

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.34.018

单核苷酸多态性结合位点 C19007T 与宫颈癌患者易感性的相关研究*

秦 梅¹,武红权²,厉 勇³,杨 旭¹,胡苑苑¹
(1. 贵州省贵阳市第一人民医院输血科 550002;2. 贵州省人民医院检验科,贵阳 550002;
3. 贵州省贵阳市妇幼保健院输血科 550003)

[摘要] **目的** 初步探讨 caspase-3 基因 3'末端的非翻译区 microRNA 的结合位点 C19007T 单核苷酸多态性与宫颈癌患者易感性的相关性。**方法** 运用 PCR-PIRA 技术对 100 例宫颈癌患者和 100 名未检出宫颈病变妇女的 C19007T 多态性位点行基因分型检测。应用免疫组织化学分析癌组织中 caspase-3 基因的蛋白表达。**结果** 有淋巴转移组 caspase-3 C19007T 的 C/C、T/C、T/T 基因型频率分别为 31.0%(18/58)、35.1%(13/37)、20.0%(1/5),无转移组的分别为 69.0%(40/58)、64.9%(24/37)、80.0%(4/5),两组基因型的分布频率差异均无统计学意义;caspase-3 蛋白在宫颈鳞癌组织中的表达降低,免疫组织化学结果提示,caspase-3 蛋白的表达情况与 C19007T 的基因型无显著相关性。**结论** caspase-3 基因的 C19007T 位点与宫颈鳞状细胞癌的发生有一定的相关性,基因型 T/T 可作为罹患宫颈癌风险的预测指标。

[关键词] 宫颈肿瘤;caspase-3 基因;microRNA;多态性,单核苷酸
[中图法分类号] R711.74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)34-4395-04

Study on correlation between single nucleotide polymorphisms binding site C19007T and susceptibility in patients with cervical cancer*
QIN Mei¹,WU Hongquan²,LI Yong³,YANG Xu¹,HU Yuanyuan¹
(1. Department of Blood Transfusion,Guiyang Municipal First People's Hospital,Guiyang, Guizhou 550002,China;2. Department of Clinical Laboratory,Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang,Guizhou 550002,China;3. Department of Blood Transfusion,Guiyang Municipal Maternal and Child Health Care Hospital,Guiyang,Guizhou 550002,China)

[Abstract] **Objective** To preliminarily investigate the correlation between the C19007T single nucleotide polymorphism at the untranslated region microRNA of 3'end of caspase-3 gene and the susceptibility in the patients with cervical cancer. **Methods** The genotyping detection of C19007T polymorphism loci was performed in 100 patients with cervical cancer and 100 women without cervical lesions by PCR-PIRA. The immunohistochemical method was employed to analyze the protein expression of caspase-3 gene in cancer tissues. **Results** The C/C, T/C and T/T genotype frequencies in the lymphatic metastasis group were 31.0% (18/58), 35.1% (13/37) and 20% (1/5) respectively, while which in the group without metastasis were 69.0% (40/58), 64.9% (24/37) and 80% (4/5) respectively. There were no significant differences in the distribution frequencies of genotypes between the two groups. The expression of caspase-3 protein in cervical squamous cell carcinoma tissues was decreased. The results of immunohistochemistry showed that there was no significant correlation between caspase-3 protein expression and C19007T genotype. **Conclusion** The C19007T gene locus of caspase-3 gene has a certain correlation with the occurrence of cervical squamous cell carcinoma, and the genotype T/T can be used as a predictive indicator for suffering from cervical cancer risk.

[Key words] cervical neoplasms;caspase-3 gene;microRNA;polymorphism,single nucleotide

宫颈癌是最常见的女性生殖系统恶性肿瘤之一,在女性恶性肿瘤发病率中排第 3 位。近年来,宫颈癌的发病趋于年轻化^[1],广大女性的健康及生命安全受到了严重威胁。通过对宫颈癌相关易感因素的研究表明,遗传基因的突变很有可能是引起宫颈癌的一个重大因素^[2]。到目前为止,针对宫颈癌易感性与基因多态性的研究已有较大进展^[3-4]。本研究旨在通过探讨位于 caspase-3 基因 C19007T 位点的多态性与宫颈

* 基金项目:贵州省卫生计生委科技基金项目(gzwjkj 2014-2-090)。 作者简介:秦梅(1968—),副主任技师,本科,主要从事分子生物学技术的临床应用的研究。

癌易感性的关系,为宫颈癌的病因学研究提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取从 2013 年 2 月至 2016 年 9 月于贵州省人民医院、贵阳市妇幼保健院、贵阳市第一人民医院妇科住院的 100 例宫颈癌患者(观察组),均未曾在采血前行放疗、化疗、免疫治疗等其他针对肿瘤的治疗,平均年龄为(46.0±10.1)岁,经术后的宫颈活组织病理检查结果判定,所有患者肿瘤病理类型都是宫颈鳞状细胞癌。根据国际妇产科联盟(FIGO)的 2009 年临床分期标准:I、II 期有 60 例,Ⅲ、Ⅳ期有 40 例;局部的淋巴结转移情况:32 例有转移,68 例无转移。患者各项信息(年龄、吸烟状态、孕产次、HPV 感染情况等)均来源于病历记录。选取同期于该院体检未检出宫颈病变的 100 例健康女性作为对照组,平均年龄为(47.8±9.4)岁。所有研究对象间相互均无直系亲属关系,且均无遗传病病史。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 采集所有受试者晨起空腹时的静脉血 3~5 mL,运用 TIANamp 试剂盒提取所采血液中基因组 DNA,于-80℃保存。

1.2.2 基因分型 选取 caspase-3 上 3'-UTR 端的 microRNA 结合位点 C19007T,使用 PCR-PIRA 方法进行引物设计,于多态性位点的上游用碱基 A 代替 T,进而引入 Taq I 酶切位点。其中,上游的引物为:5'-TTG TGA AAA AGT TAA ACA TTG AAG TAT-3',下游的引物:5'-TTC AGG ACA AAC ATC ACA AA-3',扩增的产物片断长度是 230 bp(图 1)。PCR 扩增反应体系的总体积为 25 μL,包括 10×Buffer 2.5 μL,ddH₂O 17.15 μL,dNTP 0.5 μL,MgCl₂ 2.5 μL,P 10.3 μL,rTaq 酶 0.25 μL,P2 0.3 μL。PCR 扩增条件:95℃条件下预变性 10 min,95℃条件下变性 45 s,退火 45 s,72℃ 50 s,扩增 35 个循环,72℃ 7 min,4℃保存,反应结束。电泳槽中放入 2%琼脂糖凝胶,并加 11 μL PCR 反应产物后电泳(30 min)。在凝胶成像仪下成像、拍照。酶切反应体系为 15 μL,包括 ddH₂O 1.5 μL,XspI 1 μL(8 U/μL),Buffer(10×K)1.5 μL 及 PCR 反应产物 11 μL。在 37℃恒温水浴箱过夜。用 3.5%的琼脂糖凝胶电泳(30 min)后观察并记录酶切结果,见图 2。

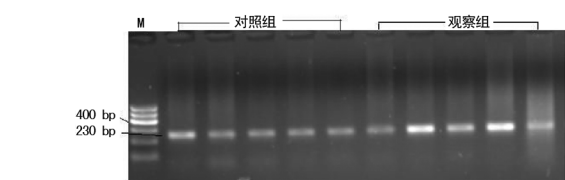


图 1 caspase-3 基因的 PCR 产物

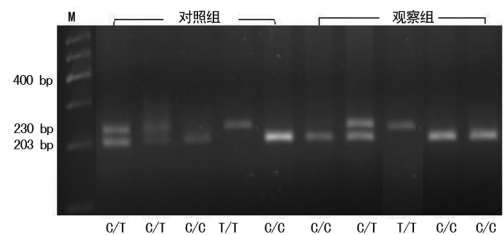


图 2 caspase-3 基因的 C19007T 多态性的分析

1.2.3 免疫组织化学 从观察组中选取 100 例宫颈鳞癌组织的石蜡标本。标本来源于贵州省人民医院、贵阳市妇幼保健院病理科。常规石蜡包埋,4 μm 连续切片后,给予免疫组织化学染色,显微镜下观察。结果分析:以细胞质或细胞膜中出现棕黄色颗粒为 caspase-3 蛋白的阳性表达。当物镜下的阳性细胞,≤10%记 0 分;>10%~50%记 1 分;>50%~75%记 2 分;>75%记 3 分。染色强度的区分标准:无色 0 分,淡黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分。上述两项的得分相加以后:0 分为“-”,1~2 分为“+”,3~4 分为“++”,5~6 分为“+++”。

1.3 统计学处理 所有数据采用 SPSS19.0 软件进行处理,计数资料采用率表示,组间采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,等级资料的相关性分析采用 Spearman 等级相关分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 caspase-3 基因上 C19007T 位点多态性的基因分布情况 对照组与观察组在年龄、吸烟状况、婚次、产次方面均无明显差异。而 HPV 感染在观察组 84 例(84%)的分布频率明显高于对照组 24 例(24%)且有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 caspase-3 结合位点上 C19007T 的基因型分布及其与宫颈鳞状细胞癌遗传易感性的关系 所有研究对象的 C19007T 多态位点共计有 3 种基因型:C/C、T/C 及 T/T,其在观察组中的基因型频率依次为 58%、37%、5%,在对照组中依次为 55%、29%、16%,将基因型 T/C、T/T 分别与等位基因 C/C 作对比,两组间基因型 C/C 和 T/C 的分布频率差异无统计学意义($P=0.540$),C/C、T/T 基因分布频率差异有统计学意义($P=0.020$),见表 1。T/T 基因型较 C/C 基因型可更明显降低宫颈鳞状细胞癌发病的可能性,见表 2。经 χ^2 检验,caspase-3 rs1049216 多态位点在两组中均符合 Hardy-Weinberg 平衡。

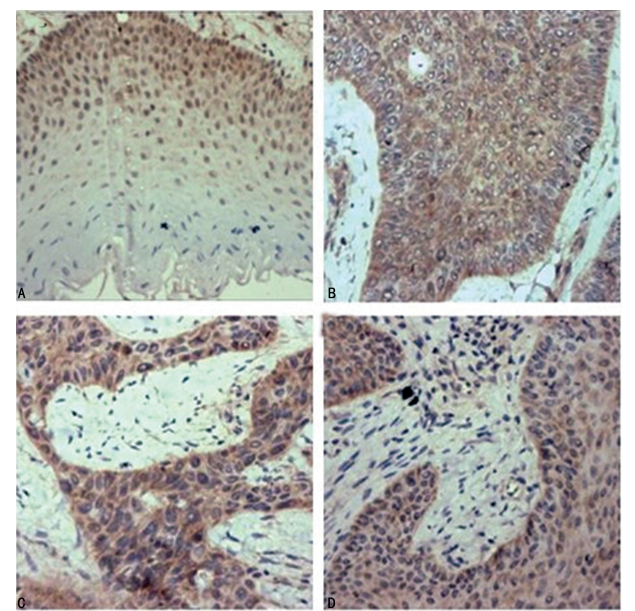
2.3 caspase-3 上 3'-UTR 端 microRNA 结合位点的 SNP 与宫颈鳞状细胞癌转移的关系 有淋巴结转移组的 caspase-3 C19007T 的 C/C、T/C、T/T 基因型频率分别为 31.0%、35.1%、20.0%,无转移组的分别为 69.0%、64.9%、80.0%,分别将基因型 T/C、T/T 与基因型 C/C 作对比,两组基因型的分布频率均差异无

统计学意义($P=0.678,0.606$),见表3。

表1 C19007T SNP 基因型在观察组和对照组的分布(n)							
基因型	n	对照组	观察组	χ^2	P	OR	95%CI
C/C	58	55	58			1.000	
T/C	37	29	37	0.375	0.540	1.210	0.657~2.227
T/T	5	16	5	5.383	0.020	0.296	0.102~0.864

表2 C19007T 基因型和宫颈癌临床分期的关系[$n(\%)$]							
基因型	n	I/II	III/IV	χ^2	P	OR	95%CI
C/C	58	9(15.5)	49(84.5)			1.000	
C/T	37	7(18.9)	30(81.1)	0.187	0.666	0.787	0.265~2.335
T/T	5	3(60.0)	2(40.0)	5.907	0.015	0.122	0.018~0.840

表3 C19007T 基因型与淋巴转移的关系[$n(\%)$]							
基因型	n	阳性	阴性	χ^2	P	OR	95%CI
C/C	58	18(31.0)	40(69.0)			1.000	
C/T	37	13(35.1)	24(64.9)	0.173	0.678	0.831	0.346~1.992
T/T	5	1(20.0)	4(80.0)	0.266	0.606	1.800	0.188~17.264



A:正常宫颈组织;B:C/C基因型患者的瘤组织;C:T/C基因型患者的瘤组织;D:T/T基因型患者的瘤组织

图3 caspase-3 蛋白在正常宫颈组织及瘤组织中的表达(IHC×200)

表4 3 种基因型的宫颈癌组织中的 caspase-3 蛋白表达水平[$n(\%)$]				
得分	n	基因型		
		CC	CT	TT
—	67	38(56.7)	25(37.3)	4(6.0)
+	17	10(58.8)	6(35.2)	1(6.0)
++	16	10(62.5)	6(37.5)	0(0)

2.4 免疫组织化学 瘤组织中 caspase-3 蛋白的表

达减少,免疫组织化学染色结果提示:阳性颗粒位于肿瘤细胞的细胞质中,部分间质细胞内亦有所发现。以上研究结果表明,caspase-3 蛋白的表达情况与rs1049216 的基因型类型(C/T、C/C、T/T)没有显著的关联($P=0.903$),见表4、图3。

3 讨论

在女性所有的生殖系统肿瘤中,宫颈鳞状细胞癌是最常见的恶性肿瘤之一。目前,宫颈鳞状细胞癌的致命性在全球引起广泛关注,在发展中国家的进展速度更为引人注目^[5]。宫颈鳞状细胞癌的发生、发展是个多因素参与的复杂过程,随着近年来的深入研究,众多研究表明,遗传因素的改变是引起宫颈鳞状细胞癌出现易感性的重要原因。遗传易感性虽然不能直接引起肿瘤,但会使肿瘤发生的可能性增加,而其中的 SNP 及其相关组合,可增加复杂性遗传病的发病风险^[6]。有研究表明,microRNA 结合位点的 SNP 可明显改变生物合成和/或相应的 microRNA 的功能表达,并由此增加恶性肿瘤的患病风险^[7]。同时,有大量研究表明,基因 3'-UTR 的 SNP 功能位点可大大增加恶性肿瘤发生的可能性^[8-9]。

caspase-3 是一种与细胞凋亡有关的蛋白,caspase-3 在整个细胞凋亡过程中发挥着关键作用^[10]。有研究表明,caspase-3 在宫颈鳞状细胞癌中表达减低,使得癌细胞在向周围正常组织及全身各器官的扩散转移速度加快。有文献报道,caspase-3 基因的多态性与许多种恶性肿瘤易感性有关^[11-12]。本研究显示,在 caspase-3 基因中的结合位点 C19007T 的 T/T 基因型可导致宫颈癌的发生。与 HPV 感染和宫颈鳞状细胞癌的临床分期都有显著的相关性。相关研究表明,SNP 的很多位点与多种肿瘤的转移与预后有关^[13-14]。

细胞增殖与凋亡失衡、促细胞凋亡的蛋白表达减少均会诱发肿瘤,而 caspase-3 在细胞的凋亡中极为重要。相关研究表明,caspase-3 在很多妇科恶性肿瘤中的表达出现变化^[15]。但 caspase-3 在宫颈鳞状细胞癌细胞中的表达可能与 C19007T 位点的多态性无明显相关性。

总之,caspase-3 基因 3'端非翻译区 microRNA 结合位点的 C19007T 可能与宫颈癌的淋巴转移无关,同时,caspase-3 的蛋白表达情况与 rs1049216 的多态性无明显相关性。这些发现可用于对易感人群进行宫颈鳞状细胞癌的筛查,对宫颈鳞状细胞癌的预防及治疗具有重要意义。

参考文献

[1] 李雪,孔为民,韩超,等.首都医科大学附属北京妇产医院1992—2011年间宫颈鳞状细胞癌发病趋势分析[J/CD].

- 中华妇幼临床医学杂志(电子版),2013,9(3):310-314.
- [2] DE MATOS L G, CÂNDIDO E B, VIDIGAL P V, et al. Association between Toll-like receptor and tumor necrosis factor immunological pathways in uterine cervical neoplasms[J]. *Tumori*, 2017, 103(1): 81-86.
 - [3] TAFURT-CARDONA Y, ACOSTA-ASTAIZA C P, SIERA-TORRES C H. The prevalence of abnormal cytology and inflammation and their association with risk factors for uterine cervical neoplasms in Cauca, Colombia[J]. *Rev Salud Publica (Bogota)*, 2012, 14(1): 53-66.
 - [4] WANG N, QIAN X Y, WANG S Z, et al. CCND1 rs9344 polymorphisms are associated with the genetic susceptibility to cervical cancer in Chinese population[J]. *Mol Carcinog*, 2012, 51(2): 196-205.
 - [5] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 61(2): 69-90.
 - [6] HINDS D A, STUVE L L, NILSEN G B, et al. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations[J]. *Science*, 2015, 307(5712): 1072-1079.
 - [7] CHEN A X, YU K D, FAN L, et al. Germline genetic variants disturbing the Let-7/LIN28 double-negative feedback loop alter breast cancer susceptibility[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(9): 1023-1029.
 - [8] MIN K T, KIM J W, JEON Y J, et al. Association of the miR-146aC>G, 149C>T, 196a2C>T, and 499a>G polymorphisms with colorectal cancer in the Korean population[J]. *Mol Carcinog*, 2012, 51(Suppl 1): S65-73.
 - [9] 尉春艳, 彭慧霞, 张熙, 等. TNF- α 基因-238 位点单核苷酸多态性与宫颈癌以及 HPV 感染的关系[J]. *山西医科大学学报*, 2014, 45(6): 468-471.
 - [10] CHRISTENSEN B C, MOYER B J, AVISSAR M, et al. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 30(6): 1003-1007.
 - [11] HOSGOOD H D, BARIS D, ZHANG YAWEI, et al. Caspase polymorphisms and genetic susceptibility to multiple myeloma[J]. *Hematol Oncol*, 2008, 26(3): 148-151.
 - [12] 倪勤. 生活方式因素、Caspase3 和 Caspase9 基因多态性与胃癌风险的流行病学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
 - [13] SMITS K M, PARANJAPPE T, NALLUR S, et al. A let-7 microRNA SNP in the KRAS 3' UTR is prognostic in early-stage colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(24): 7723-7731.
 - [14] 战祥波, 宫凤艳, 杨丽丽, 等. IL-17 单核苷酸多态性与宫颈癌的相关性研究[J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31(20): 4117-4118.
 - [15] 林碧华, 陈婧, 方炳雄, 等. miR-21 基因单核苷酸多态性与宫颈癌遗传易感的关联研究[J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2015, 9(10): 1835-1840.

(收稿日期: 2017-12-18 修回日期: 2018-10-09)

(上接第 4394 页)

- care unit admission, intensive care outcome, and post-intensive care survival in patients with de novo acute myeloid leukemia; a single center experience[J]. *Haematologica*, 2011, 96(2): 231-237.
- [6] 中美联合上海市白血病协作组. 上海市 623 例成人急性髓系白血病非选择病例的 WHO 亚型分布、初治疗效及预后[J]. *中华血液学杂志*, 2010, 31(2): 102-107.
 - [7] PORCU P, CRIPE L D, NG E W, et al. Hyperleukocytic leukemias and leukostasis; a review of pathophysiology, clinical presentation and management[J]. *Leuk Lymphoma*, 2000, 39(1/2): 1-18.
 - [8] 张瑞东, 王林娅, 郑胡镛. 世界卫生组织 2016 急性白血病分型解读[J]. *中华儿科杂志*, 2017, 55(1): 15-18.
 - [9] 李金明. 分子诊断技术引领医学临床实验发展[J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37(5): 321-323.
 - [10] 陈占国, 李艳, 童永清. 白血病分子诊断技术的研究进展[J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(3): 206-210.
 - [11] GIBSON B E, WEBB D K, HOWMAN A J, et al. Results of a randomized trial in children with Acute Myeloid Leukemia; Medical Research Council AML12 trial[J]. *Br J Haematol*, 2011, 155(3): 366-376.
 - [12] GALE R E, GREEN C, ALLEN C, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia[J]. *Blood*, 2008, 111(5): 2776-2784.
 - [13] CHAUHAN P S, IHSAN R, SINGH L C, et al. Mutation of NPM1 and FLT3 genes in acute myeloid leukemia and their association with clinical and immunophenotypic features[J]. *Dis Markers*, 2013, 35(5): 581-588.
 - [14] BROWN P, MCINTYRE E, RAU R, et al. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML[J]. *Blood*, 2007, 110(3): 979-985.
 - [15] MESHINCHI S, APPELBAUM F R. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(13): 4263-4269.

(收稿日期: 2018-06-10 修回日期: 2018-09-26)