

PIK3CA rs4975596 基因多态性与口腔癌的相关性研究

张永春, 王志强, 孙晶晶, 宋荣学, 王冶

作者单位: 赤峰学院附属医院口腔颌面外科, 内蒙古 赤峰 024005

摘要:目的 探讨 PIK3CA rs4975596 单核苷酸多态性与口腔癌发生的相关性。方法 应用聚合酶链反应检测 PIK3CA rs4975596 基因多态性, 比较口腔癌组与健康人群 PIK3CA rs4975596 基因型的分布频率差异以及等位基因频率差异。结果 50 例口腔癌组和 50 例健康人群对照组 PIK3CA rs4975596 基因型分布频率野生型 AA 分别为 52% 和 68%, 杂合型 AG 分别为 28% 和 24%, 突变型 GG 分别为 20% 和 8%, 两组比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.073, P = 0.029$); 等位基因频率野生型 A 分别为 65% 和 76%, 突变型 G 分别为 35% 和 24%, 两组比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.360, P = 0.024$)。口腔癌组与健康人群对照组 PIK3CA rs4975596 基因型分布频率和等位基因频率差异有统计学意义。结论 口腔癌的发生可能与 PIK3CA rs4975596 基因型多态性具有某种关联。

关键词: PIK3CA; 口腔癌; 基因多态性

Research on the correlation between gene polymorphism of PIK3CA rs4975596 and oral squamous cell carcinoma

ZHANG Yongchun, WANG Zhiqiang, SUN Jingjing, SONG Rongxue, WANG Ye

Author Affiliation: Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Hospital of Chifeng University, Chifeng, Inner Mongolia 024005, China

Abstract: **Objective** To study the correlation between gene polymorphism of PIK3CA rs4975596 and oral squamous cell carcinoma. **Methods** PIK3CA rs4975596 polymorphism was detected by means of polymerase chain reaction. The distribution and allele frequency of PIK3CA rs4975596 genotype in oral squamous cell carcinoma group and healthy control group were compared. **Results** Among 50 cases of oral squamous cell carcinoma patients and 50 healthy volunteers, PIK3CA rs4975596 wild AA genotype frequencies were 52% and 68%, heterozygous AG genotype frequencies were 28% and 24%, and mutant GG genotype frequencies were 20% and 8% ($\chi^2 = 7.073, P = 0.029$). Wild-type A allele frequencies were 65% and 76%, mutant G allele frequencies were 35% and 24% ($\chi^2 = 5.360, P = 0.024$). The differences in PIK3CA rs4975596 genotype distribution and allele frequencies between oral squamous cell carcinoma group and healthy control group were significant. **Conclusions** The occurrence of oral squamous cell carcinoma may be related to PIK3CA rs4975596 polymorphism.

Key words: PIK3CA; Oral squamous cell carcinoma; Polymorphism

口腔癌是世界范围内普遍存在的恶性肿瘤, 流行病学统计结果显示, 世界各地的年发病例数约为 263 000 例, 死亡例数约为 128 000 例^[1-3]。鳞状细胞癌(OSCC)是口腔癌最常见的病理类型之一, 在中国尤为常见。近年来, 肿瘤机制的研究深入, 但有效的预防和早期诊断 OSCC 的措施很少见。由于 OSCC 复发率高, 淋巴结转移多见, 5 年生存率低于 50%^[4]。PI3K 催化亚基(PIK3CA)位于 3q26.3, 编码 1 068 个氨基酸, 产生 124 kD 的蛋白质, 即 PI3K p110 催化亚单位 α (PI3K p110 α)^[5-6]。有研究表明, PIK3CA 能够参与肿瘤发生发展的过程, 且作为致癌基因^[7]。PIK3CA 基因突变能够导致 PI3K p110 α 的功能增强。通过

PI3K p110 α 的催化功能, PIP3 增加, 这是激活 PI3K/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号通路的重要媒介。为了探讨 PIK3CA 基因多态性与口腔癌发生的关系, 现对 50 例口腔癌病人以及 50 例健康人群的外周血标本进行分析, 以期对临床口腔癌的治疗以及预后提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 赤峰学院附属医院于 2015 年 1 月至 2016 年 11 月期间收治了 50 例口腔鳞状细胞癌病人(口腔癌组)以及 50 例健康人群(对照组)的外周血样本, 其中口腔癌组中男性 30 例, 女性 20 例, 年龄(51.5 ± 5.3)岁, 年龄范围为 41~77 岁; 对照组中男性 32 例, 女性 18 例, 年龄(52.6 ± 6.1)岁, 年龄

范围为43~74岁。口腔癌组与对照组在年龄和性别方面差异无统计学意义($t = 0.323, P = 0.754$; $\chi^2 = 0.05, P = 0.820$),具有可比性。纳入标准:经病理活检确诊者。排除标准:(1)有其他癌症病史;(2)精神异常者。本研究通过赤峰学院附属医院伦理委员会批准,病人或近亲属和健康志愿者均签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 提取 在所有样本中用酚/氯仿抽提核酸的方法提取外周血的DNA。

1.2.2 引物合成 PIK3CA 基因正向和反向的引物合成序列见表1,引物由上海烈冰生物技术有限公司合成。

表1 PIK3CA 基因多态性检测的引物设计

单核苷酸多态性	正向引物	反向引物
PIK3CA (rs4975596)	CGTTCTGCTTTGGACAAC	CCTGATGATGCTGCTGGAG

1.2.3 聚合酶链式反应(PCR)扩增 预变性95℃ 4 min、变性95℃ 30 s、退火56℃ 30 s、延伸72℃ 30 s,72℃末延伸5 min;共35个循环;酶切体系及条件:10X FastDigest Gren Bufer 2 μ L, FastDigestenzyme 1 μ L(rs11615 使用 Eam1105I, rs13181 使用 AleI), ddH₂O 17 μ L, PCR 产物 10 μ L;水浴37℃酶切10 min,然后取出立即置水浴65℃灭活5 min;使用2%琼脂糖凝胶,电泳45 min,电压设置为145 V。

1.3 统计学方法 使用 Padgraph 6.0 统计软件进行分析。采用 χ^2 检验分析 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律和两组间基因型和等位基因频率分布的差异。检验水准取双侧 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验 PIK3CA rs4975596 的 AA、AG、GG 基因型在对照组的数目分别为34例、12例、4例,符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验($\chi^2 = 0.121, P = 0.94$)。

2.2 PIK3CA rs4975596 基因型和等位基因频率的分布 由表2结果可知,PIK3CA rs4975596 基因多态性均存在三种基因型,对各基因的三种基因型分布经 χ^2 检验分析发现口腔癌组 PIK3CA rs4975596 的基因型分布差异有统计学意义($\chi^2 = 7.073, P = 0.029$),提示不符合遗传平衡。而对照组 $\chi^2 = 3.125, P = 0.210$,提示符合遗传平衡。

PIK3CA rs4975596 的 A、G 等位基因在口腔癌组的分布频率分别为65%、35%;在正常对照组的分布频率分别为76%、24%;两组间差异有统计学意义($\chi^2 = 5.360, P = 0.024$)。结果见表3。

表2 PIK3CA rs4975596 基因型频率分布/例(%)

组别	例数	PIK3CA rs4975596			χ^2 值	P值	遗传平衡检验
		AA	AG	GG			
对照组	50	34(68)	12(24)	4(8)	3.125	0.210	符合遗传平衡
口腔癌组	50	26(52)	14(28)	10(20)	7.073	0.029	不符合遗传平衡

表3 PIK3CA rs4975596 等位基因频率分布/例(%)

组别	例数	PIK3CA rs4975596	
		A	G
对照组	50	38(76)	12(24)
口腔癌组	50	32(65)	18(35)
χ^2 值		5.360	
P值		0.024	

2.3 PIK3CA rs4975596 多态性与口腔癌发生的关系 分析 PIK3CA rs4975596 基因的基因型与口腔癌的关系时发现 PIK3CA 的 G(突变型)等位基因与 A(野生型)等位基因比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 6.349, P = 0.005$),而 PIK3CA 的 GG 基因型与 AA 基因型比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.831, P = 0.034$)。结果见表4。

表4 PIK3CA rs4975596 基因多态性与口腔癌的关系

基因	口腔癌组/例(%)	对照组/例(%)	OR 危险比(95%置信区间)	χ^2 值	P值
PIK3CA					
AA	27(54)	33(66)	1.0(参考)		
AG	13(26)	13(26)	1.265(0.617~2.594)	2.490	0.652
GG	10(20)	4(8)	0.230(0.063~0.834)	5.831	0.034
G 等位基因	33(33)	21(21)	0.182(0.054~0.607)	6.349	0.005

2.4 PCR 扩增 对 PIK3CA rs4975596 位点的野生型、杂合突变型和纯合突变型三种基因型和样本进行 PCR 扩增,2%琼脂变性凝胶电泳结果显示,PCR 扩增的 DNA 产物片段大小与预期相同,在91 bp 附近,每孔只有一条亮带,条带清晰无杂带,PCR 扩增特异性好。见图1。

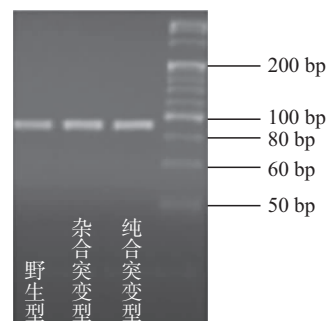


图1 PCR 扩增的电泳结果

3 讨论

口腔鳞状细胞的发生、发展是由多种因素参与,通过诱导基因突变、干扰细胞周期调控等机制作用于免疫系统,是协同作用的一个动态过程^[8]。这个过程可能涉及多种致癌基因和抑癌基因位点突变、缺失、甲基化和拷贝数的变化等,这些遗传学改变的累积终将引发口腔鳞状细胞癌的发生^[9]。根据之前的研究报道显示,PIK3CA 参与了肿瘤的发展过程并可作为致癌基因^[7]。突变使得基因重复过度活跃,导致 PIK3CA 出现扩增和 PI3Kp110 α 的增强功能。通过 PI3K p110 α 的催化功能,PIP3 增加,这是激活 PI3K/AKT 信号通路的重要媒介。PIP3 与磷酸肌醇依赖蛋白激酶 1(PDK1)的 C 末端同源性结构域结合,激活 PDK1。活化的 PDK1 磷酸化 AKT 的第 308 苏氨酸。在此基础上,磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 2(PDK2)磷酸化 AKT 的第 473 位,因此,PI3K/AKT 信号通路被激活^[10-11]。以前的研究表明,PI3K/AKT 信号通路被基因频繁的突变激活以促进肿瘤生长^[12]。PIK3CA 的遗传多态性还与多种癌症的发生有关,比如头颈鳞状细胞癌^[7],食管鳞状细胞癌^[13],非小细胞肺癌^[14],乳腺癌^[5,15],子宫内膜癌^[16-17],胃癌^[18]和直肠癌^[19-20]。

本次研究的结果显示,PIK3CA rs4975596 基因型与等位基因频率分布差异有统计学意义,并且 PIK3CA rs4975596 GG 基因型和 G 等位基因与口腔癌显著相关,说明了 PIK3CA rs4975596 基因多态性在口腔癌发生过程中是危险因素。本研究中虽然分析了 PIK3CA 基因型、等位基因与口腔癌发展的关系,但由于样本量局限,在后续研究中需进一步扩大样本数量。遗传多态性在很多癌症研究中被认为发挥着重要作用。PIK3CA 正在成为肿瘤细胞存活的关键因素。研究显示,PIK3CA 突变通常出现在肿瘤发生的晚期,就在入侵之前或与入侵一致^[18],说明 PIK3CA 可能与癌细胞的侵袭密切相关。此外,PIK3CA 多态性导致肿瘤组织中 PI3K 信号通路的增强,也表明 PIK3CA 可能参与肿瘤形成^[13]。因此,建立预测性生物标志物用于早期评估口腔癌是非常有必要的,通过检测基因多态性的预处理识别能够指导临床医生开展合理地治疗,对稳定病人病情非常有帮助。我们的研究提出了 PIK3CA 基因多态性与口腔癌发生的关联,并指出了 PIK3CArs4975596 GG、等位基因 G 能够作为口腔癌发生的危险因素,可以作为早期预防口腔癌的临床标志物。

综上所述,口腔癌病人肿瘤细胞中的 PIK3CA

多态性与口腔癌发生显著相关,检测其多态性对早期发现口腔癌有一定价值。

参考文献

- [1] MIRGHANI H, AMEN F, MOREAU F, et al. Do high-risk human papillomaviruses cause oral cavity squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2015, 51(3): 229-236.
- [2] JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [3] LI-TING C, CHUNG-HO C, YI-HSIN Y, et al. The development and validation of oral cancer staging using administrative health data[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 380.
- [4] LIU CJ, TSAI MM, TU HF, et al. miR-196a overexpression and miR-196a2 gene polymorphism are prognostic predictors of oral carcinomas[J]. Ann Surg Oncol, 2013, 20(Suppl 3): S406-S414.
- [5] PANG B, SUN SP, GAO L, et al. A single nucleotide polymorphism in PIK3CA gene is inversely associated with P53 protein expression in breast cancer[J]. Med Oncol, 2014, 31(7): 30.
- [6] NAKATSUKA T, TATEISHI K, KUDO Y, et al. Impact of histone demethylase KDM3A-dependent AP-1 transactivity on hepatocarcinogenesis induced by PI3K activation[J]. Oncogene, 2017, 36(45): 6262-6271.
- [7] WALTER V, YIN X, WILKERSON MD, et al. Molecular subtypes in head and neck cancer exhibit distinct patterns of chromosomal gain and loss of canonical cancer genes[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56823. DOI:10.1371/journal.pone.0056823.
- [8] ARORA R, BHARTI V, GAUR P, et al. Operculina turpethum extract inhibits growth and proliferation by inhibiting NF- κ B, COX-2 and cyclin D1 and induces apoptosis by up regulating P53 in oral cancer cells[J]. Arch Oral Biol, 2017, 80: 1-9.
- [9] AL-HEBISHI NN, LI S, NASHER AT, et al. Exome sequencing of oral squamous cell carcinoma in users of Arabian snuff reveals novel candidates for driver genes[J]. Int J Cancer, 2016, 139(2): 363-372.
- [10] CARNERO A, BLANCO-APARICIO C, RENNER O, et al. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(3): 187-198.
- [11] SMOLENSKY D, RATHORE K, BOURN J, et al. Inhibition of the PI3K/AKT pathway sensitizes oral squamous cell carcinoma cells to anthracycline-based chemotherapy in vitro[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(9): 2615-2624.
- [12] COHEN Y, GOLDENBERG-COHEN N, SHALMON B, et al. Mutational analysis of PTEN/PI3K/AKT pathway in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2011, 47(10): 946-950.
- [13] LIN DC, HAO JJ, NAGATA Y, et al. Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Nat Genet, 2014, 46(5): 467-473.
- [14] PU X, HILDEBRANDT MA, LU C, et al. PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway genetic variation predicts toxicity and distant progression in lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy[J]. Lung Cancer, 2011, 71(1): 82-88.