短篇论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2288-02

# 宫颈癌与 KIR3DL1 基因的相关性研究

周 琦[1],聂 蕾[1],单可人[2],黄 林[1],何 燕[2],张 婷[2] (贵阳医学院:[1]附属医院妇产科教研室,[2]分子生物学重点实验室,贵阳 550004)

**摘 要:目的** 探讨宫颈癌与 KIR3DL1 基因的相关性。**方法** 采用序列特异性引物-聚合酶链反应(PCR-SSP)及 Touchdown-PCR 方法扩增 KIR3DL1 基因。**结果** 病例组 KIR3DL1 基因频率显著低于对照组($P<0.05$)。**结论** KIR3DL1 基因缺失可能与宫颈癌的发生存在相关性。

**关键词:** 宫颈肿瘤;杀伤细胞;受体;KIR3DL1

**中图法分类号:** R730.231;R737.33 **文献标识码:** A

杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR)主要表达于 NK 细胞和部分 T 细胞的表面,可与靶细胞表面的 MHC-Ⅰ类分子结合,传导激活或抑制信号,从而调节 NK 细胞的活性[1,2]。其编码基因位于人类染色体 19q13.42。2002 年 WHO 建立了 KIR 系统命名的原则,目前命名的共有 17 个 KIR 基因亚型,包括抑制型 9 个:KIR2DL1-4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR3DL1-3;活化型 6 个:KIR2DS1-5、KIR3DS1;假基因 2 个:KIR2DP1、KIR3DP1[3,4]。KIR 基因与宫颈癌的发生存在相关性,活化型受体 KIR3DS1 基因的出现,尤其是当缺乏抑制型 KIR-HLA 配体对时,宫颈癌的发生率将提高。对活化型受体基因亚型 KIR3DS1 和抑制型受体基因亚型 KIR3DL1 进行序列分析,发现它们胞外区有 99% 的序列相同,并且都位于框架基因 KIR2DL4 的 3′端,提示两者可能是位于同一座位的等位基因[5]。本研究探讨抑制型受体基因亚型 KIR3DL1 与宫颈癌的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

病例组:56 例本院住院宫颈癌患者,均经过病理结果证明,年龄 27~70 岁。均无自身免疫性疾病,无其他恶性肿瘤及乙肝、丙肝、艾滋病毒感染病史。对照组:68 例本院体检无血缘关系的健康妇女,年龄 28~68 岁。病例组与对照组均为贵州省汉族,年龄无统计学差异($P>0.05$),标本采集均经患者知情同意。

基金项目:贵州省科技厅科研基金(2004-JN055,2005-2016)
Supported by the Scientific Research Foundation of Department of Science and Technology of Guizhou Province (2004-JN055,2005-2016)

作者简介:周 琦,女,重庆市人,硕士,副主任医师,主要从事妇科肿瘤方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:(0851)6855119,E-mail:zhouyuhanqi@163.com.

通信作者:单可人,E-mail:hikerencn@yahoo.com.cn

收稿日期:2009-01-05;修回日期:2009-04-15

### 1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 抽提 抽取外周静脉血 2 ml,EDTA 抗凝,用经典-酚氯仿抽提法提取全血 DNA,并进行 DNA 定量。

1.2.2 PCR-SSP 法 采用 PCR-SSP 法[6,7]设计 2 对引物分别在 2 个体系中扩增 KIR3DL1 基因。第 1 对上游引物 5′-CGCTGTGGTGCCTCGA-3′,下游引物 5′-GGTGTGAACCCCGACATG-3′,扩增片段长 197 bp;第 2 对上游引物 5′-CCCTGGTGAAATCAGGAGAGAG-3′,下游引物 5′-TGTAGGTCCCTGCAAGGGCAA-3′,扩增片段长 181 bp。引物由上海 Sangon 生物工程公司合成。

1.2.3 内对照 参照文献[7]在 HLA-DRB1 第 3 内含子内设计,由上海 Sangon 生物工程公司合成。这个引物无位点序列特异性,可以作为内对照。上游引物 5′-TGCCAAGTGGAGCACCCAA-3′,下游引物 5′-GCATCTTGCTCTGTGCAGAT-3′,产物 796 bp。

1.2.4 PCR 循环条件 采用了 Touchdown-PCR,在设置的最高退火温度与最适退火温度之间,以一定温度梯度逐步递减至最适退火温度,以提高扩增产物的特异性。2 对引物采用同样的循环条件:96 ℃预变性 1 min,96 ℃变性 25 s,65 ℃退火 45s,72 ℃延伸 30 s 共 5 个循环,再降低退火温度到 60 ℃共 21 个循环,最后降低退火温度到 55 ℃共 5 个循环,72 ℃终末延伸 30 s。

1.2.5 鉴定 PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,120 V 电压电泳 30 min,UVP 凝胶成相仪上照相观察结果并记录。2 对引物均扩增出目的条带,即表示携带 KIR3DL1 基因亚型。

### 1.3 统计学方法

基因表现型频率(f)通过计数测得,基因频率(gene frequency, $P$)计算公式为:$P=1-\sqrt{(1-f)}$[8]。采用 SPSS 11.5 统计软件进行四格表 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 2 组 KIR3DL1 基因表现型频率和基因频率比较

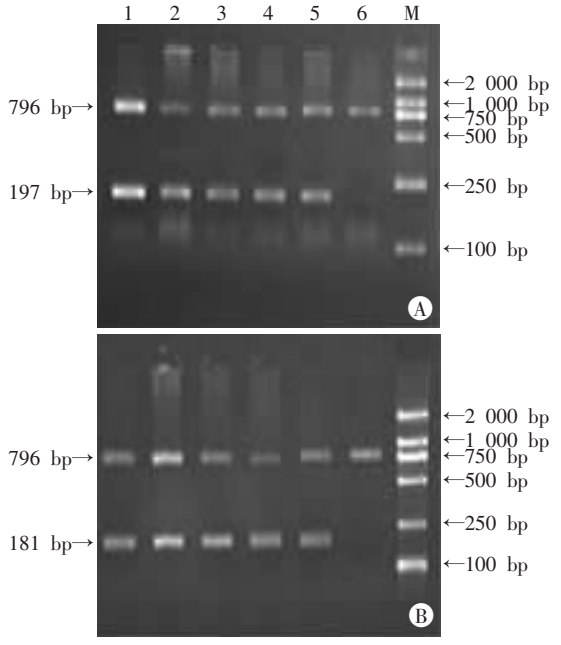
病例组与对照组 KIR3DL1 的表现型频率无统计学差异($P>0.05$),病例组 KIR3DL1 基因频率显著低于对照组($P<0.05$)。见表 1。

**表 1　病例组与对照组 KIR3DL1 基因的表现型频率和基因频率**

| 组别 | *n* | 表现型频率 | 基因频率 |
|---|---|---|---|
| 病例组 | 56 | 50 /56(0.893) | 0.673 |
| 对照组 | 68 | 65/68(0.956) | 0.790 |
| *P* 值 | | 0.318 | 0.038 |

### 2.2　KIR3DL1 基因的 PCR 扩增结果

图 1 中 1 ~ 6 泳道均出现 796 bp 的内参条带,仅 6 泳道没有 197 bp 和 181 bp 的目的条带,说明除 6 泳道外其余泳道的标本携带 KIR3DL1 基因。




1 - 6:6 个标本;M:DNA 标准

A:第 1 对引物;B:第 2 对引物

**图 1　设计的 2 对引物扩增 KIR3DL1 基因电泳结果**

## 3　讨论

杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)是主要表达在 NK 细胞表面的一类受体,其某些基因亚型在人群中的分布与自身免疫性疾病、病毒感染性疾病以及肿瘤等疾病的发生存在相关性。目前关于 KIR 与肿瘤的相关性研究并不多,大多是关于病毒相关性癌症的研究。本研究探讨抑制型受体基因亚型 KIR3DL1 基因与宫颈癌的发生是否存在相关性,结果显示病例组 KIR3DL1 基因频率显著低于对照组。

抑制型受体亚型 KIR3DL1 基因在病例组的低频现象提示 KIR3DL1 基因对正常人而言可能是一种保护性基因。国内外研究结果显示绝大多数的个体表达 KIR3DL1[5],并且多种自身免疫性疾病的发生与 KIR3DL1 基因之间呈负相关,提示 KIR3DL1 可能是一种保护性基因。龚卫娟等[9]研究发现 NK 细胞杀伤靶细胞时,活化性受体 CD16 表达上调后会伴有抑制性受体 KIR3DL1 的上调,可能反映了机体细胞的一种自我保护机制,以抑制 NK 细胞的过度活化。我们假设当正常的宫颈组织细胞受到 HPV 感染后,刺激 NK 细胞表面的活化型受体表达上调,以激活 NK 细胞杀伤病毒感染细胞。但是由于个体缺失抑制性受体亚型 KIR3DL1 基因,没有相应的受体表达以抑制 NK 细胞的过度活化,将会导致 DNA 氧化损伤,最终促进细胞发生癌变。因此,抑制性受体亚型 KIR3DL1 基因缺失可能参与增加宫颈癌的发生。

KIR3DL1 具有 8 个等位基因,且不同等位基因与其特异性单抗 DX9 的亲和力不同[10]。进一步分析其等位基因的分布可能会带来新的发现。同样,对 KIR3DL1 的表达及功能方面的研究将会有助于探讨其在宫颈癌发病中的地位和作用。

## 参考文献:

[1] 龚卫娟. KIR 研究进展[J]. 国外医学:免疫学分册, 2003, 26(2):95 - 99.

[2] 尹晓林, 郭坤元, 肖露露. KIR 基因的进化、表达与功能[J]. 免疫学杂志, 2004, 20(3):S103 - S105.

[3] Marsh S G, Parham P, Dupont B, *et al*. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002[J]. Hum Immunol, 2003, 64(6):648 - 654.

[4] Carrington M, Norman P. The KIR Gene Cluster[M]. Bethesda: National Library of Medicine (US), NCBI, 2003: 4 - 6.

[5] Carrington M, Wang S, Martin M P, *et al*. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci[J]. J Exp Med, 2005, 201(7):1069 - 1075.

[6] Koopman L A, Corver W E, van-der-Slik A R, *et al*. Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer[J]. J Exp Med, 2000, 191(6):961 - 976.

[7] Martin M P, Nelson G, Lee J H, *et al*. Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles[J]. J Immunol, 2002, 169(6):2818 - 2822.

[8] 龚卫娟, 杨珏琴, 张　磊, 等. 杀伤细胞免疫球蛋白样受体基因多态性与血清阴性脊柱关节病的关联性研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2003, 7(8):465 - 468.

[9] 龚卫娟, 杨珏琴, 姚芳娟, 等. 两种不同 HLA-B 分子对 NK 细胞表面受体表达的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2004, 20(10):665 - 667, 671.

[10] Gardiner C M, Guethlein L A, Shilling H G, *et al*. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism[J]. J Immunol, 2001, 166(5):2992 - 3001.

(编辑　邓强庭)