

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.08.028

IL-17 启动子区基因多态性与宫颈鳞状细胞癌易感性的相关性研究^{*}

刘素芹¹, 孟 丽¹, 金 玮¹, 祁 新¹, 章建国^{2△}

(1. 江苏省淮安市淮阴医院妇科 223300; 2. 南通大学附属医院病理科, 江苏南通 226000)

摘 要:目的 研究 IL-17 启动子区基因多态性与宫颈鳞状细胞癌易感性的相关性。方法 用 TaqMan 探针法检测 IL-17 启动子区 rs2275913(G/A)、rs8193037(G/A)和 rs763780(C/T)基因型。通过分层分析探讨年龄、初产年龄、吸烟、饮酒和肿瘤家族史对患宫颈鳞状细胞癌的影响。结果 rs2275913 和 rs763780 与个体患宫颈鳞状细胞癌风险无关。携带 rs8193037 AG 基因型者患宫颈鳞状细胞癌的风险性 $OR=1.77(95\%CI: 1.13\sim2.76)$, 其显性模型风险性 $OR=1.70(95\%CI: 1.10\sim2.63)$, 相加模型风险性 $OR=1.55(95\%CI: 1.03\sim2.34)$, 差异均有统计学意义, 提示 rs8193037 基因型患宫颈鳞状细胞癌风险性升高。分层分析结果显示, 在初产年龄小(≤ 24 岁)及年龄大(>45 岁)的个体中, 携带 rs8193037 A 等位基因型患宫颈鳞状细胞癌的危险性升高(初产年龄 ≤ 24 岁: $OR=1.2, 95\%CI: 1.03\sim1.39$; 年龄 >45 岁: $OR=1.18, 95\%CI: 1.00\sim1.39$)。结论 携带 rs8193037 A 等位基因型个体患宫颈鳞状细胞癌风险性升高, 可能与宫颈鳞状细胞癌易感性有关, 其中初产年龄小(≤ 24 岁)及年龄大(>45 岁)的个体携带 rs8193037 A 等位基因型患宫颈鳞状细胞癌的危险性升高。rs2275913 及 rs763780 基因型未发现与患宫颈鳞状细胞癌风险性相关。

关键词: 白细胞介素-17; 基因多态性; 宫颈鳞状细胞癌; 易感性

中图分类号: R737.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)08-1147-04

在妇科恶性肿瘤中以宫颈癌最为常见, 病因尚未完全明了, 90% 以上的宫颈癌组织人乳头状瘤病毒(HPV)呈阳性^[1], HPV 已被认为是宫颈癌及其癌前病变的主要病因, 其中高危型 HPV 持续性感染与宫颈癌的发病密切相关^[2]。HPV 感染是慢性炎症过程, 在宫颈癌的发生、发展中起重要作用。目前认为宫颈癌是一种炎症性肿瘤, 对宫颈癌的研究多集中在炎症因子方面。

白细胞介素(IL)-17 是一种具有促炎作用的前炎症细胞因子, 与宫颈癌有着非常紧密的关系, IL-17 能促进血管生成, 加速肿瘤侵袭性及生长速度, 同时 IL-17 可促进宫颈癌细胞 IL-8 和 IL-6 的分泌, 这两种白细胞介素均能加速血管生成、促进宫颈肿瘤细胞生长^[3]。HPV 感染的人群中, 宫颈组织内 IL-17 含量高的也只有部分个体最终会发展为宫颈癌, 提示了可能存在个体遗传易感性因素。机体间炎症因子差异主要取决于炎症因子基因多态性, 炎症因子的基因多态性同肿瘤的发生密切相关。本研究采用分子流行病学病例-对照的研究方法, 并结合生活习惯、环境危险因素暴露量进行综合分析, 用 TaqMan 探针法检测 IL-17 启动子区 rs2275913(G/A)、rs8193037(G/A)和 rs763780(C/T)基因型, 探讨其基因多态性与宫颈鳞状细胞癌易感性的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 7 月至 2015 年 7 月在淮阴医院就诊的宫颈鳞状细胞癌患者 239 例为研究

组, 年龄 31~78 岁, 平均(45.0 $\pm$ 9.4)岁, 所有病例均经宫颈活检或手术病理检查证实。随机选自同时期在淮阴医院体检的且未检出宫颈病变的健康女性 247 例为对照组, 年龄 29~76 岁, 平均(44 $\pm$ 8.9)岁。两组年龄分布比较差异无统计学意义($P>0.05$)。所有入选对象为汉族, 签署知情同意书, 获得了淮阴医院医学伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 用 EDTA 抗凝管采集外周静脉血 5 mL, 在半小时内离心、分装, 置于 EP 管 -20℃ 冻存。

1.2.2 DNA 的提取 采用沉淀法提取 DNA(天根), 吸取 500 μ L, 添加 750 μ L 细胞裂解液(CL), 颠倒混匀 15 次, 12 000 r/min 离心 2~3 min 弃去上清液, 添加 500 μ L CL 涡旋混匀 15 s, 12 000 r/min 离心 2~3 min 弃去上清液。加入 250 μ L 缓冲液 FG 和蛋白酶 K(100:1) 的混合液后涡旋混匀, 65℃ 水浴 15 min, 添加 250 μ L 异丙醇, 充分颠倒混匀 10 min, 12 000 r/min 离心倒掉上清液, 加入 250 μ L 无水乙醇, 12 000 r/min 离心弃去上清液, 干燥 DNA 沉淀, 加入适量的洗脱缓冲液, 低速涡旋 5 s, 在室温放置 3~4 d, 紫外分光光度法测量浓度后置于 -20℃ 冰箱保存。

1.2.3 基因分型 TaqMan 方法对 IL-17 rs2275913、rs763780 和 rs8193037 进行基因分型。采用 TaqMan® Universal PCR Master Mix 和合适浓度的引物及探针进行 PCR 反应, 使用 7900FAST 型荧光定量 PCR 仪完成

^{*} 基金项目: 淮安市淮阴区科学技术局社会发展科技支撑项目(HYS201202)。

[△] 通信作者, E-mail: zangjg125@163.com。

目的片段扩增和基因型检测。

1.3 统计学处理 采用 SAS9.1.3 统计软件进行分析。计数资料以率表示,采用 χ^2 检验进行比较。单因素和多因素 Logistic 回归计算比值比(OR)及其 95%CI,构建遗传评价模型,分析各基因型与宫颈鳞状细胞癌发生危险性的关系,并对各因素进行分层分析。所有的统计检验均为双侧检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 研究组与对照组一般资料比较 两组在年龄构成、吸烟、饮酒及肿瘤家族史方面差异无统计学意义($P>0.05$),在初产年龄构成上的差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 研究组与对照组的一般资料比较[n(%)]				
项目	研究组(n=239)	对照组(n=247)	χ^2	P
年龄(岁)				
≤45	115(48)	121(49)	0.040	0.848
>45	124(52)	126(51)		
初产年龄(岁)				
>24	69	29(114)	46(462.8)	<0.001
≤24	170(71)	133(54)		
吸烟(n)				
是	17(7)	20(8)	0.170	0.683
否	222(93)	227(92)		
饮酒				
是	31(13)	37(15)	0.410	0.523
否	208(87)	210(85)		
肿瘤家族史				
是	19(8)	12(5)	1.940	0.163
否	220(92)	235(95)		
病理分级				
高分化	46(19)	—		
中分化	164(69)	—		
低分化	29(12)	—		

注:—为无数据

2.2 rs2275913、rs8193037 和 rs763780 基因型与宫颈鳞状细胞癌易感性的关联分析 经多因素 Logistic 回归分析,对照组基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡($P=1.000$)。结果显示:(1)携带 rs2275913 AG 基因型个体宫颈鳞状细胞癌的风险性为 1.11($P>0.05,95\%CI:0.74\sim1.67$)。显性模型中携带 AG/AA 基因型个体患宫颈鳞状细胞癌的风险性为 1.05($P>0.05,95\%CI:0.71\sim1.55$)。相加模型中携带 A 基因型个体患宫颈鳞状细胞癌的风险性为 0.97($P>0.05,95\%CI:0.74\sim1.25$),rs2275913 基因型与患宫颈鳞状细胞癌的风险性无相关性。(2)携带 rs8193037 AG 基因型者患宫颈鳞状细胞癌风险性升高,患宫颈鳞状细胞癌的风险性为 1.77($P<0.05,95\%CI:1.13\sim2.76$)。显性模型中携带 AG/AA 等位基因型个体患宫颈鳞状细胞癌的风险性为 1.70($P<0.05,95\%CI:1.10\sim2.63$)。相加模型中携带 A 等位基因型个体罹患宫颈鳞状细胞癌的风险性为 1.55($P<0.05,95\%CI:1.03\sim2.34$)。(3)携带

rs763780 CT 基因型者患宫颈鳞状细胞癌的风险性为 1.05($P>0.05,95\%CI:0.65\sim1.69$)。显性模型中携带 CT/CC 基因型个体患宫颈鳞状细胞癌的风险性为 0.98($P>0.05,95\%CI:0.62\sim1.56$);相加模型中携带 C 等位基因个体患宫颈鳞状细胞癌的风险性为 0.92($P>0.05,95\%CI:0.60\sim1.40$),rs763780 基因型与患宫颈鳞状细胞癌的风险性无相关性。见表 2。

表 2 两组中各基因型位点的遗传评价模型的风险性				
基因型	研究组(n)	对照组(n)	OR(95%CI)	P ^a
rs2275913	239	247	P_{HWE}	1.000
GG	71	76	作为参照	
AG	128	123	1.11(0.74~1.67)	0.604
AA	40	48	0.89(0.53~1.52)	0.673
相加模型			0.97(0.74~1.25)	0.793
显性模型			1.05(0.71~1.55)	0.799
隐性模型			0.83(0.52~1.32)	0.441
			$P_{趋势}$	0.649
rs8193037	239	247		0.450
GG	176	204		
AG	61	40	1.77(1.13~2.76)	0.012
AA	2	3	0.77(0.13~4.68)	0.779
相加模型			1.55(1.03~2.34)	0.034
显性模型			1.70(1.10~2.63)	0.018
隐性模型			0.69(0.11~4.14)	0.682
			$P_{趋势}$	0.041
rs763780	239	247		0.276
TT	196	202		
CT	42	41	1.05(0.65~1.69)	0.838
CC	1	4	0.26(0.03~2.31)	0.225
相加模型			0.92(0.60~1.40)	0.692
显性模型			0.98(0.62~1.56)	0.932
隐性模型			0.25(0.03~2.29)	0.222
			$P_{趋势}$	0.465

注:^a 调整变量年龄后 P 值

2.3 携带 rs8193037 AG/AA 基因型与宫颈鳞状细胞癌危险性的分层分析 初产年龄≤24 岁及年龄>45 岁者携带 rs8193037 A 基因型者患宫颈鳞状细胞癌的危险性均升高,危险性分别为 1.20($P<0.05,95\%CI:1.03\sim1.39$)、1.18($P<0.05,95\%CI:1.00\sim1.39$)。有吸烟、饮酒和肿瘤家族史者携带 A 基因型罹患宫颈鳞状细胞癌的危险性无升高,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 携带 rs8193037 AG/AA 与宫颈鳞状细胞癌危险性分层分析				
项目	分型(研究组/对照组,n/n)		OR(95%CI)	P
	GG	AG/AA		
年龄(岁)				
≤45	86/91	29/30	0.99(0.86~1.15)	0.940
>45	80/96	44/30	1.18(1.00~1.39)	0.045
初产年龄(岁)				
>24	50/86	19/28	1.04(0.87~1.25)	0.660
≤24	108/101	62/32	1.20(1.03~1.39)	0.019

续表 3 携带 rs8193037 AG/AA 与宫颈鳞状细胞癌危险性分层分析

项目	分型(研究组/对照组,n/n)		OR(95%CI)	P
	GG	AG/AA		
吸烟				
是	13/15	4/5	0.98(0.68~1.41)	0.917
否	158/172	64/55	1.07(0.96~1.20)	0.239
饮酒				
是	23/28	8/9	1.02(0.77~1.35)	0.889
否	158/156	50/54	0.98(0.88~1.09)	0.692
肿瘤家族史				
是	12/9	7/3	1.19(0.74~1.91)	0.477
否	167/176	53/59	0.99(0.89~1.09)	0.801

3 讨 论

宫颈癌是发展中国家最常见的恶性肿瘤之一,我国是宫颈癌高发国家,发病高峰年龄为 45~55 岁,给患者心理带来巨大压力以及脱离社会群体的痛苦^[4-6]。宫颈癌的发病与高危型 HPV 持续性感染密切相关,机体在感染 HPV 后,在宫颈局部组织产生炎症反应,过量的炎症因子释放导致局部组织炎症反应性损伤^[7]。宫颈癌发生与多种炎症介质有关,大量研究证实了 IL 在宫颈癌发生、发展中起重要作用。IL-17 主要通过促进前炎性细胞因子的释放发挥放大炎症反应的作用,在促进细胞增殖、促进多种炎症因子释放以及中性粒细胞募集等方面均有明显作用,同时参与机体免疫应答、炎症反应及自身免疫性疾病。IL-17A 可以促进宫颈癌细胞的迁移和侵袭,经过治疗的宫颈癌患者宫颈脱落细胞中 IL-17 的水平明显减少;血清 IL-17 水平与宫颈癌分化程度呈负相关,肿瘤分化程度越高,水平越低^[8-10]。IL-17 与宫颈癌的发生、发展有密切联系。

基因的变化被认为是对环境致癌物易感性的主要决定因素,单核苷酸多态性(SNP)是人类可遗传的变异中最常见的一种。研究者发现,IL-17 基因的多态性与宫颈癌易感性有关,可能在宫颈癌的发病机制中起着重要的作用。QUAN 等^[11]研究 rs2275913 及 rs763780,发现 rs2275913 与宫颈癌易感性相关,患宫颈癌的风险增加相关,也与脉管癌栓阳性及高临床分期有关。CONG 等^[12]研究 rs2275913、rs3748067 及 rs763780 与宫颈癌的风险,发现 rs2275913 多态性可能影响共显性和显性模型在宫颈癌的发展,表明 IL-17 可能参与了宫颈癌的发生、发展。本研究显示,携带 rs763780 CT 基因型者患宫颈鳞状细胞癌的风险性为 1.05($P>0.05$,95%CI:0.65~1.69),其相加模型及显性模型差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究未发现 rs763780 基因型与患宫颈鳞状细胞癌的风险性有显著性关联,与上述研究结果一致。携带 rs2275913 AG 基因型个体患宫颈鳞状细胞癌的风险

性为 1.11($P>0.05$,95%CI:0.74~1.67),其相加模型及显性模型差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究亦未发现 rs2275913 基因型与患宫颈鳞状细胞癌的风险性有明显相关,与上述研究结果不一致,笔者分析可能其他的遗传多态性影响了宫颈癌的发展,本研究的样本数量较小,可能会限制发现两组之间的差异,也可能与本研究仅选取了宫颈鳞状细胞癌病例有关。携带 rs8193037 AG 基因型者患宫颈鳞状细胞癌风险性升高,差异有统计学意义($P<0.05$),患宫颈鳞状细胞癌的风险性为 1.77($P<0.05$,95%CI:1.13~2.76),其相加模型及显性模型差异有统计学意义($P<0.05$),提示 rs8193037(G/A)基因型患宫颈鳞状细胞癌风险性升高,可能该基因型与宫颈鳞状细胞癌易感性相关,可能参与了宫颈鳞状细胞癌的发生、发展过程。

早年分娩、过早性行为、多孕多产、吸烟及多个性伴侣等与宫颈癌发生有关。本研究显示,研究组初产年龄 ≤ 24 岁比例为 71%,而对照组为 54%,两组人群在初产年龄构成上的差异有统计学意义($P<0.05$),初产年龄小(≤ 24 岁)可能与宫颈鳞状细胞癌发生相关。女性感染 HPV 有两个高峰:年龄 <25 岁及年龄在 55 岁或以上,女性生殖道局部和系统随着年龄增长和性经历将被致敏并发育成熟,其抗病能力也随之增强,故而未经致敏年轻妇女易受 HPV 感染^[13-14]。随着年龄的增长,以及围绝经期女性体内雌、孕激素水平下降,女性免疫力逐渐下降,HPV 感染率有所升高^[15]。笔者分层分析发现:初产年龄 ≤ 24 岁者携带 rs8193037A 基因型者患宫颈癌的危险性升高,这可能与宫颈受创伤早,免疫系统不成熟,女性处于 HPV 感染第一高峰及对致癌物易感有关。年龄 >45 岁者携带 rs8193037A 基因型者患宫颈癌的危险性升高,这可能与免疫力下降及女性处于 HPV 感染第二高峰有关。

综上所述,本研究未发现 rs2275913 和 rs763780 基因型与患宫颈鳞状细胞癌风险性相关,发现携带 rs8193037 A 等位基因型个体患宫颈鳞状细胞癌风险性升高,其中初产年龄小(≤ 24 岁)及年龄大(>45 岁)的个体携带 rs8193037 A 等位基因患宫颈鳞状细胞癌的危险性升高,提示 rs8193037 A 等位基因型可能与宫颈鳞状细胞癌易感性相关,可能参与了宫颈鳞状细胞癌发生发展过程,但其确切机制尚需进一步研究。本研究样本数量较小,需要大样本量进一步研究证实。

参考文献

[1] ANDERSSON S, RYLANDER E, LARSSON B, et al. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(2): 246-250.

[2] RONCO G, GIORGI-ROSSI P, CAROZZI F, et al. Efficacy

- cy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(3):249-257.
- [3] JOHANSSON C, SCHWARTZ S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation[J]. Nat Rev Microbiol, 2013, 11(4):239-251.
- [4] NANDAKUMAR A, RAMNATH T, CHATURVEDI M. The magnitude of cancer cervix in India[J]. Indian J Med Res, 2009, 130(3):219-221.
- [5] 连利娟. 林巧稚妇科肿瘤学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000:267.
- [6] 赵娟, 杨奕梅, 李琼珠. IL-16 基因多态性与宫颈癌相关性的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(16):1205-1207, 1220.
- [7] 梁冠盈, 迟秋君, 傅瑶, 等. HPV 感染及 IL-1 β 、IL-6、IL-13 的表达与子宫颈癌临床相关性分析[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2013, 47(6):490-494.
- [8] FENG M J, WANG Y D, CHEN K L, et al. IL-17A promotes the migration and invasiveness of cervical cancer cells by coordinately activating MMPs expression via the p38/NF-kappa B signal pathway[J]. PLoS One, 2014, 9(9):e108502.
- [9] 张哲雄. IL-17 在宫颈癌患者中的表达[J]. 放射免疫学杂志, 2011, 24(5):599.
- [10] 胡洁. 宫颈癌患者血清中 IL-17 水平的检测及临床意义[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(1):204-205.
- [11] QUAN Y, ZHOU B, WANG YY, et al. Association between IL17 polymorphisms and risk of cervical cancer in Chinese women[J]. Clin Dev Immunol, 2012(6):258-293.
- [12] CONG J, LIU R, WANG X, et al. Association between interleukin-17 gene polymorphisms and the risk of cervical cancer in a Chinese population[J]. Int Clin Exp Pathol, 2015, 8(8):9567-9573.
- [13] HERRERO R, HILDESHEIM A, BRATTI C, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(6):464-474.
- [14] 梁立治, 尧良清, 黄欣, 等. 35 岁以下子宫颈癌 235 例临床分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2000, 16(9):545-546.
- [15] 由卫芝, 王玉桂, 焦盈盈, 等. 山东省聊城市子宫颈细胞学异常患者高危型人乳头瘤病毒感染状况[J]. 肿瘤研究与临床, 2015, 27(10):694-697, 702.

(收稿日期:2017-09-12 修回日期:2017-11-22)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.08.029

某院健康孕妇不同孕期血浆 D-二聚体参考范围的建立^{*}

彭传梅, 高 辉, 王 杨, 刘云芳[△], 程 云

(云南省昆明市延安医院医学检验科 650051)

摘 要:目的 初步建立该院健康孕妇不同孕期血浆 D-二聚体(D-D)的参考范围。方法 将 2014 年 1 月至 2016 年 12 月到该院进行产检或生产的健康孕妇 3 120 例按年龄分为 <30 岁组(1 514 例)和 ≥30 岁组(1 606 例);按孕周不同分为 5 组:A 组(孕 ≤13 周)462 例, B 组(孕 14~20 周)733 例, C 组(孕 21~27 周)648 例, D 组(孕 28~34 周)626 例, E 组(≥35 周)651 例。将同期该院体检的健康非孕妇女 320 例作为健康非孕组。在 Sysmex CS5100 上采用免疫比浊法定量测定各研究对象的血浆 D-D 水平, 并对检测结果进行比较。孕妇血浆 D-D 水平为偏态分布, 采用中位数(四分位间距)描述数据, 并采用第 95 位百分位数(P_{95})表示参考区间的单侧上限。结果 <30 岁组与 ≥30 岁组的孕妇血浆 D-D 水平分别为 0.86(0.62~1.17)、0.83(0.56~1.27) mg/L, 差异无统计学意义($U=30\ 576.00, P>0.05$);健康非孕组、A 组、B 组、C 组、D 组、E 组的血浆 D-D 水平分别为 0.26(0.16~0.38)、0.34(0.20~0.53)、0.52(0.32~0.72)、0.88(0.60~1.32)、0.99(0.66~1.62)、1.49(0.99~2.32) mg/L。A 组、B 组、C 组、D 组、E 组的血浆 D-D 水平分别与健康非孕组进行比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。A 组、B 组、C 组、D 组、E 组之间两两比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。健康非孕组、A 组、B 组、C 组、D 组、E 组的血浆 D-D 参考范围分别为 ≤0.49、≤1.30、≤1.48、≤2.41、≤3.25、≤4.70 mg/L。结论 初步建立了该院健康孕妇在不同孕期的血浆 D-D 参考范围。

关键词:健康孕妇; D-二聚体; 参考范围**中图法分类号:**R446.11+1**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2018)08-1150-04

D-二聚体(D-D)是交联纤维蛋白的特异性降解产物之一, 为继发性纤溶所特有的代谢产物, 其水平增

高是纤维蛋白血栓形成后继发纤溶的结果, 可作为体内血栓形成的指标之一。持续性的血浆 D-D 水平增

* 基金项目:昆明市卫生科技人才培养项目暨“十百千”工程科研项目(2015SWRC017);昆明市延安医院 2013 年院内课题。

[△] 通信作者, E-mail:meizimh@sina.com。