

江苏汉族人群p53第7内含子多态性与慢性萎缩性胃炎无相关性

王剑蓉, 赖仁胜, 张心海, 谢玲

王剑蓉, 南京中医药大学基础医学院, 南京中医药大学附属医院病理科, 国家中管局三级分子生物学实验室 江苏省南京市 210029

赖仁胜, 谢玲, 南京中医药大学附属医院病理科, 国家中管局三级分子生物学实验室 江苏省南京市 210029

张心海, 南京中医药大学 江苏省南京市 210029

通讯作者: 赖仁胜, 210029, 江苏省南京市汉中中路155号, 南京中医药大学附属医院病理科, lairenshe@163.com
电话: 025-86617141-70309

收稿日期: 2006-10-10 接受日期: 2006-10-25

No association between p53 gene intron 7 polymorphism and chronic atrophic gastritis in Han Chinese of Jiangsu province

Jian-Rong Wang, Ren-Sheng Lai, Xin-Hai Zhang, Ling Xie

Jian-Rong Wang, Basic Medical College, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine; Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine; the Third-Grade Laboratory of Molecular Biology, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Ren-Sheng Lai, Ling Xie, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine; the Third-Grade Laboratory of Molecular Biology, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Xin-Hai Zhang, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Ren-Sheng Lai, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 155 Hanzhong Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. lairenshe@163.com

Received: 2006-10-10 Accepted: 2006-10-25

Abstract

AIM: To explore whether the polymorphism of p53 gene intron 7 is associated with the occurrence of chronic atrophic gastritis (CAG) in Han Chinese of Jiangsu province.

METHODS: The genome DNA was extracted from tissues of 80 CAG patients and 76 healthy controls, and the exon 7 and 8 as well as the intron 7 within exon 7 and 8 of p53 gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The products were sequenced after purification. The polymorphism of p53 gene intron 7 was comparatively analyzed with the standard sequences. The genotypes and allelic frequencies compared between the two groups using chi-square test.

plified by polymerase chain reaction (PCR). The products were sequenced after purification. The polymorphism of p53 gene intron 7 was comparatively analyzed with the standard sequences. The genotypes and allelic frequencies compared between the two groups using chi-square test.

RESULTS: In CAG cases, the allelic frequencies of the 72th base pair (bp) and the 92th bp in p53 gene intron 7 were 32.5% (T-G) and 67.5% (C-T), and the frequencies of genotype T-G/T-G, C-T/T-G, and C-T/C-T were 11.3%, 42.5%, and 46.3%, respectively. Meanwhile in the controls, the allelic frequencies of T-G and C-T were 29.6% and 70.4%, and the frequencies of genotype T-G/T-G, C-T/T-G, and C-T/C-T were 9.2%, 40.8%, and 50.0%, respectively. There were no significant differences in the allelic frequencies and genotypic distributions between the two groups ($P > 0.05$). The risk of CAG occurrence was not significantly different between the individuals with T-G and C-T allele ($OR = 1.14$).

CONCLUSION: There is no direct association between the polymorphism of p53 gene intron 7 and epigenetic penetrance of CAG in Han Chinese of Jiangsu province.

Key Words: Chronic atrophic gastritis; p53 gene; Polymorphism; Intron; Sequencing

Wang JR, Lai RS, Zhang XH, Xie L. No association between p53 gene intron 7 polymorphism and chronic atrophic gastritis in Han Chinese of Jiangsu province. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(2):171-175

摘要

目的: 探讨江苏汉族人群p53第7内含子多态性与慢性萎缩性胃炎(CAG)之间的相关性。

方法: 提取80例CAG患者、76例健康体检人群基因组DNA, PCR特异性扩增p53基因第7, 8外显子及其间的第7内含子, 产物纯化后测序, 将样品序列与标准序列进行比对, 观察第7内含子多态性。组间的基因型及等位基因频率比

■背景资料

p53基因作为抑癌基因在恶性肿瘤中的研究最为广泛, 但目前对p53基因多态性的研究仍处于初步阶段, p53第7内含子多态性与肿瘤相关性的报道各不相同; CAG与胃癌的发生关系密切, 探讨p53第7内含子多态性与CAG的相关性, 有助于揭示人类罹患胃癌的遗传学基础。

■研究前沿

以往, p53基因与肿瘤的研究集中在第5-8外显子突变上, 近年来, p53多态性与肿瘤的相关性日益受到重视, 其结果也存在分歧, 可能与样本量小、种族间差异等有关, 需要进一步扩大样本含量、统一研究方法及统计标准, 深入研究.

较采用 χ^2 检验.

结果: CAG组p53基因第7内含子的第72位碱基和第92位碱基等位基因分别为T-G (32.5%)和C-T (67.5%), 基因型表现为T-G/T-G (11.3%), C-T/T-G (42.5%)和C-T/C-T (46.3%) 3种; 在体检组中相应的等位基因T-G和C-T的频率是29.6%和70.4%, 3种基因型频率分布分别为9.2% (T-G/T-G), 40.8% (C-T/T-G)和50.0% (C-T/C-T). 等位基因频率和基因型分布在CAG组和体检组差异无统计学意义($P>0.05$), T-G等位基因携带者和C-T等位基因携带者患CAG的危险性差异无统计学意义($OR=1.14$).

结论: 江苏汉族人群p53第7内含子多态性与CAG表遗传外显率无直接致病关系.

关键词: 慢性萎缩性胃炎; p53基因; 多态性; 内含子; 测序

王剑蓉, 赖仁胜, 张心海, 谢玲. 江苏汉族人群p53第7内含子多态性与慢性萎缩性胃炎无相关性. 世界华人消化杂志 2007;15(2):171-175

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/171.asp>

0 引言

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是临床常见的消化系统疾病, 与胃癌发生有一定的联系. p53基因是迄今发现的与人类肿瘤发生相关性最高的基因. p53外显子区的基因突变与肿瘤的相关性已经得到证实, 近年来有报道, p53内含子某些位点的多态性可能与肿瘤相关^[1]. p53基因第7内含子是位于与肿瘤关系最为密切的外显子7和8之间^[2]. 为探讨p53第7内含子多态性与癌前期疾病-CAG的相关性, 我们进行了以下研究.

1 材料和方法

1.1 材料 我们收集2004-01/2006-05江苏汉族CAG患者80例, 经胃镜及病理确诊, 并排除有其他疾病或者药物引起的胃病患者; 另有76例健康体检人群, 体检无异常发现, 无CAG等胃病史, 无肿瘤及癌前病变史, 无肿瘤家族史. 所有被检测者均知情同意参加本项检测. 80例CAG患者参照贝政平《内科疾病诊断病理标准》, 其中有轻度CAG 26例、中度CAG 39例、重度CAG 15例. 采集CAG患者新鲜的胃黏膜病灶组织2 mg、活检胃黏膜蜡块组织、2 mL抗凝血.

1.1.1 主要试剂 血液DNA提取试剂盒(Promega

公司); 动物组织基因组DNA提取试剂盒(Promega公司); 石蜡组织基因组DNA提取试剂盒(Omega公司); ABI金牌PCR扩增酶/HotStar PCR酶(QIAGEN); 琼脂糖(Promega公司); PCR纯化试剂盒(V-gene公司); 3100 POP6测序胶(美国ABI公司); ABI测序专用板(96孔).

1.1.2 主要仪器 ABI 3100-avant基因测序仪(美国ABI公司); ABI 2700型(测序级)PCR扩增仪(美国ABI公司); Ependoff DNA荧光定量仪(德国Ependoff公司); Jouan 4R: 冷冻离心机(法国JOUAN公司); Dy602S电泳仪(江苏捷达科技公司); YLN-2000荧光凝胶自动显像分析系统(江苏捷达科技公司); Gil-16A高速离心机(南京新校园生物技术研究); Millipore离子纯水装置(法国Millipore公司).

1.2 方法

1.2.1 DNA模板的提取 用Promega公司血液组织基因组DNA提取试剂盒、动物组织基因组DNA提取试剂盒及Omega石蜡组织基因组DNA提取试剂盒, 按照说明提取DNA. 应用琼脂糖凝胶电泳技术检测DNA纯度, 再用ependoff核酸定量仪测定DNA浓度[260 nm吸光率 >0.05 以上(DNA含量 >2.0 g/L), 吸光率 A_{260}/A_{280} 比值1.6-1.8之间, 320 nm波长处吸光率接近为0].

1.2.2 PCR扩增 (1)引物的设计与合成: 根据NCBI文献, 确定候选目的基因片段, 利用GenBank上提供的序列设计引物, 由上海生工合成. p53-F(上游引物): 5'TCTCCTAG GTTGGCTCTGACTG3'; p53-R(下游引物): 5'CCCTGGGGGCAGCTCGTGGTG3'特异性扩增p53基因第7, 8外显子及其间的第7内含子, 产物片段585 bp; (2)PCR反应体系(总体系20 μ L): 10 \times PCR Buffer 2 μ L, HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN公司) 0.2 μ L, 5 \times Q-Solution 4 μ L, dNTP mix 2 μ L, Primer 1 1 μ L, Primer 2 1 μ L, 模板DNA 1 μ L, Distilled water 8.8 μ L; (3)PCR反应条件: 应用ABI2700型扩增仪95 $^{\circ}$ C预变性15 min, 用Touchdown PCR技术, 94 $^{\circ}$ C变性50 s, 63-58 $^{\circ}$ C退火1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 共循环10次, 94 $^{\circ}$ C变性50 s, 57 $^{\circ}$ C退火1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 共循环30次, 最后于72 $^{\circ}$ C延伸10 min; (4)PCR产物纯化: 用自动凝胶显像系统电泳观察PCR扩增产物为单一目的条带. 用V-gene公司提供的PCR纯化试剂盒, 对PCR产物进行过柱纯化.

1.2.3 测序反应 (1)反应体系: 1 μ L BigDye

(2.5X)、1.5 μ L BigDye Seq Buffer(5X)、3 μ L引物、1 μ L PCR纯化产物、3.5 μ L ddH₂O; (2)测序PCR热循环条件: 96℃ 10 s, (96℃ 10 s, 50℃ 5 s, 60℃ 4 min)共25个循环60℃ 4 min, 4℃保温; (3)测序产物纯化: 10 μ L反应体系, 96孔板, 酒精/EDTA/NaAc法; (4)基因测序: 电泳前, 在数据采集(Data Collection2.0)软件中选取正确的运行模块和分析模块, 上样至3100-Avant遗传分析仪进行电泳, Data Collection软件自动进行数据处理和分析。

统计学处理 将测序结果用DNA Sequencing Analysis5.1自动分析原始数据, 获得测序电泳图和序列。将样品序列用DNA Star seqman与标准序列进行比对, 观察样本是否存在突变、缺失、多态性等改变。用SPSS13.0统计软件进行数据分析, 组间的基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验。

2 结果

80例CAG患者和76例健康体检人群, p53第7, 8外显子区未发现病理性突变, 标本所测的外显子7, 8和第7内含子的碱基序列均与NCBI文献标准序列一致, 第7内含子序列上检测到两个多态性位点, 相距20 bp, 前一多态性位点位于第7内含子第72 bp处, 存在纯合子C, T和杂合子C/T 3种基因型, 后一多态性位点位于第7内含子第92 bp处, 有纯合子T, G和杂合子T/G 3种基因型, 两种多态性的组合中只出现纯合子C-T, T-G和杂合子C-T/T-G 3种基因型变化, 未发现C-G和T-T的组合(图1)。

2.1 p53第7内含子两组T-G, C-T型等位基因多态频率比较 T-G等位基因与C-T等位基因患CAG的危险性差异无统计学意义($OR = 1.14$, $P > 0.05$)。CAG组等位基因频率为T-G: 32.5%和C-T: 67.5%, 在体检组中相应的等位基因频率是T-G: 29.6%和C-T: 70.4%(表1)。

2.2 CAG组与体检组p53基因第7内含子多态性分布的比较 3种基因型在CAG组及体检组中的分布见表2。该结果显示, CAG组和体检组中基因型分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

CAG与胃癌的发生关系密切, 很可能是癌前过程的重要环节之一^[3]。伴大肠化生的CAG与胃癌的关系更为密切。Mutoh *et al*^[4]研究了肠型化生的Cdx2-转基因小鼠, 证实了p53基因突变在肠型胃癌中的作用, 并成功的显示了长期的肠化

表 1 两组p53内含子多态性等位基因出现频率比较(n, %)

分组	n	等位基因		合计
		T-G	C-T	
CAG组	80	52(32.5)	108(67.5)	160
体检组	76	45(29.6)	107(70.4)	152

表 2 3种基因型在不同组别中的分布(n, %)

基因型	CAG组	体检组
T-G/T-G	9(11.3)	7(9.2)
C-T/T-G	34(42.5)	31(40.8)
C-T/C-T	37(46.3)	38(50.0)
合计	80	76

可以导致侵袭性胃癌的发生。他们的研究结果表明, 肠化本身可能在胃癌的发生及预后有着重要的意义。

p53基因是细胞癌基因中研究最为广泛和深入的基因之一, 他是调控细胞周期和保护细胞染色体免受损伤的修复基因^[5]。人p53基因定位于17p1311, 长约16-20 kb。p53基因由11个外显子和10个内含子组成, 外显子1无编码功能。p53基因cDNA全长为2074 bp, 含有单一开放读码框架, 其5c端非翻译区为881个核苷酸和编码区由1179个核苷酸组成, 编码的蛋白由393个氨基酸组成, 相对分子质量为53 kDa的核磷酸化蛋白。p53基因的异常几乎存在于人类的所有肿瘤。p53基因异常与胃黏膜细胞的癌变过程密切相关, 胃癌组织中存在p53基因突变, 导致其编码蛋白的功能异常从而参与胃癌的发生、发展^[6-7]。p53外显子突变与胃癌的相关性已经得到证实, 但p53外显子突变率报道有所差异。Lu *et al*^[8]测了39例胃癌样本的p53的11个外显子区, 发现突变率为21%, 其中肠型胃癌突变率为40%, 明显高于弥漫型胃癌(8.33%)。Ott *et al*^[9]检测了53例胃癌样本的P53第2-11外显子区, 发现突变率为36%。

p53某些关键位点的突变可以直接造成细胞增殖异常。而在p53非热点区的少见突变及内含子的低频变异便形成人群的多态性。迄今为止, 在p53基因中至少可以检测到20个多态性位点, 虽然这些多态性的意义尚未明确, 但至少有个多态性位点被证实可能与肿瘤的发生相关^[10-12], 即p53基因第4外显子的第72密码子CGC/CCC单核苷酸多态性、第3内含子16 bp插入重复序列

■创新盘点

目前, p53第7内含子与胃癌及其癌前病变—CAG相关性的研究尚未见报道; 本文应用直接测序法分析其相关性。

应用要点

探讨p53第7内含子与CAG的相关性,有助于分析癌变机制,对CAG及胃癌的防治,分子靶向药物治疗提供理论基础。

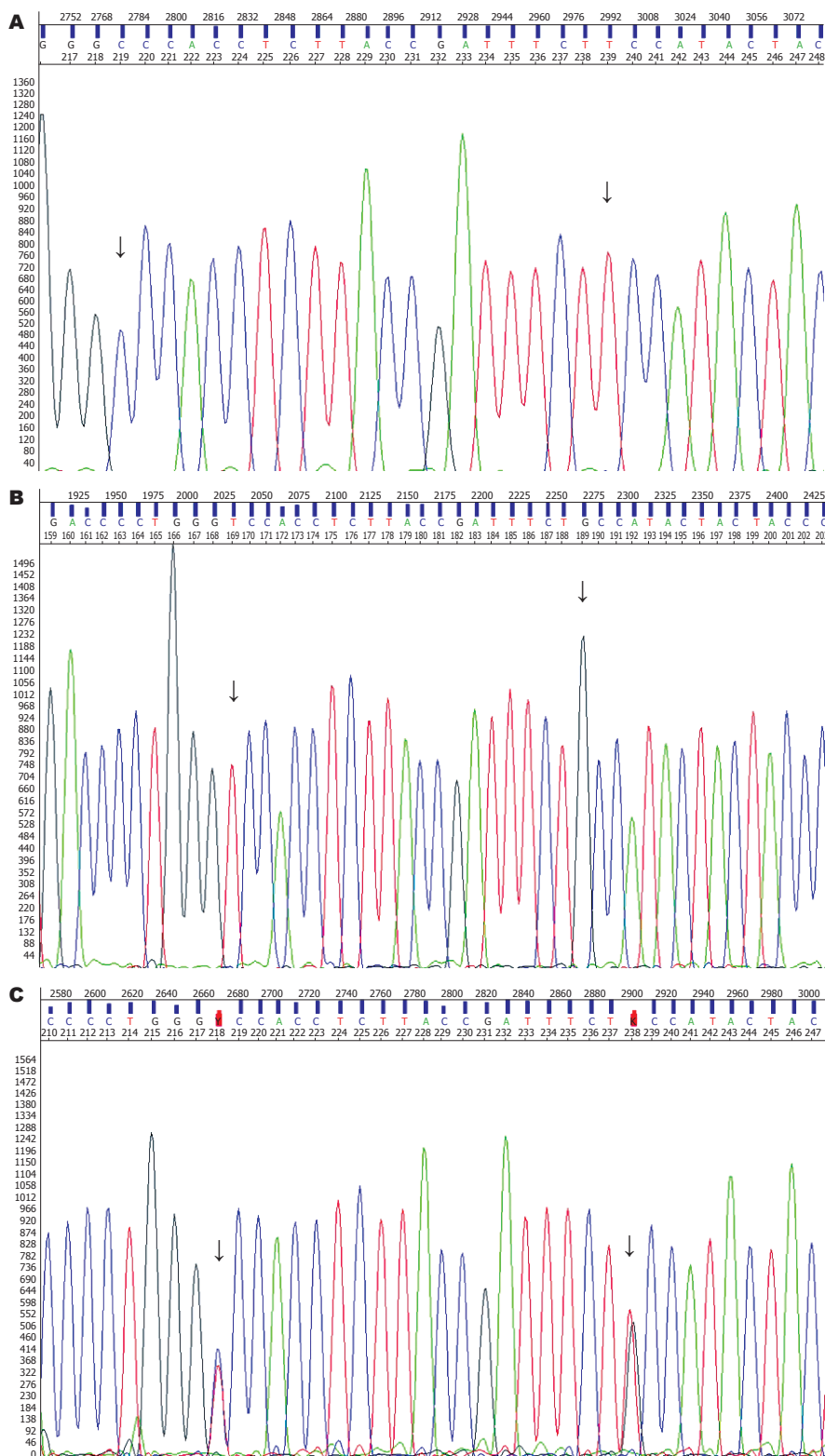


图1 纯合基因型 C-T/C-T, T-G/T-G 和杂合基因型 C-T/T-G测序图, 箭头所示为多态性位点。

和第6内含子的MSP I 限制性酶切位点。有报道, p53基因第4外显子的第72密码子多态性与胃癌的发病相关^[13-14]。

除外显子外, 内含子与基因的功能也越来越受到人们的关注, 其内藏的可读框架可以表达为成熟酶、逆转录酶和核酸内切酶, 与基因的表达和调控密切相关^[15-16]。因此, 在不同种族

和人群中, 进一步研究这些基因多态性与肿瘤易感性的关系, 有助于揭示人类罹患肿瘤的遗传学基础。p53基因第7内含子是位于与肿瘤关系最为密切的外显子7和8之间。Berggren *et al*^[2]认为, p53第7内含子有两个核苷酸多态性位点, 第72 bp处有C-T多态性位点(位点1), 92 bp处有T-G多态性位点(位点2)。并且在所有的位点1: C

→T转变的样品中, 均存在位点2: T→G的转变。提示C→T和T→G的转变同时出现, 并且属于相同的等位基因。顾其华 *et al*^[17]报道了这两个位点呈连锁不平衡, 构成纯合子C-T/C-T, T-G/T-G和杂合子C-T/T-G 3种基因型人群。p53基因第7内含子的多态性变化属相近两个位点的连锁性变化, 因而随着等位基因的多态性变化, 不同基因型的p53基因构象会发生变化, 对其作用可能产生一定的影响。

p53第7内含子与肿瘤相关性的报道各不相同。有学者发现, p53第7内含子多态性与非小细胞肺癌(NSCLC)、口腔肿瘤遗传易感性有关^[18-19]。NSCLC患者C-T/C-T型基因频率明显低于正常人, 杂合子比例明显高于正常人; 纯合子T-G/T-G和杂合子C-T/T-G型基因携带者口腔肿瘤患病危险性较纯合型C-T/C-T高(*OR*分别为2.48和2.20), T-G等位基因携带者患口腔肿瘤的危险性较C-T等位基因携带者增高(*OR* = 1.69, 95%可信区间1.12-2.51), T-G等位基因可能是口腔肿瘤发生的危险因素。然而Berggren *et al*^[2]研究了159例膀胱癌患者及171例非肿瘤对照组发现, p53第7内含子多态性与膀胱癌的发病机制及病因无关。他对芬兰、波兰、匈牙利、意大利、日本、印度和中国不同种族人群p53第7内含子第72 bp的多态性研究发现, 该多态性在种族间差异有统计学意义, 单基因频率变化从芬兰人中的C: 95%和T: 5%至中国人的C: 67%和T: 33%。

目前, p53第7内含子与胃癌及其癌前病变-萎缩性胃炎相关性的研究尚未见报道。我们对80例CAG患者和76例健康体检人群应用直接测序法对比分析, 江苏汉族人群p53第7内含子多态性与CAG表遗传外显率无直接发病关系。然而, p53第7内含子多态性与CAG易感性的关系还需加大样本做流行病学研究, 并排除种族间存在差异的影响。

4 参考文献

- Kochethu G, Delgado J, Pepper C, Starczynski J, Hooper L, Krishnan S, Fegan C, Pratt G. Two germ line polymorphisms of the tumour suppressor gene p53 may influence the biology of chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* 2006; 30: 1113-1118
- Berggren P, Hemminki K, Steineck G. p53 intron 7 polymorphisms in urinary bladder cancer patients and controls. Stockholm Bladder Cancer Group. *Mutagenesis* 2000; 15: 57-60
- Ali M, Khan AA, Tiwari SK, Ahmed N, Rao LV, Habibullah CM. Association between cag-pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates

- from peptic ulcer, gastric carcinoma, and non-ulcer dyspepsia subjects with histological changes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6815-6822
- Mutoh H, Sakurai S, Satoh K, Tamada K, Kita H, Osawa H, Tomiyama T, Sato Y, Yamamoto H, Isoda N, Yoshida T, Ido K, Sugano K. Development of gastric carcinoma from intestinal metaplasia in Cdx2-transgenic mice. *Cancer Res* 2004; 64: 7740-7747
- Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
- Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 403-406
- Tian SF, Xiong YY, Yu SP, Lan J. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and expressions of tumor suppressor genes in gastric carcinoma and related lesions. *Ai Zheng* 2002; 21: 970-973
- Lu C, Xu HM, Ren Q, Ao Y, Wang ZN, Ao X, Jiang L, Luo Y, Zhang X. Somatic mutation analysis of p53 and ST7 tumor suppressor genes in gastric carcinoma by DHPLC. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2662-2665
- Ott K, Vogelsang H, Mueller J, Becker K, Muller M, Fink U, Siewert JR, Hofler H, Keller G. Chromosomal instability rather than p53 mutation is associated with response to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2307-2315
- 段丽红, 康山, 宋俊芬. p53基因多态性与卵巢癌. 国外医学遗传学分册 2003; 26: 217-220
- Liu G, Miller DP, Zhou W, Thurston SW, Fan R, Xu LL, Lynch TJ, Wain JC, Su L, Christiani DC. Differential association of the codon 72 p53 and GSTM1 polymorphisms on histological subtype of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 8718-8722
- Wang-Gohrke S, Becher H, Kreienberg R, Runnebaum IB, Chang-Claude J. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 269-272
- 李湘洲, 管立学, 高丽, 胡德宏, 王敬先, 王瑞丽, 杜欣莹, 李海波. 国人P53基因CD72 Arg/Pro多态性与贲门腺癌发病相关. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1955-1957
- Shepherd T, Tolbert D, Benedetti J, Macdonald J, Stemmermann G, Wiest J, DeVoe G, Miller MA, Wang J, Noffsinger A, Fenoglio-Preiser C. Alterations in exon 4 of the p53 gene in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2000; 118: 1039-1044
- 唐红生, 洪剑明, 邱泽生. 内含子与基因表达. 细胞生物学杂志 1997; 19: 1-4
- Comeron JM, Kreitman M. The correlation between intron length and recombination in drosophila. Dynamic equilibrium between mutational and selective forces. *Genetics* 2000; 156: 1175-1190
- 顾其华, 舒畅, 叶爱慧, 吕新生, 唐孝亮, 况艳春. p53基因第7内含子序列的多态性位点分析. 中华医学遗传学杂志 2000; 17: 161-163
- 顾其华, 陈琼, 胡成平, 李叶青, 杨红忠. 非小细胞肺癌p53基因内含子7多态性分析. 中华结核和呼吸杂志 2005; 28: 497-499
- 李叶青, 李运良, 顾其华, 叶爱慧, 邬通生. p53内含子7多态性与口腔肿瘤遗传易感性的关系. 中华口腔医学杂志 2005; 40: 386-389

■同行评价

本文探讨p53第7内含子多态性与癌前期疾病-慢性萎缩性胃炎的相关性, 设计及实验方法合理, 结论中肯。

电编 张敏 编辑 王晓瑜