

· 研究报告 ·

α_1 抗胰蛋白酶 Pi 表型的分布及其 与肝癌相关性的分析

关赛芳 吕宝忠 许凯黎 陈复华

(上海市肿瘤研究所 200032)

摘要 本文以凝胶等电聚焦电泳方法测定 150 例原发性肝癌患者、100 例良性肝病患者的血清 α_1 AT(Pi) 表型的分布。统计学检验说明: (1) 我们的样结果符合 Hardy—Weinberg 平衡定律; (2) M_2 等位基因的相对危险度在 2.18—21.96, 平均为 7.502 ± 3.836 。因此, M_2 的出现在肝癌的检测中有重要意义。

关键词 α_1 抗胰蛋白酶 (Pi), 原发性肝癌, M_2 等位基因, 等电聚焦电泳, 相对危险度

Distribution of α_1 -antitrypsin Phenotypes and Its Relation to Human Primary Liver Cancer

Guan Saifang Lü Baozhong Xu Kaili Chen Fuhua

(Shanghai Cancer Institute Shanghai 200032)

α_1 抗胰蛋白酶 (α_1 AT) 是人体血清中一种正常的蛋白酶抑制剂。它具有抑制多种蛋白酶的生理功能, 是嗜中性弹性蛋白酶的主要抑制剂, 由一对共显性的复等位基因 (Pi 系列) 所编码, 具有高度多态性与遗传变异的重要特性。迄今已发现从 PiB→PiZ 计 75 种以上表型⁽⁴⁾, 最常见的等位基因表型称作 PiM, 包括野生型 M_1 和突变型 M_2 与 M_3 3 种, 可构成 M_1M_1 、 M_2M_2 、 M_3M_3 、 M_1M_2 、 M_1M_3 和 M_2M_3 6 种表现型⁽⁵⁾。此外尚有引起临床学者⁽⁷⁾, 特别是肝癌研究者感兴趣的与某些疾病相关联的突变基因表型 PiZ、PiS 与 Pinull^(12, 15, 17)。中国成人及儿童重症肝炎有关 Pi 表型国内已有报道⁽³⁾, 但 Pi 不同表型与肝癌之间的关系究竟如何, 尚未见报道。本文拟以等电聚焦技术测定 α_1 AT 的表型分布, 来探讨其表型和等位基因与肝癌之间的关系。

1 材料和 方法

1.1 血清标本

正常人血清来自上海市中心血站及公用事业局下属 4 个工厂的健康职工, 共 112 例。肝癌患者血清由上海医科大学肿瘤医院提供, 计 150 例, 其中 124 例经病理证实, 占 82.7%, 其余 26 例

皆符合 1977 年全国肝癌协作会议拟定的诊断标准。良性肝病例为上海医科大学附属中山医院及上海市传染病总院病人, 计 100 例。

1.2 α_1 AT 抗血清

1.2.1 羊抗人 α_1 AT 抗血清的制备 本实验室采用 ConA-Sepharose4B 亲和层析柱分离人血清获得纯化的 α_1 AT, 经蛋白电泳及免疫电泳证实为免疫纯的 α_1 AT, 以此纯化的 α_1 AT 制备多克隆抗体和单克隆抗体。

1.2.2 羊抗鼠 IgG-HRP 及兔抗羊 IgG-HRP 均为本实验室制备。

1.2.3 α_1 AT 复等位基因血清 由加拿大多伦多儿童医院 D. W. Cox 博士赠送。

1.3 试剂

二性电解质载体 pH3.5-5 和 pH4-6 为 LKB Bromma 产品。丙稀酰胺及双丙稀酰胺均为美国 Promega 产品, ACES[N-(2-乙氨基)-2-氨基 2 磺酸]为 Sigma 产品, 二巯基苏糖醇 (DTT), 碘乙酸 (IAC), 过硫酸铵, 考马士蓝 G₂₅₀ 均为国产试剂。

1.4 方法

α_1 ATPi 表型基本按 Pierce 等的方法进行聚丙烯酰胺等电聚焦电泳测定⁽¹¹⁾, 并略有改变。

1.4.1 凝胶板 120×115×0.4 毫米, 内含丙稀酰胺 5.88%, 甲叉双丙稀酰胺 0.12%, 蔗糖 13.0%, Ampholine(pH3.5-5)1.08%, Ampholine(pH4-6)1.52%, ACES 0.98%, 过硫酸铵 0.067%。

1.4.2 血清样品处理 0.1 mol/L DTT 5 μ l 加 20 μ l 血清再加 20 μ l 蒸馏水混匀, 放 4℃ 冰箱内还原 4 小时后, 再加 0.04mol/L IAC12 μ l 烷基化过夜。

1.4.3 等电聚焦电泳 (IEF) 正极液为 0.025mol/L 门冬氨酸和 0.025mol/L 谷氨酸, 负极液为 0.5mol/L 甘氨酸。聚焦电泳: 400v 预聚焦 0.5 小时, 然后将 5×10mm 新华 3 号滤纸浸入处理过的血清内, 并放于距离负极 1cm 的凝胶表面, 500v 聚焦 0.5 小时, 再 700v1 小时后, 取去加样滤纸片, 再聚焦 0.5 小时, 调至 1000v1h, 1500v1.5 小时。以上聚焦电泳均在 10℃ 冷却条件下进行, α_1 AT 表型蛋白带以考马士蓝 G₂₅₀ 显示。

1.4.4 IEF 印迹酶标法 采用 Netty 等⁽¹⁰⁾ 建立的 α_1 AT 不同 Pi 免疫印迹酶标方法, 用 25mmol/L Tris, 192mmol/L 甘氨酸, 20% 甲醇的转移缓冲液将聚焦凝胶板的蛋白质转移至硝酸纤维薄膜上, 先后分别用鼠抗人 α_1 AT 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG-HRP 处理, 再经 DAB (3,3'-二氨基联苯胺) 作用, 可显示 α_1 AT 免疫固定的各种表型。

2 结 果

2.1 Pi 的表型分布

本文所用实验条件将人血清中 α_1 AT3 条主要带(4、6 和 8 带)采用 Fagerol 的区带编号系统进行分型⁽⁶⁾, 其中 PiM 表型的 6 种共显表现型中 3 种纯合子表型为: M₁M₁、M₂M₂ 和 M₃M₃ 以及 3 种杂合子 M₁M₂、M₁M₃ 和 M₂M₃。并能显示 E、F、P、S、Z 等常见的 Pi 表型。

从图 1 可见, IEF 免疫酶标法证明, Pi 表型的特征性区带具有 α_1 AT 的抗原性。

表 1 中观察值栏列出了经 IEF 技术测定的原发性肝癌患者、良性肝病患者和正常人血清的 Pi 不同表现型的分布, 根据 Hardy-Weinberg 平衡定律对观察值进行了校正, 从而获得了 3 组人群 Pi 不同表型的频率分布的期望值。经统计学检验, 观察值与期望值的概率 $P > 0.98$, 说明

本文的抽样结果符合 Hardy-Weinberg 的平衡定律。在我们的研究中,未发现中国人群中存在着在白种人与肝癌相关的 Pizz 与 Piss 表型。

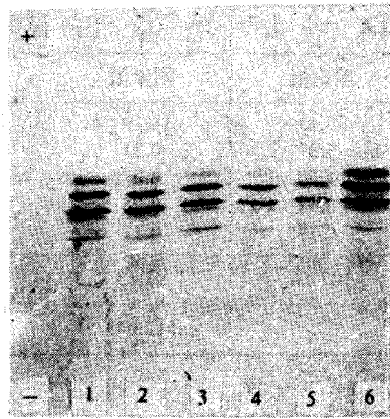


图1 α_1 AT 单克隆抗体免疫酶标 Pi 表型图

1. M_1E ; 2. M_2M_3 (标准); 3. M_1M_1 ; 4. M_2M_2 ; 5. M_1M_1 (标准); 6. M_1F (标准)。

表1 良、恶性肝病患者 α_1 -AT 表型

分型	肝癌患者		良性肝病患者		正常人	
	观察值	期望值	观察值	期望值	观察值	期望值
M_1M_1	67	68.69	74	71.40	90	88.40
M_1M_2	54	51.42	17	19.44	14	16.91
M_1M_3	4	6.46	2	3.18	1	0.89
M_2M_3	0	2.53	0	0.46	0	0.086
M_2M_2	11	9.62	3	1.52	2	0.81
M_3M_3	3	0.67	1	0.24	0	0.005
M_1M_4	3	2.03	1	0.85	0	0
$M_1Etokyo$	3	2.03	0	1	2	2.66
$M_2Etokyo$	0	0.76	0	0	1	0.26
$Etokyo Etokyo$	0	0.15	0	0	0	0.02
M_1Elem	1	0.67	0	0	0	0
M_1P	2	1.36	0	0	2	1.78
M_2P	0	0.51	0	0	0	0.17
M_1Ytor	2	1.36	1	1.39	0	0
其它	0	(2.00)	0	(0.56)	0	(0.063)
总计	150	150.13	100	100.04	112	112.049

2.2 PiM_2 与原发性肝癌的相关性

为分析 Pi 不同表型,尤其是 PiM_2 基因与肝癌是否相关,本文对肝癌患者组的不同 Pi 期望值的表型分布与正常组相应 Pi 期望值的表型分布进行关联分析,结果见表 2,经统计学检验, $\chi^2 = 22.98$, 查 χ^2 表, 当 $df = 5$ 时, $\chi^2_{0.050} = 11.1$, 似提示 Pi 表型中 M_2 等位基因与肝癌发生有显著性相关 ($P < 0.05$)。 M_2 的相对危险度估计,进一步表明了该等位基因与肝癌发生的关系,经测定 M_2 相对危险度,在 2.18-21.96, 平均相对危险度为 7.502 ± 3.836 ($X \pm SE$), 说明 M_2 表型的出现在肝癌检测中具有重要意义。

表 2 肝癌患者和正常人与 M_2 相关的 α_1AT 表型的期望值与理论值比较

分型	肝癌患者		正常人		理论值合计
	期望值	理论值	期望值	理论值	
M_1M_2	51.42	39.13	16.19	29.20	68.330
M_2M_2	9.62	5.97	0.81	4.46	10.430
M_2M_3	2.53	1.50	0.086	1.12	2.616
$M_2Etokyo$	0.76	0.58	0.26	0.44	1.020
M_2P	0.51	0.39	0.17	0.29	0.680
其它	85.29	102.56	93.13	76.53	179.103
总计	150.13		112.049		262.179

3 讨 论

α_1AT 是血清中最重要的蛋白水解酶抑制物, 它是由肝细胞合成和分泌的一种糖蛋白, 分子量在 45 000—56 000, 由一条多肽链和 4 条糖链构成。因 α_1AT 的存在, 血清才具有抑制多种蛋白酶(如胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶、纤维蛋白溶酶和胶原酶等)的活性, 其活性占血清蛋白水解酶抑制物总活性的 90% 以上。肝细胞产生和积聚异常的 α_1AT 含量可导致肝脏病变, 其确切机理尚不清楚, 很可能与其抑制活性减少, 从而导致被它抑制的酶过度增强, 导致肝细胞变性有关。许多作者报道, 测定人血清中 α_1AT 含量变化, 似可作肝脏疾病和肝癌的辅助诊断指标之一^(1, 12)。还有学者报道, α_1AT 遗传缺失与肝脏疾病和肺部疾病有关^(2, 9)。现已查明, Pi 的不同表型是由于 Pi 等位基因突变而引起, 碱基改变导致了 α_1AT 分子多肽链的个别氨基酸置换, 如 M_3 是 376 位的谷氨酸 (Glu) 为天冬氨酸 (Asp) 替换, M_2 是 376 位 Glu 被 Asp 替换及 101 位的精氨酸 (Arg) 被组氨酸 (His) 替换, Z 是 342 位的 Glu 被 Lys 置换, S 是 264 位的 Glu 被 Val 所置换, 从而改变了其在 IEF 中的移动位置而产生各种不同的 Pi 表型, 其大多数 Pi 表型是不引起病变的, 只有少部分会引起疾病, 如 PiZ、PiS、Pinull 等可导致血清中 α_1AT 缺乏, 大大降低血清中蛋白水解酶抑制物的总活性。然而我们研究的良恶性肝病中没有发现以上 3 种基因的携带者。该肝癌患者群体中发生频率最高的是 α_1ATM_2 型, 与对照组比较有显著差异, $P < 0.05$ (95% 的可信限), 相对危险度为 7.502 (2.18—21.96), 标准误 (SE) 为 3.836, 这样相对危险度 = 7.502 ± 3.836 。这些结果提示, 在观察人群中存在一种增加 α_1ATM_2 基因表型与肝癌相关的危险性, 这一结果与 Sizaret⁽¹³⁾ 报道的结果基本一致。这一相关性尚需作较大群体的检测来加以肯定。但值得注意的是, Hammond 等⁽⁸⁾ 在南非已报告了原发性肝癌与 HLA 位点 A1 有关, Zervas⁽¹⁸⁾ 报告了原发性肝癌与 HLA 位点 B12 相关, Theodoropovlos 等⁽¹⁶⁾ 发现 PiFM 表型确定是原发性肝癌的一种危险因子。因此, 本文报道的 α_1ATM_2 表型与肝癌的关联, 值得有关肝癌诊断工作者的注意, 是否可考虑作为一种重要的肝癌危险标志, 有待进一步的研究工作予以阐明。

(下转第 27 页)