文章编号:1000-5404(2012)10-0963-04

论著

Bax基因P53结合位点多态性与食管鳞癌易感性的关联研究

刘波涛[1],王 凯[1],许雪青[1],熊 刚[2],郭 洪[1],官兴颖[1],白 云[1] (400038 重庆,第三军医大学:基础医学部医学遗传学教研室[1],西南医院胸心外科[2])

[摘要] **目的** 探讨Bax基因P53结合位点多态性与我国西南地区食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma,ESCC)发病的关联性。**方法** 利用SNaPshot技术检测201例食管鳞癌病例组及183例健康对照的Bax基因rs1009316位点多态性的分布情况,分析不同基因型与食管鳞癌易感性的关联。**结果** 食管鳞癌病例组和对照组中rs1009316的CC和CT/TT基因型频率分别为59.2%、40.8%和73.2%、26.8%,CT/TT相比CC增加食管鳞癌的发病风险(*OR*值为1.884,95% *CI*为1.224~2.901),T等位基因增加食管鳞癌的发病风险(*OR*值1.620,95% *CI*为1.103~2.379)。分层分析发现,无吸烟史群体中,T等位基因(*OR*值为1.858,95% *CI*为1.050~3.288)及CT/TT基因型(*OR*值为2.178,95% *CI*为1.143~4.147)分别增加食管鳞癌的发病风险。**结论** 在中国西南地区人群中,Bax基因P53结合区域的多态性位点rs1009316是食管鳞癌的危险因素之一。

[关键词] Bax;P53;单核苷酸多态性(SNP);食管鳞状细胞癌;危险因素
[中图法分类号] R394.5;R730.23;R735.1 [文献标志码] A

Association between SNP in P53-binding site of Bax and risk of esophageal squamous cell carcinoma in southwest Chinese Han population

Liu Botao[1], Wang Kai[1], Xu Xueqing[1], Xiong Gang[2], Guo Hong[1], Guan Xingying[1], Bai Yun[1] ([1]Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Science, [2]Department of Cardiothoracic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the association between single nucleotide polymorphism (SNP) in P53-binding site of Bax and the risk of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in southwest Chinese Han population. **Methods** The SNaPshot technique was applied to detect genotype of rs1009316 in 201 cases of ESCC (ESCC group) and 183 cases of healthy controls (control group), and the association between different genotypes of rs1009316 and the risk of ESCC was analyzed. **Results** The frequencies of the rs1009316 variants CC and CT/TT were 59.2% and 40.8% in the ESCC group and 73.2% and 26.8% in the control group, respectively. Compared with CC genotype, CT/TT genotype increased the risk of ESCC (*OR* 1.884, 95% *CI* 1.224 to 2.901). T allele frequency was 20% in the ESCC group and 14% in the control group, and T allele was positively correlated with the risk of ESCC (*OR* 1.620, 95% *CI* 1.103 to 2.379). In stratification analysis, CT/TT genotype and T allele increased the risk of ESCC in the subjects without smoking history. **Conclusion** rs1009316 a SNP lying in the p53-binding site of Bax, is a risk factor of ECSS in southwest Chinese Han population.

[**Key words**] Bax; P53; single nucleotide polymorphism (SNP); esophageal squamous cell carcinoma; risk factor

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30971603). Corresponding author: Bai Yun, Tel: 86-23-68752258, E-mail: genebaiyun@gmail.com

食管癌是我国高发的肿瘤之一,以食管鳞状细胞癌为主,是致死率位于第4的恶性肿瘤[1]。P53是研究和认识最多的抑癌基因,Bax是受P53调控的重要靶分子,主要发挥促进细胞凋亡的作用[2-3]。研究证实,Bax的表达及功能异常参与了宫颈癌、乳腺癌、食管癌等肿瘤的发生、发展[4-6],Bax低表达与口腔鳞癌及晚期食管鳞癌预后差相关[7-8]。但Bax基因多态性与食管鳞癌遗传易感的关系,目前国内外还少见文献报道。

我们通过生物信息学分析发现,Bax基因P53结合区域存在单核苷酸多态性位点(single nucleotide

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30971603)
[通信作者] 白 云,电话:(023)68752258,E-mail:genebaiyun@gmail.com

polymorphism,SNP)rs1009316,推测其多态性可能影响P53对Bax的表达调控,从而导致不同基因型的个体肿瘤易感性产生差异。为此,本研究通过病例-对照研究,探讨rs1009316位点多态性与中国西南地区人群中食管鳞癌易感性的关系,为进一步深入认识食管鳞癌发生、发展的分子遗传机制提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

实验共纳入食管鳞癌样本201例和健康对照183例,所有纳入样本均长期在西南地区居住,不存在血缘关系。食管鳞癌病例均在第三军医大学西南医院胸心外科就诊,均是首发食管鳞癌病例,并经病理诊断确诊。之前有肿瘤病史的样本未被纳入。健康对照样本均在第三军医大学西南医院体检中心体检。无吸烟史是指从未吸烟或者仅在年轻时偶尔吸烟。本研究经第三军医大学伦理委员会同意,并征得所有纳入样本同意。

1.2 基因分型

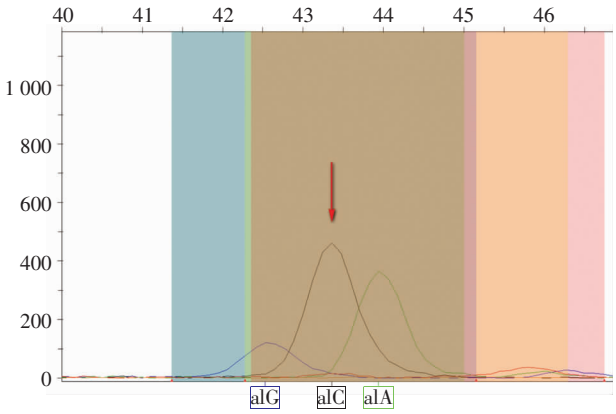
1.2.1 血液DNA提取 所有入选样本均采集静脉血5 ml,使用Promega公司的基因组抽提试剂盒提取全血基因组DNA,经微量紫外分光光度计NanoDrop 1 000进行纯度和浓度的测定后,放入-20 ℃冰箱备用。

1.2.2 PCR扩增及纯化 PCR试剂采用北京天根公司的2×*Taq* PCR MasterMix,PCR反应体积20 μl,DNA模板1 μl,2×*Taq* PCR MasterMix 10 μl,上下游引物终浓度为125 nmol/L,双蒸水补足反应体系。PCR引物利用Primer Premier 5.0设计,序列:5′-TGCGATCTCCAAGCACTG-3′(上游引物),5′-GCCTGTATCCTACATTCTCCC-3′(下游引物),产物317 bp。PCR反应条件:94 ℃ 4 min预变性,然后94 ℃变性20 s,59 ℃退火20 s,72 ℃延伸30 s,36个循环后,72 ℃终末延伸3 min。PCR反应在美国ABI 9700 PCR仪上进行。PCR产物加入美国Fermentas的FAP 5U和*Exo* Ⅰ 2U进行纯化,纯化条件:37 ℃保温1 h,75 ℃ 15 min以灭活酶。纯化产物存于4 ℃备用。

1.2.3 SNaPshot基因分型 rs1009316的基因分型采用美国ABI公司的SNaPshot(单碱基延伸)方法,SNaPshot PCR反应体积10 μl,其中PCR产物3 μl,SNaPshot PCR Mix 5 μl,SNaPshot引物1 μl,双蒸水补是反应体系。反应条件:96 ℃变性10 s,50 ℃退火5 s,60 ℃延伸30 s,25个循环。SNaPshot引物序列:5′-TTTTTTCTGCCCCCTCAGGCCAGGGGTCTGGATGCA-3′。SNaPshot产物纯化后,在ABI 3130遗传分析仪上电泳,然后利用Gene Mapper 4.0软件进行分析。5%的样本进行直接测序,得到的SNP分型数据和SNaPshot方法一致(图1、2)。

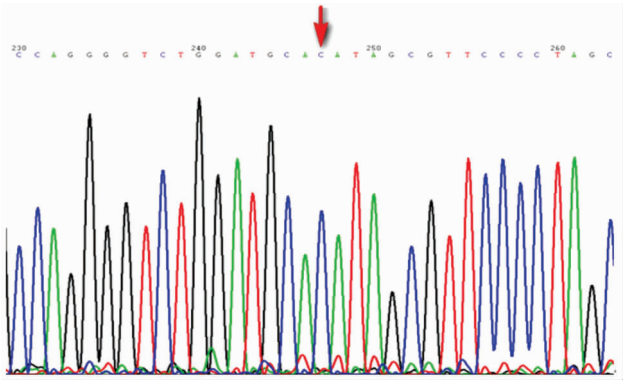
1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行分析。病例与对照之间的人口学特征利用*t*检验(年龄)或者χ^2检验(性别、吸烟史)进行分析,对照组的Hardy-Weinberg平衡利用χ^2检验分析,利用四格表χ^2检验分析病例对照之间的基因型分布并计算优势比*OR*值和95%可信区间。



箭头所指为SNP位点rs1009316,该样本基因型为C/C;其余两个峰为另一SNP的等位基因

图1 SNaPshot检测病例样本(编号:742)rs1009316的基因型



箭头所指为SNP位点rs1009316,该样本基因型为C/C

图2 测序检测病例样本(编号:742)rs1009316的基因型

2 结果

2.1 研究对象人口学分布情况

纳入对象中,病例组年龄(58.7±7.57)岁,对照组年龄(59.1±7.71)岁,两组差异无统计学意义($P=0.649$);如表1所示,病例组与对照组性别分布没有显著性差异($P=0.945$);病例组样本的吸烟暴露率(66%)明显高于对照组(40%),存在显著性差异($P<0.01$),提示吸烟是食管鳞癌的危险因素之一。

表1 病例组与对照组的人口学特征

组别	*n*	性别		吸烟史	
		男	女	有	无
对照组	183	148(0.81)	35(0.19)	73(0.40)	110(0.60)
病例组	201	167(0.83)	34(0.17)	133(0.66)[a]	68(0.33)[a]

a:$P<0.01$,与对照组比较

2.2 rs1009316的基因型分布

所有纳入样本均成功进行了基因分型,对照组样本经过遗传平衡检验,rs1009316各基因型统计结果显示*P*值为0.13,大于0.05,符合Hardy-Weinberg平衡,说明该样本群体代表性好。rs1009316的等位基因和基因型频率分布见表2,由于TT基因型数量较小,分析时将TT与CT基因型合并。如表2所示,病例组中CC基因型频率为59.2%,CT/TT为40.8%;而对照组

中CC基因型频率为73.2%,CT/TT为26.8%,基因型分布存在显著性差异($P=0.004$);病例组中C等位基因频率80%,T等位基因频率20%;而对照组中C等位基因频率86%,T等位基因频率14%,分布存在显著性差异($P=0.013$)。对rs1009316与食管鳞癌的易感性关联分析中发现,当基于广义遗传模型分析时,CT/TT基因型相比CC基因型显著增加食管鳞癌的发病风险(*OR*值为1.884,95% *CI*为1.224~2.901);基于乘法遗传模型分析发现,T等位基因相比C等位基因增加食管鳞癌的发病风险(*OR*值为1.620,95% *CI*为1.103~2.379)。结果提示:T等位基因是食管鳞癌的易感性基因。

表2 rs1009316与食管鳞癌易感性的关联分析

SNP	病例组	对照组	*OR*值(95% *CI*)	*P*值
CC	119(59.2)	134(73.2)	1.00(参照值)	
CT/TT	82(40.8)	49(26.8)	1.884(1.224~2.901)	0.004
TT	0	1		
C	320(0.80)	316(0.86)	1.00(参照值)	
T	82(0.20)	50(0.14)	1.620(1.103~2.379)	0.013

2.3 吸烟的分层分析

由于既往研究显示吸烟是食管鳞癌的危险因素之一,而本研究两组样本在吸烟暴露率上有显著差异,为排除吸烟这一因素的混杂偏倚,并分析rs1009316位点是否与吸烟存在交互作用,我们根据有无吸烟史对样本进行了分层分析。发现在无吸烟史样本中,携带CT/TT基因型样本的食管鳞癌发病风险是CC基因型样本的2.178倍(95% *CI*为1.143~4.147),T等位基因相比C等位基因增加食管鳞癌的发病风险,*OR*值为1.858(95% *CI*为1.050~3.288);但在有吸烟史的样本中,rs1009316各基因型及等位基因型与食管鳞癌的发病风险没有关联作用。结果提示:rs1009316是食管鳞癌的危险因素之一,但与吸烟不存在交互作用(表3)。

表3 rs1009316与食管鳞癌易感性关联研究的分层分析

吸烟史	SNP	病例组	对照组	*OR*值(95% *CI*)	*P*值
无	CC	39	82	1.00(参照值)	
无	CT+TT	29	28	2.178(1.143~4.147)	0.017
无	TT	0	0		
有	CC	80	52	1.00(参照值)	
有	CT+TT	53	21	1.640(0.888~3.032)	0.113
有	TT	0	1		
无	C	107	192	1.00(参照值)	
无	T	29	28	1.858(1.050~3.288)	0.032
有	C	213	124	1.00(参照值)	
有	T	53	22	1.402(0.814~2.417)	0.222

3 讨论

细胞凋亡参与了肿瘤的发生、发展过程。细胞不能按照正常程序凋亡,被认为是肿瘤发生的起始点[9]。P53是介导细胞凋亡的关键分子,其下游靶基因Bax是BCL2蛋白家族的成员之一,主要发挥促进凋亡的作用。大量的研究表明,Bax在宫颈癌、乳腺癌、食管癌等多种肿瘤中表达下调,其促凋亡作用降低,从而促进了肿瘤的发生和发展[4-6]。

人类Bax基因位于染色体19q13.3-q13.4,包括7个外显子和6个内含子。目前有关Bax基因多态性与肿瘤易感性的研究报道较少。2007年,Chen等[10]人发现在非西班牙裔白人中,Bax基因启动子区域多态性位点rs4645878与头颈部鳞癌易感性有关;2008年,Enjuanes等[11]发现该位点在西班牙裔白人样本中与慢性淋巴细胞白血病易感性相关。由于遗传背景的不同及肿瘤病因的异质性,目前国内外还少见关于Bax基因多态性与食管癌易感的相关性研究报道。

既往研究证实,Bax是转录因子P53的重要靶基因,P53通过结合到Bax的转录调控区域发挥对其的表达调控作用[12]。2006年,有学者利用CHIP-PET技术在全基因组序列筛查了转录因子P53的结合序列,结果在UCSC数据库中公开[13-14]。我们在Bax基因的P53结合区域发现了人群中存在SNP rs1009316位点,我们推测该SNP有可能影响P53与Bax调控区域的结合,导致携带不同基因型的个体受P53调控时Bax基因表达水平不同,从而影响Bax的促凋亡作用,导致不同基因型个体对食管鳞癌易感性的差异。为证实这一假设,本研究通过病例对照设计,在西南地区201例食管鳞状细胞癌病例和183例健康汉族人群中,分析了rs1009316位点多态性与食管鳞癌易感性的关联作用。结果发现携带有rs1009316 T等位基因的人群与食管鳞癌易感性有显著关联性,CT/TT基因型及T等位基因增加食管鳞癌的发病风险。分层分析结果显示,在无吸烟史的样本中,CC/TT基因型及T等位基因增加样本的发病风险,提示T等位基因可能是食管鳞癌发病风险的指标之一,该位点是否能成为有临床价值的食管鳞癌早期预测及诊断的新标志,还需要进一步采用不同地区、不同种族人群的大样本进行验证。

本研究进行了Bax基因的P53结合区域的多态性位点rs1009316与食管鳞癌易感性的研究,证实二者具有显著相关性。我们将在后续研究中进一步探讨rs1009316多态性位点影响P53对Bax基因表达调控的机制,为深入认识中国西南地区人群食管鳞状细胞癌发生、发展的分子遗传机制奠定基础。

参考文献:

[1] Zhao P, Dai M, Chen W, *et al*. Cancer trends in China[J]. Jpn J Clin Oncol, 2010, 40(4): 281-285.
[2] Chipuk J E, Moldoveanu T, Llambi F, *et al*. The BCL-2 family reunion[J]. Mol Cell, 2010, 37(3): 299-310.
[3] Speidel D. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death[J]. Trends Cell Biol, 2010, 20(1): 14-24.
[4] Oh J M, Kim S H, Cho E A, *et al*. Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen-peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(3): 402-410.
[5] Yao Q, Chen J, Lv Y, *et al*. The significance of expression of autoph-

agy-related gene Beclin, Bcl-2, and Bax in breast cancer tissues[J]. Tumour Biol, 2011, 32(6): 1163 - 1171.
[6] Vallbohmer D, Brabender J, Metzger R, *et al*. Genetics in the pathogenesis of esophageal cancer: possible predictive and prognostic factors [J]. J Gastrointest Surg, 2010, 14 Suppl 1: S75 - S80.
[7] Zhang M, Zhang P, Zhang C, *et al*. Prognostic significance of Bcl-2 and Bax protein expression in the patients with oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2009, 38(3): 307 - 313.
[8] Kang S Y, Han J H, Lee K J, *et al*. Low expression of Bax predicts poor prognosis in patients with locally advanced esophageal cancer treated with definitive chemoradiotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13 (14): 4146 - 4153.
[9] Cotter T G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(7): 501 - 507.
[10] Chen K, Hu Z, Wang L E, *et al*. Single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding or responsive promoter regions of BAX and BCL2 genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(9): 2008 - 2012.
[11] Enjuanes A, Benavente Y, Bosch F, *et al*. Genetic variants in apoptosis and immunoregulation-related genes are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia[J]. Cancer Res, 2008, 68(24): 10178 - 10186.
[12] Sinha S, Malonia S K, Mittal S P, *et al*. Coordinated regulation of p53 apoptotic targets BAX and PUMA by SMAR1 through an identical MAR element[J]. EMBO J, 2010, 29(4): 830 - 842.
[13] Wei C L, Wu Q, Vega V B, *et al*. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome[J]. Cell, 2006, 124(1): 207 - 219.
[14] Fujita P A, Rhead B, Zweig A S, *et al*. The UCSC Genome Browser database: update 2011[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(Database issue): D876 - D882.

(**收稿**:2012-01-10;**修回**:2012-02-16)
(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2012)10-0966-01

高 IgM 综合征 1 例

刘宇宏 (716000 延安,延安大学附属医院血液免疫科)

[**关键词**] 高 IgM 综合征 纯红再生障碍性贫血
[**中图法分类号**] R593.3 [**文献标志码**] B

高 IgM(HIGM)综合征是一种罕见的原发性免疫缺陷病。其特点为正常或升高的血清 IgM,极低的 IgG, IgA 和 IgE[1]。本病男性多见,大部分为性联遗传,少数为常染色体隐性或显性遗传,偶有散发病例。我科 2009 年 1 月收治 1 例,其骨髓象和国内曾报道的有不同之处,现报告如下。

1 临床资料

患儿,男性,7 岁,于 2009 年 1 月因发热、乏力、咳嗽,面色苍白入住我院,患儿为足月顺产,第 1 胎第 1 产,产重 4 000g,否认产伤窒息史。母孕期体健。按时进行预防接种。患儿出生后 6 个月易发生口腔感染、肺炎,经常使用抗生素控制病情。查体可见患儿发育正常,消瘦,精神差,重度贫血貌。口腔有多处溃疡,双肺可闻及湿性啰音,心尖区可闻及 3/6 级收缩期吹风样杂音,肝、脾、淋巴结、扁桃体无肿大。痰培养出肺炎球菌,血常规示:WBC 4.7×10^9/L N 2.1×10^9/L HGB17 g/L, PLT 70×10^9/L;骨髓穿刺:粒系增生活跃,占有核细胞的 58.5%,其中原加早幼粒细胞占 7.0%,中、晚幼粒细胞占 37.5%,部分细胞体积明显增大,染色质细致疏松,有核浆发育不平衡现象,杆状核以下阶段细胞少见,少许 Chediak - Higashi 畸形中性粒细胞,细胞质中可见巨大的蓝色颗粒。红系增生低下,原红加早幼红为 5%,可见巨大、超巨幼改变的幼红细胞,成熟红细胞大小不等;全片共见巨核细胞 32 个,血小板散在可见。淋巴细胞易见,偶见幼稚样淋巴细胞。骨髓象示:①增生伴感染骨髓象;②红系成熟障碍,结合临床。病毒学检测:巨细胞病毒 IgM(+),单纯疱疹病毒Ⅰ型抗体 IgG(+),单纯疱疹病毒Ⅱ型抗体 IgG(+);EB 病毒抗体 IgM(-),腺病毒抗体 IgM(-):微小病毒 B19 抗体 IgM(+)、IgG(+),T 细胞免疫示:CD4/CD8 = 1.1(1.2 ~ 2.9),B 细胞、NK 细胞计数在正常范围;免疫球蛋白:IgM 515 mg/dl(60 ~ 250 mg/dl),IgG 44 mg/dl(800 ~ 1 800 mg/dl), IgA 20 mg/dl(90 ~ 450 mg/dl),予以输红细胞 2 U、头孢哌酮舒巴坦抗感染、丙球 5.0 g/d,共 5 d,患儿口腔感染、肺炎好转。10 d 后复查血常规 WBC 5.3×10^9/L HGB 122 g/L PLT 226×10^9/L,复查骨髓示:增生明显活跃,粒红比值为 0.7∶1,粒系增生相对减低,部分细胞颗粒粗,红系增生明显活跃,占有核细胞的 52.5%,个别细胞体积增大。诊断:①高 IgM 综合征;②纯红再障。病情稳定后出院。2009 年 4 月患儿再次出现上述症状,前往上级医院就诊,行骨穿,报告基本与我科首次骨髓相似,进一步行 CD40L 基因突变检测阳性。现随访患儿 36 个月,平均每 1 ~ 2 个月上述症状复发 1 次,在当地医院输注 5 d 丙球和抗炎药控制病情。患儿母亲为朝鲜族人,自诉平时易发生口腔感染,检测 CD40L 表达减低,为正常的 70%,否认家族中类似病例。

2 讨论

HIGM 综合征患儿出现临床症状的平均年龄小于 12 个月,表现为反复细菌感染,还易发生关节炎,炎性肠病,中性粒细胞减少,血中出现自身抗体等[2]。Cabral-Marquesd 等[3]对 1 组巴西患者的研究中,发现 82%(9/11)患者真菌感染,有的合并克雷伯杆菌和不动杆菌感染,有的合并乳头状病毒感染。在对 51 例 HIGM 的患者研究中发现[4],胆汁淤积 (65%) 和门静脉高压(50%)是肝脏损害的主要表现,组织学显示 84% 患者肝脏结节性增生。淋巴细胞浸润、门脉异常、上皮肉芽肿分别占 90% 、

(下转 970 页)

[**通信作者**] 刘宇宏,E-mail:sxlyh514@163.com