

mtDNA的HVS-I区种系变异 在潮汕地区食管癌发生中的作用研究

李晓昀¹ 苏敏¹ 李辉² 黄海花¹ 田东萍¹ 高玉霞¹

1. 汕头大学医学院病理教研室, 广东 汕头 515041 ;
2. 复旦大学生命科学学院遗传工程国家重点实验室及现代人类学研究中心, 上海 200433

[摘要] **背景与目的:** 对线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 多态性的研究证实, 华南沿海食管癌高发区 (潮汕地区) 和华北太行山食管癌高发区的高危人群间具有相近的母系遗传背景, mtDNA D单倍群可能是一种筛选食管癌易感人群的候选遗传背景标志。本研究旨在mtDNA高变I区 (hypervariable segment-I, HVS-I) 找出可能增加潮汕地区人群, 尤其是D单倍群个体, 食管癌发病风险的种系变异。**方法:** 收集潮汕地区和太行山地区高危人群以及潮汕地区食管癌患者静脉血样本 (分别为89、48和30份), 抽提基因组DNA, HVS-I区直接测序分析。**结果:** 3组人群D单倍群HVS-I区遗传多样性分析显示, 潮汕地区患者的单倍型多样性最低, 而核苷酸多样性和碱基配对差异性最高。卡方检验表明HVS-I区的16092和16249位点种系变异频率, 潮汕地区食管癌患者明显高于潮汕和太行山地区的高危人群 ($P < 0.05$), 且在患者中仅见于D单倍群。此外, 潮汕地区食管癌患者中带有16092、16129、16172、16223、16278和16311位点种系变异的D单倍群个体频率高于潮汕高危人群, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 食管癌的发生不是一个随机事件, D单倍群的部分HVS-I区单倍型个体是食管癌危险个体。HVS-I区多个位点变异相互协同作用, 可能增加了D单倍群个体的食管癌发病风险。

[关键词] mtDNA单倍群; HVS-I; 食管癌

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-3639(2010)05-0358-06

The study on the role of germ-line mtDNA HVS-I variations on the occurrence of esophageal cancer in Chaoshan area LI Xiao-yun, SU Min, LI Hui, HUANG Hai-hua, TIAN Dong-ping, GAO Yu-xia (Department of Pathology, Shantou University Medical College, Shantou Guangdong 515031, China)

Correspondence to: SU Min E-mail: minsu@stu.edu.cn

[Abstract] **Background and purpose:** Our previous study, which was based on mitochondrial DNA (mtDNA) polymorphism, indicated that the patients with esophageal cancer (EC) from high-risk populations and high-risk areas like the Chaoshan area located in littoral of southern China and the Taihang Mountain of north-central China, all shared similar matrilineal genetic background. The haplogroup D of mtDNA might be candidate genetic markers for screening populations who are susceptible to EC in the Chaoshan area. The purpose of this study was to search the germ-line hypervariable segment-I (HVS-I) for variations that may facilitate an increase of the D haplogroup individual's risk to EC in the Chaoshan area. **Methods:** We sequenced the HVS-I of blood samples from 30 Chaoshan area EC patients. Another 48 subjects from the Taihang Mountain and 89 subjects from the Chaoshan areas with EC high risk population were also collected. **Results:** Genetic diversities of HVS-I from the haplogroup D showed that Chaoshan patients possessed the lowest haplogroup diversity, the highest nucleotide diversity and mean number of pairwise differences when compared with two EC high-risk populations. Germ-line variations at sites 16092 and 16249 in Chaoshan patients (only found in haplogroup D patients) had higher frequencies than those in EC high-risk populations ($P < 0.05$). Moreover, haplogroup D individuals with germ-line variations at sites 16092, 16129, 16172, 16223, 16278 and 16311 in Chaoshan patients had a higher frequency than those in the Chaoshan high-risk population ($P < 0.05$).

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30210103904); 广东省十五攻关资助项目 (A1080203); 广东省医学科研基金资助项目 (B2008120)。

通讯作者: 苏敏 E-mail: minsu@stu.edu.cn

Conclusion: The occurrence of esophageal cancer may not be a random event and only part of the HVS- I haplotypes of haplogroup D individuals might be actual high-risk individuals for EC. Multiple HVS- I variations may be acting synergistically to facilitate the increase in the D haplogroup individual's risk for EC.

[Key words] HVS- I; haplogroup; esophageal cancer

线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是一条长为16 569 bp的双链闭环分子, 由富含嘌呤的重链(H链)和富含嘧啶的轻链(L链)构成。由于mtDNA具有严格的母系遗传和群体变异大等特点, 已被广泛应用于人群的遗传进化和母系遗传背景的研究中。地处粤东的潮汕地区是中国南方沿海的食管癌(esophageal cancer, EC)高发区, 尤其是潮汕地区的南澳岛发病风险最高, 其在1995年—2004年10年期间的食管癌世界人口标化年发病率为109.28/10万^[1], 始终徘徊于世界食管癌最高发区行列。本课题组前期在mtDNA多态性的研究中证实, 潮汕地区和内陆中原太行山地区(众所周知的食管癌高发区)的人群间具有相近的母系遗传背景, 并表明mtDNA D单倍群遗传背景尤其是其亚群D4a和D5a可能是筛选潮汕地区食管癌易感人群的候选母系遗传背景标志物^[2]。Stoneking^[3]的研究表明, mtDNA无论是种系变异还是在肿瘤组织中体细胞突变, 均优先发生于其D环区的高变区, 包括高变I区(hypervariable segment-I, HVS-I)和高变II区(hypervariable segment-II, HVS-II)。本研究通过对前期工作^[2]中潮汕食管癌患者检测到的HVS-I序列种系变异位点在潮汕和太行山食管癌高危人群中的变异情况, 希望能找出可能增加潮汕地区人群, 尤其是D单倍群个体食管癌发病风险的HVS-I区种系变异。

1 资料和方法

1.1 资料 在知情同意的原则下, 分别于2002年—2004年, 在潮汕地区和太行山地区共采集167个相互间无亲缘关系的成年汉族个体的静脉血(乙二胺四乙酸二钠盐抗凝)。具体采样包括:(1)潮汕地区食管癌高危人群血样89份(潮汕食管癌高发区未患食管癌和其它肿瘤的个体), 来自潮汕地区的潮州市和汕头市的南澳县、澄海区和潮阳区;(2)太行山地区食管癌高危人群血样48份(太行山食管癌高发区未

患食管癌和其他肿瘤的个体), 来自河南林县和新乡;(3)潮汕地区食管癌患者血样30份, 取自汕头大学第一附属医院, 患者术后经病理确诊为食管鳞状细胞癌。

1.2 HVS-I区测序 常规酚/氯仿抽提获得基因组DNA。以L15974(序列为5'-TCCAC-CATTAGCACCCAAAG-3')和H16488(序列为5'-AGGAACCAGATGTCGGATACAG-3')为引物, PCR扩增获得目的基因HVS-I; 扩增条件: 94℃预变性3 min; 94℃变性30 s、62℃退火15 s、72℃延伸50 s, 共30个循环; 最后72℃延伸5 min。扩增产物经虾碱酶(shrimp alkaline phosphatase, SAP)和核酸外切酶I(exonuclease I)处理纯化后, 通过Big-Dye末端荧光标记试剂盒(美国PE公司)进行测序反应, 测序反应产物经乙醇沉淀后用ABI PRISM[®] 3100测序仪(美国PE公司)进行核苷酸序列测定。所有实验在合作单位复旦大学生命科学院人类学研究室完成。

1.3 统计处理 参照校对后的mtDNA剑桥标准序列(rCRS)^[4], 用DNASTart和BioEdit7.0软件对HVS-I区测序片断进行序列分析比对, 找出序列变异。与rCRS比较, 血细胞的mtDNA存在的序列变异称为种系变异。

人群单倍型多样性计算公式:

$$h = (n/n - 1)(1 - \sum_i p_i^2)$$

p_i 是第*i*个单倍型在样本中的频率, n 是样本的个体数。

基于HVS-I区序列, 用种群遗传学软件ARLEQUIN 3.1计算人群内的核苷酸多样性、平均碱基配对差异。采用SPSS 11.5统计学软件, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 卡方检验统计各组计量之间的差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 D单倍群的HVS-I区遗传多样性分析 所测样本HVS-I区序列比对良好的区域为16048~16388 np, 其中2份潮汕高危个体

血样和1份太行山高危及个体血样测序不佳, 在统计时剔除。根据mtDNA的HVS-I区序列(16048~16383 np)检测结果, 分别计算3组人群中D单倍群的HVS-I区的单倍型多样性、核苷酸多样性和碱基配对差异性(表1)。

2.2 HVS-I区种系变异分析 分析30例食管癌患者中所检测到的HVS-I区种系变异在潮汕地区食管癌患者(30例)、潮汕食管癌高危人群(87例)和太行山食管癌高危人群(47例)中的分布情况。与mtDNA的剑桥序列比较, 在潮汕地区食管癌患者的血样中共发现40种种系变异。潮汕患者种系变异频率比较高的(变异次数在6次以上, 频率在20%以上)位点包括16223(80.00%)、16362(50.00%)、16129(33.33%)、16189(33.33%)、16183(30.00%)、16182(23.33%)、16298(23.33%)、16311(23.33%)和16172(20.00%), 其中前5个位点也是潮汕地区和太行山地区高危人群频繁发生的种系变异。

进一步对潮汕地区食管癌患者和潮汕、太行山高危及个体组间行两两卡方检验, 结果显示16092、16111、16243和16249位点种系变异的分布, 差异有统计学意义。其中, 潮汕地区食管癌患者16092位点变异的频率为13.33%, 明显高于潮汕地区(0.0%)和太行山地区高危人群(0.0%)(P 值分别为, $P<0.01$ 和 $P<0.05$), 且该变异仅在D5a单倍群(每个个体的单倍群推断方法见本课题组前期工作所发表的文献^[2])潮汕地区食管癌患者中检测到; 潮汕地区食管癌16249位点变异仅在D4a单倍群患者中检测到, 其频率为13.33%, 明显高于太行山地区的高危人群(0.0%)($P<0.05$), 该变异在潮汕地区高危人群中的频率也较低为5.75%。而16111和16243位点变异则主要存在于太行山地区高危人群中, 频率分别为12.77%和8.51%, 但在潮汕地区食管癌患者和潮汕地区高危人群中的频率均很低(表2)。

卡方检验分析了潮汕地区食管癌患者D单

倍群个体中所检测到的HVS-I区种系变异在潮汕地区食管癌患者及其高危人群中的分布情况。结果发现潮汕地区食管癌患者中带有16092、16129、16172、16223、16278和16311位点种系变异的D单倍群个体频率均明显高于潮汕地区的高危人群($P<0.05$, 表3)。

3 讨 论

mtDNA异常在肿瘤发生中的作用越来越引起人们的重视, 研究显示: 已在多种肿瘤中检测到mtDNA体细胞突变, 比如在食管癌^[5]、胃癌^[6]和肝癌^[7]等多种肿瘤中。近年来, 陆续发现肿瘤发生的母系遗传背景的报道^[8-11]。反应母系遗传背景的各种人群特异性mtDNA单倍群在人群中的分布可能不仅仅反映人群进化关系, 还和个体对包括肿瘤在内的某些疾病的易感性有关。因此, 有必要在这些人群特异性mtDNA多态性遗传背景下, 鉴定出潜在的病理性mtDNA突变, 且病理性mtDNA突变和特异性的mtDNA单倍群间可能存在协同作用。

本课题组的前期研究^[2]表明食管癌的发生不是随机的, D单倍群尤其是其亚群D4a和D5a可能是筛选食管癌易感人群的遗传背景标志。与潮汕地区和太行山地区食管癌高危人群比较, 潮汕地区食管癌患者D单倍群的HVS-I区遗传多样性主要表现为单倍型多样性最低, 而核苷酸多样性和平均碱基配对差异性最高, 提示食管癌的发生不是一个随机事件, D单倍群中可能只有部分HVS-I区单倍型个体是患病风险高的个体, 且这些单倍型间的分子差异大, 突变事件的增多加大了患病的风险。HVS-I区位于mtDNA的调控区—D环区, D环区含有mtDNA复制起始位点和转录启动子, 对mtDNA的复制和转录具有重要的调控作用并因此影响mtDNA的基因表达。mtDNA编码的13条多肽参与构成线粒体氧化磷酸化酶复合物, 因此, D环区的突变可能会引起线粒体的氧化磷酸化调节异常, 从而释放高水平的活性氧自

表1 3组人群D单倍群HVS-I区的遗传多样性评估

Tab. 1 Genetic diversities of HVS-I of haplogroup D from all populations in 3 studied areas

Population	<i>n</i>	Haplogroup diversity	Nucleotide diversity	Mean number of pairwise differences
Chaoshan area EC patients	30	0.764	6.255±3.217	0.019±0.011
Chaoshan EC high-risk population	87	0.978	4.442±2.304	0.014±0.008
Taihang Mountain area EC high-risk population	47	1.019	4.578±2.456	0.014±0.008

表2 潮汕地区食管患者HVS-I种系变异在潮汕EC患者、潮汕和太行山EC高危人群中的分布

Tab. 2 Germline HVS-I variations among Chaoshan and Taihang Mountain EC high-risk populations and Chaoshan EC patients

HVS-I /np	Germline variations	Chaoshan EC patients (n=30)		Chaoshan EC high-risk population (n=87)		Taihang Mountain EC high-risk population (n=47)	
		Number	Frequency/%	Number	Frequency/%	Number	Frequency/%
16075	T→C	1	3.33	0	0.00	0	0.00
16090	T→C	1	3.33	0	0.00	0	0.00
16092	T→C	4	13.33 ^{**}	0	0.00	0	0.00
16111	C→T	1	3.33 [*]	2	2.30	6	12.77
16129	G→A	10	33.33	22	25.29	13	27.66
16140	T→C	4	13.33	10	11.49	6	12.77
16164	A→G	4	13.33	3	3.45	3	6.38
16166	A→G	1	3.33	2	2.30	0	0.00
16169	C→T	1	3.33	0	0.00	1	2.13
16172	T→C	6	20.00	10	11.49	6	12.77
16182	A→C	7	23.33	12	13.79	8	17.02
16183	A→C	9	30.00	25	28.74	16	34.04
16184	C→T	3	10.00	4	4.60	3	6.38
16185	C→T	1	3.33	4	4.60	0	0.00
16189	T→C	10	33.33	29	33.33	19	40.43
16217	T→C	2	6.67	9	10.34	2	4.26
16223	C→T	24	80.00	57	65.52	29	61.70
16227	A→G	1	3.33	2	2.30	1	2.13
16234	C→T	1	3.33	3	3.45	4	8.51
16243	T→C	1	3.33	0	0.00 [*]	4	8.51
16249	T→C	4	13.33 [*]	5	5.75	0	0.00
16260	C→T	3	10.00	5	5.75	0	0.00
16266	C→T	3	10.00	5	5.75	2	4.26
16270	C→T	1	3.33	0	0.00	1	2.13
16272	A→G	1	3.33	2	2.30	2	4.26
16274	G→A	3	10.00	6	6.90	1	2.13
16278	C→T	5	16.67	5	5.75	2	4.26
16291	C→T	4	13.33	4	4.60	1	2.13
16293	A→T	1	3.33	0	0.00	0	0.00
16295	C→T	1	3.33	1	1.15	1	2.13
16297	T→C	2	6.67	7	8.05	0	0.00
16298	T→C	7	23.33	12	13.79	5	10.64
16304	T→C	1	3.33	10	11.49	9	19.15
16311	T→C	7	23.33	13	14.94	4	8.51
16319	G→A	4	13.33	14	16.09	6	12.77
16327	C→T	2	6.67	4	4.60	3	6.38
16335	A→G	2	6.67	6	6.90%	0	0.00
16343	A→G	1	3.33	0	0.00	0	0.00
16355	C→T	2	6.67	4	4.60	0	0.00
16362	T→C	15	50.00	36	41.38	18	38.30

16092 site, ^{**}: $P<0.01$, Chaoshan EC patients vs Chaoshan EC high-risk population; ^{*}: $P<0.05$, Chaoshan EC patients vs Taihang Mountain EC high-risk population; 16111 site, ^{*}: $P<0.05$, Chaoshan EC high-risk population vs Taihang Mountain EC high-risk population; 16243 site: $P<0.05$, Chaoshan EC high-risk population vs Taihang Mountain EC high-risk population. 16249 site, ^{*}: $P<0.05$, Chaoshan EC patients vs Taihang Mountain EC high-risk population.

由基, 促进肿瘤的发生^[12]。本研究试图在前期研究^[2]的基础上找出可能增加潮汕地区食管癌发病风险的位于D环区的HVS-I区种系变异。

对潮汕地区食管癌患者和潮汕、太行山地区食管癌高危人群的HVS-I区种系变异差异分析发现, 与潮汕和太行山地区食管癌高危人群比较, HVS-I区的2个种系变异(16092位

点T→C和16249位点T→C)主要存在于潮汕地区食管癌患者中, 这2个变异分别仅在属于D单倍群亚群的D5a和D4a患者中检测到。进一步将HVS-I区种系变异与D单倍群结合进行分析, 结果提示, 与潮汕地区食管癌高危人群比较, 带有16092、16129、16172、16223、16278和16311位点种系变异的D单倍群个体更常见于潮汕地区食管癌患者中。其中16129位点和

表3 潮汕患者D单倍群个体中所检测到的HVS-I区种系变异在潮汕食管癌患者及其高危人群中的分布

Tab. 3 The distribution of germline HVS-I variations observed in haplogroup D individuals of Chaoshan EC patients among populations

HVS-I /np	Chaoshan EC patients (n=30)		Chaoshan EC high-risk population(n=87)	
	Haplogroup D/% (n=11)	Non-D haplogroups/% [△] (n=19)	Haplogroup D/% (n=17)	Non-D haplogroups/% (n=70)
16092*	13.33	0.00	0.00	0.00
16129*	23.33	10.00	6.90	18.39
16164	13.33	0.00	3.45	0.00
16172*	13.33	6.67	2.30	9.20
16182	13.33	10.00	4.60	9.20
16183	13.33	16.67	4.60	24.14
16189	13.33	20.00	6.90	26.44
16223*	36.67	40.00	18.39	47.13
16249	13.33	0.00	5.75	0.00
16266	10.00	0.00	3.45	2.30
16270	3.33	0.00	0.00	0.00
16278*	13.33	3.33	2.30	3.45
16291	3.33	10.0	0.00	4.60
16311*	20.00	3.33	3.45	11.49
16362	30.00	10.00	19.54	21.84

[△]: Non-D haplogroups: Include all other haplogroups except haplogroup D; *: $P < 0.05$, the frequencies of haplogroup D with variations of sites 16092, 16129, 16172, 16223, 16278 and 16311 in Chaoshan EC patients were significantly higher than those in Chaoshan EC high-risk population

16172位点分别位于mtDNA的7SDNA处和终止相关序列(termination-associated sequence, TAS)处,这2个区域与mtDNA重链复制所必须的7SDNA的形成和重链复制的终止有关,因此,这2个区域的变异可能对重链复制有一定影响。D环区在复制过程中形成一个三链区,其中包括一个7SDNA的片段,起始于CSB 2区(conserved sequence block 2),终止于TAS,沿着顺时针方向延长,替换旧的重链。

总结HVS-I区种系变异的结果提示,潮汕地区食管癌高危人群中在HVS-I区带有16092、16129、16172、16223、16249、16278和16311位点变异的D单倍群个体可能是发生食管癌的更危险个体,但这些位点大多数是东亚人群线粒体单倍群系统树^[13]上的多态性位点(该系统树的位点变异发生于很久以前,并且大多数是选择性的中性或接近中性的突变,因此它们的变异不是致病性的突变),而可能产生协同作用,增加了D单倍群个体的食管癌发病风险。Herrnstadta等^[14]认为mtDNA突变单独或者作为一组突变更多的是以一种风险因素而不是以明显的致病性突变的形式促进疾病发生。D单倍群尤其是D4a和D5a个体的mtDNA可能有许多重要的影响线粒体氧化磷酸化功能的氨基酸替代多态性,从而对上述HVS-I区变异所导致的mtDNA复制和转录的不稳定更敏感,继而使D单倍群个体发生食管癌的风险增

大。Wong等^[7]在肝癌配对正常组织也发现大量的mtDNA种系变异,提出虽然种系变异的生物化学结果被认为太微弱而不能对氧化磷酸化产生任何可检测到的效应,但氧化磷酸化活性微小差异的长期积累可最终导致氧化应激,mtDNA多态性在改变发病年龄晚的疾病如肿瘤的发生风险上起作用。

[参 考 文 献]

- [1] Su M, Liu M, Tian DP, et al. Temporal trends of esophageal cancer during 1995–2004 in Nanao Island, an extremely high-risk area in China [J]. *Euro J Epidemiol*, 2007, 22(1): 43–48.
- [2] Li XY, Su M, Huang HH, et al. mtDNA evidence: Genetic background associated with related populations at high risk for esophageal cancer between Chaoshan and Taihang Mountain areas in China [J]. *Genomics*, 2007, 90(4): 474–481.
- [3] Stoneking M. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67(4): 1029–1032.
- [4] Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA [J]. *Nat Genet*, 1999, 23(2): 147.
- [5] Kumimoto H, Yamane Y, Nishimoto Y, et al. Frequent somatic mutations of mitochondrial DNA in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2004, 108(2): 228–231.
- [6] Maximo V, Soares P, Seruca R, et al. Microsatellite instability, mitochondrial DNA large deletions, and mitochondrial DNA mutations in gastric carcinoma [J]. *Genes Chrom Cancer*, 2001, 32(2): 136–143.
- [7] Wong LJC, Tan DJ, Bai RK, et al. Molecular alterations in mitochondrial DNA of hepatocellular carcinomas: is there a correlation with clinicopathological profile? [J]. *J Med*

- Genet, 2004, 41(5): 65.
- [8] Xu L, Hu Y, Chen B, et al. Mitochondrial polymorphisms as risk factors for endometrial cancer in southwest China [J] . Int J Gynecol Cancer, 2006, 16(4): 1661-1667.
- [9] Booker LM, Habermacher GM, Jessie BC, et al. North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer [J] . J Urol, 2006, 175 (2): 468-472.
- [10] Bai RK, Leal SM, Covarrubias D, et al. Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk [J] . Cancer Res, 2007, 67(10): 4687-4694.
- [11] Darvishi K, Sharma S, Bhat AK, et al. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism imparts maternal Haplogroup N a risk for breast and esophageal cancer [J] . Cancer Lett, 2007, 249(2): 249-255.
- [12] Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, et al. Mitochondrial DNA in human malignancy [J] . Mut Res, 2001, 488 (2): 119-133.
- [13] Kivisild T, Tolk HV, Parik JR, et al. The emerging limbs and twigs of the East Asian mtDNA tree [J] . Mol Biol Evol, 2002, 19(10): 1737-1751.
- [14] Herrnstadta C, Howell N. An evolutionary perspective on pathogenic mtDNA mutations: haplogroup associations of clinical disorders [J] . Mitochondrion, 2004, 4(5-6): 791-798.

(收稿日期: 2009-12-29 修回日期: 2010-02-05)