

谷胱甘肽S-转移酶M1、T1基因多态性及氧化应激与非小细胞肺癌易感性

张红艳¹ 吴绪伟¹ 肖谊¹ 陈梅¹ 李志东¹ 李艳丽¹ 唐开发²

(1. 昆明医科大学附属延安医院呼吸一科, 昆明 650051; 2. 贵阳医学院医学科学研究所, 贵阳 550004)

摘要 目的 探讨谷胱甘肽S-转移酶M1、T1(*GSTM1*、*T1*)基因多态性及氧化应激损伤对非小细胞肺癌易感性。方法 本病例对照研究包括110名非小细胞肺癌患者(病例组)和100名正常健康对照者(对照组)。所有研究对象外周血基因组DNA *GSTM1*、*T1*基因型采用聚合酶链反应(PCR)技术进行检测;外周血清丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)浓度及总抗氧化能力(T-AOC)采用分光光度计检测方法测定。结果 *GSTM1*、*T1*基因缺失型及*GSTM1/T1*缺失型在病例组明显高于对照组($OR1=2.071$, $P1=0.009$; $OR2=1.900$, $P2=0.024$; $OR3=3.258$, $P3=0.003$)。MDA及NO水平在病例组显著高于对照组($P<0.001$),而T-AOC水平则在病例组明显低于对照组($P<0.001$)。同时,病例组中*GSTM1*、*T1*基因缺失型及*GSTM1/T1*缺失型亚组MDA及NO浓度水平明显高于野生型亚组,而T-AOC水平明显低于野生型亚组(P 均 <0.001)。结论 氧化损伤在非小细胞肺癌的发生发展过程中可能扮演着重要角色,而*GSTM1*、*T1*基因缺失型非小细胞肺癌患者更易受到氧化应激损伤。

关键词 谷胱甘肽S-转移酶;多态性;氧化应激;非小细胞肺癌

中图分类号 R563

文献标志码 A

文章编号 0258-4646(2014)05-0432-05

网络出版地址 <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1227.R.20140521.0953.030.html>

Genetic Polymorphisms of Glutathione S-transferase M1 and T1 and Evaluation of Oxidative Stress in Patients with Non-small Cell Lung Cancer

ZHANG Hong-yan¹ WU Xu-wei¹ XIAO Yi¹ CHEN Mei¹ LI Zhi-dong¹ LI Yan-li¹ TANG Kai-fa²

(1. The First Department of Respiration, The Affiliated Yan'an Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650051, China; 2. Institute of Medical Science of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

Abstract Objective To investigate the genetic polymorphisms of the glutathione S-transferase M1 and T1 genes (*GSTM1* and *GSTT1*), and evaluate the oxidative damage in patients with non-small lung cancer (N-SCLC). Methods A total of 110 patients with N-SCLC and 100 healthy individuals were recruited in this case-control study. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) analysis was used to identify the genotypes. The activity of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), and the total antioxidant capacity (T-AOC) were detected by spectroscopic analysis using assay kits. Results The frequencies of the *GSTM1*, *T1*, and *GSTM1/T1* null genotypes in the patient group were significantly higher than those in control group ($OR1=2.071$, $P1=0.009$; $OR2=1.900$, $P2=0.024$; $OR3=3.258$, $P3=0.003$). The activity of MDA and NO were obviously higher in the patient group compared with the control group ($P<0.001$), and T-AOC was obviously lower in patient group than those in control group ($P<0.001$). The activity of MDA, and NO were higher but the T-AOC were lower in patients with *GSTM1*, *T1* and *GSTM1/T1* null genotypes than those in patients with *GSTM1*, *T1* and *GSTM1/T1* present genotypes ($P<0.001$). Conclusion Our results suggest that oxidative damage may play an important role in patients with N-SCLC, and the N-SCLC patients with *GSTM1* and *GSTT1* deletion genotypes are more susceptible to oxidative damage.

Key words glutathione S-transferases; polymorphism; oxidative stress; non-small lung cancer

肺癌已成为美国、欧洲以及亚洲各国的癌症患者死亡的最主要原因之一,是对人群健康和生命威胁较大的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率有逐年增加的趋势^[1]。肺癌病理类型中非小细胞肺癌(non-

small cell lung cancer, N-SCLC)约占80%。然而,由于早期诊断困难,不能及时治疗从而导致N-SCLC患者的预后较差^[2]。由于肺表面积直接与空气接触,加上高氧张力,从而导致大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生^[3]。自由基产生主要包括外源性[如环境中的刺激物和污染物(香烟烟雾、臭氧等)]及内源性因素(如炎症细胞的激活),既往研究认为氧化应激及自由基可能对多种癌症的易感性增加^[4]。另外的研究结果表明,暴露于氧化应激

基金项目:云南省应用基础研究基金(2010ZC198)

作者简介:张红艳(1982-),女,主治医师,硕士。

通信作者:唐开发, E-mail: doc.tangk@hotmai.com

收稿日期:2013-12-15

网络出版时间:2014-05-21 09:53

可导致单一或聚集的细胞DNA损伤,从而致基因突变和基因重组,最终导致恶变^[4,5]。Ito等^[6]研究发现在从不吸烟者N-SCLC患者总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)明显降低,可能增加肺组织DNA对氧化应激的损伤。Peddireddy等^[7]研究认为在N-SCLC发生发展中增加氧化应激导致氧化-抗氧化能力平衡失调,从而增加脂质过氧化对DNA的损伤。

谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferases, GST)是一个II相代谢酶家族,其通过还原型谷胱甘肽共轭还原反应消除氧化应激产生的有毒的亲电子和产物^[8]。GSTM1能解毒苯并芘二醇环氧化物,而GSTT1能清除共轭的氧化脂质和卤代化合物,既往有研究认为GSTM1及GSTT1基因缺失型可能与肺癌的发生发展存在易感性,然而也有研究表明两者之间无明显的相关性^[9,10]。

然而,到目前未发现有关于GST基因多态性及氧化应激水平对N-SCLC患者易感性研究。本研究我们主要对云南地区的N-SCLC患者的GSTM1、T1基因多态性及氧化应激水平(MDA、NO及T-AOC)进行研究,以探讨两者之间的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

该研究包括110例N-SCLC患者及100例匹配的正常健康对照。其性别、年龄、吸烟史及临床特征需详细记录。所有N-SCLC患者均为首次到医院就诊通过临床特征、体格检查、血清生化检查、X线、CT及经皮穿刺活检或手术标本病理证实为N-SCLC,其中鳞癌62例,腺癌48例。临床根据TNM分期,I期19例,II期26例,III期31例,IV期34例。所有患者之前未进行过任何治疗。对照组选自同时期、同地区的正常健康志愿者。对所有患者及对照者一般情况及既往史等均进行详细问卷调查。该研究得到昆明医科大学附属延安医院医学伦理学委员会批准。

1.2 引物设计和合成

根据基因序列,采用prime5软件设计PCR扩增引物GSTM1:Forward 5'-GAAGTCCCTGAAAAGCTA AAGC-3',Reverse 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGT GG-3';GSTT1:Forward 5'-TTCCTTACTGGTCCTCA CATCTC-3',Reverse 5'-TCACCGGATCATGGC CAGCA-3';并 β -actin为内参照,引物序列为:Forward 5'-ACTCCCCATCCCAAGACC-3',Reverse 5'-

CCTTAATGTCACGCACGA T-3'。

1.3 外周血标本采集和基因组DNA提取

采取所有研究对象外周静脉血6 mL,其中3 mL以乙二胺四乙酸二钠(EDTA)作为抗凝剂混匀为抗凝血液,放置于-80℃低温冰箱备用。基因组DNA提取按照外周血微量基因组DNA提取试剂盒说明书操作;另外3 mL经1 000 r/min离心后对血清进行分离备用。

1.4 GSTM1基因型PCR扩增

采用Biomlra梯度PCR仪对所有DNA标本进行GSTM1、T1基因型检测。反应体系为25 μ L,反应条件为95℃预变性5 min,94℃变性30 s,60℃(63℃)退火30 s,72℃延伸30 s,共30个循环;72℃延伸7 min^[11]。

1.5 电泳检测

PCR扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶成像系统进行检测。GSTM1基因扩增产物为219 bp,GSTM1基因扩展产物为480 bp, β -actin扩增产物为400 bp,所有样本均重复3次PCR扩增及电泳检测。

1.6 氧化应激水平检测

主要检测血清中MDA、NO及T-AOC。检测方法按照试剂盒说明书进行。

1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析和 χ^2 检验进行,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

我们发现病例组和对照组在性别、年龄及吸烟史方面无统计学差异($P > 0.05$),见表1。

病例组GSTM1(-)比例显著高于对照组($OR = 2.071$,95%CI 1.194~3.593; $P = 0.009$);病例组GSTT1(-)比例显著高于对照组($P = 0.024$);病例组GSTM1/T1(-/-)比例显著高于对照组($P = 0.003$),见图1、表2。

在该研究中,病例组血清中MDA及NO水平显著高于对照组($P < 0.001$),而T-AOC水平显著低于对照组($P < 0.001$)。同时我们发现在病例组中,MDA和NO水平在GSTM1(-)、GSTT1(-)及GSTM1/T1(-/-)亚组中分别显著高于GSTM1(+),GSTT1(+),及GSTM1/T1(+/-)亚组(P 均 < 0.001);而T-AOC水平则是GSTM1(-)、GSTT1(-)及GSTM1/T1(-/-)亚组分别显著低于GSTM1(+),GSTT1(+),及GSTM1/T1

(+/+)亚组(P 均 <0.001)。见表3。



M ,50 bp DNA marker ;1 ,GSTM1/T1 (+/+) genotype ;2 ,GSTM1/T1 (+/-) genotype ;3 ,GSTM1/T1 (-/+) genotype ;4 ,GSTM1/T1 (-/-) genotype ;5 , negative control.

图1 GSTM1、T1水平凝胶电泳图

Fig.1 A representative image of multiplex polymerase chain reaction (PCR) analysis of glutathione S-transferase M1 and T1 and actin gene polymorphisms

表1 所有研究对象人口数据及临床特征

Tab.1 Demographic and clinical characteristics data of all subjects

Item	N-SCLC (n=110)	Controls (n=100)	P value
Age (year)	60.18±8.64	59.23±11.12	0.493
Gender			
Female[n (%)]	16 (14.55)	13 (13.00)	—
Male[n (%)]	94 (85.45)	87 (87.00)	0.746
Smoking history ^a			
Mean pack-years ± SD	50.38±20.25	48.02±20.76	0.405
Performance status ^b			
0-1 (%)	83 (75.45)	—	—
2-4 (%)	27 (24.55)	—	—

N-SCLC non-small cell lung cancer ;SD standard deviation. a ,smoking history in pack-years ;

b eastern cooperative oncology group performance status.

表2 GSTM1、T1基因在病例组及对照各组频率分布

Tab.2 The distribution of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes in study groups

Item	N-SCLC(n=110)	Control(n=100)	χ^2	P value	OR (95%CI)
GSTM1[n (%)]					
(+)	44(40.0)	58(58.0)	—	—	—
(-)	66(60.0)	42(42.0)	6.794	0.009	2.071(1.194–3.593)
GSTT1[n (%)]					
(+)	35(31.8)	47(47.0)	—	—	—
(-)	75(69.2)	53(53.0)	5.073	0.024	1.900(1.084–3.331)
GSTM1/T1[n (%)]					
(+/+)	20(18.2)	23(23.0)	—	—	—
(+/-)	24(21.8)	35(35.0)	0.345	0.557	0.789(0.357–1.743)
(-/+)	15(13.6)	24(24.0)	0.542	0.462	0.719(0.298–1.734)
(-/-)	51(46.4)	18(18.0)	8.571	0.003	3.258(1.457–7.287)

+ present genotype ;- null genotype ;OR odds ratio ;CI confidence intervals.

表3 GSTM1、T1 基因多态性与血清MDA、NO及T-AOC相关性
Tab.3 Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and T1 in relation to plasma MDA ,NO and T-AOC

Group	n	MDA (nmol/mL)	NO (nmol/mL)	T-AOC (U/mL)
Control	100	8.49±3.30	16.79±5.37	13.69±4.56
Case	110	11.67±4.31 ¹⁾	19.68±4.11 ¹⁾	9.88±3.58 ¹⁾
GSTM1				
(+)	44	10.18±4.23	18.01±3.56	11.11±2.67
(-)	66	12.67±4.09 ²⁾	20.80±4.09 ²⁾	9.07±3.88 ²⁾
GSTT1				
(+)	35	9.29±2.84	17.98±3.99	11.73±2.82
(-)	75	12.78±4.44 ³⁾	20.48±3.94 ³⁾	9.03±3.58 ³⁾
GSTM1/T1				
(+/+)	20	8.56±2.86	17.68±3.57	11.97±2.28
(+/-)	24	11.52±4.76	18.28±3.60	10.39±2.80
(-/+)	15	10.27±2.60	18.37±4.59	11.40±3.47
(-/-)	51	13.38±4.20 ⁴⁾	21.51±3.68 ⁴⁾	8.39±3.75 ⁴⁾

+ ,present genotype ;- ,null genotype ;MDA ,malondialdehyde ;NO ,nitric oxide ;T-AOC ,total antioxidant capacity. 1) $P < 0.001$ vs control group ;2) $P < 0.001$ vs GSTM1 (+) ;3) $P < 0.001$ vs GSTT1 (+) ;4) $P < 0.001$ vs GSTM1/T1 (+/+).

3 讨论

氧化应激是指体内氧化与抗氧化作用失衡 ,倾向于氧化 ,导致中性粒细胞炎性浸润 ,蛋白酶分泌增加 ,产生大量氧化中间产物 ,其产生的物质叫活性氧(reactive oxygen species ,ROS)。同时 ,机体也存在着消除氧化应激的保护物质被称为抗氧化剂 ,两者之间的不平衡导致重要的分子和细胞损伤 ,从而对整个机体造成影响^[12]。此外 ,肿瘤的发生和进展过程中也伴随着氧化应激导致增加DNA 突变 ,诱导DNA 损伤 相关基因组重组以及细胞增殖^[13]。既往研究认为机体氧化应激水平增加在N-SCLC 发生发展过程中扮演着重要的角色^[6,7]。在该研究中 ,我们发现病例组血清中MDA 及NO 水平显著高于对照组 ,同时在病例组中 ,MDA 及NO 在GSTM1 及T1 基因缺失型组显著高于野生型组 ,T-AOC 则低于野生型组。因此 ,我们认为血清中高水平的MDA 及NO ,低水平T-AOC 是N-SCLC 的危险因素。

作为机体抗氧化最重要的成员之一 ,谷胱甘肽S-转移酶属机体Ⅱ相代谢酶家族 ,包含α(A) ,μ(M) ,π(P) ,σ(σ) ,ζ(ζ) ,ω(ω)和θ(T)。其通过共轭反应催化多种内源和外源性化合物包括ROS、致癌物质以及其代谢产物。人胞浆GST 基因具有遗传多态性 ,从而导致GST 活性改变 ,这增加了机体对氧化损伤的易感性。既往研究表明 ,GSTM1 和GSTT1 基因缺失型可增加肺癌易感性^[9,14]。但也有研究认为

GSTM1 和GSTT1 基因缺失型与肺癌发生发展没有相关性^[10]。本研究我们发现病例组GSTM1(-)、GSTT1(-)及GSTM1/T1(-/-) 比例显著高于对照组。因此 ,GSTM1、GSTT1 及GSTM1/T1 缺失型可能为N-SCLC 的危险因素。

同时 ,我们对N-SCLC 患者GSTM1、T1 基因多态性及血清氧化应激水平进行检测分析 ,发现GSTM1、GSTT1 及GSTM1/T1 基因缺失型患者血清中MDA 及NO 水平高于野生型组 ,而T-AOC 水平则低于野生型组。因此 ,GSTM1 及T1 基因缺失型可能增加氧化应激对机体的易感性 ,增加N-SCLC 的风险。

综上所述 ,氧化应激在N-SCLC 发生发展过程中扮演着重要的角色 ,而GSTM1、GSTT1 基因缺失型增加了机体对氧化应激的损伤。然而 ,本研究单中心及样本量较小 ,具有一定的局限性 ,需大样本及多中心研究进一步证实。

参考文献 :

[1] Thun MJ ,Hannan LM ,Adams-Campbell LL ,et al. Lung cancer occurrence in never-smokers :an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies [J]. PLoS Med 2008 ,5(9) :e185.
[2] Jemal A ,Siegel R ,Xu J ,et al. Cancer statistics ,2010 [J]. CA Cancer J Clin 2010 ,60(5) :277-300.
[3] Wu W ,Platoshyn O ,Firth AL ,et al. Hypoxia divergently regulates production of reactive oxygen species in human pulmonary and coronary artery smooth muscle cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007 ,293(4) :L952-L959.
[4] Farinati F ,Piciocchi M ,Lavezzo E ,et al. Oxidative stress and induc-

- ible nitric oxide synthase induction in carcinogenesis [J]. *Dig Dis*, 2010, 28(4-5): 579-584.
- [5] Cadet J, Douki T, Ravanat JL. Oxidatively generated base damage to cellular DNA [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(1): 9-21.
- [6] Ito K, Yano T, Morodomi Y, et al. Serum antioxidant capacity and oxidative injury to pulmonary DNA in never-smokers with primary lung cancer [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(3): 1063-1067.
- [7] Peddireddy V, Badabagni SP, Gundimeda SD, et al. Assessment of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and malondialdehyde levels as oxidative stress markers and antioxidant status in non-small cell lung cancer [J]. *Biomarkers*, 2012, 35(9): 1023-1028.
- [8] Rezaei MK, Shobbar ZS, Shahbazi M, et al. Glutathione S-transferase (GST) family in barley: identification of members, enzyme activity, and gene expression pattern [J]. *J Plant Physiol*, 2013, 170(14): 1277-1284.
- [9] Matakova T, Sivonova M, Halasova E, et al. Gene polymorphisms of biotransforming enzymes (GSTs) and their association with lung cancer in the Slovakian population [J]. *Eur J Med Res*, 2009, 14 Suppl 4: 275-279.
- [10] Tamaki Y, Arai T, Sugimura H, et al. Association between cancer risk and drug-metabolizing enzyme gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) polymorphisms in cases of lung cancer in Japan [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, 26(5): 516-522.
- [11] Tang K, Xue W, Xing Y, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1, T1, and P1, and the assessment of oxidative damage in infertile men with varicoceles from northwestern China [J]. *J Androl*, 2012, 33(2): 257-263.
- [12] Durackova Z. Some current insights into oxidative stress [J]. *Physiol Res*, 2010, 59(4): 459-469.
- [13] Visconti R, Grieco D. New insights on oxidative stress in cancer [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2009, 12(2): 240-245.
- [14] Kant SR, Kant S, Mittal B, et al. Comparative study of GST polymorphism in relation to age in COPD and lung cancer [J]. *Tuberk Toraks*, 2013, 61(4): 275-282.

(编辑 武玉欣)

(上接第431页)

- [3] 康小龙, 唐孝龙, 何承辉. 脂联素基因多态性与新疆地区哈萨克族2型糖尿病的相关性研究[J]. *中国医科大学学报*, 2012, 41(5): 454-457.
- [4] Krasnodebski P, Opolski G, Karnafel W. Plasma adiponectin levels in acute myocardial infarction and during the postinfarction recovery period in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Kardiol Pol*, 2011, 69(9): 924-930.
- [5] Fisher FM, Mc Ternan PG, Valsamakis G, et al. Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type2 diabetic status [J]. *Horm Metab Res*, 2002, 34(11-12): 650-654.
- [6] Abate N, Chandalia M, Snell PG, et al. Adipose tissue metabolites and insulin resistance in nondiabetic Asian Indian men [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(6): 2750-2755.
- [7] Altomonte J, Harbaran S, Richter A, et al. Fat depot-specific expression of adiponectin is impaired in Zucker fatty rats [J]. *Metabolism*, 2003, 52(8): 958-963.

(编辑 陈 姜)