

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.16.005  
文章编号: 1005-8982(2019)16-0027-05

## *p21 codon31* 基因多态性与宫颈癌的关系

郭海燕<sup>1</sup>, 杨少迪<sup>2</sup>, 蒋佩<sup>3</sup>

(1. 西安市第四医院 妇产科, 陕西 西安 710004; 2. 中南大学基础医学院 生物医学工程系, 湖南 长沙 410083; 3. 娄底职业技术学院医学院, 湖南 娄底 417000)

**摘要: 目的** 探讨 *p21 codon31* 基因单核苷酸多态性与中国汉族人群宫颈癌统计学、发病风险及临床病理学参数的关系。**方法** 选取 2014 年 1 月—2016 年 6 月陕西西安及湖南地区汉族宫颈癌患者 178 例作为研究组, 并选取相同时间和地点的 237 例健康群众作为对照组。采用限制性片段长度多态性分析 (PCR-RFLP) 对 *p21 codon31* 基因多态性基因分型。对两组基因型和临床病理学参数进行分析。**结果** 对照组中 *p21 codon31* 基因 Ser 等位基因频率高于研究组 ( $P < 0.05$ ), 研究组中 *p21 codon31* 基因 Ser/Ser 基因型频率高于对照组 ( $P < 0.05$ ), *p21 codon31* 基因 Ser 等位基因携带者患宫颈癌风险是 Arg 等位基因携带者的 1.345 倍 ( $P < 0.05$ ), *p21 codon31* 基因 Ser/Ser 基因型携带者患宫颈癌风险是 Arg/Arg 基因型携带者的 2.01 倍 ( $P < 0.05$ )。**结论** *p21 codon31* 基因多态性与中国汉族人群宫颈癌的发病风险有关系, 其中携带 *p21 codon31* 基因 Ser/Ser 基因型人群有更高的宫颈癌的患病风险。

**关键词:** 多态性, 限制性片段长度; 宫颈肿瘤; 病理学, 临床

**中图分类号:** R730

**文献标识码:** A

## Relationship between *p21 codon31* gene polymorphism and cervical cancer

Hai-yan Guo<sup>1</sup>, Shao-di Yang<sup>2</sup>, Pei Jiang<sup>3</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, the Fourth Hospital of Xi'an, Xian, Shanxi 710004, China; 2. Department of Biomedical Engineering, School of Basic Medicine Science, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China; 3. School of Medicine, Loudi Vocational and Technical College, Loudi, Hunan 417000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the association between the *p21 codon31* polymorphism and statistics, cervical cancer risk and clinicopathological characteristics in Chinese Han population. **Methods** Totally 178 cases of cervical cancer from January 2014 to June 2016 in Xi'an and Hunan provinces of Shaanxi Province were selected as the study group, and 237 healthy people at the same time and place were selected as the control group. The polymorphism of *p21 codon31* gene was typed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Genotypes and clinicopathological parameters of the two groups were analyzed. **Results** Ser allele frequency of *p21 codon31* gene in control group was higher than that in research group ( $P < 0.05$ ). Ser/Ser genotype frequency of *p21 codon31* gene in research group was higher than that in control group ( $P < 0.05$ ). Ser allele carriers of *p21 codon31* gene had 1.345 times higher risk of cervical cancer than those of Arg allele carriers ( $P < 0.05$ ). Ser/Se of *p21 codon31* gene was 1.345 times higher than that of Arg allele carriers ( $P < 0.05$ ). The risk of cervical cancer in carriers of R genotype was 2.01 times higher than that in carriers of Arg/Arg genotype ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The polymorphism of *p21 codon31* gene is associated with the risk of cervical cancer in Chinese Han population. Ser/Ser genotype carriers of *p21 codon31* gene have higher risk of cervical cancer.

**Keywords:** polymorphism, restriction fragment length; uterine cervical neoplasms; cervical cancer; pathology, clinical

收稿日期: 2019-02-25

[通信作者] 杨少迪, E-mail: 15886311258@163.com; Tel: 15886311258

宫颈癌是发展中国家女性癌症病死率的首要因素,其风险因素包括性行为、饮食、人乳头状瘤病毒感染及遗传基因等<sup>[1-2]</sup>。有研究表明,癌基因的激活及抑癌基因的失活与宫颈癌的形成有相关性<sup>[3-6]</sup>。因此,遗传因素成为研究宫颈癌发生、发展机制的热点。目前国内外研究表明,*p21 codon31* 基因多态性与肿瘤具有相关性,但结果存在很大的差异<sup>[7-8]</sup>。本文针对 *p21 codon31* 基因多态性与中国汉族人群宫颈癌患者的统计学、发病风险及临床病理学参数的关系进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

选取 2014 年 1 月—2016 年 6 月陕西西安及湖南地区汉族宫颈癌患者 178 例作为研究组,并选取相同时间和地点的 237 例健康群众作为对照组。采集对照组外周静脉血样本,分装在抗凝管并于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱内保存。同时,记录研究对象的详细临床资料。其中,对照组均通过巴氏涂片和阴道镜等检查,排除宫颈癌和癌前病变的可能性。碘化钾、硼酸、浓盐酸、无水乙醇、氯仿、氯化钠及溴化乙锭均购自北京化学试剂公司,异丙醇、异戊醇、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、Tris 饱和酚、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)相关试剂、Marker DL100 ladder 及 PCR 引物序列合成均购自上海生工生物工程有限公司, *BspI* 内切酶购自英国 New England Biolabs 公司,琼脂糖购自西班牙 Biowest 公司,所有试剂均在有效期内按说明书使用。

### 1.2 实验仪器

基因扩增仪购自美国 MJ 公司,电泳仪购自北京六一仪器厂,凝胶成像仪购自北京五洲东方科技发展有限公司。

### 1.3 DNA 提取

采用标准蛋白酶 K 消化和酚/氯仿法抽提研究对象的 EDTA 抗凝外周静脉血样本的 DNA,提取后于 TE 缓冲液中溶解,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.4 限制性片段长度多态性分析

取上述 DNA 模板进行限制性片段长度多态性分析(polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)<sup>[9]</sup>, PCR 引物序列

见表 1。其中,PCR 反应体系  $15\ \mu\text{l}$ ,包括 DNA 模板  $1.0\ \mu\text{l}$ , *p21* 正向引物 ( $10\ \mu\text{mol/L}$ )  $1.0\ \mu\text{l}$ , *p21* 反向引物 ( $10\ \mu\text{mol/L}$ )  $1.0\ \mu\text{l}$ , dNTP ( $10\ \text{mmol/L}$ )  $0.5\ \mu\text{l}$ ,  $10\times$  PCR 缓冲液  $2.5\ \mu\text{l}$ ,  $\text{MgCl}_2$  ( $25\ \text{mmol/L}$ )  $1\ \mu\text{l}$ , TaqDNA 聚合酶 ( $5\ \text{u}/\mu\text{l}$ )  $0.2\ \mu\text{l}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$   $7.8\ \mu\text{l}$ 。反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,  $94^{\circ}\text{C}$  变性 40 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s,共 35 个循环,  $72^{\circ}\text{C}$  继续延伸 10 min,取出  $4^{\circ}\text{C}$  保存。

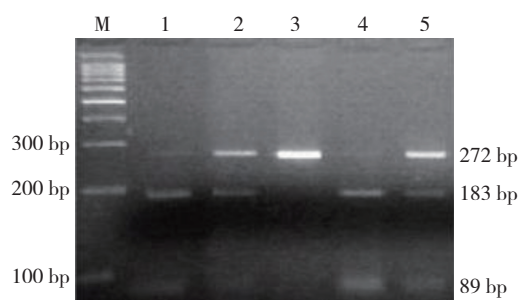
表 1 *p21 codon31* 基因引物序列

引物方向	序列	长度 /bp
正向引物	5' -GTCAGAACC GGCTGGGGATG-3'	272
反向引物	5' -CTCCTCCCAACTCATCCCGG-3'	

取上述 PCR 扩增产物  $7.5\ \mu\text{l}$ ,  $10\times$  酶切缓冲液  $1.5\ \mu\text{l}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$   $5.5\ \mu\text{l}$ ,限制性内切酶 *BspI*  $0.5\ \mu\text{l}$ ,酶切反应体系在  $37^{\circ}\text{C}$  过夜恒温培育,取出放置  $4^{\circ}\text{C}$  条件下保存。

### 1.5 测序

采用 2% 琼脂糖凝胶电泳法统计每个样本的基因分型结果,并抽取 *p21 codon31* 不同基因型的 PCR-RFLP 产物送至上海生工生物工程公司进行测序验证。见图 1、2。



M: 100 bp Marker; 1、4: Ser/Ser 基因型; 3: Arg/Arg 基因型; 2、5: Arg/Ser 基因型

图 1 琼脂糖凝胶电泳图

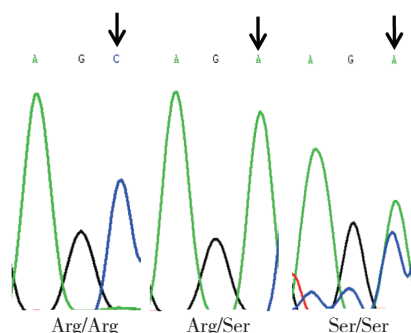


图 2 *p21 codon31* 3 种基因型 PCR 产物测序图

## 1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计数资料以率 (%) 表示, 比较用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组人口学因素分析

两组年龄、饮酒及家族史比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。两组吸烟史比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 研究组吸烟比例高于对照组。见表 2。

### 2.2 两组 p21 codon31 基因型和等位基因分布比较

PCR-RFLP 分析后, p21 codon31 精氨酸 (Arginine, Arg) 等位基因片段为 272 bp; 丝氨酸 (Serine, Ser) 等位基因被酶切成 183 和 89 bp 2 个片段; Arg/Ser 杂合子形成 272、183 及 89 bp 3 个片段。两组 p21 codon31 基因 Ser/Ser 基因型频率比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 研究组高于对照组。两组 p21

codon31 基因 Arg/Ser 基因型频率比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。两组 p21 codon31 基因 Ser 等位基因比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 对照组高于研究组。见表 3。

### 2.3 p21 codon31 基因多态性与宫颈癌风险的关系

在 Logistic 回归分析中, p21 codon31 基因多态性与宫颈癌风险相关。p21 codon31 基因 Ser 等位基因携带者患宫颈癌风险是 Arg 等位基因携带者的 1.345 倍 [ $\hat{OR}=1.345$  (95% CI: 1.020, 11.772),  $P=0.035$ ]; p21 codon31 基因 Ser/Ser 基因型携带者患宫颈癌风险是 Arg/Arg 基因型携带者的 2.01 倍 [ $\hat{OR}=2.010$  (95% CI: 1.106, 3.654),  $P=0.021$ ]。

### 2.4 基因多态性与宫颈癌临床病理特征的关系

不同宫颈癌组织类型、临床分期、淋巴结转移及肿瘤大小的 p21 codon31 基因多态性比较, 经  $\chi^2$  检验, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 4。

表 2 两组一般资料比较 例 (%)

组别	n	年龄		吸烟		饮酒		家族史	
		≤ 45 岁	>45 岁	否	是	否	是	否	是
研究组	178	85 (47.8)	93 (52.2)	148 (83.1)	30 (16.9)	142 (79.8)	36 (20.2)	163 (91.6)	15 (8.4)
对照组	237	115 (48.5)	122 (51.5)	221 (93.2)	16 (6.8)	194 (81.9)	43 (18.1)	224 (94.5)	13 (5.5)
$\chi^2$ 值		0.024		10.527		0.286		1.398	
P 值		0.876		0.001		0.593		0.237	

表 3 两组 p21 codon31 基因型和等位基因分布比较 例 (%)

组别	n	p21 codon31 基因型			p21 codon31 等位基因	
		Arg/Arg	Arg/Ser	Ser/Ser	Arg 等位基因	Ser 等位基因
研究组	178	37 (20.7)	98 (55.1)	43 (24.2)	172 (48.3)	184 (51.7)
对照组	237	64 (27.0)	136 (57.4)	37 (15.6)	264 (55.7)	210 (44.3)
$\chi^2$ 值		-	0.807	5.303	-	4.442
P 值		-	0.369	0.021	-	0.035

表 4 宫颈癌患者不同影响因素 p21 codon31 基因多态性比较 例 (%)

因素	n	Arg/Arg	Arg/Ser	Ser/Ser	$\chi^2$ 值	P 值
组织类型	175					
鳞癌	141	27 (19.1)	79 (56.0)	35 (24.8)	-	-
腺癌	34	9 (26.5)	18 (52.9)	7 (20.6)	0.966	0.617

续表 4

因素	n	Arg/Arg	Arg/Ser	Ser/Ser	$\chi^2$ 值	P 值
临床分期	178					
I 期	68	15 (22.1)	39 (57.4)	14 (20.5)	-	-
II 期	93	19 (20.4)	53 (57.0)	21 (22.6)	0.122	0.941
III 期	17	3 (17.6)	6 (35.3)	8 (47.1)	5.057	0.080
淋巴结转移	178					
是	82	21 (25.6)	42 (51.2)	19 (23.2)	-	-
否	96	16 (16.7)	56 (58.3)	24 (25.0)	2.169	0.338
肿瘤大小	178					
≤ 2 cm	73	14 (19.2)	41 (56.2)	18 (24.7)	-	-
>2 cm	105	23 (21.9)	57 (54.3)	25 (23.8)	0.194	0.907

### 3 讨论

*p21* 基因定位于人类染色体 6p21.2。*p21* 基因编码一种有效的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂, 编码的蛋白结合并抑制 CDK2 或 CDK4 复合物的活性<sup>[10-12]</sup>。*p21* 基因的表达受肿瘤抑制蛋白 p53 的严格控制, 该蛋白通过 p53 介导多种应激刺激下的 p53 依赖性细胞周期 G1 期阻滞<sup>[13-16]</sup>。该蛋白可与增殖细胞核抗原相互作用, 在 G1/S 期 DNA 复制、DNA 损伤修复或细胞凋亡中发挥调控作用。因此, *p21* 基因在抑癌过程中起着重要作用, 但关于 *p21* 基因突变的报道甚少。其中, *p21* 基因最常见的单核苷酸多态性发生在第 31 位密码子 (codon31), 碱基从 AGC 突变到 AGA (C → A), 氨基酸从 Ser 转变为 Arg<sup>[17]</sup>。*p21 codon31* 基因是唯一发生在编码区内的突变, 该多态性位点参与肿瘤发生、发展机制的调控。

LIMA 等<sup>[9]</sup> 的研究表明, 在巴西人群中研究组与对照组的基因型比较有差异, 且携带 *p21 codon31* 基因 Ser/Ser 基因型的研究组与对照组比较, 宫颈癌病变风险增加了 2.41 倍。MA 等<sup>[18]</sup> 的研究表明, 在亚洲人群中 *p21 codon31* 基因多态性与宫颈癌无显著相关性, 但在白种人群里不同基因型与宫颈癌的关系还需要进一步研究。

本研究与 LIMA 等<sup>[7]</sup> 的结果一致, *p21 codon31* 基因 Ser/Ser 基因型患宫颈癌风险比对照组高约 2 倍, *p21 codon31* 基因多态性与中国汉族人群宫颈癌的发病风险有相关性。

综上所述, 本研究在统计学及临床病理特征的研究结果显示, *p21 codon31* 基因多态性与吸烟有关。同

时, 针对中国汉族人群的结果表明, *p21 codon31* 基因多态性与宫颈癌的遗传易感性有关。目前关于 *p21 codon31* 基因多态性的研究较少, 可在不同国家不同人群及种族中进一步扩大样本量进行研究。

#### 参考文献:

- [1] BERMAN T A, SCHILLER J T. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: one cause, two diseases[J]. *Cancer*, 2017, 123(12): 2219-2229.
- [2] AKINLOTAN M, BOLIN J N, HELDUSER J, et al. Cervical cancer screening barriers and risk factor knowledge among uninsured women[J]. *Journal of Community Health*, 2017, 42(4): 770-778.
- [3] ZHOU Y, AN Q, GUO R X, et al. miR424-5p functions as an anti-oncogene in cervical cancer cell growth by targeting KDM5B via the Notch signaling pathway[J]. *Life Sciences*, 2017, 171(1): 9-15.
- [4] PERALTA-ZARAGOZA O, DEAS J, MENESES-ACOSTA A, et al. Relevance of miR-21 in regulation of tumor suppressor gene PTEN in human cervical cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1): 215.
- [5] YUAN H, KRAWCZYK E, BLANCATO J, et al. HPV positive neuroendocrine cervical cancer cells are dependent on Myc but not E6/E7 viral oncogenes[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 45617.
- [6] CHEN G, GONG R, SHI X, et al. Halofuginone and artemisinin synergistically arrest cancer cells at the G1/G0 phase by upregulating p21Cip1 and p27Kip1[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31): 50302-50314.
- [7] DONG Y, WANG X, YE X, et al. Association between p21 Ser31Arg polymorphism and gastrointestinal tract tumor risk: a meta-analysis[J]. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 2014, 14(5):627-633.
- [8] 张晓兰, 李海萍, 金艳霞, 等. 高海拔地区藏族妇女 P21Ser31Arg 多态性及与宫颈癌遗传易感性的相关性研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(11): 2167-2175.
- [9] LIMA G, SANTOS E, ANGELO H, et al. Association between p21

- Ser31Arg polymorphism and the development of cervical lesion in women infected with high risk HPV[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(8): 10935-10941.
- [10] INOUE Y, KAWACHI S, OHKUBO T, et al. The CDK inhibitor p21 is a novel target gene of ATF4 and contributes to cell survival under ER stress[J]. *Febs Letters*, 2017, 591(21): 3682-3691.
- [11] DEWHURST M R, KALDIS P. The Speedy A, Cdk2, p27 triangle[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(4): 489-490.
- [12] VILLARINO N, SIGNAEVSKAIA L, NIEKERK J V, et al. A screen for inducers of bHLH activity identifies pitavastatin as a regulator of p21, Rb phosphorylation and E2F target gene expression in pancreatic cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(32): 53154-53167.
- [13] KIM E M, JUNG C H, KIM J, et al. The p53/p21 complex regulates cancer cell invasion and apoptosis by targeting Bcl-2 family proteins[J]. *Cancer Research*, 2017, 77(11): 3092-3100.
- [14] FISCHER M. p21 governs p53's repressive side[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(21): 2852-2853.
- [15] WOJSIAT J, LASKOWSKAKASZUB K, ALQUÉZAR C, et al. Familial Alzheimer's disease lymphocytes respond differently than sporadic cells to oxidative stress: upregulated p53-p21 signaling linked with presenilin 1 Mutants[J]. *Molecular Neurobiology*, 2017: 5683-5698.
- [16] MATSUDA T, KATO T, KIYOTANI K, et al. p53-independent p21 induction by MELK inhibition[J]. *Oncotarget*, 2017, 54(7): 5683-5698.
- [17] BOONE P M, YUAN B, SHEN G, et al. Hutterite-type cataract maps to chromosome 6p21.32-p21.31, cosegregates with a homozygous mutation in LEMD2, and is associated with sudden cardiac death[J]. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2016, 4(1): 77-94.
- [18] MA Y, ZHANG Y, LIN L, et al. Quantitative assessment of the relationship between p21 Ser31Arg polymorphism and cervical cancer[J]. *Tumour Biology*, 2013, 34(6): 3887-3892.

(李科 编辑)