

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.15.010

文章编号: 1005-8982(2017)15-0047-06

MICA 基因多态性及单倍型多样性与 卵巢癌的易感关联性研究

蒋丽琴¹, 陈恩², 王超¹

(1. 南华大学附二医院 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学附一医院 湖南 衡阳 430400)

摘要:目的 探讨中国南方汉族人群 MICA 等位基因多态性和卵巢癌发生之间的关联。**方法** 采用 PCR-SSP 及 PCR-SBT 方法对外周血标本的目的基因进行检测。**结果** 中国南方汉族卵巢癌组患者外周血标本中检测到 11 种 MICA 等位基因;和对照组相比较, MICA * 010 等位基因在卵巢癌组患者中分布频率升高。卵巢癌患者组中检测到 5 种 MICA-STR 等位基因,但其与对照组比较,差异无统计学意义;卵巢癌患者组 MICA * 010/010 纯合子出现率增加,提示其对卵巢癌可能易感($OR=14.82, 95\%CI:1.89, 115.94, P<0.05$)。**结论** MICA 等位基因多态性与中国南方汉族卵巢癌的发生有相关性。

关键词: MICA 基因;基因多态性;卵巢癌

中图分类号: R392.1

文献标识码: A

Association between MICA gene polymorphism and haplotype diversity with ovarian cancer

Li-qin Jiang¹, En Chen², Chao Wang¹

(1. The Second Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China;

2. The First Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 430400, China)

Abstract: Objective To study the association between the MICA gene polymorphism and haplotype diversity with the susceptibility of ovarian cancer. **Methods** PCR-SSP and PCR-SBT were used to analyze the gene polymorphism and haplotype diversity of MICA in ovarian cancer patients and healthy individuals. **Results** Eleven MICA allele genes were found in the south China ovarian cancer patients, and the frequency of MICA * 010 was higher in south China ovarian cancer patients than in healthy controls, presenting genic susceptibility to ovarian cancer ($OR = 6.43, 95\% CI: 3.51, 11.76, P < 0.05$). Five MICA-STR alleles were detected, but there was no significant difference between the case and the control. Compared to the control group, the distribution frequency of MICA * 010/010 was significantly high and it is probably a susceptibility genotype to ovarian cancer ($OR = 14.82, 95\% CI: 1.89, 115.94, P < 0.05$). **Conclusions** MICA allele gene polymorphism and haplotype diversity may be associated with ovarian cancer.

Keywords: MICA alleles; gene polymorphism; ovarian cancer

卵巢癌(ovarian cancer, OC)患病率高,占妇科恶性肿瘤的 23%,是导致成年女性死亡的常见疾病^[1-4]。其预后差,目前没有早期诊断的方法,据报道,在已经确诊的患者中,超过 60%患者有肿瘤细胞的盆腔

和(或)远处转移,属于 III 期或 IV 期晚期病例,因此早期预防十分必要^[5]。卵巢癌的发病机制与多种因素有关,以往的研究表明,遗传背景也是其重要的发病原因之一。主要组织相容性复合物 I 类链相关基因 A

收稿日期:2017-04-21

[通信作者] 王超, E-mail: 317249741@qq.com; Tel: 13786404481

(MHC class I related chain A, MICA) 与人体免疫及肿瘤的发生息息相关,具有广泛的多态性^[4]。20 世纪末,由美国 SPIES 教授首先报道^[5]。以往的研究表明, MICA 基因与多种疾病发生有关联,尤其是肿瘤疾病,但暂无与中国南方人群卵巢癌患者易感性相关报道^[6-8]。因此,本研究以卵巢癌患者作为研究对象,从 MICA 基因多态性这个角度观察其与中国南方汉族卵巢癌之间是否具有关联性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2012 年 9 月 -2015 年 10 月在南华大学附二医院就诊并通过病理学等检查临床明确诊断为卵巢癌的患者;对其 TNM 分期不做限制;患者除卵巢癌外不能合并其他有遗传倾向的疾病。所有患者需在中国南方至少定居 3 代,且全部为汉族人群。招募到 110 例符合研究标准的患者,平均 56.1 岁(35 ~ 78 岁)。招募 124 例健康志愿者,平均 45.6 岁(20 ~ 69 岁),作为对照组。研究对象间无亲属关系。研究经南华大学附二医院伦理委员会审核,符合相关要求。

1.2 基因的提取及分型

参考相关文献,在外周血中提取 DNA,对目标基因分型^[9]。本研究采用序列特异性引物聚合酶链反应 (polymerase chain reaction-sequence specific primer, PCR-SSP) 与聚合酶链反应 - 直接测序分型 (polymerase chain reaction-sequence based typing, PCR-SBT) 的方式^[10-13]。PCR-SSP 由设计的 67 个引物对组成。通过组合等方式,设计出不同基因型别所对应的不同组合方式,绘制出格局表(引物序列和格局表同参考文献[14]);对每一标本进行 68 对 PCR 反应(其中一孔为阴性对照),每次反应都需加入内参;内参为人生长激素基因,引物序列如下,正向引物: 5'-GCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3';反向引物: 5'-GAGAAAGGCTGGAGGATTC-3'。产物长度 834 bp。

根据格局表可确立该标本的 MICA 等位基因型;根据 MICA 分型格局表对 MICA 基因的等位基因型别进行分析判断。将获得 MICA 等位基因的基因型别,采用 Anthony Nolan Trust 数据库查询获得 MICA-STR 型别。部分如 MICA*002:01 与 MICA*020 等的基因型别无法用 PCR-SSP 方法检出,也为验证 PCR-SSP 方法的可靠性,PCR-SBT 方法对部分样本的 MICA 等位基因进行分型分析。扩增引物和测序引物参见文献[14]。

1.3 统计学方法

MICA 等位基因频率、MICA 基因型频率及遗传平衡检验(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)采用 SHEGIS 软件进行计算获得^[14];OR 等关联性分析用 Logistic 回归分析;采用 Fisher 精确概率法对其进行检验。*P* 值采用 Bonferroni 校正后得到的 *P_c* 值在 5% 水平上进行检验^[15]。

2 结果

2.1 两组 Hardy-Weinberg 平衡吻合度情况

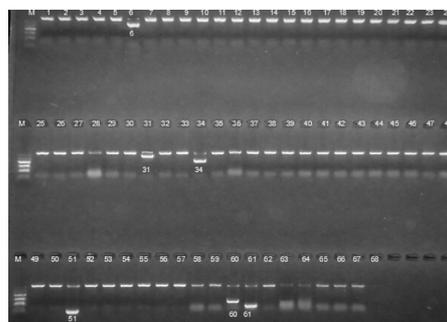
经 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验分析表明,各等位基因的分布理论频率与观察频率之间差异无统计学意义,表明本实验所选样本是符合 Hardy-Weinberg 平衡的随机婚配群体。

2.2 MICA 基因型确定

MICA 基因扩增,扩增产物的电泳图(见图 1),参照 MICA 分型格局表,判定该随机研究对象。MICA 基因型为 MICA*010/010。

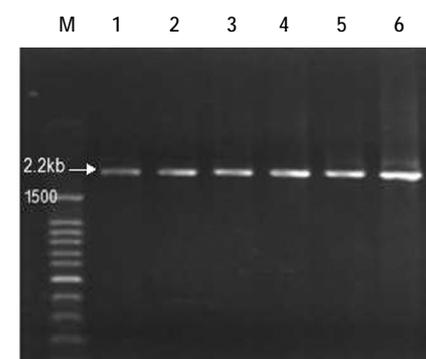
2.3 PCR-SBT 方法检测 MICA 基因

对研究对象基因组 DNA 扩增 MICA 的 PCR 产物(2.2 kb)(见图 2),每一泳道为 1 个个体的 DNA 样本。对样本经基因测序所显示的 MICA 基因(见图 3)。



M: Marker; 1 ~ 67: 67 个引物对; 68 孔: 空白对照组

图 1 MICA 基因扩增产物电泳图



M: Marker; 1 ~ 6: 6 个不同 DNA 样本的 MICA 基因 PCR 产物

图 2 随机标本 MICA 基因 PCR 结果

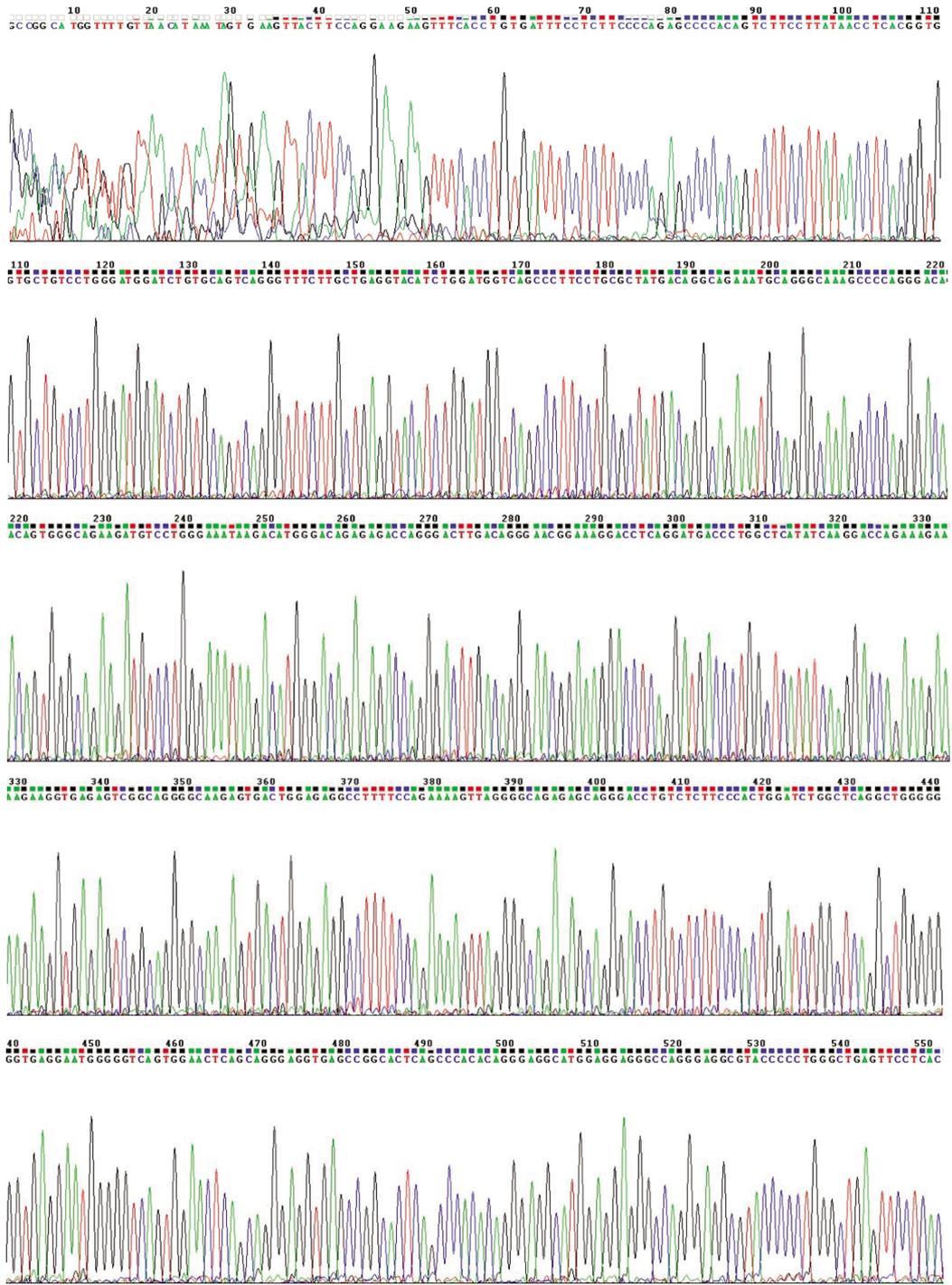


图 3 某研究对象 *MICA* 基因

2.4 *MICA* 基因与中国南方汉族卵巢癌之间的相关性

中国南方汉族卵巢癌患者中共检出 11 种 *MICA* 基因表型。其中, *MICA**00201、*MICA**010 及 *MICA**019 为最常见 3 种 *MICA* 表型, 分别占 20.90%、20.45% 及 19.55%。与健康对照组相比较, *MICA**010 等位基因在中国南方汉族卵巢癌组患者出现的频率增高

(20.45% vs 6.05%), 可能对卵巢癌易感 ($OR=6.42$, 95%CI: 3.51, 11.76, $P<0.05$)。见表 1。

2.5 *MICA-STR* 基因与中国南方汉族卵巢癌之间的相关性

MICA-STR 等位基因中国南方汉族卵巢癌组观测到 5 种, 最高分布频率的是 *MICA-A5*, 占 40.0%, 与健康组比较, 中国南方汉族卵巢癌组的分布频率

差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.6 中国南方汉族卵巢癌相关性同 MICA 单倍型多样性的比较

对比结果显示, *MICA**010/010 纯合子基因型在

中国南方汉族卵巢癌组中的出现频率与健康组对比增高(10.91% vs 0.82%), 提示其可能为易感基因型($\hat{OR}=14.83, 95\%CI: 1.89, 115.94, P<0.05$)。见表 3。

表 1 *MICA* 各等位基因型频率比较

<i>MICA</i> 等位基因	卵巢癌组($n=220$) 例(%)	对照组($n=248$) 例(%)	OR	95%CI		χ^2 值	P 值	Pc
				下限	上限			
<i>MICA</i> *006	1(0.45)	0(0.00)	-	-	-	41.61	-	-
<i>MICA</i> *009	3(1.36)	0(0.00)	-	-	-	37.70	-	-
<i>MICA</i> *010	45(20.45)	15(6.05)	3.99	2.16	7.40	21.65	0.0000	0.0000 [†]
<i>MICA</i> *017	1(0.45)	3(1.21)	0.37	0.04	3.61	0.78	0.3758	>0.05
<i>MICA</i> *019	43(19.55)	73(29.44)	0.58	0.38	0.90	6.12	0.0134	>0.05
<i>MICA</i> *023	1(0.45)	0(0.00)	-	-	-	151.59	-	-
<i>MICA</i> *045	17(7.73)	34(13.71)	0.53	0.29	0.97	4.30	0.0382	>0.05
<i>MICA</i> *00201	46(20.91)	46(18.55)	1.16	0.74	1.83	0.41	0.5213	>0.05
<i>MICA</i> *00504	1(0.45)	0(0.00)	-	-	-	112.05	-	-
<i>MICA</i> *00801	37(16.82)	62(25.00)	0.61	0.38	0.90	4.68	0.0305	>0.05
<i>MICA</i> *01201	25(11.36)	15(6.05)	1.99	1.02	3.88	4.21	0.0401	>0.05

注: [†] $Pc<0.05$

表 2 *MICA*-STR 各等位基因频率比较

<i>MICA</i> 等位基因	卵巢癌组($n=220$) 例(%)	对照组($n=248$) 例(%)	OR	95%CI		χ^2 值	P 值	Pc
				下限	上限			
<i>MICA</i> -A4	42(19.09)	49(19.76)	0.96	0.31	0.93	0.0300	0.8556	>0.05
<i>MICA</i> -A5	88(40.00)	88(35.48)	1.21	1.35	2.90	1.0100	0.3141	>0.05
<i>MICA</i> -A5.1	38(17.27)	62(25.00)	0.63	0.29	0.78	4.1400	0.0418	>0.05
<i>MICA</i> -A6	4(1.82)	0(0.00)	-	-	-	117.4300	-	-
<i>MICA</i> -A9	48(21.82)	49(19.76)	1.13	0.61	1.56	0.3000	0.5832	>0.05

注: [†] $Pc<0.05$

表 3 *MICA* 各等位基因型频率比较

<i>MICA</i> 等位基因型	卵巢癌组($n=110$) 例(%)	对照组($n=124$) 例(%)	OR	95%CI		χ^2 值	P 值	Pc
				下限	上限			
<i>MICA</i> *00201/00201	8(7.27)	6(4.92)	1.52	0.51	4.52	0.5700	0.4520	>0.05
<i>MICA</i> *00201/00804	11(10.00)	10(8.20)	1.24	0.51	3.05	0.2300	0.6326	>0.05
<i>MICA</i> *00201/00901	2(1.82)	0(0.00)	-	-	-	19.1300	-	-
<i>MICA</i> *00201/01201	2(1.82)	1(0.82)	2.24	0.20	23.06	0.4500	0.5015	>0.05
<i>MICA</i> *006/00201	1(0.91)	0(0.00)	-	-	-	1.7300	-	-
<i>MICA</i> *00804/00804	5(4.55)	13(10.66)	0.40	0.14	1.16	3.0200	0.0824	>0.05
<i>MICA</i> *00804/01201	2(1.82)	3(2.46)	0.73	0.12	4.48	0.1100	0.7371	>0.05
<i>MICA</i> *009/00804	1(0.91)	0(0.00)	-	-	-	3.5000	-	-
<i>MICA</i> *010/00201	7(6.36)	5(4.10)	1.59	0.49	5.16	0.6100	0.4366	>0.05
<i>MICA</i> *017/019	1(0.91)	2(1.64)	0.55	0.05	6.16	0.2400	0.6230	>0.05
<i>MICA</i> *019/00201	5(4.55)	14(11.48)	0.37	0.13	1.06	3.6900	0.0546	>0.05

续表 3

<i>MICA</i> 等位基因型	卵巢癌组(<i>n</i> =110) 例(%)	对照组(<i>n</i> =124) 例(%)	OR	95%CI		χ^2 值	P 值	Pc
				下限	上限			
<i>MICA</i> *019/00504	1(0.91)	0(0.00)	-	-	-	18.6400	-	-
<i>MICA</i> *019/00804	7(6.36)	14(11.48)	0.52	0.20	1.35	1.8400	0.1754	>0.05
<i>MICA</i> *019/01201	3(2.73)	7(5.74)	0.46	0.12	1.83	1.2700	0.2596	>0.05
<i>MICA</i> *019/019	9(8.18)	13(10.66)	0.75	0.31	1.82	0.4100	0.5207	>0.05
<i>MICA</i> *019/045	2(1.82)	6(4.92)	0.36	0.07	1.81	1.6700	0.1963	>0.05
<i>MICA</i> *023/01201	1(0.91)	0(0.00)	-	-	-	6.4900	-	-
<i>MICA</i> *045/00201	2(1.82)	4(3.28)	0.55	0.10	3.04	0.4900	0.4840	>0.05
<i>MICA</i> *045/00804	3(2.73)	7(5.74)	0.46	0.12	1.83	1.2700	0.2596	>0.05
<i>MICA</i> *045/01201	0(0.00)	2(1.64)	-	-	-	7.0700	-	-
<i>MICA</i> *045/045	4(3.64)	7(5.74)	0.62	0.18	2.18	0.5700	0.4520	>0.05

注: †*P*<0.05

3 讨论

目前,在全世界范围内已有许多学者研究不同基因类型与卵巢癌发病机制的关系。黄娟等人^[15]研究表明,卵巢癌发病风险与 *IL-6* 基因有一定关联;陈平等^[16]研究发现, *XRCC3* 基因与卵巢癌的发生存在相关性;李琰等^[17]报告, *MMP-12*、*13* 启动子区 A/G 型为卵巢癌易感因素;本研究表明,遗传条件对卵巢癌发病有明显的影

响。 *MICA* 基因存在广泛的多态性,许多疾病,如免疫系统疾病、肿瘤均与其有关^[12-13,18]。本研究检测中国南方汉族人群卵巢癌患者及正常对照人群的 *MICA* 基因多态性,实验显示,有 11 种 *MICA* 等位基因在卵巢癌患者组被检测出,其中, *MICA**00201、*MICA**010 和 *MICA**019 是患者组中分布频率最高的 3 种 *MICA* 等位基因;与健康对照组相比较, *MICA**010 等位基因在中国南方汉族卵巢癌患者中出现的频率增高, *MICA**010 等位基因为中国南方汉族卵巢癌的可疑相关基因(OR=6.42, 95%CI: 3.51, 11.76, *P*<0.05)。 *MICA-STR* 等位基因中国南方汉族卵巢癌组观测到 5 种,最高分布频率的是 *MICA-A5*, 占 40.0%,与健康组比较,中国南方汉族卵巢癌组的分布频率差异无统计学意义(*P*>0.05)。以上结果表明, *MICA* 等位基因与卵巢癌的发病有一定关联。由于 *MICA* 基因的产物能够与多种免疫细胞的细胞膜上的受体发生作用,从而是多种免疫细胞在抑制肿瘤的发生中发挥作用,故在本研究中,笔者推测可能是某些 *MICA* 基因的类型个体,其 *MICA* 基因的生物学活力下降、产物不能很好地促进免疫细胞发挥抑制肿瘤发生的作用,

从而导致最终卵巢癌的发生^[11]。 *GAMBELUNGHE* 等发现, *MICA-A5.1* 基因与 *SLE* 的易感关系明显^[11,19], 邢永华研究组报告 *MICA-A5.1* 基因与胃癌的发生有关^[11,20],同时可以观察到许多其他的病种也和 *MICA-A5.1* 基因相关^[11,21-22]。本实验结果中, *MICA-STR* 等位基因的分布频率在两组中无差异。引起该结果的原因可能有以下几点: ①不同肿瘤细胞具有不同的特性,虽然该基因与其他疾病密切相关,但确实与卵巢癌的发生相关性不高^[11]。②标本数量偏少,一种 *MICA-STR* 型别包括多种等位基因,如 *MICA-A5.1* 包括 *MICA**008、*MICA**23、*MICA**28 及 *MICA**054 等位基因,需要更多的样本来反映该等位基因的分布规律。③ *MICA* 在卵巢癌细胞的生长过程中脱落^[23-24],产生所谓的肿瘤免疫逃逸现象^[11]。

本研究选择的研究对象为中国南方汉族人群,以往的研究已经证实, *MICA* 基因型会在各种人群表现出差异。因此,将来仍需选取其他不同人群作为研究对象,观察其他人群中,卵巢癌的发生与 *MICA* 基因多态性之间的关系,为将来了解卵巢癌的发生与不同基因型之间的关系打下基础。

参 考 文 献:

- [1] 娄雪玲,张丽丽,王巧红,等. 先期化疗联合术后腹腔热灌注化疗治疗晚期卵巢癌疗效观察[J]. 中国现代医学杂志, 2015(11): 80-82.
- [2] SPRIGGS D R, LONGO D L. PARP Inhibitors in Ovarian Cancer Treatment[J]. N Engl J Med, 2016, 375(22): 2197-2198.
- [3] 戴芙蓉. Chi-29b 嵌合体在卵巢癌中的抗癌作用及机制研究[D]. 长沙: 中南大学, 2014.
- [4] BAHRAM S. MIC genes: from genetics to biology[J]. Adv Im-

- munol, 2000(76): 1-60.
- [5] BAHRAM S, BRESNAHAN M, GERAGHTY D E, et al. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(14): 6259-6263.
- [6] GLAS J, MARTIN K, BRUNNLER G, et al. MICA, MICB and C1_4_1 polymorphism in Crohn's disease and ulcerative colitis[J]. Tissue Antigens, 2001, 58(4): 243-249.
- [7] KIMURA T, GOTO K, YABUKI K, et al. Microsatellite polymorphism within the *MICB* gene among Japanese patients with Behcet's disease[J]. Hum Immunol, 1998, 59(8): 500-502.
- [8] LU M, XIA B, LI J, et al. MICB microsatellite polymorphism is associated with ulcerative colitis in Chinese population[J]. Clin Immunol, 2006, 120(2): 199-204.
- [9] GONG Z, LUO Q Z, LIN L, et al. Association of *MICA* gene polymorphisms with liver fibrosis in schistosomiasis patients in the Dongting Lake region[J]. Braz J Med Biol Res, 2012, 45(3): 222-229.
- [10] CHEN E, LIN L, CHEN C J, et al. MIC gene polymorphism and haplotype diversity in Zhuang nationality of Southern China[J]. Hum Immunol, 2014, 75(9): 953-959.
- [11] 陈恩, 邹学森, 聂德魁, 等. MICA 基因多态性与结直肠癌的易感关联性研究[J]. 实验与检验医学, 2016(5): 545-549.
- [12] 李瑜, 陈纯静, 王芙蓉, 等. MICB 基因多态性与肺癌的易感关联性研究[J]. 激光生物学报, 2016(1): 69-74.
- [13] 郭家权, 陈纯静, 陈恩, 等. 乳腺癌与 MICA 基因多态性的相关性研究[J]. 激光生物学报, 2015(2): 170-174.
- [14] 龚拯. MICA/B 基因多态性与血吸虫病和白血病相关性研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- [15] 黄娟, 李丹青, 孟健, 等. 白细胞介素 16 基因多态性与卵巢癌的相关性[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015(1): 14-15.
- [16] 陈平平, 杨辰敏. DNA 修复基因 XRCC3 多态性与卵巢癌相关性研究的 meta 分析[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2015(5): 718-723.
- [17] 李琰, 张晓娟, 康山, 等. MMP-12、13 基因启动子区多态性与上皮性卵巢癌的关系[C]. 遗传学进步与人口健康高峰论坛, 2007: 1.
- [18] 陈恩, 邹学森, 聂德魁, 等. MICA 基因多态性与结直肠癌的易感关联性研究[J]. 实验与检验医学, 2016(5): 545-549.
- [19] GAMBELUNGHE G, GERLI R, BOCCI E B, et al. Contribution of MHC class I chain-related A (*MICA*) gene polymorphism to genetic susceptibility for systemic lupus erythematosus[J]. Rheumatology (Oxford), 2005, 44(3): 287-292.
- [20] 邢永华, 杨生玺, 吕同德, 等. 青海汉族、回族、藏族 MICA-TM 基因多态性与胃癌相关性[J]. 青海医学院学报, 2011(1): 1-4.
- [21] DHODAPKAR K M, CIRIGNANO B, CHAMIANF, et al. Invariant natural killer T cells are preserved in patients with glioma and exhibit antitumor lytic activity following dendritic cell-mediated expansion[J]. Int J Cancer, 2004, 109(6): 893-899.
- [22] DHODAPKAR K M, CIRIGNANO B, CHAMIAN F, et al. Invariant natural killer T cells are preserved in patients with glioma and exhibit antitumor lytic activity following dendritic cell-mediated expansion[J]. Int J Cancer, 2004, 109(6): 893-899.
- [23] ZHAO S, WANG H, NIE Y, et al. Midkine upregulates MICA/B expression in human gastric cancer cells and decreases natural killer cell cytotoxicity[J]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61(10): 1745-1753.
- [24] GROH V, WU J, YEE C, et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation[J]. Nature. 2002, 419(6908): 734-738.
- [25] KAISER B K, YIM D, CHOW I T, et al. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands[J]. Nature, 2007, 447(7143): 482-486.