

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.21.006

文章编号: 1005-8982(2016)21-0030-05

论著

子宫颈癌与纤维蛋白原基因多态性的相关性研究

丛硕¹, 曾小菁², 洪科锋¹, 邱爱佳¹

(1. 贵州省肿瘤医院 输血科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属医院 输血科, 贵州 贵阳 550001)

摘要: **目的** 探究在子宫颈癌发病过程中与纤维蛋白原(Fg) β 448 G/A 基因多态性的相关性。 **方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析的方法对 2013 年 5 月-2014 年 12 月初次就诊的汉族子宫颈癌患者 141 例标本与同期收集的健康汉族女性体检者 141 例标本的 Fg β 448 G/A 基因多态性进行基因型分型检测, 并对检测结果进行统计分析。 **结果** ①病例组 Fg β 448 G/A 基因型频率及等位基因频率与对照组比较, 病例组高于对照组 ($P < 0.05$); ②A 等位基因与子宫颈癌的发生密切相关, ③子宫颈癌 GG、GA 及 AA 基因型的血浆 Fg 水平分别是 (3.09 ± 0.22) 、 (3.11 ± 0.26) 和 (3.31 ± 0.51) g/L, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 **结论** Fg β 448 G/A 基因多态性变化与宫颈癌的发生可能具有相关性。

关键词: 子宫颈癌; 基因多态性; 纤维蛋白原

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Correlation between occurrence of cervical cancer and genetic polymorphisms of Fg β -448G/A

Shuo Cong¹, Xiao-jing Zeng², Ke-feng Hong¹, Ai-jia Qiu¹

(1. Department of Blood Transfusion, Guizhou Cancer Hospital, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. Department of Blood Transfusion, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550001, China)

Abstract: **Objective** To detect the relationship between cervical cancer and gene polymorphisms of β -fibrinogen gene (Fg β)-448G/A. **Methods** Polymorphisms of Fg β -448G/A gene were detected and analyzed in the specimens from 141 cervical cancer patients and 141 healthy controls using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. **Results** The genotype frequency and allele frequency of Fg β -448G/A in the cervical cancer group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The allele A was closely associated with the incidence of cervical cancer. The plasma Fg levels in the cervical cancer patients with the genotypes GG, GA and AA were (3.09 ± 0.22) g/L, (3.11 ± 0.26) g/L and (3.31 ± 0.51) g/L respectively without obvious differences ($P > 0.05$). **Conclusions** The gene polymorphism of Fg β -448G/A is possibly associated with the incidence of cervical cancer.

Keywords: cervical cancer; gene polymorphism; fibrinogen

子宫颈癌作为妇科疾病中最为常见的三大恶性病变之一, 在其癌变的过程中, 除人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的感染及持续存在外, 还有其他因素参与子宫颈上皮的病理组织学改变并导致恶性肿瘤的发生^[1]。纤维蛋白原(Fibrinogen, Fg)

能够在凝血酶的作用下转变为纤维蛋白, 从而参与到机体的凝血机制中。当血浆的 Fg 浓度明显升高时, 会对血管内皮细胞具有损伤作用。Fg 作为凝血因子和非特异的炎症因子, 已成为许多疾病已知的重要危险因素之一^[2-5]。大量研究表明, 当血浆 Fg 浓度

收稿日期: 2016-02-17

[通信作者] 曾小菁, E-mail: zengxiaojing@medmail.com.cn; Tel: 13308506266

增高时,血管疾病的发病率也会相对增高,Fg 更是动脉硬化和血栓形成的独立危险因素^[5-7],严芝强等^[8]的最新研究结果表明,Fg 基因多态性与胃癌等恶性肿瘤的发生、发展及其分期具有一定的相关性,但 *Fgβ448 G/A* 的基因多态性与子宫颈癌发生、发展的相关性研究尚未见报道,因此本实验希望通过研究病例组与对照组的基因和基因型分布情况,探究 Fg 基因多态性与子宫颈癌发生、发展的相关性。

1 资料与方法

1.1 病例资料

选取 2013 年 5 月 -2014 年 12 月于贵州省肿瘤医院病理检查确诊为子宫颈癌,且无转移、无系统治疗的 141 名汉族患者作为病例组,平均年龄(44.0 ± 3.0)岁;同期在贵州省肿瘤医院体检的汉族女性健康体检者为对照组,平均年龄(41.8 ± 4.5)岁。

1.2 实验试剂及仪器

1.2.1 主要试剂 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) Mix(北京天根生化科技有限公司),引物合成为正向引物:AACATCAGATCCCCAGAAAAC AG, 反向引物:GGTGAGCAAGAGAAATGAAGAA (上海生工生物工程股份有限公司),Marker I (北京天根生化科技有限公司),限制性内切酶 *Mnl* I (立陶宛 MBI Fermentas 公司),琼脂糖(西班牙 Biowest 公司)。

1.2.2 主要仪器 PE9700 扩增仪(美国 ABI 公司),DNA 成像分析器 Gel Doc EQ (美国 Bio-Rad 公司),DYY-III-5 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂),Millipore 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.3 DNA 标本收集

收集乙二胺四乙酸二钾抗凝全血,离心吸取白细胞层,置入 -60°C 冰箱冷冻保存。

1.4 血浆 Fg 浓度测定

统计子宫颈癌患者于检验科初次检测的血浆 Fg 浓度。

1.5 DNA 提取

利用酚-氯仿法提取 282 份样本 DNA,置入 -60°C 冰箱分装冷冻保存。

1.6 PCR 扩增

PCR 反应体系为 $25\mu\text{l}$,含模板 DNA 和引物各 $1\mu\text{l}$,Taq 酶 $13\mu\text{l}$,双蒸水 $9\mu\text{l}$;反应条件: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 50 s, 54°C 退火 60 s, 72°C 延伸 70 s,共 35 个循环后, 72°C 再次延伸 5 min,扩增产

物降温至 4°C 冰箱保存备用。

1.7 PCR 扩增产物的检测

取 $5\mu\text{l}$ PCR 产物,于 2%琼脂糖凝胶、 $5\times$ Tris-硼酸缓冲液中,以 141 V 电压,电泳约 60 min,以分子量为 100 ~ 700 bp 的 Marker 为相对分子质量标准,在紫外成像仪下观看并分析。

1.8 PCR 产物酶切分型

反应体系中加入 $5\mu\text{l}$ PCR 产物, $2\mu\text{l}$ $10\times$ buffer, $0.5\mu\text{l}$ 限制性核酸内切酶 (*Fg448 G/A* 的内切酶为 *Mnl* I),加双蒸水至 $25\mu\text{l}$, 37°C 恒温孵育 16 h,酶切产物按 1.6 进行电泳并在紫外成像仪下观看和分析结果。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计数资料以率表示,用 χ^2 检验。基因型及等位基因频率利用直接计数法进行统计分析。采用非条件 Logistic 回归法计算比值比(odds ratio, OR)及 95%可信区间(confidence interval, CI), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子宫颈癌患者各基因型 Fg 水平分析

子宫颈癌患者 GG、GA 及 AA 基因型分别为 76、60 和 5 例,血浆 Fg 水平浓度分别为(3.09 ± 0.22)、(3.11 ± 0.26)和(3.312 ± 0.505)g/L,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 PCR 产物结果

2.2.1 *Fgβ448 G/A* 基因分型 PCR 产物鉴定 *Fgβ448 G/A* 多态性片段 PCR 产物经电泳后经紫外灯观察,可见 PCR 产物中有 427 bp 大小的条带。见图 1。

2.2.2 *Fgβ448 G/A* 基因酶切产物分型鉴定 *Fgβ448 G/A* PCR 扩增片段为 427 bp,有 2 个 *Mnl* I 酶切位点的产物片段,GG 基因型酶切产生 183、132 和 112 bp 3 个片段,AA 基因型缺乏其中 1 个 *Mnl*

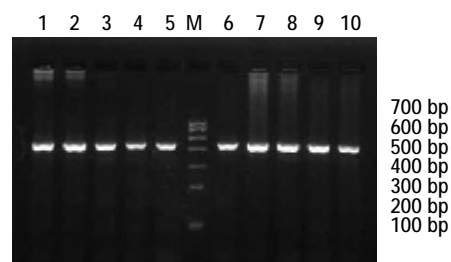
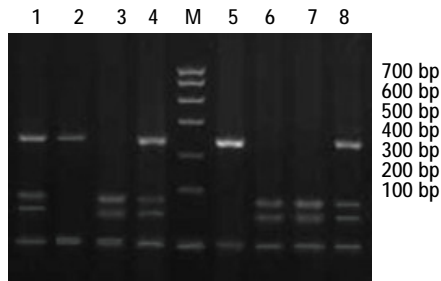


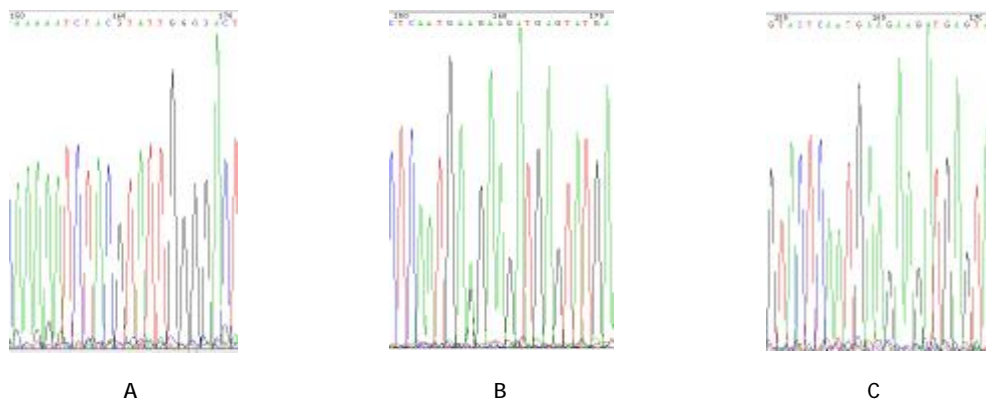
图 1 *Fgβ448 G/A* 位点 PCR 产物

I 酶切位点,酶切后产生 315 和 112 bp 2 个片段,GA 基因型酶切后产生 315、183、132 和 112 bp 4 个片段。见图 2。



M:Marker;3、6、7:GG型;2、5:AA型;1、4、8:GA型
图 2 *Fgβ448 G/A* PCR 产物酶切分型鉴定

2.2.3 PCR 产物碱基序列测定 随机在病例组 GG、GA 和 AA 3 个基因型的标本中,各抽取 1 个标本进行目的片段扩增,得到的 3 份扩增产物送上海生物工程股份有限公司进行碱基序列检测。见图 3。



A: *Fgβ448 G/A* 基因型在第 166 处有 G 1 个峰;B: *Fgβ448 G/A* 基因型在第 157 处有 G、A 2 个峰;C: *Fgβ448 G/A* 基因型在第 165 处有 A 1 个峰

图 3 PCR 扩增产物碱基序列检测

表 1 两组 *Fgβ448 G/A* 基因多态性 Hardy-Weinberg 平衡检验 (n=141)

组别	基因型观察值 / 例			等位基因频率		Hardy-Weinberg 检验	
	GG	GA	AA	G	A	χ^2 值	P 值
病例组	76	60	5	0.752	0.248	2.770	0.096
对照组	94	46	1	0.830	0.170	3.383	0.066

表 2 两组 *Fgβ448 G/A* 基因频率及基因型频率分析 例(%)

组别	基因型频率			等位基因频率	
	GG	GA	AA	G	A
病例组	76(0.539)	60(0.426)	5(0.035)	212(0.752)	70(0.248)
对照组	94(0.667)	46(0.326)	1(0.007)	234(0.830)	48(0.170)
χ^2 值	6.422			5.187	
P 值	0.040			0.029	

2.3 *Fgβ448 G/A* 基因多态性 Hardy-Weinberg 平衡检验

Fgβ448 G/A 基因多态性进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,病例组及对照组人群基因型及等位基因分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$)。见表 1。

2.4 两组 *Fgβ448 G/A* 基因型及其等位基因频率分布

对病例组与对照组 *Fgβ448 G/A* 基因型及其等位基因频率分布进行比较,经 χ^2 检验,两组中各基因型及等位基因频率分布差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.5 *Fgβ448 G/A* 基因型对子宫颈癌的相对危险性

对样本的统计结果进行非条件单变量 Logistic 回归分析,探讨 *Fgβ448 G/A* 基因多态性与子宫颈癌发生、发展的相关性,结果表明,GA+AA 型相对于纯合子 GG 型,能使子宫颈癌发病率显著升高。见表 3。

表 3 不同 *Fgβ448 G/A* 基因型对子宫颈癌的相对危险性 例(%)

基因型	病例组基因频率	对照组基因频率	χ^2 值	P 值	OR	95%CI	
						下限	上限
GG	76(0.539)	94(0.667)			1		
GA	60(0.426)	46(0.326)	3.698	0.055	1.61	0.99	2.63
AA	5(0.035)	1(0.07)	3.532	0.060	6.18	0.07	54.07
GA+AA	65(0.461)	47(0.333)	4.799	0.028	1.71	1.06	2.77
G 等位基因	212(0.752)	234(0.830)			1		
A 等位基因	70(0.248)	48(0.170)	5.187	0.023	1.61	1.07	2.43

3 讨论

Fg 是由肝细胞合成、分泌的一种急性时相反应糖基化蛋白^[9],半衰期为 3~4 d,占血浆成分的 2%~3%,约为 2~4g/L^[10],是血浆中含量最高的凝血因子,其由分子量为 67.6 kD 的 α 链、分子量为 52.3 kD 的 β 链及分子量为 48.9 kD 的 γ 链的 3 条肽链通过二硫键连接后形成二聚体^[10],使其成为肿瘤细胞和宿主细胞间的分子桥梁,与高表达 Fg 受体 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 整合素或 CD54 分子等内皮细胞上的受体结合,促使肿瘤细胞和靶器官内皮细胞之间的黏附作用,加上 II b 和 III a 的复合物是血浆 Fg 的受体,所以机体内的肿瘤细胞能够借助血浆 Fg 和血小板的 II b 和 III a 复合物相互作用,形成大的复合物聚集体,从而逃脱人体免疫系统的杀灭作用。Fg 作为不同黏附分子的配体,能增加血液中有型成分及肿瘤细胞间的黏附结合^[11],在肿瘤转移中起至关重要的作用。

本研究发现,基因型以 *Fgβ448* 的纯合子 GG 和杂合子 GA 为主(>90%),而纯合子 AA 基因型较少(<10%),与龚五星等^[11]的研究结果相似。病例组 *Fgβ448 G/A* 基因 GG、GA、AA 分为 0.539、0.426 和 0.035;对照组 *Fgβ448 G/A* 基因 GG、GA、AA 分为 0.667、0.326 和 0.007,差异有统计学意义($\chi^2=6.422$, $P=0.040$),推论出 *Fgβ448 G/A* 的基因多态性和子宫颈癌的发生有一定的相关性。通过对样本的统计结果进行非条件单变量 Logistic 回归分析,结果显示,杂合型 GA 与纯合子 AA 虽未直接显示与子宫颈癌发生、发展有差异性,但其 P 值接近于 0.05,杂合型 GA 的 OR=1.61(95%CI:0.99,2.63),纯合子 AA 的 OR=6.18(95%CI:0.07,54.07),推测只要扩大研究的样本量,基因型 GA 和 AA 会与子宫颈癌的发生有关,且研究中表明 GA+AA 能使子宫颈癌发生的可能性升高($\chi^2=4.799$, $P=0.028$),OR=1.71(95%CI:1.06,2.77),

而 A 等位基因与 G 等位基因的分布则有明显的差异($\chi^2=5.187$, $P=0.023$),OR=1.61(95%CI:1.07,2.43),可以推测 *Fgβ448 G/A* 位点单个碱基的改变在子宫颈癌的发病中发挥重要作用。

而在针对患者血清 Fg 水平的研究中发现,子宫颈癌患者 GG、GA 及 AA 基因型分别为 76、60 和 5 例,血浆 Fg 水平浓度分别为(3.09±0.22)、(3.11±0.26)和(3.312±0.505)g/L,差异无统计学意义($P>0.05$)。但整体水平上,A 等位基因的水平高于 G 等位基因,推测是因为 141 例子宫颈癌患者均是初次确诊且无转移,而其血浆 Fg 水平尚未发生明显改变。总之,*Fgβ448 G/A* 基因多态性用于易感人群的检测,对子宫颈癌的早期防治具有重要的临床意义。*Fgβ448 G/A* 基因多态性与子宫颈癌的发生可能具有相关性。

参 考 文 献:

- [1] FERREIRA D S, KOIFMAN, INTO-AANTOS, et al. Polymorphisms and viornmental risk factors associated with ceruical carcinogenesis in a cohort of Brazilian women with cervical lesions[J]. Jounary of oxicology and Environment Health, 2010, 73(13/14): 888-900.
- [2] 王学峰,赵雅莅. 肿瘤患者凝血及纤溶分子标志物变化[J]. 中华医学检验杂志, 2000, 23(6): 331-333.
- [3] 王淑娟,许亚茹,元小冬,等. 尿酸与纤维蛋白原 B β 链基因多态性及其功能表达的关系[J]. 免疫学杂志, 2010, 26(11): 956-961.
- [4] JACQUEMIN B, ANTONIADES C, NYBERG F, et al. Common genetic polymorphisms and haplotypes of fibrinogen alpha,beta,and gamma chains affect fibrinogen levels and the responseto proinflammatory stimulation in myocardial infarction survivors[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 52(11): 941-952.
- [5] DANESH J, LEWINGTON S, THOMPSON S G, et al. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality:an individual participant meta-analysis[J]. J AMA, 2005, 294(14): 799-809.

- [6] STATON C A, BROWN N J, LEWIS C E. The role of fibrinogen and related fragments in tumour angiogenesis and metastasis[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, 3(3): 1105-1120.
- [7] STOLPE A, JACOBS N, HAGE W J, et al. Frinogen binding to ICAM21 on EA. by 926 endothelial ce1ls is dependent on an intact cytoskeleton[J]. *Thromb Haenmost*, 1996, 75: 182-189.
- [8] 严芝强, 杨芳. 纤维蛋白原 β 链启动子区域 -455 单核苷酸多态性与胃癌的相关性[J]. *贵阳医学院学报*, 2014, 39(3): 328-332.
- [9] 林威, 陈群. 纤维蛋白原基因多态性研究进展[J]. *心血管杂志*, 2009, 28(1): 58-60.
- [10] 元小冬, 王淑娟, 许亚茹, 等. 纤维蛋白原 B β 链基因多态性与肥胖影响因素的关联分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2010, 27(2): 198-203.
- [11] 龚五星, 蔡月明, 陈晖, 等. 纤维蛋白原 β 基因启动区单核苷酸多态性及连锁不平衡分析 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2003, 20(6): 512-515.

(童颖丹 编辑)

《中国现代医学杂志》投稿须知

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年, 期刊号 ISSN1005-8982/CN43-1225/R, 半月刊, 系中国科技论文统计源期刊、北京大学图书馆中文核心期刊、中国核心学术期刊(RCCSE)(A-)及湖南省十佳期刊, 被中国知网、万方数据库、超星域出版、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等国内外多个检索系统收录, 公开发行。本刊是中华人民共和国教育部主管的国家级综合性医学学术期刊, 以服务于广大医药卫生科技人员, 促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨。由中南大学、中南大学肝胆肠外科研究中心主办, 中南大学湘雅医院承办。

本刊刊登的论文内容涉及基础医学、临床医学、预防医学及医学相关学科的新理论、新技术、新成果以及医学信息、动态等。文稿须具有科学性、创新性、实用性。文字要求准确、通顺、精练。本刊设论著、临床论著、综述、新进展研究、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。学术报告类论文字数控制在 3000 字以内; 病例报告类论文字数控制在 800 字以内。稿件格式为题名、作者姓名、作者单位、邮编、摘要(具体要求见投稿细则)、关键词、正文、参考文献。

本刊对国家级的科研成果或阶段性成果及部级以上课题项目的进展报道实行速审快发。一般稿件 2 个月内有评审结果, 录用后等待发表。请作者自行登录本刊网站(www.zgxdyx.com)查询稿件处理结果, 恕不另行通知。稿件发表后, 赠当期杂志 2 本。

投 稿 细 则

1. 文稿力求文字精练、准确、通顺; 文题简明、醒目, 能反映出文章的主题; 勿用不规范字。请作者仔细校对全文, 并认真复核数据。摘要应与正文内药物剂量、病例数、百分比等数据一致。如有错误, 将降低审稿人和编辑对该文真实性的信任度, 导致退稿。	6. 所有栏目需附关键词 3~5 个, 其中临床报道、学术报告和病例报告只需中文关键词, 其余栏目需中英文关键词齐全。
2. 文题中不使用英文缩略语。摘要中一般也不使用英文缩略语, 如因为该词出现多次而需要使用时, 应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文缩略语(此处不需写出英文全称)。正文中首次使用英文缩略语时, 也应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文全称及英文缩略语。此规则对已公知、公用的缩略语除外。	7. 照片、图片(黑白原始照片必须清晰, 大小 5 cm \times 7 cm), 须在文章内标明其位置, 并附标题, 显微镜下照片应标明放大倍数, 图背面标明作者姓名、文章编号、图序及照片方向(上、下)。
3. 单位介绍信原件, 注明稿件非一稿多投。采用网上投稿方式时, 请将该介绍信照片插入提交的论文 Word 文稿第一页。	8. 所有栏目参考文献须引用 10 条以上, 以近 5 年文献为主。引用期刊的格式为: 作者. 文题. 刊名, 年, 卷(期): 起止页码.; 引用书籍的格式为: 著者. 书名. 版次. 出版地: 出版社, 年份: 起止页码.; 每条参考文献应列出作者姓名, 如超过 3 名者, 则在 3 名作者后写等。中文格式: 解勤之, 陈方平, 蹇在伏, 等. 红细胞收缩: 血小板无力症的可能代偿机制[J]. <i>中国医学工程</i> , 1998, 8(11): 3-5。 英文格式: Szeman B, Nagy G. Changes in cognitive function in patient with diabetes mellitus[J]. <i>Orv Hetil</i> , 2012, 153(9): 323-329.
4. 所有栏目投稿的中英文论文题目、作者姓名及作者单位需齐全(每位作者只标注一个主要单位, 其余的可以作者简介方式在首页左下角注明, 标注通信作者的必须留下通信作者本人的电话或电子邮箱, 以便核实)。	9. 综述第一作者须有副高以上职称证明, 并注明综述人、审校人字样(参考文献 35 条以上)。
5. 栏目对中英文摘要的要求: 论著、临床论著、新进展研究需中英文摘要齐全, 并按目的、方法、结果、结论四要素书写, 200~500 个字。综述需中英文摘要齐全, 不需按四要素书写。临床报道和学术报告只需中文摘要, 病例报告无需中英文摘要。	10. 凡国家、省部级自然科学基金、博士基金、863 计划及国家重点实验室项目的论文, 请注明基金名称及编号并附相关项目批准文件或任务书复印件, 可优先发表。项目主要负责人为通信作者。采用网上投稿方式时, 请将相关证明材料的照片插入提交的论文 Word 文稿最后一页。