

还原叶酸载体基因多态性与宫颈癌关系的病例对照研究

弟娟娟 王金桃 丁玲 王志敏 高尔生

【摘要】目的 探讨叶酸代谢相关酶基因还原叶酸载体基因(RFC-1)多态性与宫颈癌易感性的关系以及与人乳头瘤病毒(HPV)16在宫颈癌发生中的交互作用。**方法** 采用以医院为基础的频数匹配病例对照研究,选择经病理学确诊的宫颈鳞状细胞癌新发病例107例作为病例组,子宫肌瘤患者107例作为对照组,应用特异性PCR和限制性片段长度多态性(RFLP)分别检测HPV16及RFC-1基因A80G多态性。**结果** (1)HPV16感染率病例组(56.07%)高于对照组(31.78%),调整OR值为3.25(95%CI:1.74~6.08)。(2)病例组与对照组各基因型频率符合Hardy-Weinberg平衡,病例组RFC-1基因80AA、AG和GG各基因型频率在病例组和对照组间差异有统计学意义($\chi^2=6.66, P=0.03$)。A80G等位基因在两组的分布存在差异($\chi^2=7.41, P=0.01$)。(3)RFC-1基因A80G多态性与宫颈癌易感性的分析结果显示,与携带AA基因型者相比,携带GG基因型者患宫颈癌的危险性增高($OR=2.42, 95\%CI:1.01\sim 5.81$)。(4)RFC-1基因多态性与HPV16感染经logistic回归模型分析,在宫颈癌发生中交互作用无统计学意义。**结论** RFC-1基因A80G位点的纯合型(GG)可增加宫颈癌发生的危险。

【关键词】 宫颈肿瘤; 病例对照研究; RFC-1基因多态性

A case-control study on the association of RFC-1 polymorphism and cervical cancer DI Juan-juan*, WANG Jin-tao, DING Ling, WANG Zhi-min, GAO Er-sheng. Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai 200032, China

Corresponding author: WANG Jin-tao, Email: wjtxw@yahoo.com.cn

【Abstract】Objective To evaluate the possible association between RFC-1 polymorphism and cervical carcinoma, as well as the interaction between polymorphism and human papilloma virus16 (HPV16). **Methods** Based on a hospital-based case-control study, 107 cases which were diagnosed as cervical cancer pathematologically and 107 controls with hysteromyoma, were selected by frequency, matched with age and habitation. HPV16 and RFC-1 A80G polymorphism were detected by special PCR and RFLP. **Results** (1)HPV16 infection rate in cases (56.07%) was higher than that in controls (31.78%) with the adjusted OR of 3.25 (95% CI: 1.74-6.08). (2) All the genotypes were tested by Hardy-Weinberg balance. (3) Compared with RFC-1 AA, RFC-1 GG had higher risk for cervical cancer with OR of 2.42 (95% CI: 1.01-5.81). (4) No statistical significance was noticed regarding the interaction between RFC-1 polymorphism and HPV16 in logistic regression method. **Conclusion** The introduction of RFC-1 80GG gene type could increase the risk of cervical cancer.

【Key words】 Cervical neoplasms; Case-control study; RFC-1 polymorphism

人乳头瘤病毒(HPV)持续感染是宫颈癌发生的主要病因^[1,2],已有研究发现膳食中叶酸缺乏及体内低叶酸水平可增加宫颈癌发生的危险,持续服用叶酸制剂可改善宫颈上皮细胞异常^[3,4],但也有研究未发现叶酸及体内叶酸水平与宫颈癌间存在关联^[5]。由于叶酸来源于食物并被吸收入人体参与代谢,这

一过程十分复杂,膳食叶酸及体内叶酸水平不能完全反映叶酸在人体内的生物学效应大小,叶酸代谢通路中影响叶酸发挥生理学作用的各种酶类对叶酸功能的发挥起重要作用,叶酸代谢链的“第一门户”为还原叶酸载体(RFC),叶酸通过RFC进入细胞,参与DNA甲基化及DNA合成。RFC-1基因A80G发生突变,可使RFC酶活性降低,导致RFC转运叶酸能力降低。目前RFC-1基因A80G突变与出生缺陷关系研究较多,在其他癌症如结肠癌等也有研究报道,但与宫颈癌的研究国内外鲜见报道。本研究采用特异PCR、PCR-RFLP探索RFC-1基因A80G突变

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.02.022

基金项目:山西省自然科学基金资助项目(2008011075-1)

作者单位:200032上海市计划生育科学研究所(弟娟娟、高尔生);山西医科大学流行病学教研室(王金桃、丁玲);安徽省疾病预防控制中心(王志敏)

通信作者:王金桃,Email: wjtxw@yahoo.com.cn

与宫颈癌间的关系,以及RFC-1基因A80G突变与HPV16在宫颈癌发生中的交互作用,为宫颈癌的病因学研究提供依据。

对象与方法

1.研究对象:选择山西省肿瘤医院2005年1-6月经病理学确诊的宫颈鳞状细胞癌新发病例107例作为病例组,同期就诊的与病例无血缘关系、年龄相差±3岁及居住地相近的子宫肌瘤患者107例作为对照。所有研究对象排除血液系统疾病、消化系统疾病、心脑血管疾病的现患和既往患者,及近3个月内B族维生素使用者和其他肿瘤患者。

2.资料收集:

(1)宫颈癌相关因素的收集:设计统一的调查问卷,由培训合格的调查员对研究对象进行面对面的调查、填写问卷。调查一般人口学特征、社会经济状况、生活方式与个人卫生习惯、月经生育史、既往病史、肿瘤家族史及避孕药使用情况等。结合医院病历,从中获取研究对象的确诊时间、确诊依据和病理类型等资料。

(2)标本收集:在研究对象首次入院后,采集清晨空腹静脉血5 ml,室温静置1 h左右,3000 r/min×10 min分离血清和血凝块,置-80℃低温冰箱,保存待检。入院后,系统治疗前用宫颈刮片360°旋转两周收集宫颈脱落细胞,置PBS液中,离心富集细胞,置-80℃低温冰箱,保存待检。

3.实验方法:

(1)HPV16 DNA扩增:采用异硫氰酸胍-酚氯仿提取法从宫颈脱落细胞中提取HPV DNA,并依照文献[6]提供的方法进行HPV16 DNA扩增。

(2)RFC-1 A80G多态性检测:酚氯仿抽提法从抗凝血块中提取人类基因组DNA,依据文献[6]设计RFC-1 A80G位点的引物,进行RFC-1扩增。在扩增产物中加入限制性内切酶Hha I在37℃恒温水浴中放置过夜,应用PCR-RFLP法进行多态性检测。

4.统计学分析:应用SPSS 11.5软件对资料进行t检验、χ²检验和分级分析等。采用非条件logistic回归模型计算多因素调整的OR值及其95%CI;交互作用分析采用logistic回归模型的方法。

结 果

1.病例组与对照组均衡性分析:本次共调查宫颈癌病例107例,年龄30~77岁(平均50.68岁±9.71岁),子宫肌瘤患者107例,年龄33~69岁(平均

48.43岁±7.32岁),两组平均年龄差异无统计学意义(t=1.92,P=0.06),婚姻状况均衡可比(Fisher确切概率P=0.45)。

2. HPV16检测:结果显示,病例组HPV16的阳性率(56.07%)显著高于对照组(31.78%),差异有统计学意义(χ²=12.83,P=0.00)。应用多元logistic回归分析在对年龄、职业、是否吸烟、首次性行为年龄、孕产次、是否绝经、文化程度、家庭收入等宫颈癌发生相关因素进行调整后,HPV16感染致宫颈癌的OR值为3.25(95%CI:1.74~6.08),见表1。

表1 HPV16感染与宫颈癌的关系

| 组别 | HPV16* | | P值 | OR值 (95%CI) | P值 | OR值 (95%CI) [†] |
|-----|-----------|-----------|------|---------------------|------|-----------------------------|
| | + | - | | | | |
| 病例组 | 60(56.07) | 47(43.93) | 0.00 | 2.74 (1.57~4.79) | 0.00 | 3.25 (1.74~6.08) |
| 对照组 | 34(31.78) | 73(68.22) | | | | |

注:*括号外数据为例数,括号内数据为感染率(%);[†]调整年龄、职业、文化程度、吸烟、月经状况、首次性行为年龄、孕次、产次、家庭收入

3. RFC-1基因A80G多态性与宫颈癌的易感性分析:首先对病例组和对照组进行Hardy-Weinberg平衡检验,表明两组人群具有群体代表性(表2)。RFC-1基因A80G多态性与宫颈癌总体差异有统计学意义(表3),易感性的分析结果显示,与携带AA基因型者相比,携带GG基因型者患宫颈癌的危险显著增高(OR=2.42,95%CI:1.01~5.81),见表4。

表2 病例组和对照组RFC-1基因型频率的Hardy-Weinberg平衡检验

| 基因型 | 病例组(n=107) | | 对照组(n=107) | |
|-----|------------|-------|------------|-------|
| | 观察值 | 期望值 | 观察值 | 期望值 |
| AA | 28 | 25.69 | 43 | 41.13 |
| AG | 48 | 53.48 | 46 | 50.42 |
| GG | 31 | 27.83 | 18 | 15.45 |

χ²=1.13,P=0.30 χ²=0.9,P=0.35
注:χ²=Σ(观察值-期望值)²/期望值,df=基因型数-等位基因数

表3 RFC-1基因A80G位点的基因频率分布

| 分组 | A80G基因型* | | | 等位基因* | |
|-----|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| | AA | AG | GG | A | G |
| 病例组 | 28(26.17) | 48(44.86) | 31(28.97) | 104(48.60) | 110(51.40) |
| 对照组 | 43(40.19) | 46(42.99) | 18(16.82) | 132(61.68) | 82(38.32) |

χ²=6.66,P=0.03 χ²=7.41,P=0.01
注:*同表1

4. RFC-1基因A80G多态性与HPV16在宫颈癌发生中交互作用分析:在对职业、吸烟、月经状况、家庭收入、文化程度、首次性交年龄、孕次、产次进行调整后,将RFC-1 A80G多态性与HPV感染引入logistic回归模型,未发现两者在宫颈癌发生中存在交互作用(表5)。

表 4 RFC-1 基因多态性与宫颈癌的关系

| 基因型 | 病例组 (n=107) | 对照组 (n=107) | OR 值(95%CI) | OR 值(95%CI) ^a |
|-----|----------------|----------------|-----------------|--------------------------|
| AA | 28 | 43 | 1.00 | - |
| AG | 49 | 46 | 1.60(0.86~2.99) | 1.26(0.56~2.86) |
| GG | 31 | 18 | 2.65(1.25~5.60) | 2.42(1.01~5.81) |

注:^a调整职业、吸烟、月经状况、家庭收入、文化程度、首次性交年龄、孕次、产次、HPV16;AA、AG、GG 三者间趋势检验 $\chi^2=7.48$, $P=0.02$

表 5 RFC-1 基因多态性和 HPV16 相互作用在 logistic 回归模型中的比较

| 因素 | β | Wald χ^2 值 | P 值 | Exp(β)(95% CI) |
|--------------------|---------|-----------------|------|------------------------|
| RFC-1 A80G 多态性 | 0.46 | 4.29 | 0.03 | 1.58(1.03~2.45) |
| HPV 感染 | 1.25 | 14.02 | 0.00 | 3.49(1.81~6.70) |
| HPV 感染 + RFC-1 多态性 | -0.30 | 0.44 | 0.51 | 0.74(0.31~1.78) |

注:调整年龄、职业、文化程度、吸烟、月经状况、首次性行为年龄、孕次、产次、家庭收入

讨 论

宫颈癌发生相关因素的单因素分析结果显示^[7], 务农、吸烟、首次性行为年龄小、孕产次多是宫颈癌发生的危险因素,而绝经、文化程度高、家庭收入高是宫颈癌发生的保护性因素;未发现被动吸烟、饮酒、饮茶、个人卫生习惯、月经初潮年龄、妇科病史、手术史、自然流产史、宫颈癌家族史、避孕药使用史等因素与宫颈癌相关。

HPV 是宫颈癌感染的主要病因,叶酸可能作为 HPV 的协同因素在宫颈癌的发生、发展中起作用^[8]。低叶酸状态可降低 DNA 甲基化程度,影响 DNA 合成与代谢,增加细胞癌变概率。作为协同因素的叶酸,其膳食与体内水平一致性较差,叶酸代谢的多环节及其复杂性决定了叶酸代谢受到多个酶的作用和影响。RFC 是血清叶酸进入细胞开始细胞内代谢的“主要门户”,活性叶酸在 RFC 的介导下进入细胞,参与 DNA 的合成与甲基化。表达 RFC 的 RFC-1 基因的单核苷酸突变位点常发生于第 80 核苷酸,发生 A-G 的改变,表达蛋白氨基酸由 CAC 转变为 CGC^[9],但这种改变是否影响到 RFC 的转运功能?有研究显示携带 RFC-1 A80/A80 基因型者,其细胞内叶酸水平明显高于携带 G80/G80 者^[10,11],即不同型别的 RFC 转运叶酸的能力不同。Matherly 和 Goldman^[12]论述了 RFC-1 基因 A80G 的突变所导致的该蛋白的氨基酸序列和数量发生改变,RFC-1 的各个跨膜区也会发生相应改变,从而影响载体活性和功能。

鉴于 RFC-1 基因在 A80G 位点发生突变,降低 RFC 转运叶酸的能力,DNA 合成和代谢受限,增加肿瘤发生概率。此次研究采用 PCR-RFLP,得出 RFC-1

基因 A80G 的突变与宫颈癌的发生有关。进一步以 AA 型为参照,分析各个型别与宫颈癌的关联性,与 AA 型携带者相比 GG 型携带者患宫颈癌的危险性在调整了其他已知危险因素后 OR 值仍增加到 2.42 (95% CI: 1.01~5.81),AG 型携带者患宫颈癌的风险 OR 值为 1.26,但关联无统计学意义。三者的趋势检验 $\chi^2=7.48$, $P=0.02$,说明 RFC-1 基因突变是罹患宫颈癌的一个危险因素。对 RFC-1 A80G 突变与 HPV16 在宫颈癌发生中相互作用的研究中,应用 logistic 回归模型对两者交互项检验,差异无统计学意义。

叶酸通过 RFC 进入细胞后,开始一系列的细胞内代谢,此次研究从叶酸代谢的起始点开始对叶酸代谢相关酶基因多态性与宫颈癌易感性的关系进行探讨。在叶酸代谢过程中亦有其他许多关键酶参与,在以后的研究中,可深入研究各种代谢酶在宫颈癌发生中的作用及其与 HPV 之间的相互作用。

参 考 文 献

- [1] 杨玲, 黄浦小梅, 张思维, 等. 中国二十世纪 70 年代与 90 年代子宫颈癌死亡率及其变化趋势. 中国医学科学院学报, 2005, 25(4): 386-390.
- [2] Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural costa rica. Natl Cancer Inst. 2000, 92: 464-474.
- [3] 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. 中华流行病学杂志, 2006, 27(5): 424-427.
- [4] Piyathilake CJ, Macaluso M, Brill I. Lower red blood cell folate enhances the HPV-16-associated risk of cervical intraepithelial neoplasia. Nutrition, 2007, 23(3): 203-210.
- [5] Childers JM, Chu J, Voigt LF, et al. Chemoprevention of cervical cancer with folic acid: a phase III Southwest Oncology Group intergroup study. Cancer Epidemiol Biomarkers, 1995, 4: 155-159.
- [6] Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, et al. Detection and typing of multiple genital HPV's by DNA amplification with consensus primers. Jpn J Cancer Res, 1991, 82(5): 524-531.
- [7] 周岑, 王金桃, 邵淑丽, 等. 宫颈癌危险因素病例对照研究. 山西医科大学学报, 2006, 4: 36-39.
- [8] Kim YI, Pogribny IP, Salomon RL, et al. Exon-specific DNA hypomethylation of the p53 gene of rat colon induced by dimethylhydrazine, modulation by dietary folate. Am J Pathol, 1997, 149(4): 1129-1137.
- [9] Gary M Shaw, Huiping Zhu, Edward J Lammer, et al. Genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G) and risk of orofacial and conotruncal heart defects. Am J Epi, 2003, 158(8): 747-752.
- [10] Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, et al. A polymorphism (80G → A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. Mol Genet Metab, 2000, 70(4): 310-315.
- [11] Laverdiere C, Chiasson S, Costea I, et al. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood, 2002, 100: 3832-3834.
- [12] Matherly LH, Goldman DI. Membrane transport of folates. Vitam Horm, 2003, 66: 403-456.

(收稿日期: 2008-06-26)
(本文编辑: 张林东)