

# 解毒酶 GSTM1和 GSTT1缺失与广西肝细胞癌相关性研究\*

## Genetic Deletion of GSTM1 and GSTT1 Detoxicated Enzymes in Relation to Hepatocellular Carcinoma in Guangxi

邓卓霖<sup>1</sup>, 韦义萍<sup>2</sup>, 马 韵<sup>1</sup>

Deng Zhuolin<sup>1</sup>, Wei Yiping<sup>2</sup>, Ma Yun<sup>1</sup>

(1. 广西医科大学病理学教研室, 广西南宁 530021; 2. 广西医科大学护理学院病理学教研室, 广西南宁 530021)

(1. Dept. of Pathology, Guangxi Medical Univ., Nanning, Guangxi, 530021, China; 2. Nurse Training Coll., Guangxi Medical Univ., Nanning, Guangxi, 530021, China)

**摘要:** 为了研究谷胱甘肽硫转移酶 GSTM1和 GSTT1基因多态性与肝细胞癌风险的相关性,在广西黄曲霉毒素(AFB1)高污染区,用 PCR技术检测肝细胞癌患者和非肝细胞癌成人血样中 GSTM1和 GSTT1的存在或缺失。肝细胞癌组(HCC)181例,经病理确诊为肝细胞癌,对照组360例,由非肝细胞癌成人组成。结果显示, GSTM1和 GSTT1零基因型的频率在对照组分别为47.8%和42.7%,在肝细胞癌组分别为64.6%和59.7%,两组间的差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。GSTM1和 GSTT1联合零基因型在肝细胞癌组与对照组分别为38.2%和18.5%,两组间差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。说明 GSTM1和 GSTT1零基因型在当地与 AFB1诱发肝细胞癌的风险相互关联。

**关键词:** 肝细胞癌 黄曲霉毒素 B1 谷胱甘肽硫转移酶

中图分类号: R737-33 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2005)01-0055-03

**Abstract** The present study was undertaken to evaluate the association between GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma. Cases and controls study the genetic polymorphisms of the genes at an aflatoxin high contaminated region in Guangxi. Polymerase chain reaction (PCR) technique was used to detect the presence or absence of the GSTM1 and GSTT1 genes at the blood samples. The case group was composed of 181 patients of HCC identified by the pathologist and the control group was composed of 360 adults without any tumor. The frequencies of GSTM1 and GSTT1 null genotype in the control were 47.8% and 42.7% respectively, while in the HCC group were 64.6% and 59.7% respectively. The differences between HCC group and the control group were very significant,  $P < 0.01$ . GSTM1 and GSTT1 combined null genotype in HCC group and control group were 38.2% and 18.5%, the difference was significant ( $P < 0.05$ ). The GSTM1 and GSTT1 null genotypes were associated with an increased risk of HCC in this AFB1 high contaminated region.

**Key words** hepatocellular carcinoma, aflatoxin B1, Glutathione S-transferase

流行病学研究和动物实验证明广西肝细胞癌流行的主因为乙型肝炎病毒(HBV)感染和暴露于黄曲霉毒素(AFB1),病因学研究也证明 HBV 和 AFB1间有协同作用,单独 HBV 的致癌率为 11.0%,两者协

同致癌率为 53.0%<sup>[1]</sup>。AFB1是一种霉菌毒素由黄曲霉所产生。霉菌毒素的研究已查出超过 100种产毒真菌和超过 300种霉菌毒素,而 AFB1是最强力的致癌物,它的致突变代谢产物结合于 DNA 可能引起 G→T 颠换诱发癌,肝是其靶器官<sup>[2,3]</sup>。已发现 AFB1在世界上常污染粮食如玉米和花生,并已知广西扶绥等地是一较高污染区并同时伴肝细胞癌流行<sup>[4]</sup>。AFB1需经细胞色素氧化酶代谢激活成为 AFB1-8,9环氧化物才会损害 DNA<sup>[5]</sup>,体内有一些解毒酶能对抗这

收稿日期: 2004-03-19

作者简介: 邓卓霖(1929-),男,教授,主要从事地方好发病及传染病研究。

\* 国家自然科学基金(39860032)和广西教育厅重点资助课题基金(98-2-8)资助项目。

种环氧化物而有抗癌作用。本文研究谷胱甘肽硫转移酶 GSTM1和 GSTT1遗传性缺失多态性与当地环境致癌物 AFB1 诱生肝细胞癌的风险相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选取 181 例肝细胞癌患者和 360 例非肝细胞癌成人作为研究对象。肝细胞癌组 (HCC) 是广西医科大学附属医院的新病人, 时间从 1998 年 1 月至 2002 年 12 月, 所有病例均经病理学诊断确定, 年龄 28~70 岁, 平均 49.5 岁, 男 145 例, 女 36 例。对照组来自同一医院健康体检者中除外肿瘤的病例。

血样是采集 2ml 静脉血, 分离白细胞, 然后用标准酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。

### 1.2 PCR 检测基因

用 PCR 法从 DNA 中决定 GSTM1 和 GSTT1 缺失基因型。GSTM1 引物为其第 4 外显子 5' 区 5'-CTGCCCTACTTGATTGATGGG-3' 和第 5 外显子 3' 区 5'-CTGAATTGTAGCAGATCATGC-3', 其扩增长度 273bp。GSTT1 的引物为: 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' 和 3' 区 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3', 用于扩增 480bp 片段。在上述两实验中若无扩增产物提示零基因型<sup>[6,7]</sup>。在 GSTM1 和 GSTT1 零基因型的标本用一对 p53 (上游 5'-CAAGTGGCTCCTGACCTGGA-3', 下游 5'-GTGTTGCCTCCTAGGTTGGC-3', 长度 110bp) 作内参照共同扩增, 以便质量监控排除由于扩增条件不合适造成的假阴性<sup>[7]</sup>。

PCR 反应在型号为 BIO-RAD 基因扩增仪中进行, 用市售 PCR 试剂盒, 基因组 DNA 约 5μg, dNTP 2.5mmol/L, 每条引物 5μmol/L, MgCl<sub>2</sub> 25mmol/L, Taq 多聚酶 0.5u, 在总容积为 25μl 中, 用等量石蜡油覆盖进行扩增。

扩增反应: 样品在 94℃ 预变性 5min, 然后分别扩增 GSTM1 和 GSTT1。GSTM1: 93℃ 30s → 50℃ 45s → 72℃ 45s, GSTT1: 94℃ 45s → 61℃ 50s → 72℃ 60s。35 个循环后 72℃ 延伸 10min。扩增产物经 2% 琼脂糖电泳, 用紫外线检测仪观察记录结果和拍照。

### 1.3 统计分析

实验结果用  $\chi^2$  检验进行统计分析。

## 2 结果

GSTT1 (480bp) 和 GSTM1 (273bp) 基因扩增产物结果见图 1。

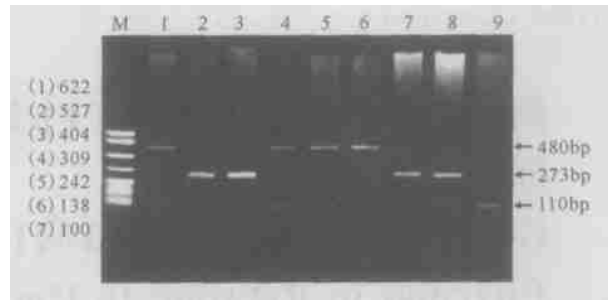


图 1 GSTT1 (480bp)、GSTM1 (273bp) 基因和 p53 蛋白 (110bp) PCR 扩增产物凝胶电泳图长度

Fig. 1 Amplification of GSTM1 (273 bp) and GSTT1 (480 bp) and p53 (110 bp) genes products in agarose gel electrophoresis

M. pBR322 DNA/MspI; 1. 对照组 GSTT1 阳性; 2~3. 对照组 GSTM1 阳性; 4~6. HCC 组 GSTT1 阳性; 7~8. HCC 组 GSTM1 阳性; 9. HCC 组 GSTM1 阴性, 1~9. p53 蛋白均阳性。

M. pBR322 DNA MspI, 1. GSTT1 Control positive, 2~3. GSTM1 Control positive, 4~6. HCC group GSTT1 positive, 7~8. HCC group GSTM1 positive, 9. HCC group GSTM1 negative, 1~9. All the p53 protein positive.

HCC 组和对照组 GSTT1 零基因型频率分别为 59.7% (108/181) 和 42.7% (154/360); GSTM1 零基因型在 HCC 组和对照组中的出现频数分别为 64.6% (117/181) 和 47.8% (172/360), 两组的差别均有非常显著性意义 ( $P < 0.01$ ), 详见表 1。

表 1 GSTM1 和 GSTT1 基因缺失比较

Table 1 The comparison of GSTM1 and GSTT1 genes deletion

分组 Group	n	GSTM1			GSTT1		
		-	+	缺失率 Deletion rate(%)	-	+	缺失率 Deletion rate(%)
HCC	181	117	64	64.6	108	73	59.7
对照组 Control	360	172	188	47.8	154	206	42.7*

两组比较 Comparison of two groups, \*  $\chi^2 = 13.7643, P < 0.01$ ; \* \*  $\chi^2 = 13.7585, P < 0.01$

检测并计算 HCC 组 110 例患者和对照组 135 例成人 GSTT1 和 GSTM1 的联合零基因型, 病例与对照分别为 38.2% 和 18.5%, 两者差别有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。GSTM1 为阳性而 GSTT1 为阴性的情况下, 病例与对照分别为 21.8% 和 20.7%, 相反 GSTM1 为阴性而 GSTT1 为阳性的情况下, 病例与对照分别为 25.3% 和 28.9%, 两者差别均无显著性意义 ( $P > 0.05$ ) 详见表 2。

## 3 讨论

谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 是一大家族, 已发现有 7 类, 但仅  $\alpha$  类中的 GSTM1 和  $\theta$  类中 GSTT1 表现有基因缺失, 即零基因型 (null genotype) 并完全缺失该酶的活性。致癌物 AFB1-8,9 环氧化物是 GSTM1 和

表 2 HCC组(110例)与对照组(135例) GSTM1和 GSTT1两种基因表达对照

Table 2 The expression of GSTM1 and GSTT1 genes in HCC (110 cases) and control(135 cases)

基因 Genotypes	GSTM1(-)(%) <sup>*</sup>		GSTM1(+)(%)	
	HCC	对照组 Control group	HCC	对照组 Control group
GSTT1(-)	42(38.2)	25(18.5)	24(21.8)	28(20.7)
GSTT1(+)	28(25.5)	39(28.9)	16(14.5)	43(30.4)

\* GSTT1(-)同时 GSTM1(-)HCC组与对照组比较,  $\chi^2 = 5.8630, P = 0.015$  括号外的数值为例数, 括号内的数值为百分率。 Comparison the combined GSTM1 and GSTT1 null genotypes between the HCC and control groups  $\chi^2 = 5.8630, P = 0.015$  Data out brackets are the number of cases, data in brackets are percent.

GSTT1的作用底物<sup>[8]</sup>。 GSTs催化谷胱甘肽与环氧化物结合易于排出和解毒, 可能在抗致癌物中起重要作用。 缺乏这些酶已知对数种癌症容易感染。 而有些报道未检出 GSTM1在肝细胞癌病例与对照中有统计学意义的相关可能是由于样品数不足<sup>[3]</sup>。 我们在 HCC高发发现场作调查研究病例充足, 大数量的研究使结果更为可信。 我们先前的研究已发现 HCC病人抑癌基因 p53第 249号密码子 G→T 颠换, 涉及环境致突变原 AFB1<sup>[3]</sup>, 这里我们有兴趣于 GSTM1和 GSTT1基因型的多态性与本地的 HCC患者是否具有比其他人群更高的 GSTM1和 GSTT1零基因型

GSTM1和 GSTT1零基因型和吸烟者容易患头颈鳞状细胞癌和肺癌<sup>[9,10]</sup>。 本文结果提示, 广西的局部地区居民 GSTM1和 GSTT1零基因型水平较高, 特别是 GSTM1零基因型为 47.8%, 处于世界高水平, 而 GSTT1零基因型为 42.7%, 远高于文献报道 18.0%的平均水准<sup>[11]</sup>。 已知遗传性高 GST零基因型的人群若不接触相关化学毒物, 如吸烟或 AFB1, 并不增加患癌症的危险性<sup>[12]</sup>。 然而长期大量吸烟或生活在 AFB1高污染区就会有足够时间充分暴露其遗传缺陷并易患癌症。 本文结果显示 GSTM1和 GSTT1零基因型在 HCC组高于对照组, 其差别有非常显著性意义 ( $P < 0.01$ ), 与年龄及性别无关 ( $P > 0.05$ )。 GSTM1和 GSTT1联合缺失的频率 HCC组与对照组分别为 38.2%和 18.5%, 差别有显著性意义 ( $P < 0.05$ ), 说明 AFB1受 GSTM1和 GSTT1酶代谢, 零基因型和联合零基因型罹患肝细胞癌的危险性增加一倍

总而言之, GSTM1和 GSTT1零基因型是一种遗传性缺陷, 它降低了人体对某些环境致癌物的解毒活性。 解毒酶基因缺失者若长期接触致癌物, 其致癌危险性一定会比常人高。 人类环境中最常见的有害物

质如烟草含 50余种致癌物, 解毒酶基因缺失尚未广为人之, 盲目参加吸烟行列却无福消受, 陡然增加生癌风险。 AFB1高污染并不常见, 仅亚洲东南及非洲撒哈拉以南局部温暖潮湿地区易于黄曲霉繁殖, 粮食受 AFB1污染较重。 广西 AFB1高污染已早有文献报道, 解毒酶基因缺失者尤其应提防, 以避免增加肝细胞癌风险

参考文献:

- [1] Yan R A, Su J J, Huang D R, et al. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma II, experimental induction of HCC in tree shrews exposed to hepatitis B virus and aflatoxin [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1996, 122: 289-295.
- [2] Wang J S, Groopman J D. DNA damage by mycotoxin [J]. Mutation Res, 1999, 424(1-2): 167-181.
- [3] 马韵, 邓卓霖, 罗虹, 等. 黄曲霉毒素高污染区肝癌 p53基因高频率定点突变 [J]. 广西科学, 1996, 3(3): 48-50.
- [4] 邓卓霖, 马韵, 罗虹. 南宁地区肝细胞性肝癌中突变型 p53蛋白表达 [J]. 广西科学, 1995, 2(1): 55-57.
- [5] McGlynn K A, Rosvold E A, Lustbader E D, et al. Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(6): 2384-2387.
- [6] Shea T C, Claffin G, Comstock K E, et al. Glutathione transferase activity and isoenzyme composition in primary human breast cancers [J]. Cancer Res, 1990, 50(21): 6848-6853.
- [7] Garcia-Closas M, Kelsey K T, Hankinson S E, et al. Glutathione S-transferase Mu and Theta polymorphisms and breast cancer susceptibility [J]. J Nat Cancer Inst, 1999, 91(22): 1960-1964.
- [8] Wiencke J K, Kelsey K T, Lamela R A, et al. Human glutathione S-transferase deficiency as a marker of susceptibility to epoxide induced cytogenetic damage [J]. Cancer Res, 1990, 50(5): 1585-1590.
- [9] Cheng L, Sturgis E M, Eicher S A, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Int J Cancer, 1999, 84(3): 220-224.
- [10] Dialyna I A, Miyakis S, Georgatou N, et al. Genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer risk [J]. Oncol Rep, 2003, 10(6): 1829-1835.
- [11] Kargas C, Krupa R, Walter Z. Combined genotype analysis of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in a Polish population [J]. Hum Biol, 2003, 75: 301-307.
- [12] Deng Z L, Ma Y, Wei Y P. Study of the deletion mutation of glutathione S-transferase M1 gene and its role in susceptibility to hepatocellular carcinoma [J]. Chinese J cancer Res, 2001, 13: 176-178.

(责任编辑: 邓大玉)