

• 论 著 •

Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点多态性与肺癌发病的相关性研究^{*}陈贤华¹, 刘和艳¹, 詹前美¹, 徐玉婵¹, 刘大鹰²

(柳州市柳铁中心医院:1. 检验科;2. 呼吸内科, 广西柳州 545007)

摘要:目的 探讨 Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点 G>C 位点单核苷酸多态性改变与肺癌发生的相关性。方法 基因分型用 TaKaRa 公司的 MightyAmp DNA 聚合酶法,分别检测 36 例肺癌患者(癌症组)和 23 例非癌症患者(对照组)的 Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点 G>C 分布,运用 χ^2 检验、Logistic 回归分析和 Armitage's 趋势检验分析基因多态性、患者性别、吸烟与否、年龄与肺癌发生的相关性。结果 两组标本经哈迪-温伯格平衡检测,对照组在 Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点 G>C 基因型 GG、GC、CC 观测频数分别为 21、1、1,理论频数分别为 20.01、2.80、0.10,差异无统计学意义($P=0.067$);癌症组的 GG、GC、CC 基因型观测频数分别为 33、1、2,理论频数分别为 31.17、4.65、0.17,差异有统计学意义($P=0.003$)。Logistic 回归分析显示,年龄、基因多态性、患者性别和吸烟与否在肺癌发生中均不是危险因素($P>0.05$);经 Armitage's 趋势检验显示,Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点多态性与肺癌发生之间无相关性($\chi^2=0.00, P=0.946$)。结论 Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点 G>C 单核苷酸位点多态性与肺癌发生不具有相关性。

关键词:肺癌; Reprimo 基因; 多态性; 哈迪-温伯格平衡

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.18.009 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)18-2576-04

The correlation between Reprimo 824 polymorphism and lung cancer^{*}CHEN Xianhua¹, LIU Heyan¹, ZHAN Qianmei¹, XU Yuchan¹, LIU Daying²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Respiratory Department, Liuzhou Municipal Liutie Central Hospital, Liuzhou, Guangxi 545007, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between Reprimo gene 3'-untranslated region 824 G>C polymorphism and lung cancer. **Methods** Genotyping was performed by using MightyAmp DNA Polymerase, 36 lung cancer patients (cancer group) and 23 lung cancer patients (control group) were genotyped. The results of investigation were analyzed with χ^2 test, Logistic regression and Armitage's trend test. **Results** According to Hardy-Weinberg equilibrium examination, the observed frequencies of GG, GC and CC in Reprimo 824 G>C genotype of control group were 21, 1 and 1, respectively, while the theoretical frequency were 20.01, 2.80 and 0.10 respectively (no statistically significant difference was observed, $P=0.067$). The observed frequencies of GG, GC and CC in Reprimo 824 G>C genotype of cancer group were 33, 1 and 2, respectively, while the theoretical frequency were 31.17, 4.65 and 0.17, respectively (no statistically significant difference was observed, $P=0.067$). Tested by using Logistic regression, gene polymorphism, age, smoking status and lung cancer ($P>0.05$). Armitage's trend test revealed no statistically significant correlation between Reprimo 824 G>C polymorphism and susceptibility to lung cancer ($\chi^2=0.00, P=0.946$). **Conclusion** This study indicates that there is not an association between the Reprimo gene 3'-untranslated region 824 G>C polymorphism and lung cancer.

Key words: lung cancer; Reprimo gene; polymorphism; Hardy-Weinberg equilibrium

肺癌是临床上常见恶性肿瘤之一,80%肺癌患者就诊时已属中晚期,生存率低,但早期肺癌治疗的5年生存率可达90%^[1-2]。早期肺癌患者无特异性症状,其早期诊断率较低的问题仍待解决。有学者在实验中发现人类许多基因都具有遗传多态性,并对个体肿瘤易感性起重要决定性作用^[3]。肺癌的基因易感性体现在基因(包括抑癌、酶修复和酶代谢基因)的多态性和某些基因的突变缺失^[4-5]。国内外报道 Reprimo 基因甲基化与肿瘤发生发展、治疗方面具有一定的相关性^[6-8],而肿瘤与 Reprimo 基因多态性关系的论述较少,本实验旨在探讨 Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点多态性是否与肺癌有关联。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2006~2012 年本院和外院手术切除或纤支镜取得的患者肺(癌)组织,包括 36 例肺癌患者(肺癌组)

的肺癌组织标本和 23 例非肺癌患者(对照组)的正常肺组织标本。选取的标本质地均一,经 10%中性甲醛溶液固定后石蜡包埋,室温存档至今。肺癌组的患者按病理诊断分类,大细胞癌者 10 例,腺癌 9 例,鳞癌 7 例,小细胞癌 10 例;男 26 例,平均年龄(58.81±10.42)岁,女 10 例,平均年龄(54.40±9.58)岁,年龄比较差异无统计学意义($t=1.161, P=0.254$);吸烟者 19 例,未吸烟者 7 例。对照组的非肺癌患者为肺支气管扩张、肺扩张和肺部不典型增生的患者。23 例对照组患者中,男 19 例,平均年龄(54.21±10.24)岁,女 4 例,平均年龄为(50.00±6.16)岁,年龄比较差异无统计学意义($t=0.784, P=0.442$);吸烟者 16 例,未吸烟者 7 例。吸烟者的判断依据为 1997 年世界卫生组织(WHO)的定义:一生中连续或累计吸烟 6 个月或以上者。

^{*} 基金项目:广西壮族自治区卫生厅计划课题(Z2010138);广西壮族自治区柳州市科学技术局技术与开发计划课题(2011J0302031)。

作者简介:陈贤华,男,副主任技师,主要从事临床检验诊断学的研究。

1.2 仪器与试剂 核酸扩增仪为伯乐 MJ Mini 型扩增仪;试剂为 TaKaRa 公司的 MightyAmp DNA 多聚酶,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物的碱基序列为 R1:5'-AGA GGG CGA TTA GGG CGC AG-3';R2:5'-AGA GGG CGA TTA GGG CGC AC-3',R3:5'-AGG AGA AGA GTG GGA GCG C-3'。引物 R1、R3 针对的 824 位点为 G 片段,扩增产物长度为 249 bp;R2、R3 针对的 824 位点为 C 片段,扩增产物长度为 249 bp。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 采用 TaKaRa 公司 DEXPAT® 试剂。将肺(癌)组织(切片厚度为 5 μm)加入 PE 管,加 0.3 mL TaKa-Ra DEXPAT® 提取液,恒温仪器 100 ℃加热 10 min,低温离心机(4 ℃、12 000 r/min)离心 10 min 形成分层,吸取透明水层得到 PCR 扩增的 DNA。具体操作按说明书进行。

1.3.2 PCR 反应及产物的检测 反应体系为 25 μL:2×PCR 缓冲液 12.5 μL,模板 DNA 4 μL,上下游引物各为 0.5 μL,酶(5 U/μL)0.5 μL,ddH₂O 7 μL。扩增条件:98 ℃预变性 5 min;98 ℃ 10 s,60 ℃ 15 s,68 ℃ 60 s,循环 40 次;最后 68 ℃延伸 4 min。PCR 产物的检测:吸取 10 μL 产物进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳。

1.4 统计学处理 *t* 检验评估年龄组间的差异,χ² 检验评估肺癌组和对照组各基因型的分布差异,Logistic 回归分析多因素的危险性,以上的统计学处理采用统计软件 SPSS15.0 进行。哈迪-温伯格平衡检测、Armitage's 趋势检验,比值比(OR)及 95% 可信区间(CI)的计算利用在线软件(<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>)进行。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Reprimo 基因分型及统计结果 Reprimo 基因 3'非翻译区 824G>C 位点各个基因型在琼脂糖凝胶电泳显示的条带分别为 GG:249 bp;CC:249 bp,见图 1。

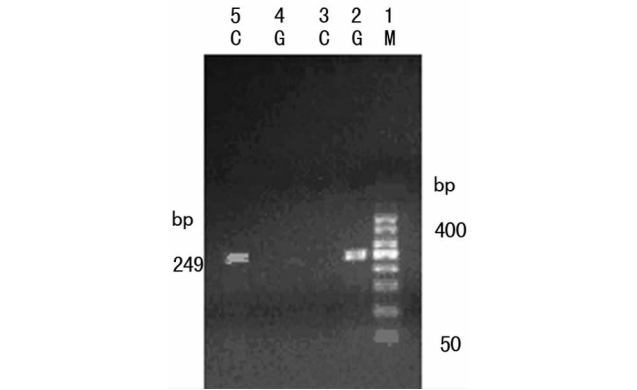
2.3 哈迪-温伯格平衡检测结果 各组在 Reprimo 基因 3'非翻译区 824G>C 位点基因型频数以及哈迪-温伯格平衡检验情况见表 1。判断符合哈迪-温伯格平衡的标准为精确检验(*P* > 0.05)。

2.4 肺癌发生的危险因素分析

2.4.1 单因素分析 统计分析显示基因多态性与肺癌无相关关系(χ² = 1.053, *P* = 0.591);性别与肺癌无相关关系(χ² = 0.837, *P* = 0.360);吸烟与否与肺癌无相关关系(χ² = 1.639, *P* = 0.200);年龄与肺癌无相关性(χ² = 1.532, *P* = 0.131)。见表 2。

2.4.2 多因素 Logistic 回归分析 以基因多态性、患者性别、吸烟与否和年龄为 4 个自变量,以是否患肺癌为因变量做 Lo-

gistic 回归分析,B 为回归系数,Exp(B)为相对危险度,见表 2。回归方程模型的适配度 Hosmer and Lemeshow 检验结果为 χ² = 2.730, *P* = 0.950,自由度(df) = 8。



注:泳道 1 为 DNA maker 条带(从上至下为 400、350、300、250、200、150、100、50 bp);G 表示 PCR 所加引物针对 G 片段;C 表示 PCR 所加引物针对 C 片段;泳道 2、3 表示测得基因型为 GG,泳道 4、5 表示测得基因型为 CC。

图 1 Reprimo 基因 3'非翻译区 824G>C 位点基因型条带图谱

表 1 各组研究对象哈迪-温伯格平衡检测结果[n_测(n_{理论})]

基因型	大细胞 癌组	腺癌组	鳞癌组	小细胞 癌组	肺癌组	对照组
GG	9(9.03)	8(7.11)	6(5.14)	10(0.00)	33(31.17)	21(20.01)
GC	1(0.95)	0(1.78)	0(1.71)	0(0.00)	1(4.65)	1(2.80)
CC	0(0.03)	1(0.11)	1(0.14)	0(0.00)	2(0.17)	1(0.10)
<i>P</i>	1.000	0.059	0.077	0.000	0.003	0.067

表 2 多因素 Logistic 回归分析

因素	B	S. E.	Wald	df	<i>P</i>	Exp(B)
基因多态性	-0.664	0.697	0.909	1	0.340	0.515
性别	-0.051	0.929	0.003	1	0.956	0.950
吸烟	-1.057	0.817	1.673	1	0.196	0.348
年龄	-0.064	0.034	3.578	1	0.059	0.938
常数项	5.387	2.701	3.977	1	0.046	218.490

2.5 Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点单核苷酸多态性与各组肺癌易感性 Armitage's 趋势检验 与携带 G 等位基因的患者相比,携带 C 等位基因的患者肺癌发病率高;与携带 GG 基因型的患者相比,携带 GC、CC 及 GC+CC 基因型的患者肺癌发病率稍高,各组肺癌 Armitage's 趋势检验情况见表 3。

表 3 各组肺癌 Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点各基因模型 Armitage's 趋势检验

项目	肺癌组	大细胞癌组	腺癌组	鳞癌组	小细胞组
等位基因 G vs. C					
OR	0.935	1.326	0.558	0.419	3.299
95%CI	0.212~4.114	0.129~13.579	0.085~3.654	0.063~2.799	0.163~66.881
χ ²	0.01	0.06	0.38	0.85	1.37
<i>P</i>	1.000	1.000	0.615	0.582	0.550
基因型 GG vs. GC					
OR	1.571	0.429	1.186	0.907	1.465

续表 3 各组肺癌 Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点各基因模型 Armitage's 趋势检验

项目	肺癌组	大细胞癌组	腺癌组	鳞癌组	小细胞组
95%CI	0.093~26.503	0.024~7.632	0.044~32.081	0.033~25.054	0.055~39.115
χ^2	0.10	0.35	0.38	0.28	0.47
P	0.752	0.554	0.540	0.595	0.493
基因型 GG vs. CC					
OR	0.786	1.326	0.381	0.286	1.465
95%CI	0.067~9.215	0.049~35.598	0.021~6.847	0.015~5.279	0.055~39.115
χ^2	0.04	0.42	0.46	0.78	0.47
P	0.847	0.516	0.499	0.376	0.493
基因型 GG vs. GC+CC					
OR	1.048	0.857	0.762	0.571	2.442
95%CI	0.161~6.804	0.069~10.699	0.060~9.611	0.044~7.438	0.107~55.562
χ^2	0.00	0.01	0.04	0.19	0.93
P	0.961	0.905	0.833	0.666	0.336
Armitage's 趋势检验					
χ^2	0.00	0.04	0.21	0.48	0.83
P	0.946	0.844	0.645	0.491	0.363

3 讨 论

基因 Reprimo 是一种细胞调控蛋白,由 109 个氨基酸组成,定位于人类染色体 2q23,作为 P53 基因的下游靶基因。异位表达的 P53 可引起 Reprimo mRNA 表达,其过表达可使细胞停止增殖,可能是通过抑制 Cdc2/cyclinB1 以及 Cdc2 活性核转位的途径调节细胞周期^[9]。

Ye 等^[10]报道 Reprimo 基因 3'非翻译区的 824 位点存在 G>C 多态性,并用哈迪-温伯格平衡检验高加索人群,证明该位点基因型和等位基因频率分布均符合遗传平衡规律。Beasley 等^[11]研究大肠癌与 Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点 G>C 多态性关系时,大肠癌组和健康组在该位点也符合遗传平衡规律,但憩室病组不符合遗传平衡规律。本实验结果发现,对照组 Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点 G>C 基因型和等位基因频率分布符合遗传平衡状态($P>0.05$),肺癌组不符合遗传平衡状态($P<0.05$),但肺癌病理分组中大细胞癌组、鳞癌组、腺癌组符合遗传平衡状态($P>0.05$),小细胞癌组不符合遗传平衡状态($P<0.05$)。各肺癌病理分组之间的基因型差异无统计学意义($\chi^2=5.949, P=0.429$)。不符合哈迪-温伯格平衡的原因可能有(1)基因分型错误,(2)基因突变/缺失,(3)样品数不够大。

相同致癌环境下,暴露人群只有一部分会得肺癌。Liu 等^[12]发现不同个体对致癌因素的易感性有差异;遗传倾向在大多数肺癌中可起到重要作用。本研究发现,基因多态性、患者性别、吸烟与否和年龄对肺癌是否发生作单因素分析时,均无统计学意义。以基因多态性、性别、吸烟与否和年龄为 4 个自变量,以肺癌是否发生为因变量做 Logistic 回归分析,四者在肺癌发生中不存在交互作用($P>0.05$)。

Beasley 等^[11]在研究 Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点 G>C 多态性与大肠癌关系时,发现 Reprimo 基因 824 位点 G>C 多态性与大肠癌不存在相关性。本实验结果显示 Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点基因改变,携带 C 等位基因的患者肺癌发病率高于 GG 纯合基因型的患者。Armitage's 趋势检验显示差异无统计学意义($P>0.05$),说明 Reprimo 基因 3'

非翻译区 824 位点基因改变所引起的肺癌发生率上升不呈线性递增,即 Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点 G>C 多态性与肺癌不存在相关性,而且肺癌病理分组中大细胞癌、腺癌、鳞癌、小细胞癌与 Reprimo 基因 824 位点 G>C 多态性也不存在相关性($P>0.05$)。

综上所述,Reprimo 基因 3'非翻译区 824 位点 G>C 单核苷酸多态性与肺癌的发生无相关性;基因多态性、患者性别、吸烟与否和年龄在肺癌发生中均不是危险因素。由于本研究例数有限,结果说服力不够,在后续研究中有必要进一步扩大标本例数,以明确 Reprimo 基因单核苷酸多态性改变在肺癌发生、发展中的作用。

参考文献

[1] 谢柏胜,杨勇,董礼文,等. 早期肺癌的影像学诊断及微创手术研究进展[J]. 中华胸心血管外科杂志,2015,31(6): 382-384.

[2] 王强. MicroRNA 在肺癌诊治中的研究进展[J]. 临床肺科杂志,2015,20(9):1728-1730.

[3] Fasching PA, Gayther S, Pearce L, et al. Role of genetic polymorphisms and ovarian Cancer susceptibility[J]. Mol Oncol, 2009, 3(2):171-181.

[4] Wang H, Zhang K, Qin HF, et al. Genetic association between angiotensinogen polymorphisms and lung Cancer risk[J]. Medicine(Baltimore), 2015, 94(37):e1250.

[5] Wen L, Jiang K, Yuan W, et al. Contribution of variants in CHRNA5/A3/B4 gene cluster on hromosome 15 to tobacco smoking: from genetic association to mechanism [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(1):472-484.

[6] 王海, 胡世莲, 沈干, 等. 5-AzadC 联合 TSA 对人胃癌 SGC-7901 细胞生长及 Reprimo 基因表达的影响[J]. 安徽科技大学学报, 2012, 47(1):1-5.

[7] 李颖, 易默, 何小勤. Reprimo 和 hMLH1 基因甲基化在胃癌早期诊断价值的研究[J]. 现代检验(下转第 2581 页)

慢性炎症患者和一些健康吸烟者的血清 CEA 水平也有升高的情况发生,因此,有专家认为 CEA 不适合单独作为诊断非小细胞肺癌的特异性指标^[12-13]。LPA 具有生长因子活性,与肿瘤患者的预后密切相关,能够提高肿瘤细胞迁移活性,现已发现其显著高表达于胃癌、卵巢癌、肺癌以及子宫内膜癌等多种肿瘤细胞,LPA 及其受体在肿瘤发生过程中发挥关键作用^[14-15]。

灵敏度高,特异性强,准确度高是一个理想的肿瘤标记物应有的特点,此外,还需能在肿瘤早期即可检测并有助于评价治疗效果、预测肿瘤的复发和转移^[16-17]。但目前所知的肿瘤标志物均不具有以上所有优点,因此,单个肿瘤标志物在恶性肿瘤的诊断中临床意义有限,有学者通过对多种肿瘤标记物在肺癌诊断方面的进行评价,认为其各有自己的优势,联合检测有利于提高灵敏度及特异度^[18],本研究也证实了这一点,血清 CEA 和 LPA 联合检测能够提高非小细胞肺癌诊断的灵敏度和准确度,弥补单一检测对非小细胞肺癌的漏诊现象。

综上所述,血清 CEA 与 LPA 联合检测有利于提高非小细胞肺癌诊断率,值得临床推广应用。

参考文献

[1] 蒋贝兰,沙杭,马劲夫,等.血清肿瘤标志物检测在肺癌诊断和临床分期中的作用[J].中国卫生检验杂志,2014,24(3):386-389.

[2] Xu LM,Li LQ,Li J,et al. Overexpression of miR-1260b in Non-small Cell Lung Cancer is Associated with Lymph Node Metastasis[J]. Aging Dis,2015,6(6):478-485.

[3] 王良,纪爱芳.6 项血清肿瘤标志物的联合检测在肺癌诊断中的价值研究[J].长治医学院院报,2014,28(1):24-26.

[4] Kaul D,Angelidis A,Budach V,et al. Prognostic indices in stereotactic radiotherapy of brain metastases of non-small cell lung Cancer[J]. Radiat Oncol,2015,10(1):244.

[5] 郭柳薇,高兴华,黄王莹.肺癌患者 6 种血清肿瘤标志物检测结果分析[J].江苏医药,2014,40(1):69-71.

[6] Guo K,Zhang ZP,Han L,et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in plasma as a biomarker in Chinese patients with early-stage non-small cell lung cancer[J]. Onco Targets Ther,2015,8(8):3289-3296.

[7] 王文涛,张国俊. CEA,CYFRA21-1,NSE,CA125 联合检测在肺癌诊断中的价值[J].中国实验诊断学,2014,18

(2):224-226.

[8] Gozzard P,Chapman C,Vincent A,et al. Novel humoral prognostic markers in small-cell lung carcinoma;a prospective study[J]. PLoS One,2015,10(11):e0143558.

[9] Xu CH,Cao L,Wei Y,et al. Serum crypto-1 as a clinical marker for lung cancer[J]. Int J Biol Markers,2015,30(4):369-373.

[10] Granger CL,Parry SM,Edbrooke L,et al. Deterioration in physical activity and function differs according to treatment type in non-small cell lung cancer-future directions for physiotherapy management[J]. Physiotherapy,2015,96(15):3829-3838.

[11] Meder L,König K,Fassunke J,et al. Implementing amplicon-based next generation sequencing in the diagnosis of small cell lung carcinoma metastases[J]. Exp Mol Pathol,2015,99(3):682-686.

[12] Du J,Han JC,Zhang YJ,et al. Relationship between serum leptin levels and non-small cell lung carcinoma;a meta-analysis [J]. Genet Mol Res,2015,14(4):13699-13708.

[13] 朱云芝,青春,汪开明,等.4 项血清肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中价值[J].中华实用诊断与治疗杂志,2013,27(8):785-786.

[14] Dietel M,Bubendorf L,Dingemans AM,et al. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer(NSCLC): recommendations of the European Expert Group[J]. Thorax,2016,71(2):177-184.

[15] Takahashi Y,Sakaguchi K,Horio HA,et al. Urinary N-1,N-12-diacetylspermine is a non-invasive marker for the diagnosis and prognosis of non-small-cell lung Cancer [J]. Br J Cancer,2015,113(10):1493-1501.

[16] 贺曼娇,范柳青.6 种肿瘤标志物联合检查对肺癌的诊断价值[J].国际检验医学杂志,2014,35(20):2746-2748.

[17] 徐燕,李龙芸,王孟昭.非小细胞肺癌脑膜转移诊疗现状[J].中国肺癌杂志,2015,18(10):626-632.

[18] 赵焕,郭会芹,张传欣,等.纤维支气管镜下刷取标本液基细胞学检查在肺癌临床诊断中的价值[J].中华肿瘤杂志,2015,(6):431-434.

(收稿日期:2016-01-24 修回日期:2016-04-15)

(上接第 2578 页)

医学杂志,2015,30(3):53-59.

[8] Liu LH,Yang XF. Implication of reprimo and hMLH1 gene methylation in early diagnosis of gastric carcinoma [J]. Int J Clin Exp Pathol,2015,8(11):14977-14982.

[9] Ohki R,Nemoto J,Murasawa H,et al. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase[J]. Biol Chem,2000,275(30):22627-22630.

[10] Ye Z,Parry JM. Identification of polymorphisms in the human Reprimo gene using public EST data[J]. Teratog

Carcinog Mutagen,2002,22(6):485-493.

[11] Beasley WD,Beynon J,Jenkins GJ. Reprimo 824 G>C and p53R2 4696 C>G single nucleotide polymorphisms and colorectal Cancer: a case-control disease association study[J]. Int J Colorectal Dis,2008,23(4):375-381.

[12] Liu G,Zhou W,Christiani DC. Molecular epidemiology of non-small cell lung Cancer[J]. Semin Respir Crit Care Med,2005,26(3):265-272.

(收稿日期:2016-01-25 修回日期:2016-03-28)