

· 论 著 ·

## 凝血栓蛋白 1 基因多态性与食管鳞癌易感性的关联研究\*

唐胜军<sup>1</sup>,熊刚<sup>2</sup>,郭洪<sup>3</sup>,杨超<sup>1</sup>,白云<sup>3△</sup>(1. 重庆三峡中心医院胸心外科 404000;第三军医大学;2. 西南医院胸心外科;  
3. 基础部医学遗传学教研室,重庆 400038)

**摘要:**目的 探讨凝血栓蛋白 1(THBS1)基因多态性与食管鳞状细胞癌(ESCC)易感性的关系。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法进行基因分型,检测了 183 例 ESCC 患者以及 171 名健康人为对照组对 THBS1 基因的外显子编码区一个非同义单核苷酸多态性(SNP)位点,rs2292305 的基因型分布情况,并进行统计学分析。结果 THBS1 基因中该位点的 3 种基因型 GG、AG 和 AA 在 ESCC 患者组中的分布和对照组比较差异有统计学意义( $P=0.008$ )。非条件 Logistic 回归分析发现,与 AA 基因型相比,GG 基因型是 ESCC 易感的一种保护因素,比值比(OR)存在显著为 0.30,95%可信区间(95%CI)为 0.11~0.86( $P=0.022$ )。结论 THBS1 基因编码区非同义多态性位点 rs2292305 与重庆地区汉族人群 ESCC 患病风险有关。

**关键词:**多态性;单核苷酸;食管鳞癌;THBS1 基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.19.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)19-1878-03

## Relationship between polymorphisms of THBS1 gene and susceptibility of esophageal squamous cell carcinoma\*

Tang Shengjun<sup>1</sup>, Xiong Gang<sup>2</sup>, Guo Hong<sup>3</sup>, Yang Chao<sup>1</sup>, Bai Yun<sup>3△</sup>(1. Department of Cardiothoracic Surgery, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China;  
2. Department of Cardiothoracic Surgery, Southwest Hospital; 3. Department of Medical Genetics,  
Branch of Basic Medical Science, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** Objective To investigate the relationship between the THBS1 gene polymorphism and the susceptibility of esophageal squamous cell carcinoma(ESCC). **Methods** 183 ESCC patients and 171 normal controls were recruited. One coding non-synonymous SNP of THBS1(rs2292305) was defined by analyzing the data of Chinese Han population in Hapmap. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) was used for genotyping. **Results** The distribution of the three genotypes of rs2292305 in cases was different from that of the controls( $P=0.008$ ). Genotype GG was a protective factor of ESCC, OR = 0.30, 95%CI = 0.11-0.86( $P=0.022$ ). **Conclusion** SNP rs2292305 of THBS1 may associate with the risk of developing the ESCC in Chongqing Han population.

**Key words:** polymorphism; single nucleotide; esophageal squamous cell carcinoma; THBS1 gene

重庆地区是食管癌的高发区之一。食管癌以食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)为主,是人类常见的恶性肿瘤,其分布具有明显的地域性和种族差别。统计显示,食管癌在中国发病率和病死率居第 4 位,且近年来食管癌的发病呈上升趋势,总体发病年龄也在降低<sup>[1]</sup>。现代研究已发现多种癌基因和抑癌基因参与了食管癌的发生和转移。凝血栓蛋白 1(Thrombospondin-1, THBS1)基因位于人类染色体 15q15,属于候选抑癌基因。研究显示,THBS1 的表达上调与横纹肌肉瘤和膀胱癌的转移和预后不良相关;而在胃癌的发生、远处转移以及血管侵袭过程中,THBS1 却呈表达缺失状态。因此,THBS1 基因如何参与食管癌的发生和转移成了科研工作者关注的问题。

结合 HapMap 网站中汉族人群资料,本文选取了 THBS1 基因编码区的非同义单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点 rs2292305 进行研究。在中国重庆地区汉族人群中,检测 ESCC 患者及健康对照人群中上述位点基因型的分布,并对其基因多态性进行统计分析,探讨 THBS1 基因多态性与 ESCC 发病风险的关系。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 研究对象采集自 2008 年 10 月到 2009 年 3 月重庆三峡中心医院胸心外科和西南医院胸心外科门诊 ESCC 患者共 183 例,其中男 139 例,女 44 例,通过病史询问以及临床检查排除其他疾病及家族史,根据胃镜或手术病理诊断为 ESCC。与患者组年龄分布、性别等相匹配的健康对照组共 171 名,其中男 121 例,女 50 例,随机取自同期健康体检人群,排除食管癌以及其他疾病。患者家族中存在 1 名以上一级亲属或 2 名以上二级亲属患食管癌者定义为具有食管癌阳性家族史。所有参试成员均签署知情同意书。本研究经第三军医大学伦理委员会批准,ESCC 患者及健康对照人群基本资料见表 1。

**1.2 主要仪器和试剂** 血液基因组 DNA 提取试剂盒、2×Taq 酶 Mix、限制性内切酶 Aci I(北京经科宏达生物技术有限公司)。PTC-200 型基因扩增仪(德国, Eppendorf), DYY-11B 型三恒电泳仪器(北京六一仪器厂), Gel doc 2000 凝胶成像系统(意大利, Bio-RAD)。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 基因组 DNA 的提取** 收集研究对象 EDTA 抗凝静脉血 2~3 mL, 4℃ 保存,于采血后 1 周内按照基因组 DNA 提取

\* 基因项目:国家自然科学基金资助项目(30971603);重庆市自然科学基金资助项目(2009BB5338)。△ 通讯作者, Tel:(023)68752258; E-mail: baiyungene@gmail.com。

试剂盒的实验步骤提取 DNA,并测定 DNA 的浓度及纯度。

**1.3.2 THBS1 的基因多态性分析** THBS1 的基因位点 rs2292305 的多态性分析采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism,PCR-RFLP) 方法进行。PCR 引物设计采用 Primer Premier 5.0 软件,正向引物 5'-AGG GAG GGA TTT GAA AGT TGA-3',反向引物 5'-CAG TGT AAG ATA TTA TAG GGT ATA GGG A-3',并送交上海 Invitrogen 生命技术有限公司合成。PCR 扩增体系为 21.5  $\mu$ L,其中包括 2 $\times$ Taq 酶 Mix 10  $\mu$ L、引物 0.5  $\mu$ L、模板 DNA 1  $\mu$ L,灭菌双蒸水 10  $\mu$ L。扩增条件为:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s;56  $^{\circ}$ C 退火 30 s;72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环后 72  $^{\circ}$ C 充分延伸 5 min。THBS1 基因扩增后产物长度 414 bp,多态性位点 rs2292305 (A/G)碱基为 G 时可以被限制性内切酶 Aci I 识别并酶切。于 37  $^{\circ}$ C 水浴槽中消化 4 h 后,可得到 263 bp 和 151 bp 的产物片段,进行 2%琼脂糖凝胶电泳分离,统计基因型分布。

**1.4 统计学处理** 数据采用 SPSS13.0 软件进行统计,用  $\chi^2$  检验进行 rs2292305 位点基因型的 Hardy-Weinberg 遗传平衡分析。直接计数法计算 rs2292305 的 3 种基因型 (GG、GA、AA)在 ESCC 组和对照组的分布频率,以非条件 Logistic 回归模型计算相对风险度的比值比(odds ratio,OR)及其 95%可信区间(confidential interval,CI),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 PCR 及酶切电泳图** PCR 产物大小为 414 bp,酶切检测结果发现,AA 基因型为 414 bp 一条带,GG 基因型为 263 bp 和 151 bp 两条带,而 AG 杂合子为 414 bp、263 bp 和 151 bp 三

条带(图 1)。

**表 1 ESCC 患者以及对照组的基本资料[n(%)]**

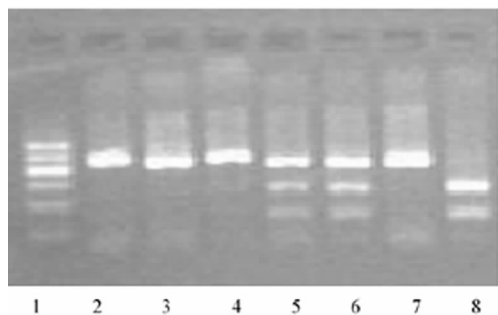
病例特征	ESCC 患者组	对照组	$\chi^2$	P
年龄(岁)			0.15	0.70
<60	116(63.39)	105(61.40)		
$\geq 60$	67(36.61)	66(38.60)		
性别			1.22	0.27
男	139(75.96)	121(70.76)		
女	44(24.04)	50(29.24)		
分化程度			-	-
高	43(23.50)			
中	105(57.38)			
低	35(19.12)			
TNM 分期			-	-
I	3(1.64)			
II a	142(77.60)			
II b	31(16.94)			
III	5(2.73)			
IV	2(1.09)			
合计	183	171		

**2.2 THBS1 基因多态性与 ESCC 的关联性分析** 经  $\chi^2$  检验,rs2292305 基因位点在对照组中的基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡( $P = 0.42$ )。数据经统计和分析,THBS1 基因 rs2292305 位点(基因型 GG、AA、AG)在 ESCC 患者组与正常对照组之间的分布比较差异具有统计学意义(表 2)。

**表 2 ESCC 患者组与对照组 rs2292305 的基因型分布及 ESCC 患病风险的关系[n(%)]**

rs2292305		ESCC 患者组(n=183)	对照组(n=171)	$\chi^2$	P	OR 值(95%CI)
等位基因	A	249(68.03)	227(66.37)	-	-	-
	G	117(31.97)	115(33.63)	0.22	0.64	0.93(0.68~1.27)
基因型	AA	71(38.80)	73(42.69)	-	-	-
	GA	107(58.47)	81(47.37)	1.90	0.17	1.36(0.88~2.10)
	GG	5(2.73)	17(9.94)	5.43	0.02*	0.30(0.11~0.86)
	GA/AA	112(61.20)	98(57.31)	0.56	0.46	1.18(0.77~1.80)

\*:与正常对照组比较;OR 值与 P 值均由非条件 Logistic 回归分析得出,分别校正了年龄、性别以及吸烟状态等因素。



**图 1 rs2292305 位点的酶切电泳图**

PCR 产物大小为 414 bp;1 为 Marker I :从上到下依次为 600、500、400、300、200、100 bp;2、3、4 和 7 为 AA 基因型;5 和 6 为 GA 基因型;8 为 GG 基因型。

**3 讨 论**

THBS1 是 20 世纪 70 年代发现的一种细胞外基质糖蛋

白。它可由肿瘤细胞、巨噬细胞、单核细胞、内皮细胞等多种细胞合成,主要储存在血小板的  $\alpha$  颗粒内,在血小板被激活时释放,是最强的血管生成负性调节物质之一[2]。THBS1 通过与各种细胞外基质(包括纤维蛋白原、纤连蛋白、层粘连蛋白、V 型胶原以及整合素  $\alpha$ -V/ $\beta$ -1 等)的相互作用,调节细胞的黏附、迁移、增殖和分化[3]。另外,THBS1 在转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )通路的上游有明显的激活作用,它可抑制多种蛋白酶的表达,进而产生重要的生物学效应[4]。

现有的研究发现,THBS1 在不同肿瘤组织中表达不一致,在不同的肿瘤的发生、发展中起着完全不同的调节作用。目前认为这种对肿瘤发生的相互矛盾的调节作用与 THBS1 的复杂性有关,THBS1 可以与多种细胞外基质相互作用后,从而激活细胞内不同的信号传导途径,最后表现在靶细胞上的是其综合效应。这种综合效应会随所作用的细胞种类不同而变化,因而在不同类型的肿瘤细胞内,THBS1 出现表达上调或下调的

不一致,其表现出的对肿瘤的发生和转移具体的促进或抑制作用也不尽相同。也有学者认为这是由于 THBS1 的作用具有时间上的两相性,肿瘤发生初期以血管生长和逃避宿主免疫反应为主,THBS1 可以通过抑制肿瘤血管的生长而发挥抑癌作用。而随着肿瘤的发展,肿瘤原发灶周围细胞外基质被降解、肿瘤细胞侵入血管或者淋巴管继而经过靶器官定位发生转移,在此过程中,THBS1 可以作为黏附分子或者细胞外蛋白酶,通过抑制宿主的免疫反应促进肿瘤的发展和扩散。从间接作用来看,THBS1 对肿瘤发生的不同作用也可能与其激活 TGF- $\beta$  通路,借由 TGF- $\beta$  产生对肿瘤的双向调节作用有关<sup>[5-6]</sup>。

最新的研究证实,食管癌组织内 THBS1 表达增多,且与食管癌的 TNM 分期和区域淋巴结转移有关。THBS1 过表达,刺激食管癌细胞内 TGF- $\beta$  信号通路的活化能力增强,使其下游通路的 Cyr61 和 CTGF 表达增多;当患者食管癌组织内 THBS1、Cyr61 以及 CTGF 中的 2 种或者以上发生高表达时,其生存率则明显降低,显示 THBS1 的高表达与食管癌患者的预后不良相关<sup>[7]</sup>。

尽管 THBS1 在食管癌中的表达上调已经被实验所证明,但 THBS1 基因多态性与食管癌的发生和转移间的关系却少见报道。THBS1 介导细胞的黏附、迁移以及对肿瘤血管生成的调控都与肿瘤发生和转移息息相关。THBS1 在发挥上述作用时,需要依赖其具有功能的结构域与多种细胞外基质或者细胞表面的受体结合,因此在食管癌组织中,THBS1 作用的发挥不仅与其表达的量有关,也与表达的 THBS1 蛋白的质有关。

rs2292305 位于 THBS1 基因的编码区,在汉族人群中的杂合率为 0.433,rs2292305 的多态性改变为 G→A,属于非同义编码 SNP,会导致基因产物的 523 位氨基酸由丙氨酸(GCC)变为苏氨酸(ACC)。因此,该多态性会对 THBS1 基因的表达或功能造成一定的影响,从而在食管癌的发生中产生作用。本

研究结果显示,该多态性确实会影响食管癌的发生,提示 THBS1 基因是食管癌发病的易感基因之一。THBS1 基因多态性的研究有助于进一步揭示 THBS1 基因的表达在肿瘤发生和发展机制中所发挥的作用。但该基因 rs2292305 位点的多态性以何种机制参与食管癌的发生和发展,以及该多态性会导致怎样的基因功能变化,仍需进一步的研究和探讨。

#### 参考文献:

- [1] 陈竺. 全国第三次死因回顾抽样调查报告[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2008:10-78.
- [2] Ueki T, Toyota M, Sohn T, et al. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(7):1835-1839.
- [3] Roberts DD. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1[J]. *FASEB J*, 1996, 10(10):1183-1191.
- [4] Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo[J]. *Cell*, 1998, 93(7):1159-1170.
- [5] Kazerounian S, Yee KO, Lawler J. Thrombospondins in cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(5):700-712.
- [6] Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and prometastatic factor in human cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1775(1):21-62.
- [7] Zhou ZQ, Cao WH, Xie JJ, et al. Expression and prognostic significance of THBS1, Cyr61 and CTGF in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9:291-298.

(收稿日期:2010-12-02 修回日期:2011-02-10)

(上接第 1877 页)

综上所述,用胰岛素控制糖尿病大鼠血糖能导致抵抗素 mRNA 表达下降,可能与血糖控制后胰岛素抵抗改善,胰岛素负调节抵抗素 mRNA 表达有关。但本实验血清抵抗素浓度未显示明显变化,可能血清中抵抗素浓度变化还需要较长时间的血糖变化影响,也可能表明胰岛素的治疗仅在基因水平调节抵抗素表达。进一步开展胰岛素严格控制血糖对抵抗素影响的研究,将有助于阐明抵抗素在糖尿病发病机制中的作用,有望为糖尿病的防治提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 李丙蓉,邓华聪. 抵抗素研究进展[J]. *重庆医学*, 2003, 32(12):1751-1754.
- [2] Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes[J]. *Nature*, 2001, 409(3):307-312.
- [3] Steppan CM, Wang J, Whitman EL, et al. Activation of SOCS-3 by resistin[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(4):1569-1575.
- [4] Satoh H, Nguyen MTA, Miles PDG, et al. Adenovirus mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo in-

ulin resistance in normal rats[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(2):224-231.

- [5] Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(2):502-506.
- [6] Haugen F, Jorgensen A, Dreven CA, et al. Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes[J]. *FEBS Lett*, 2001, 507(1):105-108.
- [7] Sato N, Kobayashi K, Inoguchi T, et al. Adenovirus mediated high expression of resistin causes dyslipidemia in mice[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(1):273-279.
- [8] 方超,杨刚毅,李伶,等. 高脂诱导胰岛素抵抗大鼠糖代谢及血抵抗素、脂联素水平的变化[J]. *重庆医学*, 2006, 35(10):865-867.
- [9] Ort T, Arjona AA, Rothberg ME, et al. Recombinant human FIZZ3/resistin stimulates lipolysis in cultured human adipocytes, mouse adipose explants, and normal mice[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(5):2200-2209.

(收稿日期:2010-12-29 修回日期:2011-02-19)