

自噬相关基因 16L1 单核苷酸多态性与宫颈癌相关性研究*

刘亚敏, 赵凤容, 凌玲[△], 殷勤(重庆市红十字会医院/重庆市江北区人民医院 400020)

【摘要】目的 检测自噬相关基因(ATG)16L1 基因 rs2241880 位点的多态性, 研究该位点与宫颈癌是否具有相关性。**方法** 收集宫颈癌病例(病例组)及健康体检者(健康对照组)标本各 100 例, 提取细胞基因组 DNA 进行基因片段扩增, 观察琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物及 DNA 序列测定。**结果** ATG16L1 基因第 9 外显子第 47 位等位基因位点为等位基因多态性位点, 病例组与健康对照组 ATG16L1 基因型及等位基因频率分布比较无差异。**结论** 深入研究基因型变异等有利于揭示宫颈癌的发病机制, 为宫颈癌的早诊断、早治疗提供新思路。

【关键词】 宫颈癌; 自噬溶酶体; 单核苷酸多态性自噬相关基因 16L1 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.24.043 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)24-3722-02

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤, 高危型人乳头瘤病毒(HPV)感染是导致宫颈癌的主要原因之一^[1]。HPV 感染是宫颈癌发生过程中是必要的环境因素, 但近年众多研究表明, 个体遗传因素的改变也起非常重要的作用。免疫调节基因、癌基因及抑癌基因等内在因素的变化导致细胞稳态失衡, 可能是宫颈癌发生的重要原因^[2]。在肿瘤发生的研究中, 细胞自噬机制的作用受到越来越多的关注^[3]。自噬体系可能在细胞内发挥着抑制肿瘤发生的作用。自噬相关基因(ATG)16L1 是自噬相关基因之一, 在自噬体形成过程中, ATG16L1 与 ATG12、ATG5 组成聚合物, 引导 LC3 泛素化, 从而形成自噬体的外膜结构, 并促进自噬体外膜的分离和延伸^[4]。ATG16L1 的缺陷和突变引起自噬系统破坏, 从而造成免疫监视系统功能障碍, 并最终导致肿瘤发生。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 病例组 收集 2012 年 3 月至 2015 年 3 月来自重庆市红十字会医院及酉阳县人民医院就诊的宫颈癌患者 100 例, 所有患者确诊依据来源于宫颈活组织病理检查, 诊断符合国际标准, 宫颈病理学检查提示宫颈鳞癌/腺癌患者; 宫颈癌前病变及原位癌不纳入该研究。采集全血标本 3 mL, EDTA 抗凝, 本研究方案经重庆市红十字会医院医学伦理委员会批准, 所有研究对象均签署知情同意书。

1.1.2 健康对照组 收集 2012 年 3 月至 2015 年 3 月来自重庆市红十字会医院体检中心健康体检者 100 例, 有性生活史 1 年以上; 宫颈细胞学检查阴性; 无子宫颈锥切和子宫切除病史; 目前未怀孕; 无遗传性疾病家族史。采集全血标本 3 mL, EDTA 抗凝。

1.2 基因组 DNA 提取 采集 EDTA 抗凝静脉血 3 mL, 采用离心柱法(大连宝生物)提取细胞基因组 DNA, 具体操作按照试剂说明书进行。以紫外分光光度法测定基因组 DNA 纯度和浓度, -80 °C 低温保存备用。

1.3 基因片段扩增 根据国外文献报道的 ATG16L1 基因的多态性位点 rs2241880 位于第 9 外显子, 以 primer design5 软

件设计引物, 扩增包含该位点的 DNA 片段。上游引物为 5'-ATT TGA TGA GGA GTA AAC CTC TG-3', 下游引物为 5'-GGG GCT GAA GCA TAC TTA CT-3', 产物 200 bp 左右。PCR 体系为 50 μL: 其中 DNA 模板 500 ng, PCR 上、下游引物各 20 pmol, Taq DNA 聚合酶 2.5 U, dNTP 及镁离子常规剂量, 以去离子水补充至 50 μL。

1.4 PCR 扩增条件 94 °C 预变性 5 min; 4 °C 变性 30 min, 55 °C 退火 30 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 min 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物, 观察条带大小是否符合预期。产物 4 °C 保存备用。

1.5 测序 PCR 产物进行 DNA 序列测定, 由生物技术公司完成。ATG16L1 第 9 外显子 47 位为多态性位点, 苏氨酸 ACT 变为丙氨酸 GCT, 测序可能出现以下情况: 纯合突变 GG, 黑色单峰; 纯合突变 AA, 绿色单峰; 杂合突变 G/A, 黑绿双峰。HPV 的检测以荧光定量 PCR 检测 HPV DNA 量, 并进行基因型分析。

1.6 统计学处理 所有统计处理采用 SPSS19.0 软件分析。根据所测位点各基因型分布计算基因型和等位基因频率, 并行 Hardy-weinberg 平衡检验评估病例组和健康对照组具有代表性基因型; 采用 χ^2 检验比较各组间基因频率和等位基因频率, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。以优势率(OR)及其 95% 可信区间(95% CI)表示各基因型发生频率在不同比较组间的相对危险度, 其相对危险度近似估计值比值和估计各研究因素与宫颈癌发病风险的关系, 所有统计检验均为双侧概率检验。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物电泳结果 结果显示, 病例组及健康对照组 PCR 扩增产物电泳产物在 MAKER 100~200 bp 处均可见明亮条带, 提示扩增产物应为 193 bp。

2.2 PCR 产物核苷酸序列测定 测序结果显示, ATG16L1 基因第 9 外显子第 47 位等位基因位点为等位基因多态性位点, 该位点由苏氨酸突变为丙氨酸(ACT 变为 GCT)。

2.3 ATG16L1 基因测序结果 病例组与健康对照组比较, 两组标本遗传平衡检验差异无统计学意义($P > 0.05$), 由此表明

* 基金项目: 重庆市卫生局科研资助项目(2012-2-370)。

[△] 通讯作者, E-mail: 381250530@qq.com。

标本具有代表性。病例组与健康对照组 ATG16L1 基因型及等位基因频率分布比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。

表 1 两组基因测序结果 [$n(\%)$]

组别	n	基因型			等位基因频率
		G/G	A/A	G/A	
病例组	100	37(37)	20(20)	53(53)	53(53)
健康对照组	100	38(38)	19(19)	52(52)	52(52)

2.4 ATG16L1 基因主要表达于上皮细胞、淋巴细胞及巨噬细胞 其编码的 ATG16L1 蛋白与自噬蛋白形成复合物, Cadwell 等报道了 ATG16L1 在 Paneth 细胞中的独特作用。Paneth 细胞是小肠内的一种上皮细胞, 分泌 ATG16L1 蛋白, 含有抗菌肽和溶菌酶颗粒; 异常 Paneth 细胞分泌颗粒缺乏, 导致清除微生物能力下降。ATG16L1 缺陷会阻断 ATG12-ATG5 结合到细胞膜, 从而影响微管连接蛋白 1 轻链 3 结合到磷脂酰乙醇胺, 最后影响自噬体形成, 导致自噬过程障碍及一系列病原体清除能力下降。另外, 在缺乏 ATG16L1 表达的巨噬细胞中在细菌内毒素刺激下会产生大量炎性反应性因子, 如白细胞介素-1 和白细胞介素-18。

3 讨论

宫颈癌是妇科最常见的恶性肿瘤。目前认为宫颈 HPV 感染是宫颈癌发生的基本原因, 但仅有一小部分 HPV 感染者最终发生宫颈癌, 提示其他因素和宿主遗传易感性影响 HPV 感染的结局^[5]。肿瘤遗传水平的改变包括: 基因结构的异常改变, 如单核苷酸多态性、微卫星不稳定性、基因组拷贝数增加或减少、基因扩增、重排和缺失等, 这类效应并不改变基因序列, 但影响基因表达状况^[6]。其中单核苷酸多态性 (SNP) 是指基因水平上由单个核苷酸的变异引起的 DNA 序列多态性, 它是人类可遗传变异中最为常见的一种, SNP 在人类基因组中广泛存在, 估计其总数可达 300 个以上。SNP 所表现的多态性只涉及单个碱基的变异, 这种变异可由单个碱基的转换、颠换、插入及缺失所引起, 其可引起基因表达水平及表达产物功能的改变导致疾病发生, 成为复杂性疾病的危险因素之一。近年研究表明, 一些基因的 SNP 与宫颈癌的发生具有相关性^[7]。有研究报道, 细胞表面分子 CD83 基因的 SNP 位点 rs750749、rs9296925 和 rs9370729 与宫颈癌易感性具有相关性。钱年凤等^[8]报道, 炎性因子白细胞介素-1B 的 SNP 位点 C511T 与宫颈癌易感性有显著性相关。其他一些基因多态性位点也被研究证实可能与宫颈癌易感性相关, 包括人类白细胞抗原 DRB1、细胞色素 p450 1A1、p53 codon 72、白细胞介素-8、基质金属蛋白酶等^[9-11]。这些报道表明, 宫颈癌作为一种复杂性疾病, 可能有多种遗传因素与之相关。本研究通过对 100 例宫颈癌患者及 100 例健康者的血液标本进行采集, 采用 PCR 和基因测序技术, 检测 ATG16L1 基因 rs2241880 位点的多态性, 研究该位点与宫颈癌是否具有相关性; 提取细胞基因组 DNA; 以紫外分光光度法测定基因组, 以荧光定量 PCR 检测 HPV DNA 量, 并进行基因型分析。ATG16L1 基因测序 HH

BGHXXXXXXB 结果显示, 病例组与健康对照组比较, 两组标本遗传平衡检验差异无统计学意义 ($P>0.05$), 表明样本具有代表性。病例组与健康对照组 ATG16L1 基因型及等位基因频率分布比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

细胞自噬是近年来生命科学的研究热点之一, 其与肿瘤的相关性研究仍处于起步阶段, 尝试解答多态性与宫颈癌相关性的机制, 但肿瘤的发生和发展是一个多因素、多阶段及多基因变异的综合病变过程。深入研究这些基因, 将有利于进一步揭示宫颈癌的发病机制, 为宫颈癌的早期诊断、治疗疗效、预后评价和指导开发新的抗肿瘤药物提供新思路, 彻底了解遗传因素在宫颈癌发生和发展中的作用, 有待更深入、更大规模的研究。

参考文献

- [1] Sheinfeld Gorin SN, Glenn BA, Perkins RB. The human papillomavirus (HPV) vaccine and cervical cancer: uptake and next steps[J]. Adv The, 2011, 28(8): 615-639.
- [2] Horn LC, Raptis G, Fischer U. Familial cancer history in patients with carcinoma of the cervix uteri[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002, 101(1): 54-57.
- [3] Deretic V, Levine B. Autophagy, Immunity, and microbial adaptations[J]. Cell Host Microbe, 2009, 5(6): 527-549.
- [4] Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate[J]. Cell, 2003, 116 (Pt 9): 1679-1688.
- [5] 丰有吉, 沈鑑. 妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 325-331.
- [6] 陈杰, 李甘地. 病理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 148-150.
- [7] Yu KJ, Rader JS, Borecki I, et al. CD83 Polymorphisms and cervical cancer risk[J]. Gynecol Oncol, 2009, 114(2): 319-322.
- [8] 钱年凤, 韩素萍, 陈小军. 等. IL-1B 及 IL-1R 基因多态性与江苏地区宫颈癌遗传易感性相关[J]. 南京医科大学学报, 2008, 28(5): 629-634.
- [9] 黄金双, 林蓓, 齐跃, 等. 人类白细胞抗原 DRB1 等位基因多态性与子宫颈癌易感性的相关性研究[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(10): 715-716.
- [10] 石玉荣, 耿建, 程龙强. 细胞色素 P4501A1 基因多态性与宫颈癌的相关性[J]. 复旦学报, 2011, 38(5): 428-431.
- [11] Wu S, Lu S, Tao H, et al. Correlation of polymorphism of IL-8 and MMP-7 with occurrence and lymph node metastasis of early stage cervical cancer[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011, 31(1): 114-119.

(收稿日期: 2015-06-13 修回日期: 2015-08-22)