

鼻咽癌患者乙醛脱氢酶 2 基因 G1510A 突变及酶活性研究

张成禄¹, 于新发¹, 谢健敏¹, 王 前², 郑 磊², 曾方银², 张 鹏² (1. 南方医科大学附属顺德第一人民医院, 广东顺德 528300; 2. 南方医科大学南方医院检验医学中心, 广州 510515)

【摘要】 目的 研究乙醛脱氢酶 2(ALDH2)基因第 12 外显子 G1510A 遗传多态性及 ALDH 活性与鼻咽癌(NPC)的关系。方法 研究对象包括 70 例 NPC 患者和 86 例健康对照者。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术结合琼脂糖凝胶电泳,研究受试者 ALDH2 基因 G1510A 多态性位点的基因型与等位基因分布;采用比色法测定研究对象血清 ALDH 总活性水平。结果 病例组 AA、GA 和 GG 基因型频率分别为 24.29%、30.00% 和 45.71%, A 和 G 等位基因频率分别为 39.29% 和 60.71%;对照组 AA、GA 和 GG 基因型频率分别为 12.79%、25.58% 和 61.63%, A 和 G 等位基因频率分别为 25.58% 和 74.42%。病例组 A 等位基因频率高于对照组[相对危险度(OR)=1.88,95%可信区间(95%CI)=1.16~3.05, P<0.05],与 GG 基因型比较,AA 和 GA 基因型 NPC 患病风险增加。在病例组与对照组之间,ALDH 总活性无明显差异。结论 ALDH2 基因 G1510A 变异可能与 NPC 患病风险存在相关性,有待加大样本量作进一步研究。

【关键词】 鼻咽肿瘤; 醛脱氢酶; 多态现象,遗传; 基因; 突变

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.02.025 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)02-0178-02

Relationship of aldehyde dehydrogenase-2 G1510A gene polymorphism and aldehyde dehydrogenase activity with nasopharyngeal carcinoma ZHANG Cheng-lu¹, YU Xin-fa¹, XIE Jian-min¹, WANG Qian², ZHENG Lei², ZENG Fang-yin², ZHANG Peng² (1. Affiliated Shunde First People's Hospital, Southern Medical University, Shunde, Guangdong 528300, China; 2. Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

【Abstract】 Objective To investigate the association between G1510A polymorphism in the ALDH2 gene and genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma(NPC). **Methods** A total of 156 participants, including 70 patients diagnosed with NPC and 86 healthy control subjects, were genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) assay and PAGE electrophoresis. **Results** AA, GA and GG genotype frequencies were 24.29%, 30.00% and 45.71% respectively, A and G allele frequencies were 39.29% and 60.71% respectively in AMI group; AA, GA and GG genotype frequencies were 12.79%, 25.58% and 61.63% respectively, A and G allele frequencies were 25.58% and 74.42% respectively in control group. A allele frequency in the patient group was higher than that in the control group(OR=1.88,95%CI=1.16~3.05, P<0.05). **Conclusion** The study indicated that ALDH2 gene G1510A polymorphism might be related to NPC risk, it's necessary to increase sample size for further study.

【Key words】 nasopharyngeal neoplasms; aldehyde dehydrogenase; polymorphism, genetic; genes; mutation

乙醇进入体内后,在肝脏首先由乙醇脱氢酶(ADH)氧化生成乙醛,乙醛进而在乙醛脱氢酶(ALDH)的作用下生成乙酸,乙酸经三羧酸循环最终代谢为二氧化碳和水而排出体外。乙醛为致癌物质,ALDH2 对乙醛具有解毒功能,是乙醛的主要代谢酶^[1]。已有文献探讨 ALDH2 基因多态性及 ALDH 活性与肿瘤之间的关系,由于遗传、生活环境、生活方式以及是否存在病毒感染等因素的差异,其结论亦存在差异^[2]。本研究采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术结合琼脂糖凝胶电泳和紫外比色法对受试者 ALDH2 基因 G1510A 遗传多态性及 ALDH 活性与鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)的关系进行探讨。

1 对象与方法

1.1 研究对象 156 例研究对象中男 94 例,女 62 例,平均年龄为(51.0±13.5)岁。其中病例组 70 例,平均年龄(54.8±

11.8)岁,依据 WHO 颁布的“上呼吸道和耳部肿瘤组织学分类”中鼻咽癌的诊断标准进行确诊;对照组 86 例,平均年龄(47.7±14.2)岁,均无恶性肿瘤病史。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 抽取研究对象外周血 2 mL,置于含 3.6 mg 乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)的抗凝管中充分混匀,采用常规酚/氯仿法提取基因组 DNA,TE 缓冲液溶解 DNA 后,20 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 聚合酶链反应 基因型分析采用 PCR-RFLP 扩增基因组 DNA。设计引物序列^[3]:上游引物为 5'-CAAATTA-CAGGGTCAACTGCTATG-3';下游引物为 5'-CCACACTCA-CAGTTTTCTCTT-3'。反应体系(总体积 25 μL):10 × Ex PCR buffer 2.5 μL,2.5 mmol/L dNTP 2 μL,上游引物(15 pmol/μL)1 μL,下游引物(15 pmol/μL)1 μL,5 U/μL Ex Taq

DNA 聚合酶 0.13 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 16.5 μ L。采用 Applied Biosystems ABI 9700 PCR 仪进行扩增。反应条件:93 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;循环条件:94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。酶切:限制性核酸内切酶 Mbo II (Takara)在 37 $^{\circ}$ C 水浴对 PCR 扩增产物酶切 2 h。13.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 溴化乙锭 (EB) 染色, Marker 为 DL2000 (TaKaRa)。

1.2.3 ALDH 活性定量分析 采用 ALDH 定量检测试剂盒 (上海杰美) 分析受试者血清 ALDH 总活性。

1.3 统计学方法 所有实验资料均采用 SPSS13.0 统计软件

分析。采用基因计数法计算基因型和等位基因频率, 组间基因型和等位基因频率比较均采用 χ^2 检验。组间 ALDH 活性比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基因型分析 原扩增片段 136 bp, AA 型纯合子不能被酶切, 电泳显示只有 136 bp 区带; GG 型纯合子被完全酶切, 酶切产物为 127 bp 和 9 bp, 电泳显示 127 bp 区带; GA 型被部分酶切, 酶切产物为 127、136 和 9 bp, 电泳显示 127 和 136 bp 两条区带。

表 1 NPC 组和对照组 ALDH2 G1510A 多态性基因型与等位基因频率

组别	n	基因型			等位基因	
		AA	GA	GG	A	G
NPC 组[n(%)]	70	17(24.29)	21(30.00)	32(45.71)	55(39.29)	85(60.71)
对照组[n(%)]	86	11(12.79)	22(25.58)	53(61.63)	44(25.58)	128(74.42)
χ^2	—	4.563	1.474	—	6.691	—
P	—	0.033	0.225	—	0.010	—
OR(95%CI)	—	2.56(1.07~6.15)	1.58(0.75~3.32)	—	1.88(1.66~3.05)	—

注:—表示无数据。

2.2 NPC 组与对照组 ALDH2 基因 G1510A 基因型与等位基因频率分布比较 NPC 组 A 等位基因频率高于对照组。假定 GG 型 OR 值为 1.0, 则 AA 基因型 OR 为 2.56, GA 基因型 OR = 1.58。结果表明, A 等位基因个体 NPC 患病风险高于 G 等位基因个体, AA 基因型和 GA 基因型个体罹患 NPC 风险高于 GG 基因型个体(表 1)。

2.3 ALDH 活性定量测定 独立样本 *t* 检验结果显示, NPC 组与对照组 ALDH 总活性水平差异无统计学意义($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 NPC 组和对照组 ALDH 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALDH(U/L)	t	P
NPC 组	70	57.24 \pm 139.37	-0.210	0.834
对照组	86	63.62 \pm 100.86		

3 讨 论

ALDH2 定位于第 12 号染色体(12q24.2), 是线粒体 ALDH 的主要编码基因。ALDH2 基因在第 12 外显子处发生点突变(G1510A), 即 G \rightarrow A 密码子的改变导致其所编码的氨基酸发生改变(Glu487Lys), 谷氨酸变成赖氨酸, 使野生型等位基因 GG(ALDH2 * 1)变为突变型等位基因 AA(ALDH2 * 2)或杂合型等位基因 GA(ALDH2 * 1 / * 2), 而 ALDH2 * 1 / * 2 和 ALDH2 * 2 基因型携带者被认为无 ALDH 酶活性^[4], 从而使 ALDH2 酶活性丧失或降低^[5], 导致乙醛氧化为乙酸延迟, 使饮酒后血液中乙醛蓄积。饮酒后产生的有毒物质乙醛主要依赖 ALDH2 进行代谢, 解除毒性。有研究表明, ALDH2 活性丧失或降低可致饮酒后乙醛在血液中蓄积, 从而增加罹患肝癌、食管癌和胰腺癌等疾病的风险^[6-9]。

有研究表明, ALDH2 基因存在多态性, 突变基因型发生频率在不同种族、不同人群中存在差异。东方人 ALDH2 * 2 等位基因发生频率最高, 中国人平均为 17.7%, 也可达 48.26%, 而白种人最低, 几乎为 0, 这可能是白种人饮酒量大

于东方人的主要原因^[4,10]。

本研究显示 NPC 组 ALDH2 基因第 12 外显子 G1510A 位点 A 等位基因频率高于对照组, OR 值为 1.88, AA 和 GA 基因型频率均高于 GG 基因型, OR 值分别为 2.56 和 1.58, 提示 A 等位基因个体患 NPC 风险高于 G 等位基因个体。NPC 组和对照组 ALDH 总活性水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。以上结果可能存在 AA 和 GA 基因型在对照组未被充分代表, 而在 NPC 组过度表达的因素, 同时不排除表型异质性的因素, 有待加大研究样本例数进行验证。遗传多态性与疾病发生、发展的相关性研究结论可能存在矛盾之处, 其原因可能包括使用小样本、抽样偏差、病例组和对照组之间发生错配、表型异质性、种族差异、人群差异、生活方式差异(如有无饮酒、吸烟习惯)以及未能识别基因-基因和基因-环境相互作用等。因此, 针对不同的种族、人群, 有必要构建多中心合作研究模式, 加大研究样本含量, 开展前瞻性追踪研究, 并对疾病及各种危险因素进行分层研究, 尤其是必须强化基因突变位点突变与否所表达产物的生物学功能与作用机制的研究。

参考文献

[1] Yamauchi M, Maezawa Y, Mizuhara Y, et al. Polymorphisms in alcohol metabolizing enzyme genes and alcoholic cirrhosis in Japanese patients: a multivariate analysis[J]. Hepatology, 1995, 22(Pt4) : 1136-1142.

[2] Tan EC, Lim L, Leong JY, et al. Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms in Chinese and Indian populations[J]. Subst Use Misuse, 2010, 45(1-2) : 1-14.

[3] Nishida N, Tanaka M, Hayashi N, et al. Association of ALDH2 genotypes and alcohol consumption with periodontitis[J]. J Dent Res, 2004, 83(2) : 161-165.

[4] 哈斯图雅, 毕力夫, 苏秀兰. 乙醛脱氢酶 2 (ALDH2) 基因研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15(5) : 3-4.

[5] Ikawa MC, Imprati NC, Wang G, et al. (下转第 181 页)