

2.3 hCD134L cDNA 的克隆与鉴定

分别将 PCR 产物和 pGEX-4T-1 质粒以 *Bam*HI 和 *Sal*I 酶切后, 经 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 BL21, 经 LBA 平板筛选阳性克隆, 提取重组质粒, 经酶切鉴定, 经琼脂糖凝胶电泳, 出现约 4.9 kb 的质粒 DNA 片段和 607 bp 的目的基因, 重组质粒被命名为 pGEX-4T-1/hCD134L(图 2)。

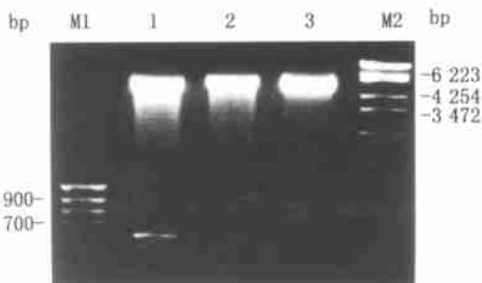


图 2 重组质粒 pGEX-4T-1/hCD134L 的酶切分析

M1: 1 kb DNA 标准 M2: Lambda DNA/Eco1301 DNA 标准
1: *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切后的重组质粒 pGEX-4T-1/hCD134L; 2: *Bam*HI 单酶切后的重组质粒 pGEX-4T-1/hCD134L; 3: *Bam*HI 单酶切后的空质粒 pGEX-4T-1

2.4 序列分析

对重组子 pGEX-4T-1/hCD134L 进行双向测序, 结果表明与 GenBank 中报告的序列完全一致。

3 讨论

许多研究认为, CD134/CD134L 参与了细胞与体液免疫反应。它能协调 CD4⁺ T 细胞的选择、迁移和 Th2 类细胞的分化; 还能与 CD154/CD40、CD70/CD27 一起共同调节 T 细胞依赖性的 B 细胞反应^[7]。动物实验中通过阻断 CD134/CD134L 信号来治疗自身免疫性疾病的设想有明显优点, 它只针对炎症部位的 T 细胞和巨噬细胞, 不影响外周 T 细胞群, 从而可避免全身免疫抑制。我们拟采用抗人 CD134L 的单克隆抗体阻断 CD134/CD134L 信号途径, 来研究这一信号途径在自身免疫性疾病发病过程中的作用。因此, 本实验中我们采用 RT-PCR 方法从激活的 EBV 转化 B 细胞中扩增出了中国人 CD134L 全长 cDNA, 并构建了其高效原核表达载体, 为 hCD134L cDNA 的表达和抗 hCD134L 单抗的制备准备了实验材料。

我们选用的 pGEX-4T-1 载体是表达 GST 融合蛋白的大肠杆菌高效表达载体, 选择该载体的主要原因是: ① 其含非常强的 *tac* 启动子, IPTG 可诱导目的基因的高效表达。② 其表达产物利于分离纯化: 融合蛋白可通过谷胱甘肽-交联葡聚糖 4B 柱亲和层析纯化, 温和的抽提条件对融合蛋白的抗原性和功能活性影响极小。再用凝血酶或 Xa 因子将 GST 切除, 可方便地获得目的蛋白。我们构建的 pGEX-4T-1/hCD134L 经双酶切鉴定证实 hCD134L cDNA 已成功克隆入 pGEX-4T-1 载体中。序列测定结果表明, 中国人 CD134L cDNA 序列与 GenBank 中报告的完全一致, 为今后研究 CD134/CD134L 分子作用机理和制备抗 hCD134L 单抗打下基础。

参考文献:

- [1] Flynn S, Toellner K M, Raykundalia C, *et al*. CD4⁺ T cell cytokine differentiation; the B cell activation molecular, OX40 ligand, instructs CD4⁺ T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blnr-1[J]. *J Exp Med* 1998, 188(2): 297.
- [2] Ohshima Y, Yang L P, Uchiyama T, *et al*. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4⁺ T cells into high IL-4 producing effectors[J]. *Blood*, 1998, 92(9): 3338.
- [3] MacDonald T T. The role of activated T lymphocytes in gastrointestinal disease[J]. *Clin Exp Allergy*, 1990, 20(3): 247.
- [4] Raine C S. Multiple sclerosis: a pivotal role for the T cell in lesion development[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1991, 17(4): 265.
- [5] Tsukada N, Akiba H. Blockade of CD134(OX40)-CD134L interaction ameliorates lethal acute graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation[J]. *Blood* 2000, 95(6): 2434.
- [6] Godfrey W R, Fagnoni F F, Harara N A, *et al*. Identification of a human OX40 ligand, a costimulator of CD4⁺ T cells with homology to tumor necrosis factor[J]. *J Exp Med*, 1994, 180(2): 757.
- [7] Morimoto S, Kanno Y, Tanaka Y, *et al*. CD134L engagement enhances human B cell Ig production; CD154/CD40, CD70/CD27, and CD134/CD134L in interactions coordinately regulate T cell dependent B cell responses[J]. *J Immunol* 2000, 164(8): 4097.

(编辑 张敏瑞)

GSTM1 基因缺失与非小细胞肺癌关系的病例对照研究

乔贵宾¹, 吴一龙², 曾伟生¹, 蒋仁超¹, 王思愚², 杨学宁²

(1. 广州军区广州总医院心胸外科, 广东广州 510010; 2. 中山大学肺癌研究中心, 广东广州 510630)

摘要:【目的】探讨谷胱甘肽硫转移酶 μ 基因缺失与肺癌发生的关系。【方法】采用病例对照研究方法和 PCR 检测手段分析谷胱甘肽硫转移酶 μ 基因缺失在病例和对照组中的分布情况, 并分析其与肺癌发生的关系。【结果】谷胱甘肽硫转移酶 μ 基因(GSTM1)缺失在病例组和对照组中的分布存在显著差异 ($P < 0.01$), 病例组中 GSTM1-/- 基因型携带率较高(61%), 而对照组则为 48%; GSTM1-/- 基因型是

收稿日期: 2002-07-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39670651)

作者简介: 乔贵宾(1969-), 男, 山西大原人, 博士生, 吴一龙, 导师, 教授。

肺癌发生的重要危险因素(OR 为1.7, $P=0.04$)。【结论】谷胱甘肽硫转移酶 μ 基因缺失与肺癌的发生密切相关, $GSTM1+/-$ 是肺癌发生的重要宿主因素, 并可能是肺癌遗传易感性的重要生物学标志。

关键词: 肺肿瘤; 谷胱甘肽硫转移酶 μ 基因; 病例对照研究

中图分类号: 730.2; 734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)5S-0026-02

μ 类谷胱甘肽硫转移酶($GSTM1$)是体内主要参与多环芳烃类等化学致癌物灭活的解毒酶系, $GSTM1$ 基因的缺失与否可致酶活性的显著不同, 从而引起个体对肿瘤易感性的差异^[1]。本研究通过病例-对照研究方法及PCR技术, 分析 $GSTM1$ 基因缺失在病例和对照组中的分布情况, 并分析其与肺癌发生的关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象

病例为1997年1月~1999年12月在我院胸外科进行手术的全部肺癌患者, 共213例, 所有病例均由组织病理学确诊, 其中鳞癌106例, 腺癌62例, 细支气管肺泡癌11例, 其他34例。对照分两组, 对照I为同期在我院进行肺部手术的良性肿瘤患者, 共64例, 其中炎性假瘤44例, 结核瘤11例, 其他9例; 对照II为同期在我院体检中心进行体检的健康体检者, 共135名。

纳入标准: ①所有对照年龄均在45岁以上, 与入选病例无血缘关系; ②对照及病例均无其他部位原发肿瘤, 病例术前未接受放疗和化疗等治疗; ③所有病例与对照均为汉族, 且均为在广东地区居住20年以上的常住人口。

1.2 调查内容

调查病例及对照的年龄, 性别等一般人口学特征以及与肺癌相关的危险因素(如职业、吸烟、肿瘤家族史等)。

1.3 标本收集

病例标本取自手术切除的肿瘤组织; 对照I标本取自手术切除的肺良性肿瘤组织; 对照II标本则抽取被检者静脉血5 mL, 离心去血清后取剩余的血凝块。

1.4 实验室检测

1.4.1 标本DNA的提取 经研磨的肺肿瘤组织或被吹打细碎的血凝块组织经蛋白酶消化后, 用酚-氯仿抽提数次, 乙醇和 Na^+ 沉淀, TE溶解后保存于 $-20^{\circ}C$ 。

1.4.2 PCR反应 每例DNA模板均经引物P1(5'-CTG CCC TAC TTG ATT GAT GGG-3')与P2(5'-CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC-3')进行PCR扩增, 扩增 $GSTM1$ 第4、5外显子(包括第4内含子), 产物是约为273 bp的片段。同时, 共扩增人肌动蛋白基因作为内对照, 引物为H₁(5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3')与H₂(5'-GGC CCC TCC ATC GTC CAC CG-3'), 产物是493 bp的片段。反应混合物含 $10\times$ Buffer(1.5 mmol/L Mg^{++}), 200 μ M dNTP, 每种引物各0.25 μ mol/L, TagDNA聚合酶1 U, 总反应体积为50 μ L, PCR循环条件为 $94^{\circ}C$ 变性55 s, $55^{\circ}C$ 复性1.5 min, $72^{\circ}C$ 延伸1 min, 经35个循环后继续在 $72^{\circ}C$ 延伸7 min。

1.4.3 电泳及结果判定 PCR反应产物于20 g/L Agorase凝胶、电泳缓冲液中, 在电压40 V, 电流2.5 mA的条件下进行电泳, 电泳后于300 nm的紫外线透射分析仪上观察、拍照, 电泳后凝胶上显示一条273 bp和一条493 bp的条带则

为 $GSTM1+/+$ 型或 $GSTM1+/-$ 型, 若仅有一条493 bp的条带显示, 则为 $GSTM1-/-$ 型。

1.5 主要设备及试剂

TaqDNA聚合酶, dNTP等试剂均购自华美公司, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, PCR扩增仪为PE480紫外透射分析仪为上海康华生化仪器厂产ZF型, 电泳仪为北京六一仪器厂产DYY-II₁型, 所有试剂均为分析纯。

1.6 混杂因素的控制

所有病例及对照一般资料的调查均由四名经统一培训的护理人员调查完成。所有标本均统一编号, 进行标本的PCR检测及结果判定时, 研究人员不知标本对应的临床资料。为控制实验中的假阳性和假阴性, 每批次PCR反应除设系统内对照外, 均设阳性、阴性及空白对照。

1.7 统计方法

所有资料均由SPSS10.0软件包处理, 采用 t 检验, 卡方检验, 计算 χ^2 、 P 值、比值比(OR)和95%可信限(95%CI)。

2 结果

2.1 均衡性检验

病例组年龄(58.6 ± 11.0)岁, 对照I组(54.2 ± 10.7)岁, 对照II组(53.8 ± 10.4)岁; 病例组男158例, 女55例, 对照I组男50例, 女14例, 对照II组男101例, 女34例。经统计检验3组间在年龄、性别、职业方面均未见显著性差异。

2.2 $GSTM1$ 基因型在肺癌病例组和对照组中的分布

$GSTM1$ 基因缺失在肺癌病例组(213例), 对照I组(64例), 对照II组(135例)中的分布情况见表1。经统计学检验, $GSTM1$ 基因型在3组间的分布有显著性差异($P<0.01$), 但在两组对照间的分布无差异($P=0.415$), 因此以下资料分析将两组对照合并分析。

表1 $GSTM1$ 基因型在肺癌病例和对照中的分布 例(%)

组别	n	$GSTM1+/+$ 或 $+/-$	$GSTM1-/-$
病例组	213	83(39)	130(61)
对照I	135	33(52)	31(48)
对照II	64	71(53)	64(47)

2.3 $GSTM1$ 基因缺失在不同病理类型肺癌中的分布

$GSTM1$ 基因缺失在不同病理类型肺癌中的分布未见显著差异(见表2), 由于该组资料中腺癌和细支气管肺泡癌例数较少, 故将两组合并分析。

2.4 $GSTM1$ 缺失与肺癌的关系

病例组中 $GSTM1$ 基因缺失率明显高于对照组, OR 值为1.7, 95%可信限为1.1~2.5, $P=0.04$ (见表3)。说明 $GSTM1$ 基因缺失可能是肺癌发病的危险因素。

表 2 GSTM1 基因型在不同病理类型肺癌中的分布 例

肺癌病理类型	GSTM1-/-	GSTM1+/-或+/-	χ^2	P
肺鳞癌	64	42		
肺腺癌和细支气管肺泡癌	45	28	0.038	0.981
其他	21	13		

表 3 GSTM1 基因缺失与肺癌的关系 例

组别	n	GSTM1+/-或+/-	GSTM1-/-	OR(95%CI)
病例组	213	83	130	1.7(1.1-2.5)
对照组	199	104	95	

3 讨论

大量的研究表明,吸烟等环境因素是引起肺癌发生的重要危险因素,除了吸烟等环境致癌因素暴露外,在肺癌的发生中,对外来致癌物易感性的个体差异也是重要的宿主因素。已经有许多研究发现,由于代谢酶活性在人的个体间相差几十倍乃至几百倍,因此,接触同样的致癌物,最终是否患癌却因人而异^[1]。人类谷胱甘肽硫转移酶 M1 属于谷胱甘肽转移酶基因超家族,是体内重要的代谢灭活酶,可催化香烟等致癌物中的多环芳烃类化合物(PAH)与谷胱甘肽结合,从而具有解毒活性^[2],GSTM1 基因型和其表型完全一致,即携带有 GSTM1 基因的人具有 GSTM1 酶的活性,而该基因缺失的人则没有该酶的活性^[3]。

大量的研究表明,GSTM1 基因缺失与多种肿瘤的易感性相关^[4,5],但有关 GSTM1 基因缺失与肺癌易感性的研究结果却不尽一致。最近,一个有关 GSTM1 基因与肺癌关系的 Meta 分析表明^[6],研究设计的不规范和系统内偏倚是导致这种研究结果不一致的主要原因。许多研究没有建立严格的质量控制方法,甚至没有考虑研究对象的种族和居住地等混杂因素,对病例和对照的选择也是随意的,因而,研究的结果也就可靠性和可信度不高。

我们采取规范的病例-对照研究设计,选取特定期接受手术治疗的连续病例和同期在同一医院诊治的人群进行研究,并制定了统一的纳入、排除标准和实验室质控方法,较好地控制了研究中的系统偏倚。我们的研究发现,GSTM1 基因缺失率在对照人群中为 48%,在肺癌病例中却高达 61%,显著高于对照组,而且 GSTM1 基因的缺失可能与肺癌的发生存在相关性,OR 值为 1.7。这就提示 GSTM1 是肺癌发生中重要的宿主因素。这与以往在上海、沈阳和江苏等地对汉族人群进行的研究结果相似。高扬等^[7]的研究结

果与我们的不同,他们的研究发现 GSTM1 基因缺失在病例和对照组中的分布无显著差异,这可能与他们的研究样本小(仅 59 例),研究对象的选择不规范有关。此外,与孙贵范等^[8]的研究结果不同,我们的研究显示,不同病理类型的肺癌患者中 GSTM1 基因缺失率均明显高于对照组,而他们的研究则发现 GSTM1 基因缺失仅与肺腺癌的发生存在关系,与鳞癌等类型肺癌无明显关系。导致这种研究结果不同的原因可能与他们的研究中腺癌肺癌所占比例偏大有关。而我们的研究结果则与 Nakachi 等^[9]的研究相似。因此,样本量更大,设计更加规范的研究尚需进一步进行。

肺癌的发生是一个多因素参与,多阶段、多步骤发展的过程。环境和宿主因素在肺癌的发生、发展中均起十分重要的作用。环境因素与宿主因素在肺癌发生中的联合作用是我们感兴趣的问题,也是我们下一步准备探讨的问题。

参考文献:

- [1] Raunio H, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, *et al.* Diagnosis of polymorphisms in carcinogen activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility-a review[J]. *Gene*, 1995, 159(1): 113.
- [2] Ketterer B. Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis[J]. *Mutat Res*, 1988, 202(2): 343.
- [3] Brockmoller J, Gross D, Kerb D, *et al.* Correlation between trans-stilbene oxide glutathione conjugation activity and the deletion mutation in the glutathione transferase class μ gene detected by polymerase chain reaction[J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, 43(2): 647.
- [4] Heckbert S R, Weiss N S, Homung S K, *et al.* Glutathione S-transferase and epoxide hydrolase activity in human leukocytes in relation to risk of lung cancer and other smoking-related cancers[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84(6): 414.
- [5] Strange R C, Matharoo B, Faulder G C, *et al.* The human glutathione S-transferases: a case-control study of the incidence of the GST10 phenotype in patients with adenocarcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 1991, 12(1): 25.
- [6] Houlston R S. Glutathione S-transferases M1 status and lung cancer risk: a meta analysis[J]. *Cancer Epidemiological Biomarkers Prev*, 1999, 8(8): 675.
- [7] 高 杨, 张 桥. GSTM1 和 CYP2D6 基因多态性与肺癌敏感性的关系[J]. *中国公共卫生*, 1999, 15(6): 488.
- [8] 孙贵范, 皮静波, 郑全美, 等. 谷胱甘肽转移酶 μ 基因缺失与肺癌发病的相关性研究[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 1995, 18(6): 167.
- [9] Nakachi K, Imai K, Hayashi S, *et al.* Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose[J]. *Cancer Res*, 1991, 51(19): 5177.

(编辑 张恩健)