

白介素 8-251 位点基因多态性与我国高低发区胃癌关系

曾志荣, 周韶璋, 廖山婴, 陈 斌, 李初俊, 陈旻湖, 胡品津

(中山大学附属第一医院消化科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】研究白介素(interleukin, IL)-8 基因-251A/T 位点多态性在中国高、低发区普通人群和胃癌(gastric cancer, GC)患者中的分布,并探讨其基因多态性与我国胃癌的关系。【方法】用聚合酶链反应-反向杂交法(polymerase chain reaction and reverse dot blot, PCR-RDB)检测我国胃癌低发区(广东省)104 例健康人和 104 例胃癌患者和胃癌高发区(陕西省)102 例健康人和 102 例胃癌患者的 IL-8 基因-251A/T 位点多态性。【结果】在胃癌低发区,胃癌患者 IL-8-251 A/A 基因型的频率略高于正常对照组,但未达统计学意义(27.9% vs 21.2%, $\chi^2=1.27$, $P>0.05$),胃癌患者携带 IL-8-251 A/A 基因型不增加 Hp 感染后胃癌发生的危险性($\chi^2=1.40$, $P>0.05$),而在胃癌高发区,胃癌患者携带 IL-8-251 A/A 的频率明显高于普通人群(31.2% vs 16.7%, $\chi^2=6.04$, $P<0.05$, OR=2.29, 95% CI=1.17-4.46),并增加 Hp 感染后胃癌发生的危险性($\chi^2=6.38$, $P<0.05$, OR=4.71, 95% CI=1.36-16.30)。【结论】IL-8-251A 等位基因与我国汉族人群胃癌的发生相关,以高发区明显。

关键词: 白介素 8; 基因多态性; 胃癌

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)05-0537-04

Correlation of Polymorphism of Interleukin 8 Gene-251 Locus and Gastric Cancer in High and Low Prevalence Regions in China

ZENG Zhi-rong, ZHOU Shao-zhang, LIAO Shan-yin, CHEN Bin, LI Chu-jun, CHEN Min-hu, HU Pin-jin
(Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To study the relationship among interleukin 8 gene -251 locus polymorphism, Helicobacter pylori infection, and gastric cancer in high prevalent (Shanxi province) and low prevalent (Guangdong province) regions in China. 【Methods】Genomic DNA was extracted from the peripheral blood of 104 healthy controls and 104 gastric patients from Guangdong, and 102 healthy controls and 102 gastric cancer patients from Shanxi. Polymorphism of IL-8-251 locus was analyzed by polymerase chain reaction and reverse dot blot (PCR-RDB). 【Results】In the low prevalence region, the frequency of IL-8-251 A/A locus of the patients with gastric cancer was slightly higher than that of healthy controls (26.0% vs 21.2%, $\chi^2=1.27$, $P>0.05$). Hp infection combined with IL-8-251 A/A locus in those patients had no effect on the risk of gastric cancer development ($\chi^2=1.40$, $P>0.05$). In high prevalence region, the number of patients carrying with IL-8-251 A/A is much higher than those of healthy controls (31.2% vs 16.7%, $\chi^2=6.04$, $P<0.05$, OR = 2.29, 95%CI = 1.17-4.46), IL-8-251 A/A can significantly increase the risk of gastric cancer occurrence after Hp infection ($\chi^2=6.38$, $P<0.05$, OR=4.71, 95%CI=1.36-16.30). 【Conclusion】IL-8-251A locus is associated with gastric cancer in China, especially in high prevalence region.

Key words: interleukin 8; polymorphism; gastric cancer

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(5):537-540]

白细胞介素-8(IL-8)是中性粒细胞趋化因子,是一种具有趋化和激活白细胞功能的内源性和多源性细胞因子,它不仅与炎症、哮喘等疾病相关,而且还参与肿瘤的发生发展。有报道 IL-8 基因在

其转录起始点上游-251 位点处存在 A/T 基因多态性^[1]。我国是胃癌高发区,其致病原因可能与环境、Hp 感染和饮食因素有关。IL-8 基因多态性作为一种遗传因素是否与胃癌的发生,目前鲜见报道。因

收稿日期:2005-06-20

基金项目:广东省医学科研基金资助项目(420002176)

作者简介:曾志荣(1966-),男,江西乐安人,博士,副教授.E-mail: zengzhihong@vip.163.com

此我们通过对我国胃癌高、低发区人群 IL-8-251 基因位点的多态性进行分析, 探讨 IL-8-251 基因多态性与胃癌发生的相关关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象

两地区普通人群分别来自中山大学附属第一医院和西安交通大学附属第二医院健康体检人员, 均为汉族。胃癌低发区(广东省)普通人群 104 名, 广东籍, 其中男性 63 例, 女性 41 例, 年龄为 (59.3 ± 10.6) 岁; 胃癌高发区(陕西省)普通人群 102 名, 陕西籍, 其中男性 62 例, 女性 40 例, 年龄为 (59.6 ± 10.1) 岁。胃癌低发区患者 104 例, 男 63 例, 女 41 例, 平均年龄 (58.5 ± 11.2) 岁; 为中山大学附属第一医院、附属第二医院、广州医学院附属第二医院、广州市第一人民医院和惠州市中心医院就诊的广东籍胃癌患者。胃癌高发区患者 102 例, 男 62 例, 女 40 例, 年龄 (61.3 ± 9.6) 岁; 为西安交通大学附属第一医院、西安交通大学附属第二医院、第四军医大学附属西京医院、西安市中心医院、西安市铁路局中心医院和西安市西电医院就诊的陕西籍胃癌患者。两地区胃癌患者年龄和性别无显著性差异($P > 0.05$)。胃癌的诊断均经内镜检查(包括病理组织学)或/和手术后病理证实, 所有病例均具有完整的胃镜检查和组织学编号。不典型增生、贲门癌、胃转移癌患者不列入本研究对象。

1.2 IL-8 基因多态性的检测

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用 NaI 法提取外周血 DNA。取外周血 100 μ L 加入同等体积的 6 mol/L NaI 以及氯仿: 异戊醇(24:1)在高速离心 5 min。取上清液加入异丙醇以沉淀 DNA, 分离出来的 DNA 用 700 mL/L 的乙醇洗涤 2~3 次并加入 40 μ L TE 缓冲液(pH 8.0)保存。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 反应条件为: 93 预变性 3 min, 93 变性 45 s, 63 退火 45 s, 72 延伸 60 s, 共 35 个循环, 最后 72 保温 5 min。5'端携带有生物素的正向和反向引物序列分别为 5' Bio-CTTATCTTCACCATCATGATAGCATCTG-3 和 5' Bio-GGCTGCCAAGAGAGCCACGGCCAGC-3 (上海博亚生物公司合成), 待扩增片段长度为 549 bp。

1.2.3 反向点杂交法检测基因多态性位点 RDB 膜条的制作: 经单蒸水漂洗过的尼龙膜晾干后, 将溶于 0.5 mol/L 的 NaHCO_3 缓冲液中的探针取出, 带 NH_2 基团的 IL-8A 和 IL-8T 探针序列分别为 5 -

NH_2 -AAGCATACAATTGATAATTCA-3 和 5 - NH_2 -AAGCACTACTATTGATAATTCA-3 (由上海博亚生物公司合成), 调整浓度为 5 pmol/L 后点膜, 上排及下排分别点入探针 IL-8A 和 IL-8T, 结合 15 min 后用 100 mmol/L NaOH 反应 2~5 min, 再用蒸馏水漂洗 2~3 次后晾干备用。取 PCR 产物在 95 经 5~10 min 变性后, 与置于杂交槽中的 RDB 膜条在杂交液中进行杂交, 然后在 46 条件下用洗脱液洗脱未杂交探针, 后取 TMB 显色液 1 mL 加入杂交槽显色, 10 min 后观察结果。在生物素和 NH_2 基团同时存在的情况下经显色液显色为蓝色(图 1), 依所点探针为标记, 仅上行显色为 A/A 纯合子, 仅下行显色为 T/T 纯合子, 上下均着色为 A/T 杂合子。

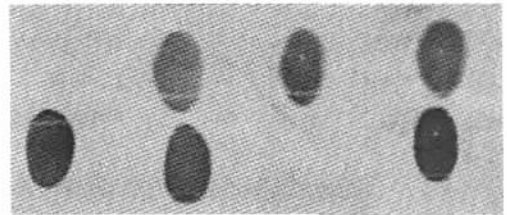


图 1 经反向杂交法显色后的基因位点

Fig.1 Polymorphisms by PCR-RDB

The genotype of interleukin-8-251, from left to right: T/T, A/T, A/A, and A/T

1.3 抗 Hp 抗体的检测

用酶联免疫吸附法(ELISA)检测标本血清中的 Hp IgG 抗体(BioChek Inc, USA)。在 450 nm 的酶标仪上读取光密度值(optical density, OD), 每份标本将检测 2 次, Hp IgG > 20 U/mL 为阳性。

1.4 统计方法

计数资料、率、风险因素 OR 值及 95% 的可信区间的比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为显著性差别, 数据处理采用 SPSS 11.0 统计软件(version 11.0, Chicago, Illinois, USA)。

2 结果

2.1 两地区对象的一般资料及 Hp 阳性率比较

低发区胃癌患者、对照组人群各 104 例, 高发区胃癌患者、对照组人群各 102 例, 高、低发区胃癌和对照人群在性别和年龄比较上无显著差异($P > 0.05$)。

比较两地区 Hp 感染率发现: 在低发区, 胃癌人群 Hp 感染率明显高于普通人群(81.7% vs 59.6%, $\chi^2=12.27$, $P < 0.001$; OR=3.03, 95% CI=1.61-5.71); 在高发区, 胃癌人群与普通人群 Hp 感染率没有明

显差别 (82.4% vs 75.5%, $P > 0.05$); 高发区胃癌人群 Hp 感染率与低发区胃癌人群无差异, 高于低发区普通人群 (82.4% vs 59.5%, $OR=3.16$, $95\% CI=1.66-6.01$)。而高发区普通人群 Hp 感染率明显高于低发区普通人群, (75.5% vs 59.6%, $\chi^2=5.91$, $P=0.015$ $OR=2.09$, $95\%CI=1.15-3.79$)。

2.2 胃癌高、低发区胃癌患者和普通人群 IL-8-251 各基因型频率分布及其比较

结果见表 1。在胃癌高发区, 胃癌患者 IL-8-251A/A 基因型频率明显高于对照组 (31.2% vs 16.7%, $\chi^2=6.04$, $P < 0.05$; $OR=2.29$, $95\%CI=1.17-4.46$); 而在胃癌低发区, 胃癌患者 IL-8-251A/A 基因型频率与对照组人群无明显差异 (26.0% vs 21.2%, $\chi^2=1.27$, $P > 0.05$)。

两地区胃癌人群 IL-8-251A/A 基因型频率相比也没有明显差别 (31.2% vs 26.0%, $\chi^2=0.30$, $P > 0.05$); 在普通人群中, 胃癌高发区 IL-8-251A/A 基因型频率与胃癌低发区普通人群差异未达到统

计学意义 (16.7% vs 21.2%, $\chi^2=0.68$, $P > 0.05$)。

表 1 胃癌高、低发区胃癌患者和普通人群 IL-8-251 各基因型频率分布

Table 1 Frequency of IL-8-251 Genotypes in high and low prevalence regions of gastric cancer

	High prevalence region (Shanxi)		Low prevalence region (Guangdong)	
	GC	controls	GC	controls
IL-8-251 T/T	18	24	19	19
T/A	52	61	58	53
A/A	32(31.2)	17(16.7)	27(26.0)	22(21.2)

2.3 IL-8-251 基因型与 Hp 感染和胃癌的关系

结果见表 2。在胃癌高发区, 以 Hp 阴性的 IL-8-251 T/T 的普通人群为参照组, IL-8-251 A/A 基因型者感染 Hp 后胃癌发生的危险性显著增加 ($\chi^2=6.38$, $P < 0.05$, $OR=4.71$, $95\% CI=1.36-16.30$), 但是在胃癌低发区未发现此差异 ($P > 0.05$)。

表 2 IL-8-251 基因型与 Hp 感染和胃癌的关系

Table 2 Relationship among interleukin-8-251 genotype, Hp infection, and gastric cancer

Region	Region	Genotypes	GC(n)	Controls(n)	χ^2	P	OR(95% CI)
Ahanxi	Hp-	T/T	6	11			1.00
		A/A	8	10	0.31	>0.05	1.48 (0.18-2.66)
	Hp+	T/T	12	13	0.67	>0.05	1.69(0.48-6.01)
		A/A	24	7	6.38	< 0.05	4.71(1.36-16.30)
Guangdong	Hp-	T/T	6	12			1.00
		A/A	9	12	0.37	>0.05	1.50(0.41-5.54)
	Hp+	T/T	13	7	3.8	>0.05	3.71(0.97-14.23)
		A/A	18	10	2.23	>0.05	2.40(0.75-7.65)

3 讨论

IL-8是一种强烈的中性粒细胞趋化和激活因子,主要由单核细胞、内皮细胞、肝细胞和成纤维细胞等细胞产生^[3],产生的 IL-8 与位于中性粒细胞表面的 IL-8 受体结合,可活化中性粒细胞,使之分泌大量的细胞因子,如 IL-1, TNF- α , IL-8 等,进一步扩大炎症反应,同时释放大量的胞内酶及其活化氧化物,产生大量自由基^[4-6]。在许多肿瘤组织如支气管原癌^[7],肺癌^[8],肝癌^[9]和胃癌^[10]中均检测到 IL-8 蛋白质分泌及 mRNA 表达,而与其相应的正常组织中 IL-8 表达缺如。IL-8 在 Hp 相关性疾病,尤其在介导 Hp 感染引发的早期炎症反应中发挥着重要的调控作用。有实验证实携带 *cagA* 致病岛基因的 Hp 能增加 IL-8 的分泌,从而导致更严

重的胃黏膜炎症细胞浸润^[11]。编码 IL-8 的基因在其转录起始点-251 处存在基因多态性(A/T),通过转录调控影响 IL-8 的合成,在基因水平发挥着调节作用。近期有报道 IL-8-251(A/T)基因多态性与病毒性支气管炎存在密切关系^[5],但是目前 IL-8 基因多态性与胃癌关系的研究较少。

我们的结果提示:在胃癌高发区,胃癌患者 IL-8-251 A/A 基因型频率明显高于对照的普通人群,IL-8-251 A/A 基因型增加胃癌发生的危险性,在这一地区胃癌患者携带 IL-8-251T/T 纯合子及 T/A 杂合子基因型的频率均较普通人群为低,分别为 17.6% vs 23.5% 和 50.98% vs 59.80%,但未达到统计学意义;而在胃癌低发区,胃癌患者 IL-8-251 A/A 基因型频率与普通对照人群相似,两地区比较发现高发区胃癌患者 IL-8-251A/A 基因型频率与低发区胃癌患者相似,高发区普通人群 IL-8-251A/

A 基因型频率与低发区普通对照人群无明显差异。

在胃癌低发区,胃癌患者 Hp 感染率明显高于普通人群 IL-18-251 各基因型伴 Hp 感染并不增加胃癌发生的危险性;在高发区,两组人群 Hp 感染率无差异,统计分析发现 IL-8-251 A/A 基因型合并 Hp 感染使胃癌发生的危险性增加。对于此种现象的解析,我们认为高发区人群在 Hp 高感染率这一背景的前提下存在与 IL-8-251 A/A 基因型频率的差异分布有关,这与低发区存在明显的区别,上述结果说明个体间 IL-8-251 的遗传背景差异与胃癌易感性高低存在着密切的关系,但胃癌的发生发展是一个多因素共内参与的复杂过程,IL-8-251 A/A 基因型如何与 Hp 共同作用影响胃癌发生的机制仍不甚清楚,因此 IL-8-251 基因多态性与胃癌的关系有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Fey MF, Tobler A. An interleukin-8 (IL-8) cDNA clone identifies a frequent HindIII polymorphism [J]. *Hum Genet*, 1993, 91(3):298.
- [2] Ponder BA. Cancer genetics [J]. *Nature*, 2001, 411 (6835):336- 1.
- [3] Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, et al. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiditis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114(3): 671- 6.
- [4] Ross OA, O' Neill C, Rea IM, et al. Functional promoter region polymorphism of the proinflammatory chemokine IL-8 gene associates with Parkinson's disease in the Irish [J]. *Hum Immunol*, 2004, 65(4): 340- 6.
- [5] Campa D, Zienoddiny S, Maggini V, et al. Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(2):229- 35.
- [6] Rovin BH, Lu L, Zhang X. A novel interleukin-8 polymorphism is associated with severe systemic lupus erythematosus nephritis [J]. *Kidney Int*, 2002, 62 (1) : 261- 5.
- [7] Smith DR, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. Inhibition of IL-8 attenuate angiogenesis in bronchogenic carcinoma [J]. *J Exp Med*, 1994, 179(5):1409- 15.
- [8] Arenbeng DA, Kunker SL, Polvini PJ, et al. Inhibition of IL-8 reduce tomorigenesis of human non-small cell line cancer in SCID mice[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97 (12):2792- 02.
- [9] Miyamoto M, Shimizu Y, Okada K, et al. Effect of interleukin-8 on production of tumor-associated substances and autocrine growth of human liver and pancreatic cancer cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1998, 47(1):47- 57.
- [10] Crabtree JE. Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori* [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 1996, 10(Suppl 1):29- 37.
- [11] Yamacka Y, Kodama T, Gutierrez O, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* ice A, cagA and vac A status and clinical outcome: studies in four different countries[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 47(7):2274- 9.

(编辑 黄小延)