;  $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct<sub>癌组织</sub> -  $\Delta$ Ct<sub>癌旁组织</sub>; <sup>b</sup> t 检验

对 4 个基因表达数据与食管癌发病的关系作 logistic 逐步回归, 进入和剔除自变量的检验水准  $\alpha_{\text{入}} = \alpha_{\text{出}} = 0.15$ , 结果见表 4。共有 2 个自变量进入模型, CYP2E1 与食管癌发病风险的关联强度可达 OR =

箱式图的上下边界线代表上四分位数和下四分位数, 中间横线代表中位数, 竖线代表数据散布范围, 溢出值被描述为圆形 (1.5 倍四分位数间距) 或星号 (3.0 倍四分位数间距)。

2.2 各代谢酶基因 mRNA 水平的比较域值分析 对癌组织和配对癌旁组织的 CYP2E1、GSTP1、MTHFR、NQO1 等基因  $\Delta$ Ct 值的差值  $\Delta\Delta$ Ct 进行了 t-test 分析如表 2。结果表明, CYP2E1 和 MTHFR 等基因的  $\Delta$ Ct 值在癌组织和配对癌旁组织之间的差异有统计学意义, 癌组织的表达水平平均为配对癌旁组织表达水平的比例为 CYP2E1 400.8%、MTHFR 42.7%。

2.3 各代谢酶基因 mRNA 相对表达水平的条件 logistic 回归分析 我们以条件 logistic 回归分析癌组织和配对癌旁组织各基因表达水平的  $\Delta$ Ct 值与食管癌发病风险的关系, 如表 3, 由结果可见, 癌组织的 CYP2E1 与癌旁组织相比表达明显上调, OR = 1.625 = 1.60 表明 CYP2E1 表达每上调 50%, 食管癌发病风险即增加 1.60 倍; 此外, MTHFR 表达下调, 与食管癌发病风险有显著关联, 但关系偏弱, OR 为 1.270。

1.890, 95%CI = 1.439~2.481, 表明 CYP2E1 基因的表达水平上调与食管癌发病关系较为密切; 此外, 在食管癌组织可见 MTHFR 表达水平明显下调, OR = 1.362, 95%CI = 1.107~1.677。

表 3 代谢酶基因的 mRNA 相对表达水平与食管癌发生的单因素 logistic 回归分析

基因	$\beta$	SE	$\chi^2$	P 值	OR (95% CI) <sup>a</sup>
CYP2E1	-0.469	0.104	20.375	< 0.000 1	0.625 (0.510~0.766)
GSTP1	0.097	0.119	0.662	0.416	1.102 (0.873~1.391)
NQO1	0.018	0.112	0.027	0.870	1.020 (0.818~1.269)
MTHFR	0.239	0.077	9.576	0.002	1.270 (1.092~1.477)

注: <sup>a</sup>  $\Delta$ Ct 每变化一个单位的 OR 值

表4 代谢酶基因的mRNA 相对表达水平与食管癌发生的多因素 logistic 回归分析

基因	$\beta$	SE	$\chi^2$	P 值	OR (95% CI) <sup>a</sup>
CYP2E1	- 0.637	0.139	21.059	< 0.000 1	0.529 (0.403~ 0.695)
MTHFR	0.309	0.106	8.606	0.003	1.362 (1.107~ 1.677)

注:<sup>a</sup>  $\Delta C_t$  每变化一个单位的OR 值

### 3 讨 论

现有研究表明食管癌的发生有着明显的遗传易感基础,对食管癌易感基因及其功能的探讨有助于全面阐明食管癌的遗传机制,对食管癌的发病风险进行准确评估。肿瘤的遗传易感性除表现为个体基因型的多态性,易感基因的表达与否和表达水平及其表达产物的正确修饰与活化都影响了个体对肿瘤的发病风险。国内外近年来开展了对代谢酶表达水平与食管肿瘤发病关系的研究,一般认为肿瘤组织的CYP2E1、CYP1A1 2 表达上调,而对GSTP1 表达水平的认识则有着矛盾的结果<sup>[9-11]</sup>;由于既往研究多采用定性或半定量研究,不能准确估计表达水平,造成了不同研究结果比较上的困难,因此本研究在前期初筛的食管癌相关基因基础上定量分析与比较候选基因的表达水平以便进一步明确其与食管癌发病的关系。

本次研究比较了食管癌患者的癌组织与癌旁组织中CYP2E1、GSTP1、NQO1 和MTHFR 等基因的mRNA 水平。配对t 检验结果发现两组的CYP2E1 mRNA 水平差异有显著性,癌组织中的CYP2E1 mRNA 水平比癌旁组织高3 倍,逐步回归分析表明在排除其他代谢相关基因表达水平的影响后,CYP2E1 表达水平上调与食管癌发病风险有关联(OR = 1.0529 = 1.89),CYP2E1 表达每上调50%,食管癌发病风险即增加1.89 倍,这一结果说明在食管癌癌变组织中CYP2E1 对外源化学物代谢活化能力增强,有可能增加食管上皮细胞对食管癌的易感性。我们的研究未发现GSTP1 和NQO1 的mRNA 水平在食管癌患者的癌组织与癌旁组织有显著差异(OR = 1.102, 95%CI = 0.873~ 1.391; OR = 1.020, 95%CI = 0.818~ 1.269),推测出现这一结果的原因:一方面不同地区人群的遗传易感特征不同,由于不同高发区可能具有不同的主要环境危险因素和不同的遗传基础,不同人群对环境化学物的反应可能有着分布上的差异,在淮安当地人群GSTP1 和NQO1 表达异常可能并不是食管组织癌变的一个遗传特征;另一方面我们的研究对象均为食管鳞癌患

者,肿瘤不同病理类型与GSTP1 和NQO1 mRNA 水平之间的关系尚需进一步探讨。我们对食管癌组织与癌旁组织的MTHFR mRNA 水平的分析结果表明,MTHFR 的表达水平在食管癌组织显著低于癌旁组织,与癌旁组织相比,癌组织的MTHFR mRNA 表达水平下调了57.3%,在一定意义上反映了癌组织叶酸代谢能力的异常。多因素Logistic 回归分析结果表明MTHFR 的表达下调可能与食管组织癌变有关(OR = 1.362, 95%CI = 1.107 ~ 1.677)。可能的机制为:由于MTHFR 的缺陷,导致了血液中5-甲基四氢叶酸的降低和同型半胱氨酸的堆积,使得作为甲基供体的蛋氨酸合成障碍,最终引起DNA 的低甲基化。因此对肿瘤组织中基因组甲基化水平的分析可能有助于进一步明确MTHFR 在食管癌发病中的意义。

综上所述,我们可以初步明确食管组织中食管癌发生相关差异表达代谢酶基因有CYP2E1 和MTHFR,在排除功能相关基因的影响后,CYP2E1 表达上调和MTHFR 表达下调可显著增加食管癌的发病风险。提示在淮安地区食管癌中,CYP2E1 和MTHFR 基因的适量表达对维持食管组织的正常代谢和基因组稳定性起着重要作用,其表达水平的异常可能影响了食管组织对外源性化学物的易感性,增加了食管癌的患病风险。

### 参 考 文 献

- [1] 陈建国, 陆建华. 国内外癌症防制现状[J]. 肿瘤, 2007, 27(9): 755-759
- [2] 林东昕, 谭文, 陆士新, 等. 中国食管癌分子流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(10): 939-943.
- [3] V allbohm D, L enz H J. Predictive and prognostic molecular markers in outcome of esophageal cancer[J]. Dis Esophagus, 2006, 19(6): 425-432
- [4] Spivack SD, H urtau GJ, Fasco MJ, et al Phase I and II carcinogen metabolism gene expression in human lung tissue and tumors[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(16 Pt 1): 6002-6011
- [5] H oriike N, A be M, Kum agi T, et al The quantification of cytochrome P-450 (CYP 3A4) mRNA in the blood of patients with viral liver diseases[J]. Clin Biochem, 2005, 38(6): 531-534

- [6] Strassburg A, Strassburg CP, Manns MP, et al. Differential gene expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase and NRH:quinone oxidoreductase in human hepatocellular and biliary tissue[J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 61(2): 320-325
- [7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [8] Liu R, Yin LH, Pu YP. A association of combined CYP2E1 gene polymorphism with the risk for esophageal squamous cell carcinoma in Huai'an population, China[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(20): 1797-1802
- [9] Godoy W, Albano RM, Moraes EG, et al. CYP2A6, 2A7 and CYP2E1 expression in human esophageal mucosa: regional and inter-individual variation in expression and relevance to nitrosamine metabolism[J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(4): 611-616.
- [10] 王江, 张三申, 文小岗, 等. 食管癌发生发展过程中GST- $\pi$ 基因表达的研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 1999, 21(1): 29-31
- [11] Brabender J, Lord RV, Wickramasinghe K, et al. Glutathione S-Transferase-Pi expression is down regulated in patients with Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma[J]. *J Gastrointest Surg*, 2002, 6(3): 359-367

(收稿日期: 2008-08-04)

(本文编辑: 潘雪飞; 英文编辑: 王建东)

## · 短 篇 ·

## 骨折术后并发异位骨化的临床分析(附37例报告)

俞新胜, 汪 普, 刘庆志, 林立波, 张 军, 丁 剑  
(解放军第94医院, 江西南昌 330002)

[关键词] 异位骨化; 骨折; 术后

中图分类号: R 683 文献标识码: B 文章编号: 1672-271X (2008)06-0405-02

异位骨化(heterotopic ossification, HO)是指机体骨骼系统之外的关节周围软组织中出现成熟的板层状骨的现象, 可导致严重的运动功能障碍, 也可称为关节周围骨化或关节周围新骨形成。HO常发生于关节手术、神经损伤、肌肉损伤或严重烧伤等。随着人工关节的广泛应用及关节切开复位内固定术的推广, HO发病率增高, 为临床医师所重视。自2000年1月以来, 对37例骨折术后致HO进行分析, 现报告如下。

## 1 临床资料

1.1 一般资料 本组37例, 男25例, 女12例, 男女比例约为2:1。年龄11~82岁, 平均43.1岁。髋部27例, 膝关节9例, 肘关节1例。临床表现为术后出现关节周围疼痛、发热、红肿, 逐渐出现关节活动受限等。实验室碱性磷酸酶(ALP)检查、普通X片、CT及必要时三相核素骨扫描可诊断。

1.2 结果 本组37例33例获随访1~3年, 29例症状不同程度缓解, 4例1年后行内固定取出术时行局部松解, 关节活动度有改善, 其中1例行异位骨化切除后3月复查X片仍有异位骨化征象。

## 2 讨论

2.1 原因及发病机理 异位骨化通常可分为以下三类: 创伤后异位骨化、神经源性异位骨化和原发性异位骨化。创伤性异位骨化好发于上肢的肩关节、肘关节和下肢的髋关节、膝关节及踝关节。其病因还不十分清楚, 但多数学者认为是

创伤后骨折、脱位使骨膜被掀起或骨膜被肌肉、肌腱、韧带或关节囊撕脱以及血肿吸收所致。各类创伤因素能造成间叶细胞或纤维细胞分化成骨先质细胞或成骨细胞, 这种转化必须依赖于诱导因子及体液调节的参与。Chalmers等<sup>[1]</sup>提出HO在软组织中形成的三个条件, 并认为HO的形成与局部及全身多种刺激成骨因素和抑制成骨因素之间的相互作用有关。这三个条件是成骨前体细胞、成骨诱导物及骨形成的软组织环境。Asa等<sup>[2]</sup>认为失去活力的组织可成为异位骨化的驱动因素。笔者认为异位骨化可能与多种因素有关, 据观察骨性关节炎、强直性脊柱炎患者为引起HO高危因素, 其次与性别年龄有关。手术中软组织损伤、骨膜剥离广泛、手术时间长、术中止血不彻底及功能锻炼不够或过度, 致局部血液滞留、组织缺氧、pH值改变, 能促进钙沉积以及疾病种类和个体差异等。本组2例过分追求早期功能锻炼且活动度过度, 胫骨平台骨折后股骨远端出现HO。

2.2 临床表现和诊断 HO的临床表现最早出现于伤后3周, 也有1年以后出现的报道<sup>[3]</sup>。进行性关节活动受限是HO最常见的表现, 早期表现包括关节周围疼痛、发热、红肿, 逐渐出现关节活动受限。除了关节活动障碍, HO的并发症还包括周围神经嵌压和压迫性溃疡<sup>[4]</sup>。出现肿胀、发热、红斑等, 需与深静脉栓塞、蜂窝组织炎、骨髓炎、脓肿或肿瘤相鉴别。实验室检查: ALP可以反映成骨细胞的活性, 是检测HO的可靠指标, 对于早期检测HO有一定的临床意义, 但ALP并非HO的特异指标, 在骨折和一些其他骨骼(下转第435页)