

• 论 著 •

XRCC1 基因在白血病中表达的研究*

柴晓静, 李娟, 陆莉

(兰州大学第一医院中心实验室, 甘肃兰州 730000)

摘要: 目的 通过比较白血病患者与健康人群人类 X 射线交叉互补修复基因 1(XRCC1)基因多态性和超甲基化水平, 探讨 XRCC1 与白血病的相关性。方法 利用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)和甲基化特异聚合酶联反应(MSP)的方法检测 150 例白血病患者(病例组)和 150 例健康体检者(对照组)XRCC1 基因多态性和启动子区超甲基化水平。结果 在各型白血病中 XRCC1 基因 rs1799782、rs25487、rs25489 位点基因型有不同程度的变化。病例组各亚组的 XRCC1 基因超甲基化阳性率与对照组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 多态性位点基因型分布及等位基因频率和白血病易感有一定的相关性, 但 XRCC1 基因在白血病中可能不存在超甲基化现象。

关键词: 人类 X 射线交叉互补修复基因 1; 白血病; 基因多态性; 甲基化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.20.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)20-3005-02

The study on the expression of XRCC1 in chronic myelocytic leukemia*

Chai Xiaojing, Li Juan, Lu Li

(Central Laboratory, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract; Objective To investigate whether XRCC1 was associated with the occurrence of leukemia through the comparison of XRCC1 gene's polymorphism and hypermethylation between leukemia patients and healthy people. **Methods** Restriction fragment length polymorphism polymerase chain reaction (PCR-RFLP) and methylation specific polymerase chain reaction (MSP) were used to detect the polymorphism and promoter region's methylation of XRCC1 gene in 150 patients with leukemia (patients group) and 150 healthy persons (control group). **Results** In different types of leukemia patients, the genotype of XRCC1 gene loci rs1799782, rs25487 and rs25489 loci changed in different degrees. The positive rate of XRCC1 gene methylation in different subgroups of patients group were not statistically significantly different from that of control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Genotype distribution and allele frequency and leukemia susceptible have some correlation, but hypermethylation phenomenon may not exist in XRCC1 gene in leukemia.

Key words: X-ray cross complementing group 1; leukemia; gene polymorphism; methylation

XRCC1 基因是第一个分离到的影响细胞电离辐射敏感性的哺乳动物基因, 是碱基切除修复系统的核心蛋白之一, 它对一系列氧化剂导致的 DNA 断裂和碱基损伤修复起着极其重要的作用。XRCC1 基因与其他修复蛋白共同参与电离辐射和氧化引起的碱基切除修复和单链断裂修复^[1]。该基因的异常表达与多种恶性肿瘤的发生有关。XRCC1 蛋白质共分为 3 个功能域:N 端的 DNA 结合区及两个 BRCT 蛋白相互作用结构域。中间的 BRCT I 区对维持基因组的稳定性和细胞存活是必须的, 而 C 端的 BRCT II 区与 G1 期 DNA 损伤单链修复有关^[2]。XRCC1 通过与多聚 ADP 核糖聚合酶(PARP)、DNA 连接酶 III 及 DNA 多聚酶 B 作用来修复包括氧化应激在内的各种损害引起的 DNA 损伤^[3-5]。本研究对白血病 XRCC1 基因多态性和启动子区超甲基化表达进行了测定, 旨在探讨 XRCC1 基因与白血病之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对照组: 150 例健康体检者全部来自兰州大学第一医院体检中心(男 70 例、女 80 例), 年龄 20~50 岁, 无吸烟、饮酒习惯且无全身系统性疾病, 空腹肝素钠抗凝外周血 2 mL。病例组: 82 例急性髓细胞白血病(AML)、25 例急性淋巴细胞白血病(ALL)和 43 例慢性髓细胞白血病(CML)全部来自兰州大学第一医院血液科初诊患者(男 80 例、女 70 例), 年龄 20~60 岁, 诊断均符合《血液病诊断和疗效标准》^[6]。

1.2 仪器与试剂 血液全基因组 DNA 提取试剂盒为上海生工公司产品; Zymo Research 公司的甲基化检测试剂盒; 限制性内切酶 PvuII、MspI、RsaI 为 Fermentas life sciences 公司产品; 荧光定量 PCR 试剂为罗氏公司产品; GeneAMP9700 型 PCR 反应仪为美国 PE 公司产品; 电泳仪为北京市六一仪器厂 DYY-H 型, 凝胶成像系统为美国联合生物公司的 CK-1308 型。

1.3 方法

1.3.1 rs1799782、rs25487、rs25489 位点基因型分布及等位基因频率 基因组提取并经纯度分析后用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)进行检测。rs1799782C26304T (Arg194Trp)26304(C/T)引物序列如下, F: 5'-GCC AGG GCC CCT CCT TCA A-3', R: 5'-TAC CCT CAG ACC CAC GAG T-3'; rs25487G28152A(Arg399Gln)28152(G/A)引物序列如下, F: 5'-CAG TGG TGC TAA CCT AAT C-3', R: 5'-AGT AGT CTG CTG GCT CTG G-3'; rs25489 G27466A (Arg280His)27466(G/A)引物序列如下, F: TGG GGC CTG GAT TGC TGG GTC TG, R: CAG CAC CAC TAC CAC ACC CTG AAG G。扩增条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 54 °C 60 s, 72 °C 60 s, 共 36 个循环; 72 °C, 10 min。

1.3.2 基因甲基化检测 从样本骨髓组织中提取 DNA, DNA 经修饰、纯化沉淀后, 进行 PCR 扩增, 在 30 μL 的反应体系中, 包含 1 μL 模板 cDNA, 10×缓冲液 3 μL, dNTP 0.6 μL,

* 基金项目: 兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(lzjbky-2012-192); 甘肃省青年科技研究基金项目资助项目(1308RJY073)。 作者简介: 柴晓静, 女, 主治医生, 主要从事肿瘤学基础研究的研究。

Qiagen 热启动 TaqE 0.15 μ L、上下游引物各 0.4 μ L、双蒸水 24.45 μ L。引物为 MGMT 基因甲基化和未甲基化引物对, 5'-GAG ATT TGT TAA TTT TTT TCG C-3', 5'-AAA CGT AAA CGA CTA CGC TAA-3' 为甲基化引物, 5'-AAA GAG ATT TGT TAA TTT TTT TTG T-3', 5'-CAA ACA TAA ACA ACT ACA CTA AAC-3' 为未甲基化引物。扩增条件如下 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 继而 95 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物进行变性高效液相色谱(DHPLC)检测。

1.3.3 注意事项 (1)每次检测从样本 DNA 提取开始同时提取甲基化对照和非甲基化对照 DNA, 检测全过程必须同时进行甲基化对照和非甲基化对照检测。(2)DHPLC 检测前应先校验柱效和柱温, 保证检测结果稳定且可追溯。

1.4 统计学处理 所有数据通过 SPSS16.0 统计软件包进行, 计数资料以百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 显著性检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组 XRCC1 基因多态性情况 rs1799782 位点基因型分布: 以携带 Arg/Arg 基因型的人群为参照组, AML 组中, 杂合子 Arg/Trp 基因型增加了罹患 AML 的风险 ($P=0.032$), 其 OR 值为 1.845; ALL 组中, 杂合子 Arg/Trp 基因型增加了罹患 ALL 的风险 ($P=0.003$), 其 OR 值为 3.827。rs25487 位点基因型分布: 以携带 Arg/Arg 基因型的人群为参照组, Arg/Gln 基因型的患者罹患 CML 的风险降低 ($P=0.047$), OR 值为 0.632; Gln 等位基因频率与对照组比较差异有统计学意义 ($P=0.034$), OR 值为 0.677。rs25489 位点基因型分布: 以携带 Arg/Arg 基因型的人群为参照组, Arg/His 基因型的患者罹患 AL 的风险降低 ($P=0.000$), OR 值为 0.326; His 等位基因频率与对照组比较差异有统计学意义 ($P=0.000$), OR 值为 0.363。

2.2 各组 XRCC1 基因超甲基化情况 病例组各亚组与对照组 XRCC1 基因超甲基化阳性率比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。

表 1 各组间 XRCC1 基因超甲基化阳性率的比较

组别	<i>n</i>	阳性 [<i>n</i> (%)]	χ^2	<i>P</i>
对照组	150	4(2.64)	—	—
AML 组	82	5(6.10)	1.674	0.196
ALL 组	25	1(4.00)	1.137	0.711
CML 组	43	2(4.65)	0.437	0.509

—: 无数据。

3 讨 论

过去对 XRCC1 基因的研究主要集中在其多态性与肿瘤的发病之间的关系上。含人类 XRCC1 的质粒能完全纠正 EM9 细胞(XRCC1 空白细胞, 有一个无义突变)的修复缺陷作用。Taylor 等^[7]报道, 在 EM9 细胞检测不到单链断裂修复(SSBR)能力, EM9 细胞和突变的 XRCC1 有残余修复作用, 其 SSBR 降低致细胞对烷化剂高敏感。EM9 和其他大鼠类细胞株(EM7、EM2C11、EM2C12)存在 XRCC1 功能缺陷, EM9 对甲基甲烷硫酸盐(MMS)和乙烷基甲烷硫酸盐(EMS)有 10 倍高敏感性, 每一个 XRCC1 缺陷株在该基因不同位点都有突变^[8], 本研究表明 XRCC1 基因的 3 个不同多态性位点对不同类型的白血病影响不同, 各种变异是如何影响其编码的蛋白质功能及酶活性的, 有待选择不同的细胞株对其功能做进一步探讨。

研究发现 DNA 修复是细胞通过各种途径对基因组损伤的保护性反应, 细胞 DNA 修复功能的缺陷将导致其对损伤物

质的敏感性增加, 从而导致染色体畸变的频率及癌症易感性增强^[9]。本研究表明 rs1799782 位点, 杂合子 Arg/Trp 携带者增加了罹患急性白血病的风险; rs25487 位点, 杂合子 Arg/Gln 携带者减少了罹患 CML 的风险。XRCC1 Gln 等位基因频率在 CML 组明显高于对照组 ($P=0.034$), Gln 等位基因可能是 CML 的保护性基因, 可能会降低 CML 的患病风险。rs25489 位点, Arg/His 变异明显减少了 ALL 的患病风险。His 等位基因频率在 ALL 组明显高于对照组, His 等位基因可能是 ALL 的保护性基因。相同基因同一位点的变异在白血病不同亚型中的分布不尽相同, 这些现象是否与本省所处的地理位置及生存环境有关, 是否是人类为了长期生存、抵御疾病所发生的相应变异, 有待做进一步的区域性研究。

另外本研究的结果表明, 各型白血病与对照组 XRCC1 基因的超甲基化阳性率比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。因此, 笔者认为在该人群中各型白血病存在 XRCC1 基因多态性的差异, 当然, 这需要下一步在一个大样本量的人群中去验证。

国内外基因多态性与疾病关联性研究已经取得了很大成就, 但其临床应用价值、研究策略及未来发展前景尚未得到临床工作者的认同。研究工作的重点往往局限于基因多态性与疾病发生的相关性。简单地进行频率调查或是简单地解释基因多态性与疾病预后、转归的关系, 忽视了疾病基因多态性与临床表型及治疗效果多样性的内在联系。尚未把研究重点放在为什么不同的个体在相同的疾病中表现不一样以及为什么不同的个体对相同的化疗药物会有不同的反应等深层次原因的探讨上, 回答这些问题远比简单地解释基因多态性与疾病易感性的关系复杂得多。

参考文献

- Thompson LH, Brookman KW, Jones NJ, et al. Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA Strand break repair and sister chromatid exchange [J]. Mol Cell Biol, 1990, 10(12): 6160-6171.
- Cappelli E, Taylor R, Cevasco M, et al. Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair [J]. Biol Chem, 1997, 272(38): 23970-23975.
- D'silva I, Pelletier JD, Lagueux J, et al. Relative affinities of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-dependent protein kinase for DNA Strand interruptions [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1430(1): 119-126.
- Masutani M, Nozaki T, Nishiyama E, et al. Function of poly(ADP-ribose) polymerase in response to DNA damage: gene-disruption study in mice [J]. Mol Cell Biochem, 1999, 193(1/2): 149-152.
- Taylor RM, Thistlethwaite A, Caldecott KW. Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(8): 2556-2563.
- 张之南. 血液病诊断和疗效标准 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 431-432.
- Taylor RM, Thistlethwaite A, Caldecott KW. Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(8): 2556-2563.
- Thacker J, Zdzienicka MZ. The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability [J]. DNA Repair (Amst), 2003, 2(6): 655-672.
- 黄程辉, 谢兆霞. DNA 修复与白血病耐药的研究进展 [J]. 国外医学: 输血及血液学分册, 2003, 26(2): 125-127.