血小板膜糖蛋白基因-176T/C 和-506G/A 单核苷酸多态性与肺癌的相关性*

于 湧[1]，杨 芳[2,3]**，何 芸[3]，符 贵[2]，彭云潇[2]
（1. 贵阳市公共卫生救治中心，贵州 贵阳 550003；2. 贵州医科大学附属肿瘤医院，贵州 贵阳 550004；3. 贵州医科大学，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的**：探讨血小板膜糖蛋白基因（GP）-176T/C 和-506G/A 单核苷酸多态性与肺癌的相关性。**方法**：经病理确诊的肺癌患者 100 例作为肺癌组，同期健康体检者 100 例作为对照组，提取两组受检者外周全血 DNA，用聚合酶链反应－序列特异性引物（PCR-SSP）法检测 GP-176T/C 和-506G/A 位点的基因型；采用非条件 *logistic* 回归法分析肺癌患者 GP-176T/C 和-506G/A 基因型频率及等位基因频率与肺癌的相关性。**结果**：对照组和肺癌组 GP-176T/C 基因型频率及等位基因频率比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）；GP-176T/C 和-506G/A 位点的基因型和等位基因频率分布与肺癌的 TNM 分期及淋巴结转移之间无明显关系（$P>0.05$）；对 GP-176T/C 和-506G/A 位点的不同基因型与肺癌的相关性进行相对危险度分析，结果显示 GP-176T/C 位点中 TC 型及 C 等位基因对肺癌的发病有统计学意义（$OR=0.392$、0.490，95% CI 分别为 0.241～0.639 和 0.301～0.798，$P<0.05$）。**结论**：GP-176T/C 基因多态性可能与肺癌的发生有关，C 等位基因可能是肺癌发病的保护因素。

［关键词］肺肿瘤；多态性，单核苷酸；血小板膜糖蛋白基因；基因位点，GP-176T/C，GP-506G/A；相关性分析
［中图分类号］R734.2；R34－33 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2017）03-0279-05
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.03.007

Correlation between Platelet Membrane Glycoprotein Gene-176T/C and -506G/A Single Nucleotide Polymorphisms and Lung Cancer

YU Yong[1], YANG Fang[2,3], HE Yun[3], FU Gui[2], PENG Yunxiao[2]
(*1. Guiyang Public Health Center for Treatment, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Guizhou Provincial Cancer Hospital Affiliated to Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To investigate the correlation between platelet membrane glycoprotein (PMGP) -176T/C and -506G/A single nucleotide polymorphisms and lung cancer. **Methods**: One hundred pathologically confirmed lung cancer patients were selected as observation group (group O), and 100 healthy people as control group (group C). Peripheral blood of the research subjects was collected and PMGP gene was detected for genotypes of GP-176T/C and-506G/A by using polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSP) method. The correlation of genotype frequency and allele frequency of GP-176T/C and-506G/A with lung cancer was analyzed with non-conditional logistic regression. **Results**: The differences of GP-176T/C genotype and allele frequencies between groups O and C were statistically significant ($P<0.05$); The genotype and allele frequencies of GP-176T/C and -506G/A were not significantly correlated with TNM stages and lymph node metastasis ($P>0.05$); The relative risk analysis of GP-176T/C and-506G/A sites showed that at GP-176T/C

*［基金项目］贵州省科技厅基金项目（TN2014－73）
**通信作者 E-mail：1129831581@qq.com
网络出版时间：2017－3－18 网络出版地址：http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170318.2320.025.html

locus, TC type and C allele had statistically significant influences on the incidence of lung cancer, of which OR (95% CI) were 0.392(0.241 ~0.639) and 0.490(0.301 ~0.798) ($P<0.05$). **Conclusions**: GP-176T/C gene polymorphism might correlate with the occurrence of lung cancer, and C allele might be a protective factor against lung cancer.

[**Key words**] lung tumor; polymorphism, mononucleotide; platelet membrane glycoprotein gene; genetic loci, GP-176T/C, GP-506G/A; correlation analysis

肺癌是呼吸系统常见的恶性肿瘤,其发病率、死亡率居各类恶性肿瘤之首。癌细胞的浸润和转移高度依赖血液循环,通过血液循环肿瘤细胞可转移到脑、肝、肾上腺及骨等部位[1]。有研究发现血小板活化状态及其数量的增多与肺癌的发生、发展及转移密切相关[2]。癌细胞可活化血小板,使肿瘤患者血液呈高凝状态时,还可使活化血小板的聚集能力增强,对肿瘤细胞的侵袭、转移、生长、增殖以及肿瘤血管的生成起到重要的作用[3-4]。血小板抗原性可影响血小板的活化功能,其表达水平和结构受血小板膜糖蛋白(glycoprotein,GP)基因多态性的影响[3]。目前 GP 基因多态性与疾病的相关性研究大量集中于心梗、脑梗等血栓性疾病[4]。关于 GP 基因多态性与肺癌患者的相关性研究未见报道,本研究采用序列特异性引物 - 聚合酶链反应技术(seqeuence specific primers-polymerase chain reaction ,PCR-SSP)对 GP-176T/C 和 506G/A 基因位点进行扩增,采用病例 - 对照的研究方法,探讨 GP-176T/C 和 506G/A 位点单核苷酸多态性与肺癌发生、发展的相关性。

1　材料与方法

1.1　对象

收集 2014 年 6 月 ~2015 年 2 月就诊的 100 例肺癌患者作为肺癌组,所有病例经临床资料和组织病理学检查确诊,采用世界卫生组织(WHO2004)肺癌组织类型划分标准进行病理分型[5]。100 例同期健康体检者作为对照组。肺癌组平均(57.43 ± 11.57)岁,男性 73 例,女性 27 例;小细胞癌 16 例,腺癌 46 例,鳞癌 26 例,腺鳞癌 4 例;根据 2009 年国际抗癌联盟(UICC)肺癌 TNM 分期标准,Ⅰ期 5 例、Ⅱ期 7 例、Ⅲ期 43 例及Ⅳ期 45 例。对照组平均(56.50 ±9.29)岁,男性 74 例,女性 26 例。

1.2　方法

1.2.1　血样采集和 DNA 提取　抽取所有受试者外周静脉血 2 mL,采用酚 - 氯仿法提取全血基因组 DNA(全血 DNA 试剂盒购于上海生工生物工程技术有限公司),-20 ℃保存备用。

1.2.2　基因检测　应用 PCR-SSP 技术对 GP-176T/C 和 506G/A 位点进行基因分型(美国 ABI 公司生产的 PE9700 扩增仪),GP-176T/C 和-506G/A 的上、下游引物序列由上海捷瑞试剂公司合成[6]。PCR 体系中包含 1 对内参照来确认 PCR 反应的有效性,PCR 反应体系为 2 × Taq plus PCRMaster Mix 12.5 μL、内参上游引物(5 nmol/L) 1 μL、内参下游引物(5 nmol/L)1 μL、特异性引物(10 nmol/L)1.0 μL、公共引物(10 nmol/L) 1.0 μL、模板 DNA(0.1 g/L)2.0 μL、灭菌双蒸水补足体积为 25 μL,PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性5 min,94 ℃ 30 s、65 ℃ 45 s、72 ℃ 30 s 进行 10 个循环,再以 94 ℃ 30 s、61 ℃ 45 s,72 ℃ 30 s 进行 22 个循环,最后 72 ℃ 延伸 7 min。

1.2.3　电泳　取扩增产物 5 μL 进行 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 溴乙锭)电泳,置于 DNA 成像分析器 Gel Doc EQ(美国 Bio-Rad 公司)观察特异性条带,记录实验结果。

1.3　统计学分析

应用 Hardy-Weinberg (H-W) 平衡软件计算肺癌患者 GP 基因型的分布并进行统计检验,$P>0.05$ 说明研究人群符合 H-W 平衡;采用 χ^2 检验分析肺癌患者基因型和等位基因频率的分布,非条件 *logistic* 回归法计算比值比 (*OR*) 及 95% *CI*,探讨 GP-176T/C 和 506G/A 位点单核苷酸多态性与肺癌发生、发展的相关性;$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　受试人群的年龄和性别分布

两组受试人群的年龄和性别分布比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1　两组受试人群的年龄和性别分布

Tab. 1　The distribution of age and sex in groups O and C

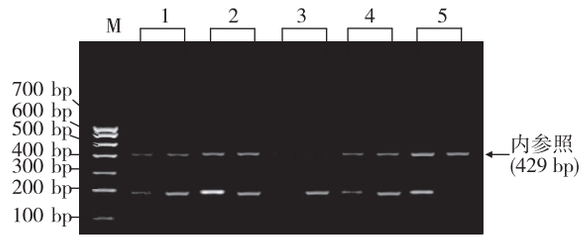
指标	分组		χ^2	P
	肺癌组	对照组		
年龄(岁)				
<50	28	25		
50~65	48	50	0.321	0.891
>65	24	25		
性别				
男	73	74	0.260	0.873
女	27	26		

2.2　PCR 扩增结果及基因型判定

GP-176T/C 位点基因经 PCR 扩增后可见 196 bp 扩增片段,GP-506G/A 位点基因经 PCR 扩增后可见 252 bp 扩增片段见图 1、图 2。

2.3　H-W 平衡检验

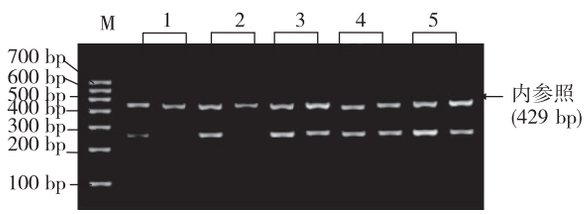
对肺癌组及对照组基因型频率进行 H-W 平衡检验,除对照组 GP-176T/C 位点外,均符合 H-W 平衡。见表 2。



注: M 为 100 bp ladder DNA,1、2、4 为基因型 TC,3 为基因型 CC;5 为基因型 TT

图 1　GP-176T/C 位点琼脂糖电泳结果

Fig. 1　Agarose gel electrophoresis of GP-176T/C locus



注:M 为 100 bp ladder DNA,1~2 为 GG,3~5 为基因型 GA

图 2　GP-506G/A 位点琼脂糖电泳结果

Fig. 2　Agarose gel electrophoresis of GP-506G/A locus

表 2　两组受试人群 GP-176T/C 和-506G/A 基因多态性 H-W 平衡检验

Tab. 2　Gene polymorphism Hardy-Weinberg equilibrium test of GP-176T/C and GP-506G/A in the 2 groups

基因型	实际频数,预期频数(%,%)		肺癌组		对照组	
	肺癌组	对照组	χ^2	P	χ^2	P
GP-176T/C						
TT	68.00,70.56	45.00,51.84				
TC	32.00,26.88	54.00,40.32	3.628	0.057	11.510	0.001
CC	0.00,2.56	1.00,7.84				
GP-506G/A						
GG	75.00,76.56	73.00,66.42				
GA	25.00,21.88	17.00,15.49	2.041	0.153	0.810	0.368
AA	0.00, 1.56	0.00, 0.90				

2.4　GP-176T/C 和-506G/A 基因型和等位基因频率分布

对照组与肺癌组 GP-176T/C 基因型频率及等位基因频率分布比较,差异有统计学意义($P<0.05$);GP-506G/A 基因型频率及等位基因频率分布比较,差异无统计学意义($P>0.05$);见表 3。

2.5　不同临床分期及有无淋巴结转移肺癌中的 GP-176T/C 和-506G/A 位点多态性分布

GP-176T/C 和-506G/A 位点的基因型和等位基因频率在分期及有无淋巴结转移中分布比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

2.6　GP-176T/C 和 506G/A 位点不同基因型对肺癌的相对危险度

非条件 *logistic* 回归法结果显示,GP-176T/C

表 3　肺癌病人 GP-176T/C 和 506G/A 基因型分布和等位基因频率

Tab. 3　Genotype and allele frequencies of GP-176T/C and 506G/A in patients with lung cancer

基因型	组别		χ^2	P
	肺癌组(%)	对照组(%)		
GP-176T/C				
TT	68	45		
TC	32	54	11.300	0.004
CC	0	1		
T	168	144		
C	32	56	8.390	0.004
GP-506G/A				
GG	75	73		
GA	25	17	1.030	0.310
AA	0	0		
G	175	163		
A	25	17	0.900	0.343

位点 TC 型及 C 等位基因与肺癌的发病相关（*OR* =0.392、0.490，95% *CI* 分别为 0.241 ~0.639 和 0.301 ~0.798，*P* <0.05）。GP-506G/A 位点中 GA 型及 A 等位基因与肺癌的发病无关（*OR* =1.627、1.538，95% *CI* 分别为 0.999 ~2.651 和 0.944 ~2.505，*P* >0.05），见表 5。

表 4　不同临床分期及淋巴结转移肺癌中的 GP-176T/C 和-506G/A 位点多态性分布

Tab. 4　The GP-176T/C and -506G/A genotype and allele frequencies in lung cancer patients with different clinical stages and lymph node metastasis situation

基因型	分期（%）				χ^2	*P*	淋巴结转移（%）		χ^2	*P*
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ			有	无		
GP-176T/C										
TT	3	7	28	30			59	9		
TC	2	1	14	15	1.620	0.650	29	3	0.314	0.578
CC	0	0	0	0			0	0		
GP-506G/A										
GG	5	6	32	32			66	9		
GA	0	1	11	13	2.466	0.481	22	3	0.000	1.000
AA	0	0	0	0			0	0		

表 5　GP-176T/C 和-506G/A 位点不同基因型对肺癌的相对危险度

Tab. 5　Relative risk of different genotypes of GP-176T/C and-506G/A loci to lung cancer

	基因型	肺癌组	对照组	χ^2	*P*	*OR*	95% *CI*
GP-176T/C	TT	68	45				
	TC	32	54	10.03	0.002	0.392	0.241 ~0.639
	CC	0	1				
	T	168	144	8.39	0.004	0.490	0.301 ~0.798
	C	32	56				
GP-506G/A	GG	75	83				
	GA	25	17	1.03	0.310	1.627	0.999 ~2.651
	AA	0	0				
	G	175	183	0.90	0.343	1.538	0.944 ~2.505
	A	25	17				

3　讨论

肺癌的发病机制复杂，早期诊断率低，病死率高，转移是患者治疗失败的主要原因。肿瘤的转移包括了肿瘤细胞的迁移、侵袭，并通过内渗或外渗作用穿过血管，最终在远处器官积聚[7]。研究发现，肿瘤细胞可释放凝血酶、组织因子和基质金属蛋白酶等诱导血小板活化，活化的血小板可表达大量糖蛋白于膜表面，并黏附于肿瘤细胞表面，为肿瘤细胞的存活及成功转移提供条件。血小板黏附、活化后，GP 可获得结合纤维蛋白原的能力，使血小板聚集，故 GP 的表达水平和结构可影响血小板的黏附、聚集和活化反应[8]。Wan 等[9]研究发现在结直肠癌中发生复发转移的患者平均血小板数高于局限性癌症患者及未发生转移的患者。此外，在胰岛管腺癌、肝癌等多种肿瘤组织中发现血小板内皮细胞黏附分子 1 高表达[10]；缪小辉等[11]研究也发现血小板内皮细胞黏附分子 1 表达与肺癌患者淋巴结转移存在显著相关性。因此，血小板的活化功能与肿瘤的发生发展密切相关，其可能是促使肿瘤细胞侵入脉管，进行血行转移的重要因素。

本研究对性别、年龄分布无统计学差异的肺癌和正常对照人群 GP-176T/C 和-506G/A 的基因型及等位基因频率分析，结果显示，GP-176T/C 中 CC 基因型只有 1 例，C 等位基因频率与既往学者对亚洲人的研究报道相近[12]。在 GP-506G/A 位点中未检测到 AA 型，A 等位基因频率与美国白种人、

黑人、韩国人群[13]，德国人群[14]基本接近，而低于日本人群(1.8%)[15]。提示 GP-176T/C 和 506G/A 等位基因频率可能存在明显的地区、人群和种族的差异。分析 GP-176T/C 和-506G/A 位点基因多态性与肺癌的相关性，结果显示，与对照组相比，肺癌组 GP-176T/C 的 T 等位基因频率升高，GP-506G/A 位点等位基因频率无明显变化；对两位点基因多态性与肺癌分期、有无淋巴结转移的相关性分析显示，其基因型和等位基因频率在肺癌分期、有无淋巴结转移患者分布无明显差异。用单变量 *logistic* 回归分析探讨两位点基因多态性与肺癌的关系，结果显示，GP-176T/C 位点中相对于 TT 型及 T 等位基因而言，TC 型及 C 等位基因与肺癌的发生发展具有相关性，而 GP-506G/A 位点中相对于 GG 型及 G 等位基因而言，GA 型及 A 等位基因与肺癌的发病无明显相关性。推测 GP-176T/C 位点基因改变可影响肺癌的发生发展，C 等位基因是肺癌发病的保护因素，其可能通过影响 GP 基因转录及翻译效率，从而影响血小板的活化，最终造成个体对疾病易感性的差异。

4　参考文献

[1] Raiz SP, Luchtenborg M, Coupland VH, et al. Trends in incidence of small cell lung cancer and all lung cancer [J]. Lung Cancer, 2012 (3):280 - 284.

[2] 雷鸣，杨丽，胡太华，等. 非小细胞肺癌远处转移与血小板参数变化的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志，2015 (6):729 - 733.

[3] 雷鸣，胡黎娅，王自米，等. 血小板活化标志物 CD62P、CD63 的表达与血小板参数对非小细胞肺癌患者的意义[J]. 检验医学与临床，2016 (10):1319 - 1321.

[4] 魏寇准，陈晓鹏. 血小板与恶性肿瘤的关系[J]. 沈阳医学院学报，2014 (1):42 - 44.

[5] 李传印，李盈甫，史荔，等. 云南汉族人群 CD80 基因多态性位点与肺癌的相关性[J]. 贵州医科大学学报，2016 (9):1015 - 1019.

[6] Nie YM. Zhou HJ, Fu YS, et al. The allele frequencies of HPA 1-16 determined by PCR-SSP in Chinese Cantonese donors [J]. Transfus Med, 2010 (6):376 - 382.

[7] Liu GQ, Aaron TP, Chen ZL, et al. ICAM-1-activated Src and eNOS signaling increase endothelial cell surface PECAM-1 adhesivity and neutrophil transmigration [J]. Blood, 2012 (9):1942 - 1952.

[8] 孙曼怡，冯凭，谭华. 血小板膜糖蛋白Ⅲa 基因多态性与溃疡性结肠炎关系[N]. 天津医科大学学报，2011 (1):15 - 16,20.

[9] Wan S, Lai Y, Myers RE, et al. Preoperative platelet count associates with survival and distant metastasis in surgically resected colorectal cancer patients [J]. J Gastrointest Cancer, 2013 (3):293 - 304.

[10] Yao S, Zhang J, Chen H, et al. Diagnostic value of immunohistochemical staining of GP73, GPC3, DCP, CD34, CD31, and reticulin staining in hepatocellular carcinoma [J]. J Histochem Cytochem, 2013(9):639 - 648.

[11] 缪小辉，夏锡仪，吕镗烽，等. 血小板内皮细胞黏附分子 1 在肺癌中表达及与转移的关系[J]. 中国老年学杂志，2016 (10):2411 - 2413.

[12] Chen CH, Lo YK, Ke D, et al. Platelet glycoprotein Ia C807T. Ib C3550T and Ⅲa PlA1 polymorphisms and ischemic stroke in young Taiwanese [J]. J Neurol Sci, 2004 (3):1 - 5.

[13] Meyer O, Hildebrabdt M, Schulz B, et al. Simultaneous genotyping of human platelet antigens (HPA)1 through 6 using new sequence-specificprimers for HPA-5 [J]. Transfusion, 1999 (1):1256.

[14] Legler TJ, Kolher M, Mayr WR, et al. Genotyping of human platelet antigen sysytem 1 through 5 by multiplex polymerase chain reaction and ligation based typing[J]. Transfusion, 1996 (1):426.

[15] 张秉贵，刘馨，安煜致. 肿瘤标志物临床手册[M]. 北京：北京人民军医出版社，2008:234 - 237.

(2016-12-03 收稿，2017-02-12 修回)

中文编辑：吴昌学；英文编辑：苏晓庆