

纤维蛋白原 B β 链 Hinf I 基因多态性与胃癌的相关性*

严芝强¹, 杨芳^{2**}

(1. 贵州医科大学附院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨纤维蛋白原 B(FgB) β 链-Hinf I A/C 基因多态性与胃癌的相关性。方法: 151 例经病理确诊的胃癌患者为胃癌组, 151 例同期健康体检者为对照组, 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测 2 组受检查全血 DNA FgB β -Hinf I 位点基因型, 比较两组受检者 FgB β -Hinf I C 基因多态性, 分析 FgB β -Hinf I C 基因型分布与胃癌的临床分期及转移的关系, 采用 logistic 回归分析 FgB β -Hinf I C 基因型与胃癌的相对危险度。结果: FgB β -Hinf I A/C 位点 AA、AC、CC 基因型分布及 A/C 等位基因频率与正常对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$), FgB β -Hinf I A/C 位点 3 种基因型分布和等位基因频率与胃癌的临床分期及转移比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); FgB β -Hinf I A/C 位点 AC 基因型与胃癌的相对危险度分析, 结果显示, $OR = 1.888$, 95% 置信区间 CI 为 $1.105 \sim 3.224$ 。结论: FgB β -Hinf I A/C 的 AC 基因型可能增加胃癌的发病风险, C 等位基因可能是胃癌发病的致病基因。

[关键词] 胃肿瘤; 纤维蛋白原; 基因; 多态性; 限制性片段长度

[中图分类号] R735.2; R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)04-0423-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.04.009

Relevance between Fibrinogen β Chain- Hinf I Gene Polymorphisms and Gastric Cancer

YAN Zhiqiang¹, YANG Fang²

(1. Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate relevance between Fibrinogen B beta chain-Hinf I gene polymorphism and gastric cancer. **Methods:** 151 cases of pathological diagnosed gastric cancer patients as gastric cancer group, and 151 cases of healthy physical check takers as control group; the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technology was adapted to detect Fibrinogen beta chain-Hinf I site genotype. **Results:** Gastric cancer group fibrinogen beta beta-Hinf I A/C locus AA, AC, CC genotype distribution and A/C allele frequency showed significant difference with normal control group ($P < 0.05$); Fibrinogen beta-HinfI A/C locus of three kinds of genotype distribution and allele frequency was compared with clinical staging and transfer of gastric cancer, comparison was statistically significant ($P > 0.05$); analysis between Fibrinogen beta-HinfI A/C locus AC genotype and relative risk degree of gastric cancer showed odds ratio (OR) as 1.888 and 95% confidence interval (CI) between 1.105 and 3.224. **Conclusions:** FgB beta Hinf I AC of the A/C genotype may increase the risk of gastric cancer, C allele may be disease genes of gastric cancer.

[Key words] gastric neoplasm; fibrinogen; gene polymorphism; restriction fragment length

*[基金项目] 贵州省科技厅联合基金[黔科合 IJ(2016)7235 号]

** 通信作者 E-mail: 465920538@qq.com

网络出版时间: 2019-04-26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190425.2119.009.html>

胃癌是常见的消化道肿瘤之一,其发病率在世界范围内排名第 4 位,死亡率为癌症死因的第 2 位^[1]。根据全国肿瘤登记中心发布的数据,2015 年中国胃癌发病例数约为 67.9 万,死亡例数约为 49.8 万,其发病率和死亡率都仅次于肺癌而排第 2 位^[2]。随着对胃癌发病机制的深入研究,发现胃癌的发生是由多因素作用、多基因调控、多步骤参与的复杂过程^[3]。纤维蛋白原(Fibrinogen, Fg)是一种肝细胞合成和分泌的血浆糖蛋白,其在促进恶性肿瘤发生、发展方面的作用已经得到普遍的认可^[4]。Fg 主要是作为凝血因子 I 而直接参与凝血过程,促进血栓的形成。恶性肿瘤与凝血功能的改变有密切的关系,肿瘤细胞通过组织因子或其他促凝血因子激活 Fg,鳞状细胞癌能刺激肝细胞产生大量的 Fg,同时 Fg 可分解形成纤维蛋白,为癌细胞的生长、浸润和转移提供支架,Fg 亦可以作为不同的黏附分子的配体,增加血小板(platelet, PLT)及肿瘤细胞间的黏附结合,PLT 附着肿瘤细胞的表面,形成瘤栓阻碍免疫细胞攻击肿瘤细胞^[5-6]。因此 Fg 对肿瘤细胞的生长、浸润、转移具有重要的价值。编码 β 链的基因被认为是影响血浆 Fg 水平的主要基因,目前的研究大多集中于 FgB 基因的多态性分析上^[7]。但对 FgB β 链的基因多态性位点 3'端非转录区的 Hinf IA/C 位点的临床研究较少^[8]。因此,本研究采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法对 FgB β -Hinf I A/C 位点基因多态性进行研究,讨基因多态性与胃癌的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

以 2013 年 6 月~2015 年 2 月经胃镜和病理活检确诊 151 例胃癌患者为研究对象,其中男 89 例、女 62 例,26~85 岁、平均 67 岁;I 期 36 例、II 期 29 例、III 期 72 例、IV 期 13 例。以同期 151 例健康体检者为对照组,其中男 91 例、女 60 例,29~86 岁、平均 64 岁。胃癌组与对照组之间年龄、性别分布差异无统计学意义($P < 0.05$),具有可比性。

1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶上海 Sangon 生物工程公司,引物合成及 Maker(北京天根生化科技有限公司),琼脂糖(西班牙 BOWEST 公司),主要仪器 PE9700 扩增仪(美国 ABI 公司),DNA 成像分析器

GelDocEQ(美国 Bio-Rad 公司),DYY-III-5 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂),恒温水浴箱(北京长源仪器厂),TGL-16 高速离心机(常州国华电子设备公司)。

1.3 方法

1.3.1 提取 DNA 收集胃癌患者及对照组清晨空腹全血(EDTA-K₂ 抗凝)各 151 例,白细胞层采用酚-氯仿法提取基因组 DNA, -20℃ 保存备用。

1.3.2 Fg β -HinfIA/C 位点检测 应用 PCR-RFLP 技术对 Fg β -HinfIA/C 位点进行基因分型。引物序列设计参照元小冬等^[10]方法。PCR 反应体系, DNA 模板 1 μ L, 特异性引物 1 μ L, 上、下游引物 1 μ L, 2 \times HotstartTaq PCR Master Mix13 μ L, 补 ddH₂O 9 μ L 至 25 μ L。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 60 s, 54℃ 退火 55 s, 72℃ 延伸 60 s, 扩增 30 个循环, 最后 72℃ 再延伸 5 min。取 PCR 产物 8 μ L, 加内切酶 Ava II/Hinf I 0.9 μ L, Buffer2 μ L, ddH₂O 补足 20 μ L, 混匀, 瞬时离心, 置 37℃ 恒温水浴箱水浴 12 h 后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。EB 染色, 在凝胶成像系统下观察并记录实验结果。

1.4 统计学分析

胃癌患者基因型的分布应用 Hardy-Weinberg (H-W) 平衡软件计算并进行统计检验($P > 0.05$ 表明研究人群符合 H-W 平衡), 胃癌患者基因型和等位基因频率的分布采用 χ^2 检验分析, 采用非条件 Logistic 回归法计算比值比(OR)和 95% CI。

2 结果

2.1 两组人群的年龄及性别的分布

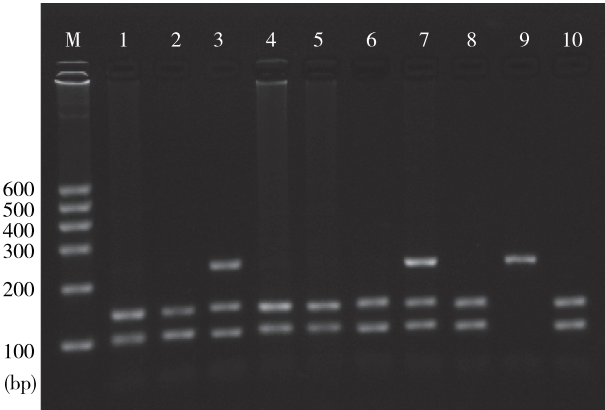
胃癌组与对照组的年龄、性别分布比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.468$, $P = 0.055$, $P > 0.05$), 见表 1。

表 1 两组被检人群年龄及性别的分布
Tab. 1 Distribution of gender and age of two groups

指标	胃癌组 (n, %)	对照组 (n, %)	χ^2	P
年龄(岁)				
<50	22(15)	19(13)	0.468	0.791
50≤~<65	75(50)	73(48)		
≥65	54(36)	59(39)		
性别				
男	89(59)	91(60)	0.055	0.815
女	62(41)	60(40)		

2.2 两基因位点 PCR 产物酶切结果

FgBβHinf I A/C 基因多态性呈 A-C 两态,A 等位基因含 Hinf I 酶切位点,当 A 突变为 C 时,A 等位基因缺乏 Hinf I 酶切位点, Hinf I 位点 AA 型表现为 140 bp 和 100 bp 两个片段,AC 型表现为 240 bp、140 bp 和 100 bp 片段,CC 型表现为 240 bp 片段,见图 1。



注:M 为 DNA Marker,1、2、4、5、6、8、10 为 AA 基因型,3、7 为 AC 基因型,9 位 CC 基因型
图 1 FgBβHinf I A/C 位点 PCR 产物酶切后的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 FgB β Hinf I A/C locus sepharose electrophoretogram

2.3 FgBβHinf I A/C 基因多态性 Hardy-Weinberg 平衡度检验

FgBβHinf I A/C 应用 χ^2 检验对胃癌组及对照组的基因型频率进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,两组受检者 FgBβHinf I A/C 基因多态性分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($\chi^2 = 0.596$ 、 0.011 , $P = 0.440$ 、 0.918),见表 2。

表 2 FgBβHinf I A/C 基因位点的 H-W 平衡检验
Tab.2 FgBβHinf I A/C locus H-W balance test

FgBβHinf I A/C 基因型	胃癌组实际频数 (预期频数)	对照组实际频数 (预期频数)
AA	119(118.00)	100(100.30)
AC	29 (30.97)	46 (45.53)
CC	3 (2.03)	5 (5.17)

注: $P>0.05$,符合 Hardy-Weinberg 平衡

2.4 胃癌组及对照组 FgBβHinf I A/C 基因型分布和等位基因频率

结果显示,FgBβHinf I A/C 位点的基因型在胃癌组和对照组中的比较分布无统计学意义,等位基因在两组之间的分布差异具有统计学意义 ($\chi^2 =$

6.002 , $P = 0.05$; $\chi^2 = 5.706$, $P < 0.05$),见表 3。

表 3 FgBβHinf I A/C 基因位点基因型频率及等位基因频率在两组中的分布(n ,%)

Tab.3 Distribution of FgB β HinfI A/C locus genotype frequency and allele frequency in both groups

FgBβHinf I A/C	胃癌组 (n ,%)	对照组 (n ,%)	χ^2	P
基因型				
AA	119(78.8)	100(66.2)	6.002	0.050
AC	29(19.2)	46(30.5)		
CC	3 (2.0)	5 (3.3)		
等位基因				
A	267(88.4)	246(81.5)	5.706	0.017
C	35(11.6)	56(18.5)		

2.5 FgBβHinf I A/C 基因的多态性与胃癌的临床分期、转移的关系

结果显示,FgBβHinf I A/C 基因的 AA、AC 及 CC 基因分型分布与胃癌的临床分期及转移无关,各期型频率分布比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 5.905$ 、 $P > 0.05$; $\chi^2 = 0.736$ 、 $P > 0.05$)。见表 4。

表 4 FgBβHinf I A/C 位点的基因多态性与不同分期及淋巴结转移的关系(n ,%)

Tab.4 Relationship between FgB β HinfI A/C locus polymorphism and different staging and lymph nodes transfer

指标	FgBβHinf I A/C 基因型			χ^2	P
	AA	AC	CC		
病理分期					
I	27(18)	9(6)	0(0)	5.905	0.434
II	23(15)	4(3)	2(1)		
III	58(38)	13(9)	1(1)		
IV	10(7)	3(2)	0(0)		
淋巴结转移					
有	68(45)	16(11)	1(1)	0.736	0.692
无	50(33)	13(9)	2(1)		

2.6 FgBβHinf I A/C 位点不同基因型对胃癌的相对危险度分析

结果显示,FgBβHinf I A/C 位点的 AC 型可能与胃癌的发病有关联,且 AC 基因型在两组人群中的分布差异具有统计学意义 ($OR = 1.888$,95% CI 为 $1.105 \sim 3.224$; $\chi^2 = 5.488$, $P < 0.05$);C 等位基因可能与胃癌的发病有关联,且 C 等位基因在两组人群中的分布差异具有统计学意义 ($OR = 1.737$,95% CI 为 $1.100 \sim 2.741$; $\chi^2 = 5.706$, $P < 0.05$),见表 5。

表 5 FgβHinf I A/C 位点各基因型及等位基因对胃癌的相对危险度

Tab. 5 Relative risk degree of FgβHinf I A/C locus genotypes and allele gene on gastric cancer

FgβHinf I A/C	胃癌组(<i>n</i> ,%)	对照组(<i>n</i> ,%)	χ^2	<i>P</i>	OR	95% CI
基因型						
AA	119(78.8)	100(66.2)			1	
AC	29(19.2)	46(30.5)	5.488	0.019	1.888	1.105~3.224
CC	3(2.0)	5(3.3)	0.880	0.348	1.983	0.463~8.505
等位基因						
A	267(88.4)	246(81.5)			1	
C	35(11.6)	56(18.5)	5.706	0.017	1.737	1.100~2.741

3 讨论

Fg 作为重要的凝血因子,其功能表达和调控一直是临床研究的重点内容之一。Humphries 等^[9]最早发现了 Fg3 条链的多个基因多态性位点,同时探讨了遗传机制在 Fg 水平调节中所起的作用,发现大约 51% 的 Fg 结构功能及水平的异常与基因遗传缺陷相关。有研究也表明 Fgβ 链的 mRNA 合成是调控纤维蛋白原整个分子合成的限速步骤,而其基因学特征是决定纤维蛋白原功能表达的主要因素。Fgβ 链转录区 8.1 kb 的基因长度中,所含有的 8 个外显子仅占 1.9 kb,而 7 个内含子却为 6.2 kb,约占转录区基因总长度的 76.5%;同时由于内含子区的基因位点并不直接参与 mRNA 的转录,正是机体存在内含子,且大部分基因随机变异或突变发生在这种内含子中,而使机体对基因突变或变异的耐受能力明显增强。本研究结果显示,胃癌组和对照组的性别、年龄分布差异均无统计学意义,FgβHinf I A/C 基因多态性位点在两组人群等位基因频率分布均符合 H-W 平衡定律^[11],说明本项研究人群具有代表性。研究结果显示,β-HinfIA/C 位点的 C 等位基因频率在对照组为 18.5%,这高于孙川等^[12-13]报道的正常人 G¹⁶⁸⁹ 频率,这可能是由于地区、种族,环境的不同所造成。还显示 β-HinfIA/C 位点的基因型和等位基因分布在胃癌组和对照组之间有统计学差异,提示 β-HinfIA/C 位点基因多态性可能与胃癌的发生相关。对胃癌患者进行危险度评价,结果显示 Fgβ-HinfIA/C 位点中以 AA 型及 A 等位基因作对照,携带 AC 基因型及 C 等位基因的个体患胃癌的风险分别是携带 AA 基因型及 A 等位基因的 1.888 倍和 1.737 倍($P=0.019$ 和 0.017),差异具有统计学意义,携带突变纯合子 CC 型的个体患胃癌的风险是携带 AA 型的 1.983 倍,差异无统计

学意义($P>0.05$),推测 Fgβ-HinfIA/C 位点基因改变可能对胃癌的发病起着重要作用,C 等位基因可能是胃癌发病的遗传危险因素。进行 Fgβ-HinfIA/C 基因的多态性与胃癌的临床分期、转移比较发现,Fgβ-HinfIA/C 位点的基因多态性在胃癌的临床分期、转移方面比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

综上所述,Fgβ-HinfIA/C 位点的基因多态性与胃癌的发病存在相关性,Fgβ-HinfIA/C 位点的 C 等位基因可能是胃癌的遗传危险因素。

4 参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer Statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.

[2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[3] SANO T. Gastric cancer: Asia and the world[J]. Gastric Cancer, 2017, 20(Suppl 1): 1-2.

[4] 王静文,韩韬. 结直肠癌患者 β-纤维蛋白原基因多态性和血浆纤维蛋白原水平相关性的研究[J]. 中国癌症杂志, 2015,25(10):807-811.

[5] LONSDOR A S, KRAMER B F, FAHRLEITNER M, et al. Engagement of α II bβ3 (GP II b/III a) with αvβ3 integrin mediates interaction of melanoma cells with platelets: aconnection to hematogenous metastasis [J]. J Biol Chem, 2012, 287(3): 2168-2178.

[6] ALVESL C S, BURDICK M M, THOMAS S N, et al. The dual role of CD44 as a functional P-selectin ligand and fibrin receptor in colon carcinoma cell adhesion[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294(4): 907-916.

[7] ROY S N, MUKHOPADHYAY G, REDNRAN C M. Regulation of fibrinogen assembly. Transfection of Hep G2 cells with B beta cDNA specifically enhances synthesis of the three component chains of fibrinogen [J]. J Biol Chem,1990, 265(11): 6389-6393.

(下转第 452 页)