

E2F1 基因多态性与宫颈癌风险关联性研究

李佳星¹, 李勇¹, 王姿¹, 张红丽¹, 鲁亮¹, 曹辉¹, 李馨¹,
向阳¹, 赖小练², 黄立敏^{1,2}
(1. 贵州省人民医院, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州大学医学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: [目的] 选取 *E2F1* 基因中 rs3213172、rs3213173 和 rs3213176 三个多态性位点, 研究其与宫颈癌的关联性。[方法] 选取 2016—2019 年贵州省人民医院肿瘤科确诊为宫颈癌的 149 例患者为病例组, 选取同期同院参加正常体检的健康女性 206 人为对照组。采用通用探针法对 *E2F1* 基因中的多态位点 rs3213172、rs3213173 和 rs3213176 进行基因分型, 研究这些多态性位点的等位基因、基因型及构建的单倍型在对照组和病例组中分布频率的差异。[结果] *E2F1* 基因中的多态性位点 rs3213172 CT 基因型在病例组和对照组间分布频率差异有统计学意义, 可能是宫颈癌发生的危险因素 (OR=1.57, 95%CI: 1.00~2.48); 多态位点 rs3213173 和 rs3213176 的等位基因和基因型在病例组和对照组中的分布频率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。单倍型分析结果显示, rs3213172-rs3213173-rs3213176 的单倍型 C-T-G 可能是宫颈癌发生的保护性因素 (OR=0.66, 95%CI: 0.47~0.93); 单倍型 T-T-G 可能是宫颈癌发生的危险因素 (OR=2.49, 95%CI: 1.35~4.59)。[结论] *E2F1* 基因中的多态位点 rs3213172 可能与宫颈癌的发病风险有关。

关键词: 宫颈癌; *E2F1*; 基因多态性; 发病风险

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2021)11-0952-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.11.B010

Association of *E2F1* Gene Polymorphisms with Risk of Cervical Cancer

LI Jia-xing¹, LI Yong¹, WANG Zi¹, ZHANG Hong-li¹, LU Liang¹, CAO Hui¹, LI Xin¹,
XIANG Yang¹, LAI Xiao-lian², HUANG Li-min^{1,2}

(1. Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China; 2. School of Medicine, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: [Objective] To investigate the association of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *E2F1* gene with risk of cervical cancer. [Methods] A total of 149 patients with cervical cancer admitted in Department of Oncology of Guizhou Provincial People's Hospital from 2016 to 2019 were enrolled in the study, and 206 healthy women undergoing routine health check-up were recruited as control group. The rs3213172, rs3213173 and rs3213176 SNPs of *E2F1* gene were examined with universal fluorescence probe assay. And the association between SNPs and the risk of cervical cancer was analyzed. [Results] There was significant difference in genotypic frequencies of rs3213172 between patients with cervical cancer and control groups, and CT genotypic might be an independent risk factor of cervical cancer (OR=1.57, 95%CI: 1.00~2.48, $P<0.05$). However, the genotypic and allelic frequencies of rs3213173 and rs3213176 showed no significant difference between cervical cancer patients and healthy controls. Additionally, the haplotype analysis showed that rs3213172-rs3213173-rs3213176 C-T-G haplotype occurred more frequent in control group compared to cervical cancer group (OR=0.66, 95%CI: 0.47~0.93, $P=0.02$), T-T-G haplotype might be associated with higher risk of cervical cancer (OR=2.49, 95%CI: 1.35~4.59, $P=0.02$). [Conclusion] *E2F1* gene polymorphisms may be associated with the risk of cervical cancer.

Subject words: cervical cancer; *E2F1*; gene polymorphism; risk

高危型人乳头状瘤病毒 (high risk human papillomavirus, HPV) 感染是导致宫颈癌的主要原因, HPV16E7 与 *E2F1* 的结合是 HPV 感染细胞转录中

的一个重要事件^[1]。*E2F1* 主要通过 p53 依赖与 p53 非依赖途径参与细胞凋亡, 通过 p53 依赖途径, *E2F1* 活化 P14/P19 从而抑制 p53 降解, p53 高表达抑制下游 CDK 活性, 从而中断细胞周期的进行, 诱导细胞凋亡^[2-3]。近年来研究发现, *E2F1* 在众多肿瘤如前列腺癌、乳腺癌、肺癌等细胞中高表达, 并在肿瘤的发生中发挥重要作用。目前 *E2F1* 基因多态性

基金项目: 贵州省科技厅项目 (黔科合 LH 字 [2015] 7171), 贵州省地方标准制修订项目计划 (2019-89)

通信作者: 黄立敏, 科副主任, 主任医师, 博士; 贵州省人民医院肿瘤科, 贵州省贵阳市南明区中山东路 83 号 (550001); E-mail: 939300956@qq.com

收稿日期: 2021-06-07; **修回日期:** 2021-08-03

与宫颈癌相关性研究较少。本研究选取 *E2F1* 基因的三个多态性位点 rs3213172、rs3213173、rs3213176, 研究其与宫颈癌的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2016—2019 年贵州省人民医院肿瘤科确诊的宫颈癌患者 149 例作为病例组, 其中鳞癌 99 例, 腺癌 35 例, 其他病理类型 15 例。年龄 25~74 岁, 平均年龄(51±10) 岁。诊断标准依据 2007 年《临床诊疗指南—妇产科学分册》; 临床分期采用 2009 年国际妇产科联合会 (International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO) 分期标准。排除标准: ①术前接受化疗等抗肿瘤治疗的患者; ②患有其他恶性肿瘤或合并糖尿病、心血管病等疾病的患者; ③临床资料不全的患者。同时选取同期在贵州省人民医院正常体检的健康女性 206 人作为对照组。本研究获得贵州省人民医院伦理委员会批准(伦理号: 2015031), 标本采集均由本人知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 样本基因组 DNA 提取

DNA 提取患者静脉血 5 mL, 经枸橼酸钠抗凝, 4℃冰箱保存。采血 1 周内以蛋白酶 K 消化饱和氯化钠盐析法提取外周血 DNA。

1.2.2 单核苷酸多态性位点基因分型

本研究采用通用荧光探针法对研究对象单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 位点进行基因分型, 每个 SNP 检测均设计 3 条引物, 包括 2 条上游引物和 1 条下游引物, 其中 2 条上游引物均在 3' 端的末位根据不同的 SNP 碱基给予不同的错配, 共用下游引物。根据 NCBI 网站上公布的 DNA 全序列信息, 在 Primer Designer 6.0 版辅助下, 自行设计引物, 由尚亚公司合成。RS3213176 上游引物为 5'-TGATGAACTCCTCAGGGAGGAGGCT-3', 5'-TGATGAACTCCTCAGGGAGGAGGCC-3', 下游引物为 5'-GGAGCATGTGCGGAGGAGCTTCTCC-3'。RS3213172 上游引物为 5'-TGCTCTGCAGGGTCTGCAATGCTAT-3', 5'-TGATGAACTCCTCAGGGAGGAGGCC-3', 下游引物为 5'-GCCTACGTGACGTGTCA-GGACCTTC-3'。RS3213173 上游引物为 5'-CA-

GATCTCACCTCCGAAGAGTCCAT-3', 5'-CAGATCTCACCTCCGAAGAGTCCAC3', 下游引物为 5'-CCC-TCTGAGACCCAGCTCCAAGCC-3'。PCR 反应体系为 10 μL, PCR 反应条件为 95℃预变性 5 min, 95℃变性 10 s, 60℃退火延伸 30 s, 循环 40 次, 72℃延伸 2 min。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据分析; 采用 Hardy-Weinberg 平衡检验样品代表性; 采用 *t* 检验分析病例组和对照组年龄是否存在差异; 采用卡方检验分析病例组和对照组中 *E2F1* 基因 3 个 SNP 位点基因型、等位基因分布频率的差异。采用 SHEsis 软件计算 SNP 位点间的连锁不平衡关系, 用 *D'* 值表示两个位点间的连锁关系, 当 *D'*>0.8 时说明 SNP 位点间存在强连锁。构建存在强连锁 SNP 的单倍型, 并用卡方检验分析所构建的单倍型在病例组和对照组之间分布频率的差异。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多态性位点与宫颈癌的相关性

E2F1 基因的三个多态性位点 rs3213172、rs3213173、rs3213176 的基因型在病例组和对照组分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 (*P*>0.05), 说明本研究中所选择的样本是具有群体代表性的随机样本。rs3213172 CT 基因型在两组间分布频率差异有统计学意义, 基因型 CT 在病例组中分布频率高, 可能是宫颈癌发生的危险因素 (OR=1.57, 95%CI: 1.00~2.48); 但该位点的另外两个基因型 (C/C、T/C) 及等位基因 C 和 T 型在两组间的分布频率差异无统计学意义 (*P*>0.05)。*E2F1* 基因的另外 2 个多态性位点 rs3213173 和 rs3213176 的等位基因和基因型在两组间分布频率差异无统计学意义 (*P*>0.05) (Table 1)。

2.2 连锁不平衡关系及单倍型分析

E2F1 基因 SNP 位点连锁不平衡分析结果显示 *D'*>0.8, 3 个位点间均存在强连锁。根据连锁不平衡结果构建 rs3213172-rs3213173-rs3213176 的单倍型, 并分析分布频率>3%的单倍型在病例组和对照组中分布特征, 单倍型 C-T-G 和单倍型 T-T-G 在两组中分布频率的差异有统计学意义 (Table 2)。单倍

型 T-T-G 可能是宫颈癌的风险因素 (OR=2.49, 95% CI: 1.35~4.59)。单倍型 C-T-G 与宫颈癌的保护性因素有关 (OR=0.66, 95% CI: 0.47~0.93)。

3 讨论

在恶性肿瘤发生过程中, 个体遗传因素的差异发挥重要作用, 基因组 SNP 是个体对肿瘤易感性差异的重要遗传学基础, 已成为疾病的诊断、治疗和预防及个体化的药物治疗重要监测指标。

肿瘤的发展与肿瘤细胞周期密切相关, 主要原因是肿瘤细胞周期性调节机制受到破坏, 从而导致细胞失控性生长。细胞周期关键点就是细胞从 G₁ 期进入 S 期, E2F1 是细胞进入 S 期的转录因子之一, 在

细胞周期中起关键作用。研究发现, E2F1 在多种肿瘤组织和细胞中呈高表达, 起着促癌基因的作用^[4-7]。例如, E2F1 在外阴癌中表达增加, 且 E2F1 表达与外阴癌的 FIGO 分期有关^[8]。在子宫内膜癌中, E2F1 在癌组织中的阳性表达明显高于正常子宫内膜组织中的表达, 而且表达与肿瘤分级和分期有关, 级别越高、分期越高, E2F1 表达强度越高^[9]。Li 等^[10]发现 E2F1 在乳腺癌组织中过表达, E2F1 表达水平升高与乳腺癌患者的总生存期、无复发生存期和无远处转移期显著性相关。在卵巢癌中 E2F1 也扮演促癌角色^[11]。本研究结果显示, rs3213172 CT 基因型可能是宫颈癌的风险因素。Singh 等^[12]研究发现 rs3213172 CT 基因型是宫颈癌的风险因素, 与本研究结果一致。Lu 等^[13]发现 E2F1 和 E2F2 启动子区域多态性与头颈部鳞癌的风险有关。Jiang 等^[14]研究结果显示 E2F1 基因多态性 [rs35301225 (C/A)] 与结直肠癌发生风险相关。E2F1 启动子区域的基因多态性 (rs6667575) 与 HPV16 阳性口咽癌风险有关^[15]。以上资料说明, 同一基因不同多态位点在不同疾病发挥作用可能不同, 这可能是环境因素和个体遗传因素交互作用的结果。

本研究分析了 E2F1 基因中的三个多态性位点的连锁不平衡关系, 构建三个位点的单倍型, 并对分布频率大于 3% 的单倍型在病例组和对照组的分布差异进行了分析。结果显示, rs3213172-rs3213173-rs3213176 单倍型 C-T-G 可能是宫颈癌发生的保护性因素。rs3213172-rs3213173-rs3213176 单倍型 T-T-G 与宫颈癌的易感性相关。该结果与等位基因和基因型 rs3213172 在宫颈癌发生过程中发挥的作用相一致。

综上所述, 本研究中 E2F1 基因中的两个多态性位点 rs3213173 和 rs3213176 可能与宫颈癌的易感性无关。多态位点 rs3213172 基因型 CT 可能是宫颈癌发生的风险因素; 单倍型 T-T-G 可能与宫颈癌风险增加有关, 单倍型 C-

Table 1 Comparison of distribution frequency of E2F1 gene SNP locus genotype and alleles in case group and control group

Index	Control group (%)	Case group (%)	OR (95%CI)	P
rs3213172				
CC	101 (49.03)	57 (38.26)	1.00	
CT	82 (39.80)	73 (48.99)	1.57 (1.00~2.48)	0.04
TT	23 (11.17)	19 (12.75)	1.46 (0.73~2.91)	0.27
C	284 (68.93)	187 (62.75)	1.00	
T	128 (31.07)	111 (37.25)	1.31 (0.96~1.80)	0.08
rs3213173				
CC	92 (44.66)	55 (36.91)	1.00	
CT	84 (40.78)	69 (46.31)	1.37 (0.87~2.18)	0.17
TT	30 (14.56)	25 (16.78)	1.39 (0.74~2.61)	0.29
C	268 (65.05)	179 (60.07)	1.00	
T	144 (34.95)	119 (39.93)	1.23 (0.91~1.68)	0.17
rs3213176				
GG	105 (50.97)	71 (47.65)	1.00	
GA	82 (39.81)	57 (38.26)	1.03 (0.65~1.62)	0.91
AA	19 (9.22)	21 (14.09)	1.64 (0.82~3.25)	0.16
G	292 (70.87)	199 (66.78)	1.00	
A	120 (29.13)	99 (33.22)	1.21 (0.87~1.66)	0.25

Table 2 Distribution of haplotypes constructed by 3 polymorphic sites of E2F1 gene in case group and control group

rs3213172-rs3213173-rs3213176	Case group (%)	Control group (%)	P	OR (95%CI)
C - C - A	44 (14.6)	54 (12.9)	0.52	1.15 (0.75~1.76)
C - T - G	66 (22.3)	124 (30.2)	0.02	0.66 (0.47~0.93)
C - T - A	24 (8.0)	30 (7.5)	0.83	1.06 (0.61~1.85)
C - T - G	54 (18.3)	82 (19.7)	0.63	0.91 (0.62~1.33)
T - C - A	20 (6.9)	20 (5.0)	0.27	1.42 (0.76~2.67)
T - C - G	48 (16.3)	68 (16.7)	0.89	0.97 (0.65~1.45)
T - T - A	12 (3.8)	16 (3.7)	0.97	1.01 (0.42~2.22)
T - T - G	30 (9.9)	18 (4.2)	0.02	2.49 (1.35~4.59)

T-G 则可能是宫颈癌发生的保护因素。本研究不足是没有完善与宫颈癌关联的危险因素,包括 HPV 感染、流产、分娩等信息;另外样本量较少,故需进一步补充相关信息、扩大样本量,对资料深入研究,为今后个体化治疗方案提供参考依据。

参考文献:

- [1] Turek LP. The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer [J]. *Adv Virus Res*, 1994, 44(8): 305–356.
- [2] Bell LA, Ryan KM. Life and death decisions by E2F-1[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(2): 137–142.
- [3] Hu J, Shen J, Sun J. CDK4/RB/E2Fs axis as potential therapeutic target of endometrial cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125(10): 109870.
- [4] Lin Z, Ren N, Jiang Y, et al. Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer augments gemcitabine-induced apoptosis in human colon cancer cells[J]. *Clin Lab*, 2015, 61(10): 1435–1444.
- [5] Yin YW, Jin HJ, Zhao W, et al. The histone acetyltransferase GCN5 expression is elevated and regulated by c-Myc and E2F1 transcription factors in human colon cancer[J]. *Gene Expr*, 2015, 16(4): 187–196.
- [6] Wei WY, Yan LH, Wang XT, et al. E2F-1 overexpression inhibits human gastric cancer MGC-803 cell growth in vivo[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(2): 491–501.
- [7] Lee SR, Roh YG, Kim SK, et al. Activation of EZH2 and SUZ12 regulated by E2F1 predicts the disease progression and aggressive characteristics of bladder cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(23): 5391–5403.
- [8] 杨秀华, 武昕. 转录因子 E2F1 在外阴鳞癌中的表达及意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(4): 580–583.
Yang XH, Wu X. Expression and clinical significance of E2F1 in vulvar squamous cell carcinoma[J]. *Modern Oncology*, 2018, 26(4): 580–583.
- [9] Mints M, Mushtaq M, Iurchenko N, et al. Mitochondrial ribosomal protein S18-2 is highly expressed in endometrial cancers along with free E2F1[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16): 22150–22158.
- [10] Li Y, Huang J, Yang D, et al. Expression patterns of E2F transcription factors and their potential prognostic roles in breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 9216–9230.
- [11] Zhan L, Zhang Y, Wang W, et al. E2F1: a promising regulator in ovarian carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3): 2823–2831.
- [12] Singh S, Gupta M, Seam RK, et al. E2F1 genetic variants and risk of cervical cancer in Indian women[J]. *Int J Biol Markers*, 2018, 33(4): 389–394.
- [13] Lu M, Liu Z, Yu H, et al. Combined effects of E2F1 and E2F2 polymorphisms on risk and early onset of squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Mol Carcinog*, 2012, 51(1): E132–E141.
- [14] Jiang H, Ge F, Hu B, et al. rs35301225 polymorphism in miR-34a promotes development of human colon cancer by deregulation of 3'UTR in E2F1 in Chinese population[J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17(12): 39.
- [15] Yuan Y, Sturgis EM, Zhu L, et al. A functional variant at the miRNA binding site in E2F1 gene is associated with risk and tumor HPV16 status of oropharynx squamous cell carcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(3): 1100–1106.