

叶酸与甲基-CpG-结合蛋白2基因表达在宫颈癌变中的关系及交互作用

李巧玲 丁玲 南晶 刘春亮 杨作凯 陈芳 梁雅丽 王金桃

030001 太原,山西医科大学公共卫生学院流行病学教研室

通信作者:王金桃, Email:wangjt59@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.07.016

【摘要】 目的 探讨叶酸和甲基-CpG-结合蛋白2(MeCP2)表达在宫颈癌变中的交互作用。方法 选择经病理学确诊的宫颈鳞状细胞癌(SCC)患者41例,宫颈上皮内瘤样变(CIN)患者71例(34例CIN1和37例CIN2+)及61名宫颈正常(NC)妇女为研究对象。采用微生物法检测血清叶酸和红细胞叶酸水平,Western blot法和荧光定量PCR法检测宫颈组织中MeCP2蛋白和mRNA的表达量。利用SPSS 20.0软件进行相关资料的Kruskal-Wallis H 检验、 χ^2 检验、 χ^2 趋势检验和Spearman秩相关分析,应用广义多因子降维模型(GMDR)评价交互作用。结果 随着宫颈病变程度的加重,血清叶酸($H=44.71, P<0.001$;趋势检验 $\chi^2=24.48, P<0.001$)和红细胞叶酸($H=5.28, P<0.001$;趋势检验 $\chi^2=3.83, P<0.05$)水平均呈逐渐降低趋势,且血清叶酸和红细胞叶酸水平呈正相关($r=0.270, P<0.001$);MeCP2蛋白($H=33.72, P<0.001$;趋势检验 $\chi^2=14.74, P<0.001$)和mRNA($H=19.50, P<0.001$;趋势检验 $\chi^2=10.74, P<0.001$)表达量随着宫颈病变的进展均呈逐渐升高趋势;叶酸水平与MeCP2蛋白表达量呈负相关(血清叶酸: $r=-0.226, P=0.003$;红细胞叶酸: $r=-0.164, P=0.004$)。GMDR交互作用分析表明,在SCC组和CIN2+组,血清叶酸和红细胞叶酸缺乏,MeCP2蛋白高表达与MeCP2mRNA高表达呈现交互作用。结论 叶酸缺乏和MeCP2基因异常高表达可增加宫颈癌及其癌前病变的风险,血清叶酸缺乏、红细胞叶酸缺乏、MeCP2蛋白高表达和MeCP2mRNA高表达在宫颈癌变的发展过程中具有协同作用。

【关键词】 叶酸;甲基-CpG-结合蛋白2;宫颈癌变;交互作用

基金项目:国家自然科学基金(30872166,81273157,81473060);国家卫生和计划生育委员会公益性行业科研专项(201402010);山西省自然科学基金(2008011075-1)

Relationship and interaction between folate and expression of methyl-CpG-binding protein 2 in cervical cancerization Li Qiaoling, Ding Ling, Nan Jing, Liu Chunliang, Yang Zuokai, Chen Fang, Liang Yali, Wang Jintao

Department of Epidemiology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China
Corresponding author: Wang Jintao, Email:wangjt59@163.com

【Abstract】 Objective To explore the interaction between folate and the expression of methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) in cervical cancerization. **Methods** Forty one patients diagnosed with cervical squamous cell carcinoma (SCC), 71 patients diagnosed with cervical intraepithelial neoplasm (CIN1, $n=34$; CIN2+, $n=37$) and 61 women with normal cervix (NC) were recruited in this study. Microbiological assay was conducted to detect the levels of serum folate and RBC folate, Western blot assay and real-time PCR were performed to detect the expression levels of MeCP2 protein and mRNA, respectively. The data were analyzed by Kruskal-Wallis H test, χ^2 test, trend χ^2 test and Spearman correlation with SPSS statistical software (version 20.0), and the interaction were evaluated by using generalized multifactor dimensionality reduction (GMDR) model. **Results** The levels of serum folate ($H=44.71, P<0.001$; trend $\chi^2=24.48, P<0.001$) and RBC folate ($H=5.28, P<0.001$; trend $\chi^2=3.83, P<0.05$) decreased gradually along with the severity of cervical lesions. There was a positive correlation between serum folate level and RBC folate level ($r=0.270, P<0.001$). The expression levels of MeCP2 protein ($H=33.72, P<0.001$; trend $\chi^2=14.74, P<0.001$) and mRNA ($H=19.50, P<0.001$; trend $\chi^2=10.74, P<0.001$) increased gradually along with the severity of cervical lesions. There were negative correlation between folate level and the expression level of MeCP2 protein (serum folate: $r=-0.226, P=0.003$; RBC folate: $r=-0.164, P=$

0.004)。Moreover, the results by GMDR model revealed there were interaction among serum folate deficiency, RBC folate deficiency, MeCP2 protein high expression and MeCP2 mRNA high expression in SCC and CIN2 + patients. **Conclusion** Folate deficiency and high expression of MeCP2 gene might increase the risk of cervical cancer and its precancerous lesions through interaction among serum folate deficiency, RBC folate deficiency, MeCP2 protein high expression and mRNA high expression in the progression of cervical cancerization.

【Key words】 Folate acid; Methyl-CpG-binding protein 2; Cervix carcinogenesis; Interaction

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (30872166, 81273157, 81473060); National Nonprofit Scientific Research Industry Special Fund of Health and Family Planning Commission of China (201402010); Natural Science Foundation of Shanxi Province (2008011075-1)

叶酸具有参与和调节 DNA 甲基化的生物学功能, 叶酸缺乏与 DNA 甲基化异常均与宫颈癌的发生密切相关^[1-2]。国内外和本课题组前期研究结果均提示, 叶酸缺乏可增加宫颈癌及其癌前病变的患病风险^[3-4]。叶酸缺乏导致甲基化模式紊乱, 特别是引起抑癌基因启动子区 CpG 岛的甲基化^[5], 提示叶酸与抑癌基因的甲基化过程有关。甲基-CpG-结合蛋白 2 (MeCP2) 是 DNA 甲基化 CpG 岛结合蛋白 (MBD) 家族中的重要一员, 可与甲基化的 DNA 特异性结合, 广泛参与抑癌基因甲基化导致的转录沉默过程^[6]。有研究报道在结肠黏液性腺癌、乳腺癌、前列腺癌等多种肿瘤中存在 MeCP2 表达的异常。本课题组前期体外细胞干预实验结果显示, 随着叶酸水平的升高, 宫颈癌细胞中 MeCP2 蛋白和 mRNA 表达均呈下降趋势^[7]。但基于人群研究的结果未见报道, 叶酸与 MeCP2 在宫颈癌变过程中的关系尚不明确。为此本研究以不同宫颈病变患者为研究对象, 通过检测血清叶酸和红细胞叶酸水平以及 MeCP2 蛋白和 mRNA 的表达量, 综合分析叶酸与 MeCP2 在宫颈病变中的作用和相互关系, 以期对宫颈癌的病因研究提供新的理论依据。

对象与方法

1. 研究对象: 选取 2009 年 9 月至 2010 年 12 月在山西省肿瘤医院、山西医科大学第二医院、介休市妇幼保健院和太原市妇幼保健院经病理学确诊的宫颈鳞状细胞癌 (SCC) 患者 41 例, 宫颈上皮内瘤样变 (CIN) 患者 71 例 (34 例 CIN1, 37 例 CIN2+) 以及 61 名宫颈正常 (NC) 妇女为研究对象。所有研究对象均排除营养性巨幼细胞贫血、溶血性疾病、白血病、消化道疾病、其他肿瘤患者以及 3 个月内 B 族维生素使用者, 并在知情同意情况下进入研究。

2. 资料收集: 应用结构式问卷收集研究对象的人口学特征、生殖情况、生活习惯、妇科病史、肿瘤家族史等资料。采集全部研究对象于入院后、系统治疗前清晨空腹静脉血 (抗凝血和非抗凝血) 5 ml, 对

非抗凝血进行离心处理分离血清, 置于 -80 °C 冰箱贮存待检。同时收集全部研究对象宫颈组织标本 (手术或活组织检查), 立即放入液氮罐, 低温运至实验室后放入 -80 °C 冰箱贮存待检。

3. 实验方法:

(1) PCR 检测 HPV: 采用酚-氯仿蛋白酶 K 法从宫颈组织中提取 DNA, 参照本实验室前期建立的 PCR 扩增方法检测 HPV 感染状况^[8]。

(2) Western blot 法检测宫颈组织中 MeCP2 蛋白表达水平: 取冻存宫颈组织 (10 ~ 50 mg), 加入适量 WIP 裂解液和 PMSF 的混合液, 冰浴中匀浆, 充分裂解。参照本实验室前期建立的方法检测 MeCP2 蛋白表达水平^[9]。MeCP2 一抗为 1 : 2 000 稀释的兔抗人单克隆抗体 (Abcam Inc., British), 内参蛋白 (β -actin) 为 1 : 1 000 稀释的兔抗人 β -肌动蛋白抗体。在相对分子质量 53×10^3 和 43×10^3 处分别获得 MeCP2 和 β -actin 特异性抗体结合蛋白条带。利用 Quantity One 软件分析各条带的 A 值, 将目的条带与 β -actin 条带 A 值的比值作为 MeCP2 蛋白的相对表达量。

(3) 荧光定量 PCR 检测宫颈组织中 MeCP2 mRNA 表达量: 取冻存的宫颈组织约 20 μ g, 剪碎后放入 EP 管中, 加入 1 ml 的 RNAiso™ Plus (日本 TaKaRa 公司), 使用组织匀浆机充分粉碎, 提取总 RNA (Trizol 法)。参照本实验室前期建立的方法^[10], 获得 MeCP2 的特异性扩增曲线和溶解曲线。以 MeCP2 Ct 值/ β -actin Ct 值表示 MeCP2 mRNA 相对表达量, Ct 值是扩增产物的荧光信号到达阈值时所经过的循环次数, Ct 值越小, 荧光达到阈值的循环数越少, Ct 比值越小, 对应的 mRNA 表达水平越高, 反之亦然。

(4) 微生物法测定血清叶酸和红细胞与叶酸水平: 用 1% 抗坏血酸溶液处理血清和全血样本, -20 °C 保存。参照本实验室前期建立的方法^[11], 将干酪乳酸杆菌 L-casei (ATCC7469, 中国科学院菌种保藏中心) 接种于装有乳酸杆菌肉汤培养基的试

管中,增菌纯化后用5 ml生理盐水悬浮,制成菌悬液。在无茵操作条件下向每支已灭菌的标准叶酸空白管、标准系列管[叶酸浓度(ng/ml)为0.01、0.02、0.04、0.08、0.12、0.14、0.16、0.20、0.30、0.40]和样品管接种50 μl菌悬液,混匀,留一支标准管不接种,用于测定A值时调零。37℃避光孵育24 h,置于721-分光光度计(λ=660 nm)比浊,测定标准叶酸空白管、标准管和样品管的A值。以标准系列管中叶酸含量为横坐标,A值为纵坐标,绘制叶酸标准曲线,由标准曲线查出该试管的血清叶酸和全血叶酸浓度。血清和红细胞叶酸含量按公式计算:血清叶酸浓度(ng/ml)=样本血清叶酸浓度×50,红细胞叶酸浓度(ng/ml)=[样本全血叶酸浓度×100-样本血清叶酸浓度×50]/红细胞压积。

4. 统计学分析:采用SPSS 20.0软件进行相关资料的Kruskal-Wallis H检验、χ²检验、χ²趋势检验、Spearman秩相关分析、因素与宫颈疾病之间关联强度(OR值及其95%CI)分析。采用广义多因子降维(GMDR)软件进行交互作用评价^[12]。检验水准α=0.05。

结 果

1. 人口学特征及相关因素分析:NC、CIN1、CIN2+、SCC组的年龄中位数(最小至最大年龄)分别为41(27~57)、43(29~63)、46(29~64)、50(36~70)岁。各组间在民族、出生地、居住地、婚姻状况、吸烟、饮酒、经期性生活、产次、肿瘤家族史等方面的差异均无统计学意义(P>0.05),但在HPV感染(χ²=17.73, P<0.001)、年龄(χ²=21.15, P=0.012)、文化程度(χ²=65.80, P<0.001)、人工流产史(χ²=9.39, P=0.025)、妇科病史(χ²=54.62, P<0.001)、洗阴频率(χ²=57.80, P<0.001)、孕次(χ²=16.09, P=0.011)、职业(χ²=16.30, P<0.001)、性生活后清洗(χ²=18.13, P<0.001)、月经初潮年龄(χ²=17.49, P=0.008)等方面差异均有统计学意义。

2. 叶酸与宫颈病变的关系:血清叶酸和红细胞

叶酸水平均不服从正态分布,经Kruskal-Wallis H检验,血清叶酸(H=44.71, P<0.001)与红细胞叶酸水平(H=5.28, P<0.001)在不同宫颈病变组间差异均有统计学意义,且血清叶酸与红细胞叶酸呈正相关(r=0.270, P<0.001)。调整检验水准为α=0.008 3(α=0.05/比较次数=0.05/6),采用Bonferroni法两两比较后发现,血清叶酸水平在SCC组和CIN2+组均低于CIN1组和NC组,差异有统计学意义,但SCC组与CIN2+组, CIN1组与NC组间的差异均无统计学意义,红细胞叶酸在SCC组与NC、CIN1或CIN2+组的差异均有统计学意义,而NC、CIN1或CIN2+组间差异均无统计学意义(表1)。

表1 不同宫颈病变组叶酸水平(ng/ml)比较

组别	例数	血清叶酸含量(M±Q _n)	红细胞叶酸含量(M±Q _n)
NC	61	7.20±4.54 ^a	275.98±37.33 ^a
CIN1	34	6.78±4.28 ^a	271.24±59.20 ^a
CIN2+	37	3.51±4.46 ^b	260.81±28.80 ^a
SCC	41	2.75±3.22 ^b	243.31±62.79 ^b
检验统计量		H=44.71, P<0.001	H=5.28, P<0.001

注: ^a^b组间比较时相同字母差异无统计学意义,不同字母表示差异有统计学意义

进一步以NC组血清叶酸和红细胞叶酸水平的P₅₀值(7.20 ng/ml和275.98 ng/ml)作为叶酸低水平的分界点进行定性分析,以NC组为对照进行OR值和调整(a)OR值及其95%CI的计算,结果显示,随着宫颈病变程度的加重,血清叶酸(趋势检验χ²=24.48, P<0.001)与红细胞叶酸水平(趋势检验χ²=3.83, P<0.05)均呈逐渐降低趋势(表2)。

3. MeCP2与宫颈病变的关系:MeCP2蛋白与mRNA表达量均为非正态分布,经Kruskal-Wallis H检验,MeCP2蛋白(H=33.72, P<0.001)与mRNA(H=19.50, P<0.001)表达量在不同宫颈病变组间差异均有统计学意义。采用Bonferroni法,以调整检验水准α=0.008 3(α=0.05/比较次数=0.05/6)两两比较后发现,MeCP2蛋白与mRNA表达量在SCC组与NC、CIN1或CIN2+组的差异均有统计学意

表2 叶酸水平与不同宫颈病变的关系

组别	例数	血清叶酸低水平(ng/ml)			红细胞叶酸低水平(ng/ml)		
		例数(%)	OR值(95%CI)	aOR值(95%CI)	例数(%)	OR值(95%CI)	aOR值(95%CI)
NC	61	32(52.4)	1.00	1.00	32(52.4)	1.00	1.00
CIN1	34	21(61.8)	1.46(0.62~3.44)	1.40(0.49~4.01)	20(58.8)	1.23(0.53~2.85)	1.19(0.42~3.35)
CIN2+	37	28(75.7)	2.82(1.14~6.96)	2.95(0.66~13.20)	25(67.6)	1.89(0.82~4.23)	4.01(0.43~37.52)
SCC	41	40(97.5)	36.52(4.68~280.70)	13.56(3.72~70.34)	31(75.6)	2.85(0.86~4.73)	9.22(1.39~30.12)
趋势检验			χ ² =24.48, P<0.001			χ ² =3.83, P<0.05	

注: aOR值为对HPV感染、年龄、文化程度、职业、性生活后清洗、人工流产史、妇科病史、洗阴频率、孕次、月经初潮年龄调整后的OR值

义,而NC、CIN1 或 CIN2+ 组间差异均无统计学意义(表3)。

表3 不同宫颈病变患者 MeCP2 蛋白和 mRNA 表达水平的比较

组别	例数	MeCP2 蛋白表达量 (M±Q _n)	MeCP2 mRNA Ct 比值 (M±Q _n)
NC	61	1.07±0.15 ^a	1.22±0.29 ^a
CIN1	34	1.07±0.12 ^a	1.21±0.16 ^a
CIN2+	37	1.09±0.12 ^a	1.19±0.28 ^a
SCC	41	1.22±0.12 ^b	1.10±0.18 ^b
检验统计量		H=33.72, P<0.001	H=19.50, P<0.001

注: ^{a,b}组间比较时相同字母差异无统计学意义,不同字母表示差异有统计学意义; MeCP2 mRNA Ct 比值为 MeCP2 Ct/β-actin Ct 值, Ct 比值越小,对应的 mRNA 表达水平越高

进一步以 NC 组的 MeCP2 蛋白和 mRNA 表达量的 P₅₀ 值(1.07 和 1.22) 作为 MeCP2 高表达的分界点进行定性分析,以 NC 组为对照进行 OR 值和 aOR 值及其 95%CI 的计算。结果显示,随着宫颈病变程度的进展, MeCP2 蛋白(趋势检验 $\chi^2=14.74, P<0.001$) 和 mRNA(趋势检验 $\chi^2=10.74, P<0.001$) 表达量均呈逐渐升高趋势(表4)。

4. 叶酸与 MeCP2 蛋白在宫颈癌变中的相关关系:采用 Spearman 秩相关分析显示,血清叶酸水平与 MeCP2 蛋白表达量($r=-0.226, P=0.003$),红细胞叶酸水平与 MeCP2 蛋白表达量($r=-0.164, P=0.004$) 均呈负相关(图1)。而叶酸与 MeCP2 mRNA 相关分析未显示有统计学意义。

5. 叶酸与 MeCP2 在各宫颈病变组中交互作用的 GMDR 分析:血清叶酸与红细胞叶酸是衡量机体叶酸营养状况最常用的两项指标,尽管两者存在相

关,但血清叶酸是衡量机体近期叶酸水平的有效指标,红细胞叶酸主要反应机体叶酸的长期稳定状态;基因表达是从 DNA→mRNA→蛋白的连续过程, mRNA 和蛋白分别是基因转录和翻译水平的产物,蛋白水平和 mRNA 水平表达不一定一致。GMDR 具有分析相关变量克服共线性问题的优势,而且该模型不需要指定交互作用模式(线性或非线性模型,加法还是乘法模型),基于此,本研究采用 GMDR 模型进行交互作用评价。

以 NC 组叶酸水平的 P₅₀ 值和 MeCP2 表达量的 P₅₀ 值分别作为叶酸低水平及 MeCP2 高表达的界值,将叶酸低水平赋值为 1,高水平赋值为 0, MeCP2 蛋白和 mRNA 低表达赋值为 0,高表达赋值为 1,宫颈病变结局赋值为 0 或 1,即 NC 组赋值为 0, CIN1、CIN2+ 和 SCC 组赋值为 1。以 NC 组为对照,将血清叶酸、红细胞叶酸、MeCP2 蛋白和 MeCP2 mRNA 四个因素纳入 GMDR 模型,通过 GMDR 提供的 logistic 回归将影响宫颈癌变的混杂因素作为协变量加以控制,以预测误差最低和交叉验证一致性最高且置换检验有统计学意义(P<0.05) 的模型为 GMDR 分析的最佳交互作用模型。结果显示,在 SCC 组和 CIN2+ 组,交互作用最佳模型均为血清叶酸缺乏、红细胞叶酸缺乏、MeCP2 蛋白高表达和 MeCP2 mRNA 高表达之间的交互作用,预测误差分别为 21.75% 和 34.46%,交叉验证一致性均达到了 10/10,且置换检验均有统计学意义(P<0.05),在调整影响宫颈癌变的协变量后这种效应更为明显,预测误差降低为 9.54% 和 21.63%。在 CIN1 组未发现

表4 MeCP2 蛋白及 mRNA 表达量与宫颈癌变的关系

组别	例数	MeCP2 蛋白高表达			MeCP2 mRNA 高表达		
		例数(%)	OR 值(95%CI)	aOR 值(95%CI)	例数(%)	OR 值(95%CI)	aOR 值(95%CI)
NC	61	30(49.2)	1.00	1.00	32(52.4)	1.00	1.00
CIN1	34	20(58.8)	1.48(0.63 ~ 3.45)	1.14(0.54 ~ 3.66)	22(64.7)	1.66(0.70 ~ 3.94)	2.61(0.84 ~ 8.14)
CIN2+	37	25(67.6)	2.09(0.63 ~ 3.44)	1.40(0.40 ~ 4.96)	22(59.5)	1.33(0.58 ~ 3.04)	3.72(1.17 ~ 6.05)
SCC	41	38(92.7)	13.09(3.65 ~ 47.00)	46.57(5.32 ~ 407.80)	36(87.8)	6.53(2.26 ~ 18.90)	7.76(1.13 ~ 23.22)
趋势检验			$\chi^2=14.74, P<0.001$			$\chi^2=10.74, P<0.001$	

注: aOR 值为对 HPV 感染、年龄、文化程度、职业、性生活后清洗、人工流产史、妇科病史、洗阴频率、孕次、月经初潮年龄调整后的 OR 值

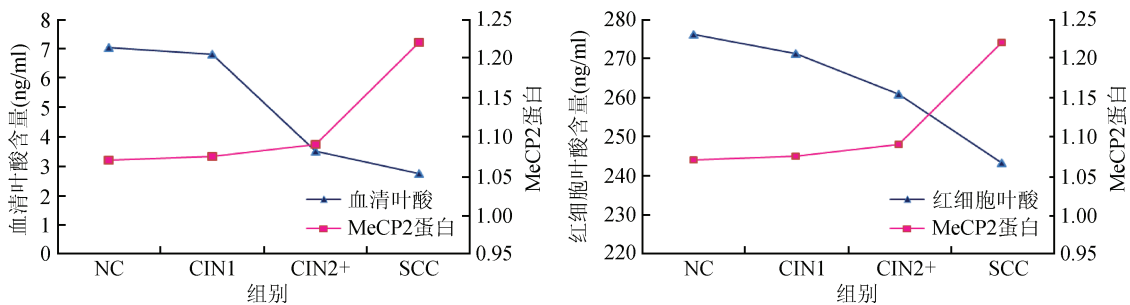


图1 不同宫颈病变组血清叶酸、红细胞叶酸平均水平与 MeCP2 蛋白平均表达量的关系

类似交互作用存在($P>0.05$),见表5。

表5 叶酸与MeCP2在各宫颈病变组中交互作用的GMDR分析

组别	模型	预测误差 ^a (%)	预测误差 ^b (%)	交叉验证 一致性	交叉验证 一致性 ^b	P值	P值 ^b
SCC	A ₂	32.86	22.94	7/10	7/10	0.001	0.011
	A ₂ A ₃	26.85	11.69	8/10	10/10	0.001	0.001
	A ₂ A ₃ A ₄	22.43	9.62	8/10	10/10	0.001	0.001
	A ₁ A ₂ A ₃ A ₄ ^c	21.75	9.54	10/10	10/10	0.001	0.001
CIN2+	A ₂	43.10	37.85	9/10	7/10	0.377	0.377
	A ₁ A ₂	42.14	36.93	10/10	7/10	0.055	0.055
	A ₁ A ₂ A ₄	48.75	31.16	9/10	9/10	0.377	0.251
	A ₁ A ₂ A ₃ A ₄ ^c	34.46	26.13	10/10	10/10	0.011	0.017
CIN1	A ₄	57.98	47.26	6/10	6/10	0.990	0.990
	A ₁ A ₂	48.15	46.53	9/10	9/10	0.828	0.801
	A ₁ A ₂ A ₃	50.48	48.37	4/10	6/10	0.623	0.576
	A ₁ A ₂ A ₃ A ₄	50.69	48.27	10/10	10/10	0.828	0.588

注: A₁~A₄分别表示红细胞叶酸、血清叶酸、MeCP2蛋白表达量和mRNA表达量; ^a预测误差=(1-预测准确率)×100%; ^b对HPV感染、年龄、文化程度、职业、性生活后清洗、人工流产史、妇科病史、洗阴频率、孕次、月经初潮年龄的调整值; ^c交互作用最优模型

讨 论

宫颈癌是仅次于乳腺癌的全球第二高发妇科恶性肿瘤^[13],其发生是由癌前病变逐步演变为癌的连接过程,通常为CIN1-CIN2-CIN3-宫颈原位癌-宫颈早期浸润癌-宫颈浸润癌^[14-15]。HPV反复或持续感染是宫颈癌发生的主要而非唯一因素^[16-18],寻找其他致癌因子或协同HPV致癌因素成为多数学者关注的焦点。作为表观遗传的核心内容,DNA甲基化被认为是在肿瘤发生过程中重要的早期事件,在多种肿瘤发生中起到重要作用。研究显示,DNA甲基化水平和模式的紊乱普遍存在于各种癌症的发生发展过程中^[2,19-20]。叶酸作为甲基基团的主要供体参与了DNA的甲基化过程^[21],缺乏时可影响基因组的甲基化状态,参与肿瘤的发生^[3,5]。本课题组在国内首次报道了叶酸与宫颈癌的关系,研究显示随着叶酸水平降低,患宫颈癌的危险性增加^[4]。本次研究采用微生物法同时检测了宫颈病变患者的血清叶酸和红细胞叶酸水平,结果显示,血清叶酸和红细胞叶酸之间呈正相关,从NC、CIN1、CIN2+到SCC组,两者均逐渐降低,随着叶酸水平的降低,宫颈癌患病风险增加,经校正影响宫颈癌变的其他因素后,这种效应仍然存在,再次验证了叶酸缺乏可增加宫颈癌发生风险的结论。同时提示合理补充叶酸对于有效降低宫颈癌及其癌前病变的发病风险可能具有重要意义,当然对于叶酸补给的具体剂量尚需依据

人群的不同情况予以深入探讨和确定。

在DNA甲基化阻遏基因表达的过程中,DNA甲基化CpG岛结合蛋白(MBD)起着重要作用。MeCP2是第一个被发现的可以特异性识别DNA甲基化的MBD家族成员,MeCP2通过与甲基化的CpG残基区结合,形成稳定的转录抑制复合体,该复合体造成染色质的重构、浓缩,导致基因表达沉默,这被认为是甲基化长期沉默的原因^[22-23]。Xu等^[24]和Müller等^[25]在乳腺癌研究中发现,肿瘤组织中MeCP2的表达高于非肿瘤组织。Bernard等^[26]的研究显示MeCP2可以促进前列腺癌细胞的生长。Song等^[27]研究表明,相对于正常及其他肿瘤组织,MeCP2在结肠黏液性腺瘤,尤其是侵袭性结直肠癌组织中异常高表达。本研究采用Western blot和荧光定量PCR对MeCP2基因表达量的研究结果显示,随着宫颈病变程度的加重,MeCP2蛋白和mRNA的表达量均逐渐增加,提示MeCP2表达异常增高,可增加宫颈癌及其癌前病变的风险,尤其在宫颈上皮内瘤变阶段即有MeCP2蛋白及mRNA的异常升高,对宫颈癌变具有一定的预警意义。

叶酸缺乏导致甲基化模式紊乱,突出表现为基因组整体的低甲基化及抑癌基因CpG岛的高甲基化^[28]。在小鼠叶酸和甲基缺乏性饮食诱导的肝癌模型研究中发现,在癌变早期就出现了MeCP2蛋白表达的增加^[29]。本实验室前期采用体外干预实验表明,随着叶酸水平的升高,C33A和Caski宫颈癌细胞中MeCP2蛋白与mRNA表达均逐渐下降,提示补充叶酸可逆转MeCP2蛋白及mRNA的异常高表达^[7]。基于此,本研究进一步对不同级别宫颈病变患者叶酸与MeCP2关系的研究显示,随着宫颈病变程度的加重,叶酸含量呈降低趋势,而MeCP2表达水平呈上升趋势,两者之间存在负相关关系。

logistic回归模型是流行病学研究中常用的分析影响因素作用的方法,该方法利用纳入乘积项的方法分析因素间交互作用,如有统计学意义表示存在相乘交互作用,但乘积项无统计学意义并不表示相加或生物学交互作用的有或无,而且实际分析中还可能遇到有相乘交互作用但不一定有相加交互作用的情况^[30]。GMDR是近年来新发展的能够同时检测并刻画影响疾病的多基因联合作用的方法,该法并不需要指定交互作用模式(线性或非线性模型,加法或乘法模型),该模型的优势是通过将变量从n个维度减少到1个维度发现高阶的交互作用,而且还能分析相关的变量克服共线性的问题^[31],此外

GMDR 模型能够纳入协变量,从而控制协变量引起的干扰。基于 GMDR 模型分析显示,在 SCC 组和 CIN II/III 组,血清叶酸缺乏、红细胞叶酸缺乏、MeCP2 蛋白高表达和 MeCP2 mRNA 高表达之间存在交互作用,预测误差分别为 21.75% 和 34.46%,交叉验证一致性均达到了 10/10,且置换检验均有统计学意义($P < 0.05$),调整影响宫颈病变的协变量后这种效应更为明显,预测误差降低为 9.54% 和 21.63%。结果提示,机体叶酸缺乏与 MeCP2 高表达同时存在时,可增加宫颈癌及癌前病变发生的风险,尤其在宫颈癌变进展的后期更为明显,但其详细机制有待深入研究。

本研究从人群研究的角度揭示了叶酸缺乏与 MeCP2 基因的转录水平和蛋白水平功能活跃在宫颈病变的恶性演进中均具有重要作用,当叶酸缺乏与 MeCP2 高表达同时存在时,其作用具有协同效应。结合叶酸干预实验,提出在宫颈病变过程中,叶酸缺乏可能引起基因组的甲基化状态紊乱,进而导致 MeCP2 高表达促进了宫颈病变进展的可能分子机制,为寻找宫颈癌及其癌前病变干预和治疗的生物靶点开拓了新的思路。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Pathak S, Bhatla N, Singh N. Cervical cancer pathogenesis is associated with one-carbon metabolism [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 369(1/2): 1-7. DOI: 10.1007/s11010-012-1362-3.
- [2] Mersakova S, Nachajova M, Szepe P, et al. DNA methylation and detection of cervical cancer and precancerous lesions using molecular methods [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(1): 23-27. DOI: 10.1007/s13277-015-4197-1.
- [3] Wang JT, Ding L, Jiang SW, et al. Folate deficiency and aberrant expression of DNA methyltransferase 1 were associated with cervical cancerization [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(11): 1639-1646. DOI: 10.2174/13816128113199990543.
- [4] 王金桃, 马晓晨, 程玉英, 等. 叶酸与宫颈癌关系的病例对照研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(5): 424-427. Wang JT, Ma XC, Cheng YY, et al. A case-control study on the association between folate and cervical cancer [J]. *Chin J Epidemiol*, 2006, 27(5): 424-427.
- [5] Bai LX, Wang JT, Ding L, et al. Folate deficiency and FHIT hypermethylation and HPV 16 infection promote cervical cancerization [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(21): 9313-9317. DOI: 10.7314/APJCP.2014.15.21.9313.
- [6] 王汉姣, 吴建兵, 邱小华, 等. 肺癌 A549 细胞中 RNAi 抑制 MeCP2 表达的实验研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2010, 18(4): 631-634. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2010.04.01. Wang HJ, Wu JB, Qiu XH, et al. Experimental study of RNA inference targeting MeCP2 in lung carcinoma cell line A549 [J]. *J Mod Oncol*, 2010, 18(4): 631-634. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2010.04.01.
- [7] 白兰, 王金桃, 丁玲, 等. 叶酸对子宫颈癌细胞甲基-CpG-结合蛋白质 2 表达及细胞增殖抑制的作用 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2012, 24(9): 603-606, 609. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-9801.2012.09.008. Bai L, Wang JT, Ding L, et al. Folate inhibits methyl-CpG-binding protein 2 expression and cervical cancer cell proliferation [J]. *Cancer Res Clin*, 2012, 24(9): 603-606, 609. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-9801.2012.09.008.
- [8] 王金桃, 高尔生, 程玉英, 等. 内源性雌、孕激素与人乳头瘤病毒在宫颈癌发生中的协同作用研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(5): 370-373. Wang JT, Gao ES, Cheng YY, et al. Analysis on synergistic action between estrogen, progesterone and human papillomaviruses in cervical cancer [J]. *Chin J Epidemiol*, 2005, 26(5): 370-373.
- [9] 王金桃, 霍晓旭, 丁玲, 等. 叶酸与 DNA 甲基转移酶 1 在宫颈癌及癌前病变中的作用 [J]. *中华流行病学杂志*, 2011, 32(6): 617-621. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.06.019. Wang JT, Huo XX, Ding L, et al. Effect of folic acid and DNA methyltransferase 1 on cervical cancer and its precancerous lesion [J]. *Chin J Epidemiol*, 2011, 32(6): 617-621. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.06.019.
- [10] 王金桃, 吴婷婷, 白兰, 等. 叶酸对 DNMT1 和 MeCP2 在宫颈癌细胞中表达调节的实验研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2013, 34(2): 173-177. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.02.016. Wang JT, Wu TT, Bai L, et al. Effect of folate in modulating the expression of DNA methyltransferase 1 and methyl-CpG-binding protein 2 in cervical cancer cell lines [J]. *Chin J Epidemiol*, 2013, 34(2): 173-177. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.02.016.
- [11] 孙雪松, 丁玲, 陈芳, 等. 叶酸缺乏及其与 HPV16 感染的交互效应对宫颈癌变的影响 [J]. *中华流行病学杂志*, 2014, 35(4): 437-441. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.04.021. Sun XS, Ding L, Chen F, et al. Effects of folate deficiency with HPV16 infection on cervix cancerization [J]. *Chin J Epidemiol*, 2014, 35(4): 437-441. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.04.021.
- [12] 陈卿, 唐迅, 胡永华. 应用广义多因子降维法分析数量性状的交互作用 [J]. *中华流行病学杂志*, 2010, 31(8): 938-941. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.08.024. Chen Q, Tang X, Hu YH. Detecting interaction for quantitative trait by generalized multifactor dimensionality reduction [J]. *Chin J Epidemiol*, 2010, 31(8): 938-941. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.08.024.
- [13] Arbyn M, Castellsagué X, de Sanjosé S, et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008 [J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(12): 2675-2686. DOI: 10.1093/annonc/mdr015.
- [14] 林小娟, 赵霞. 人乳头瘤病毒感染与宫颈上皮内瘤变 [J]. *实用妇产科杂志*, 2013, 29(3): 167-170. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6946.2013.03.004.

- Lin XJ, Zhao X. Human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia [J]. *J Pract Obstet Gynecol*, 2013, 29 (3): 167–170. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6946.2013.03.004.
- [15] 张新武. 宫颈癌常用筛查技术应用现状[J]. *武警医学*, 2009, 20 (10): 939–941. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3594.2009.10.032.
- Zhang XW. Cervical cancer screening commonly used technical application situation [J]. *Med J Chin People's Armed Police Forces*, 2009, 20 (10): 939–941. DOI: 10.3969/j.issn.1004-3594.2009.10.032.
- [16] Guan P, Howell-Jones R, Li N, et al. Human papillomavirus types in 115, 789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131 (10): 2349–2359. DOI: 10.1002/ijc.27485.
- [17] Guzmán-Olea E, Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, et al. Molecular mechanism and potential targets for blocking HPV-Induced lesion development [J]. *J Oncol*, 2012, 2012: 278312. DOI: 10.1155/2012/278312.
- [18] Yang HP, Zuna RE, Schiffman M, et al. Clinical and pathological heterogeneity of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (1): e29051. DOI: 10.1371/journal.pone.0029051.
- [19] Lu Q, Ma DH, Zhao SP. DNA methylation changes in cervical cancers [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 863: 155–176. DOI: 10.1007/978-1-61779-612-8_9.
- [20] Georgia S, Kanji M, Bhushan A. DNMT1 represses p53 to maintain progenitor cell survival during pancreatic organogenesis [J]. *Genes Dev*, 2013, 27 (4): 372–377. DOI: 10.1101/gad.207001.112.
- [21] Rochtus A, Jansen K, van Geet C, et al. Nutri-epigenomic studies related to neural tube defects: does folate affect neural tube closure via changes in DNA methylation? [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2015, 15 (13): 1095–1102. DOI: 10.2174/1389557515666150909144828.
- [22] 康慧杰, 王金桃, 高晨菲, 等. DNA甲基转移酶1与甲基-CpG-结合蛋白2异常表达在宫颈病变中的作用及相互关系[J]. *中华流行病学杂志*, 2013, 34 (12): 1223–1227. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.12.016.
- Kang HJ, Wang JT, Gao CF, et al. Effect of DNA methyltransferase 1 and methyl-CpG-binding protein 2 abnormal expression on cervical lesions and related interaction [J]. *Chin J Epidemiol*, 2013, 34 (12): 1223–1227. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.12.016.
- [23] Bogdanović O, Veenstra GJ. DNA methylation and methyl-CpG Binding proteins: developmental requirements and function [J]. *Chromosoma*, 2009, 118 (5): 549–565. DOI: 10.1007/s00412-009-0221-9.
- [24] Xu XM, Jin HY, Liu LY, et al. The expression patterns and correlations of claudin-6, methyl-CpG binding protein 2, DNA methyltransferase 1, histone deacetylase 1, acetyl-histone H3 and acetyl-histone H4 and their clinicopathological significance in breast invasive ductal carcinomas [J]. *Diagn Pathol*, 2012, 7 (1): 33. DOI: 10.1186/1746-1596-7-33.
- [25] Müller HM, Fiegl H, Goebel G, et al. MeCP2 and MBD2 expression in human neoplastic and non-plastic breast tissue and its association with oestrogen receptor status [J]. *Br J Cancer*, 2003, 89 (10): 1934–1939. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601392.
- [26] Bernard D, Gil J, Dumont P, et al. The methyl-CpG binding protein MeCP2 is required for prostate cancer cell growth [J]. *Oncogene*, 2006, 25 (9): 1358–1366. DOI: 10.1038/sj.onc.1209179.
- [27] Song N, Li K, Wang Y, et al. Lentivirus-mediated knockdown of MeCP2 inhibits the growth of colorectal cancer cells *in vitro* [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13 (1): 860–866. DOI: 10.3892/mmr.2015.4612.
- [28] Li Y, Pan P, Qiao P, et al. Downregulation of N-myc downstream regulated gene 1 caused by the methylation of CpG islands of NDRG1 promoter promotes proliferation and invasion of prostate cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47 (3): 1001–1008. DOI: 10.3892/ijo.2015.3086.
- [29] Ghoshal K, Li X, Datta J, et al. A folate-and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats [J]. *J Nutr*, 2006, 136 (6): 1522–1527.
- [30] 邱宏, 余德新, 王晓蓉, 等. Logistic回归模型中交互作用的分析及评价[J]. *中华流行病学杂志*, 2008, 29 (9): 934–937.
- Qiu H, Yu DX, Wang XR, et al. Study on the interaction under logistic regression modeling [J]. *Chin J Epidemiol*, 2008, 29 (9): 934–937.
- [31] Beretta L, Cappiello F, Moore JH, et al. Ability of epistatic interactions of cytokine single-nucleotide polymorphisms to predict susceptibility to disease subsets in systemic sclerosis patients [J]. *Arthritis Care Res*, 2008, 59 (7): 974–983. DOI: 10.1002/art.23836.

(收稿日期: 2016-01-15)

(本文编辑: 张林东)