

纤溶酶原激活物抑制剂-1 基因启动子区 4G/5G 多态性与胃癌侵袭和转移的关系

蔡 芬, 曾小菁[△] (广东省广州市中西医结合医院检验科 510800)

【摘要】 目的 探讨纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)基因启动子区的一个鸟嘌呤插入/缺失多态性(4G/5G)与胃癌侵袭和转移的关系。**方法** 运用聚合酶链反应(PCR)和琼脂糖电泳对 28 例胃癌患者癌变胃组织与癌旁正常胃组织进行 PAI-1 基因 4G/5G 多态性检测和分析,并将两者进行比较。**结果** 胃癌患者 PAI-1 3 种基因型在癌变胃组织和癌旁正常胃组织的表达差异无统计学意义($P>0.05$),且在胃癌各期表达差异亦无统计学意义($P>0.05$)。有淋巴结转移组的胃癌患者 4G/4G 基因型频率为 52.6%,4G/5G 基因型频率为 47.4%,5G/5G 基因型频率为 0%;无淋巴结转移组分别为 22.2%、55.6%和 22.2%,两组基因型频率比较差异有统计学意义($P<0.05$),其中 4G/4G 基因型相对于其他基因型差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** PAI-1 基因多态性与胃癌的侵袭和 TNM 分期无关,而与胃癌淋巴结转移相关,4G/4G 型可能是胃癌淋巴结转移的风险因素。

【关键词】 胃癌; 纤溶酶原激活物抑制剂-1; 基因频率; 多态性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.07.020 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)07-0906-02

Relationship between plasminogen activator inhibitor -1 gene 4G/5G polymorphism and the invasion and metastasis of gastric cancer CAI Fen, ZENG Xiao-jing[△] (Clinical Laboratory, Traditional Chinese and Western Medicine Hospital of Guangzhou, Guangzhou, Guangdong 510800, China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between a guanine sub region of the insertion/deletion polymorphism (4G/5G) in the plasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1) gene promoter and the invasion and metastasis of gastric cancer. **Methods** Polymerase chain reaction and agarose gel electrophoresis were performed to analyze the PAI-1 gene 4G/5G polymorphism in cancer tissues and adjacent normal gastric tissues in 28 cases of gastric cancer. **Results** Three genotypes of PAI-1 in gastric cancer tissues and adjacent normal gastric tissue were without significant differences ($P>0.05$) in patients with gastric cancer, and the genotypes of PAI-1 were also without differences between patients at different TNM stages ($P>0.05$). The genotype frequency of 4G/4G in gastric cancer patients with lymph node metastasis was 52.6%, of 4G/5G was 47.4% and of 5G/5G was 0.0%, which in patients without lymph node metastasis were 22.2%, 55.6% and 22.2%. Genotype frequency of these two groups were with statistical difference ($P<0.05$), and genotype frequency of 4G/4G was significantly different with the other genotypes ($P<0.05$). **Conclusion** Polymorphism of PAI-1 gene might be not related to the invasion of gastric cancer and TNM stages, but closely related to lymph node metastasis of gastric carcinoma. Genotype of 4G/4G could be the risk factor in lymph node metastasis of gastric cancer.

【Key words】 gastric cancer; plasminogen activator inhibitor -1; gene frequency; polymorphism

目前相关研究认为恶性肿瘤侵袭转移与纤溶活力密切相关^[1-2]。纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)具有多种生物学功能,参与细胞的迁移、黏附及侵袭过程,人类 PAI-1 基因定位于 7q21.3-7q22,PAI-1 基因有 8 处不同的多态位点。4G/5G 缺失/插入多态性是指在 PAI-1 基因 5' 端启动子区域,转录起始位点上游-675 bp 处存在一种单核苷酸 G 插入或缺失,从而基因型表现为 3 种多态性:4G/4G、4G/5G、5G/5G,在调节 PAI-1 基因表达过程中起了重要作用。既往研究多关注 PAI-1 在某种肿瘤的变化,而很少涉及 PAI-1 基因多态性在肿瘤转移和侵袭中的作用。本研究分析胃癌患者癌变胃组织和癌旁正常胃组织 PAI-1 基因启动子区 4G/5G 基因分布频率,分析以上各项指标与胃癌侵袭和转移的关系,为临床判断预后、指导治疗提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 2009 年 4 月至 2010 年 2 月本院胃肠外科初诊为胃癌拟手术治疗的患者 28 例,其中男 12 例,女 16 例,年龄 26~79 岁。临床病理分期[国际抗癌联盟(UICC)

2005 年公布的胃癌 TNM 分期法]:其中 I 期 4 例,II 期 6 例,III 期 16 例,IV 期 2 例;有淋巴结转移 19 例,其中 II 期 2 例,III 期 15 例,IV 期 2 例;无淋巴结转移 9 例。以上患者术前均未接受放化疗,所有病例经手术治疗后病理组织均经病理检查证实^[3]。

1.2 主要仪器与试剂 聚合酶链反应(PCR)仪(美国 Sigma 公司),电泳仪(AE-8130,日本 ATTO 公司),凝胶成像系统(UVP Mini,美国 UVP 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 切取患者癌变胃组织和癌旁正常胃组织(距离癌变组织至少 20 cm 以上)各约 1 cm×1 cm 冰冻保存。

1.3.2 组织标本 DNA 提取 将组织块解冻,用生理盐水洗去血污,剪取约 0.5 g 组织,放入 1.5 mL 离心管中,剪碎,盐析法提取组织白细胞 DNA, -20℃ 保存。

1.3.3 PCR 引物合成 PCR 扩增引物设计参照文献[4]。P₁(插入型 5G):5'-GTC TGG ACA CG TGG GGG-3',产物大小 140 bp;P₂(缺失型 4G):5'-GTC TGG ACA CGT GGG GA-3',

产物大小 139 bp;P3:5'-TGC AGC CAG CCA CGT GAT TGT CTA-3'。

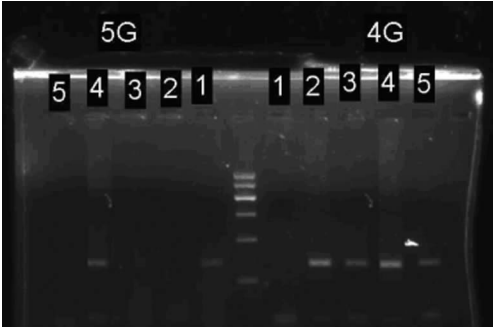
1.3.4 PAI-1 基因的 PCR 扩增 每份 DNA 标本同时进行两个体系 PCR 反应,即 P₁P₃ 和 P₂P₃ 反应体系。总反应体系 25 μL,首先 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 45 s,62 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。

1.3.5 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳 吸取 10 μL PCR 产物与 2 μL 10 倍上样缓冲液吹打混匀,上样至 20 g/L 琼脂糖凝胶梳孔中,150 V 稳压电泳 40 min,根据电泳图形鉴别基因型。在凝胶成像系统中成像、摄片,并判断各样本的基因型结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 医学处理软件进行统计分析。采用基因计数法计算各组基因型频率, χ^2 检验比较两组标本各基因型的分布差异, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PAI-1 4G/5G 基因型分布特征 胃癌患者癌变胃组织和癌旁正常胃组织基因型分布在总体研究对象中经 χ^2 检验符合 Hardy-Weinberg 平衡,根据 χ^2 值查 χ^2 界值表得出相应的 P 值。可以鉴别出 3 种基因型:4G/4G 型只有 139 bp 片段,4G/5G 型有 139 bp 和 140 bp 2 个片段,5G/5G 型只有 140 bp 片段。见图 1。



注:M 为 DNA 100 bp ladder;2、3、5 泳道为 4G/4G 型;4 泳道为 4G/5G 型;1 泳道为 5G/5G 型。

图 1 PCR 产物电泳图片

2.2 胃癌患者 PAI-1 3 种基因型在癌变胃组织和癌旁正常胃组织的表达差异无统计学意义($\chi^2=2.120,P>0.05$),见表 1。

表 1 胃癌患者不同胃组织基因型分布与比较[n(%)]

组别	n	4G/4G	4G/5G	5G/5G
癌变组织组	28	12(42.9)	14(50.0)	2(7.1)
正常胃组织组	28	8(28.6)	15(53.6)	5(17.9)

2.3 PAI-1 三种基因型在胃癌各期表达差异无统计学意义($\chi^2=1.431,P>0.05$),见表 2。

表 2 胃癌组织分期与 PAI-1 4G/5G 基因型的分布(n)

分期	n	4G/4G 型	4G/5G 型	5G/5G 型
I	4	0	4	0
II	6	4	2	0
III	16	7	7	2
IV	2	1	1	0
合计	28	12	14	2

2.4 胃癌淋巴结转移与 PAI-1 3 种基因型分布频率差异有统计学意义($P<0.05$),且 4G/4G 型可能是胃癌淋巴结转移的风险因素,见表 3。

表 3 胃癌淋巴结转移与 PAI-1 4G/5G 基因型的关系[n(%)]

组别	n	4G/4G 型	4G/5G 型	5G/5G 型
有淋巴结转移	19	10(52.6)	9(47.4)	0(0.00)
无淋巴结转移	9	2(22.2)	5(55.6)	2(22.2)
χ^2		5.833 ^a	2.939 ^b	—

注:—表示无数据。与 5G/5G 型比较,^a $P<0.05$,^b $P>0.05$ 。

3 讨 论

近年来,PAI-1 基因多态性在肿瘤生长中所起的作用成为研究热点。Gilabert-Estellés 等^[5]发现,PAI-1 基因 4G/5G 分布频率较健康人群高,且 4G/4G 基因型可能是子宫内膜癌发生的风险因素。Lei 等^[6]发现,PAI-1 4G/5G 插入/缺失多态性与乳腺癌的不良预后相关,其中 5G/5G 基因型乳腺癌患者预后最差,5G/5G 基因型与乳腺癌淋巴结转移相关。Lee 等^[7]发现,PAI-1 4G/5G 插入/缺失多态性与乳腺癌的病理学分期和预后相关,且 4G/4G 基因型可能是乳腺癌发生的风险因素,5G/5G 基因型与乳腺癌淋巴结转移相关。本研究结果表明,PAI-1 4G/5G 插入/缺失多态性与胃癌的侵袭、TNM 分期无关,而与胃癌淋巴结转移相关,且 4G/4G 型基因可能是胃癌淋巴结转移的风险因素。体外实验分析发现,PAI-1 基因启动子活性在某些细胞因子刺激下 4G 等位基因比 5G 等位基因具有更高的转录活性;研究者认为是由于 4G 等位基因只结合了一种转录激活物,而 5G 等位基因除了结合了这种转录激活物外,还在相同位点结合了一种转录抑制物,所以 5G 等位基因较 4G 等位基因的 PAI-1 转录活性低^[8]。PAI-1 基因 4G/5G 多态性的测定有助于胃癌患者病情判断、临床用药的选择、复发可能性的观测和预后的判断等。

参考文献

[1] 王肖泽,王继见. 胃癌转移机制研究新进展[J]. 重庆医学,2010,39(4):479-481.

[2] Hildenbrand R, Allgayer H, Marx A, et al. Modulators of the urokinase-type plasminogen activation system for cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2010, 19(5):641-652.

[3] 吴在德,吴肇汉. 外科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,1984:437-441.

[4] Nagi DK, McCormack LJ, Mohamed-Ali V, et al. Diabetic retinopathy, promoter (4G/5G) polymorphism of PAI-1 gene, and PAI-1 activity in Pima Indians with type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 1997, 20(8):1304-1309.

[5] Gilabert-Estellés G, Labraza-Boels J, Agilabert J, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G polymorphism and endometrial Cancer [J]. Thromb Res, 2012, 130(2):242-247.

[6] Lei H, Hemminki K, Johansson R, et al. PAI-1 -675 4G/5G polymorphism as a prognostic biomarker in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 109(1):165-175.

[7] Lee JH, Kim Y, Choi JW, et al. Clinicopathological significance of plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G polymorphism in breast Cancer: a meta-analysis[J]. Arch Med Res, 2013, 44(1):39-45.

[8] Ho CH, Yuan CC, Liu SM. Diagnostic and prognostic values of plasma levels of fibrinolytic markers in ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 1999, 75(3):397-400.