

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.04.003

自噬相关基因 ATG4A rs807185 位点单核苷酸多态性与重庆地区人群肺癌的相关性研究*

陈 姝¹, 贺 巧¹, 胡 琴¹, 陈维贤¹, 胡 锐^{2△}

1. 重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010; 2. 重庆市中医骨科医院检验科, 重庆 400012

摘 要:目的 研究自噬相关基因 ATG4A rs807185 位点单核苷酸多态性与重庆地区人群肺癌风险的相关性。**方法** 收集 225 例癌症患者(病例组)和 257 例健康对照者(对照组)的血液标本及相关病历资料,采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析方法对自噬相关基因 ATG4A 的 rs807185 位点进行基因分型,比较病例组和对照组的基因型差异;按照性别、年龄、吸烟史、饮酒史及肺癌病理分型等因素进行分层分析。**结果** 对照组 rs807185 位点的突变 A 等位基因频率高于病例组(37.7% vs. 24.9%, $P=0.006$),校正优势比为 1.989(95% 置信区间:1.223~3.236)。与野生 T 等位基因相比,ATG4A 基因 rs807185 位点的突变 A 等位基因与肺癌风险降低相关(校正优势比=0.605,95% 置信区间:0.456~0.803, $P<0.001$)。分层分析表明,在不同年龄、吸烟、饮酒及病理类型中,rs807185 位点的纯合突变基因型(AA)均可降低肺癌的患病风险。**结论** 在重庆地区人群中,ATG4A 基因 rs807185 突变体与肺癌风险的降低显著相关,表明 ATG4A 基因 rs807185 AA 突变可能是肺癌的保护因子。

关键词:ATG4A; 自噬; 肺癌; 单核苷酸多态性

中图法分类号:R734.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)04-0440-04

Correlation between single nucleotide polymorphism of ATG4A at rs807185 locus and lung cancer among population in Chongqing area*

CHEN Shu¹, HE Qiao¹, HU Qin¹, CHEN Weixian¹, HU Rui^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Orthopedic Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400012, China

Abstract: Objective To study the correlation between of single nucleotide polymorphism(SNP) of autophagy-related gene 4A (ATG4A) at rs807185 locus and lung cancer risk among the population of Chongqing area. **Methods** The blood samples and related medical records from 225 cases of lung cancer (case group) and 257 healthy controls (control group) were collected. The genotyping of ATG4A at rs807185 locus was performed by adopting the PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. The genotype differences were compared between the case group and control group; the stratified analysis was carried out based on the sex, age, smoking history, drinking history and lung cancer pathological classification. **Results** The mutant A allele frequency of rs807185 locus in the control group was higher than that in the case group (37.7% vs. 24.9%, $P=0.006$), the adjusted odds ratio(OR) was 1.989 [95% confidence interval(CI): 1.223-3.236]. Compared with the wild T allele, the mutant A allele at rs807185 locus of ATG4A was correlated with the decreased of lung cancer risk (adjusted OR=0.605, 95% CI: 0.456-0.803, $P<0.001$). The stratified analysis showed that in different ages, smoking, drinking and pathologic types, homozygous mutant genotype AA at rs807185 locus could decrease the risk suffering from lung cancer. **Conclusion** The mutant of rs807185 in ATG4A is closely correlated with the decrease of lung cancer risk among the population in Chongqing area. The AA mutation of ATG4A at rs807185 might be a protective factor for lung cancer.

Key words: ATG4A; autophagy; lung cancer; single-nucleotide polymorphism

肺癌是中国癌症人群死亡的主要原因,其致病因素包括重金属中毒、吸烟、遗传和其他环境因素。越来越多的证据表明,遗传多态性与肺癌的易感性有关^[1]。

* 基金项目:重庆市渝中区科技计划项目(20150144)。

作者简介:陈姝,女,技师,主要从事临床检验方面的研究。△ 通信作者,E-mail:zengzhen9163@163.com。

细胞自噬是一个高度保守的过程,对维持细胞内环境平衡至关重要,与人类许多疾病相关。自噬相关基因(ATGs)是调节自噬通路的基因,迄今已发现超过 30 种 ATGs。ATG4 基因编码的蛋白酶在解偶联复合物 ATG8-PE 和促进自噬体成熟方面有着重要的作用^[2]。据报道,ATG4A 是乳腺癌细胞致癌性所必需^[3],对卵巢癌的预后判断也有重要意义^[4]。然而,ATG4A 在肺癌的作用仍不清楚。本文拟通过病例对照研究,探讨 ATG4A 基因单核苷酸多态性(SNP)和肺癌风险的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 10 月至 2013 年 9 月在重庆医科大学附属第二医院就诊的 225 例肺癌患者作为病例组,其中男 180 例,女 45 例;平均年龄(62.8±9.6)岁;36 例患者接受过手术切除,189 例患者接受过纤维支气管镜活检,这些患者均按照临床标准、放射学和组织病理学报告确诊为肺癌;腺癌 81 例,鳞状细胞癌 89 例,小细胞肺癌 22 例,其他非鳞状细胞癌 33 例。对照组选择重庆医科大学附属第二医院体检中心同时段内的健康体检者,共 257 例,其中男 203 例、女 54 例,平均年龄(61.7±8.5)岁,性别与年龄分布与病例组相仿,排除恶性肿瘤患者或有任何其他严重慢性疾病病史者。所有受试对象均自愿参与本研究,并签署了知情同意书。本研究经重庆医科大学附属第二医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 每例受试者抽取 2 mL 静脉血,采用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝,离心后将上层血浆与下层中上部分血细胞分装,-80℃冰箱保存。用天根血液基因组 DNA 提取试剂盒提取外周血基因组 DNA,即蛋白酶 K 消化-饱和氯化钠盐析法。并采用紫外分光光度仪测量提取出的 DNA 浓度及 260 nm 处吸光度(A 值)与 A₂₈₀ 比值,若 DNA A₂₆₀/A₂₈₀ 比值在 1.7~2.0 则为标本纯度合格,低于 1.8 则考虑可能为蛋白污染,高于 2.0 可能存在 RNA 污染,不合格标本须重新抽提 DNA。合格标本稀释至工作浓度后存于-80℃冰箱备用。

1.2.2 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP) 采用 PCR-RFLP 进行基因组分型^[5]。PCR 扩增引物为 5'-GAGCAGTGCTGTCCAG-TAGAA-3'和 5'-GGGGGAAATGATCTCTCTCTG-3',扩增产物为 222 bp。该片段含有 Alu I 酶切位点,取产物 4 μL,采用限制性内切酶 Alu I(酶切序列为 5'-AGCT-3')针对 rs807185 位点进行酶切,在 A 等位基因存在情况下,产物可被消化成 88 bp 和 134 bp,而具有 T 等位基因的产物不能被消化。为进一步确认基因型,选择对照组和病例组中不同基因型别的 PCR 扩增产物送至上海生工公司测序,分析测序结果并与酶切分型结果进行比对,以确认酶切分型结果准

确性。

1.3 统计学处理 使用 SPSS16.0 软件进行分析。计量资料若为正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计数资料用频数、百分率表示,采用 χ^2 检验分析计数资料组间的差异。 t 检验用于比较病例组和对照组之间的年龄差异。校正年龄、性别、吸烟史、饮酒状况、肿瘤家族史、肺癌的组织病理学分型和转移程度后,采用非条件 Logistic 回归分析计算优势比(OR)和 95%置信区间(95%CI)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例组和对照组的临床特征 如表 1 所示,病例组男女比为 80:20,对照组男女比为 79:21,两组之间在性别上差异无统计学意义($P = 0.822$);纳入研究的两组研究对象均以年龄超过 55 岁的人群为主,约占 80%,两组之间年龄差异无统计学意义($P = 0.169$)。病例组中吸烟者的比例较对照组高,分别为 70.2%和 41.2%,差异有统计学意义($P < 0.001$)。病例组中有肿瘤家族史的比例较对照组高,分别为 13.3%和 7.0%。

表 1 病例组与对照组肺癌的临床特征			
变量	病例组	对照组	P
n	225	257	
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	62.8±9.6	61.7±8.5	0.169
≤55 岁[n(%)]	44(19.6)	55(21.4)	
>55~65 岁[n(%)]	96(42.7)	131(51.0)	0.056
>65 岁[n(%)]	85(37.8)	71(27.7)	
性别[n(%)]			0.822
男	180(80.0)	203(79.0)	
女	45(20.0)	54(21.0)	
吸烟史[n(%)]			<0.001
非吸烟者	67(29.8)	151(58.8)	
烟龄<20 年	14(6.2)	62(24.1)	
烟龄 20~40 年	49(21.8)	36(14.0)	
烟龄>40 年	95(42.2)	8(3.1)	0.613
饮酒状况[n(%)]			
有	113(50.2)	135(52.5)	
无	112(49.8)	122(47.5)	
肿瘤家族史[n(%)]			0.031
无	195(86.7)	239(93.0)	
有	30(13.3)	18(7.0)	
组织类型[n(%)]			
鳞状细胞癌	81(36.0)		
腺癌	89(39.5)		
小细胞肺癌	22(9.8)		
其他非鳞状细胞癌	33(14.7)		
临床分期[n(%)]			
局限期 ^a	93(41.3)		
扩散期 ^b	132(58.7)		

注:^a 小细胞肺癌和Ⅰ~ⅢB 期非鳞状细胞癌;^b 小细胞肺癌和Ⅳ期非鳞状细胞癌。

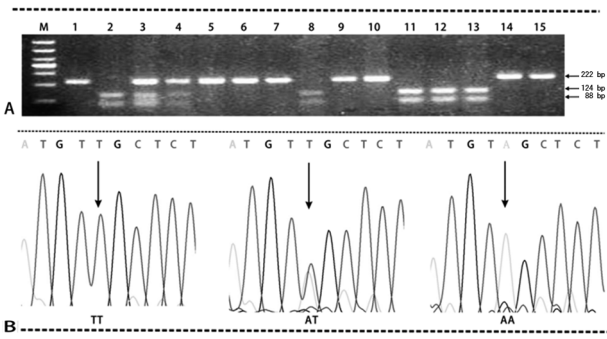
2.2 ATG4A rs807185 多态性与肺癌的相关性

2.2.1 ATG4A rs807185 位点的基因型分析及测序结果 纯合突变基因型(AA)PCR 产物可被切割为 88 bp 和 134 bp 两个片段,野生基因型(TT)不能被切

开,仍然为 222 bp 的一个片段,而杂合突变基因型(AT)则被部分切开,出现 88、134 bp 和 222 bp 3 个片段(图 1)。测序结果证实了 PCR-RFLP 分析结果的正确性。

2.2.2 ATG4A 基因多态性分析 对照组中突变等位基因 A 的频率高于病例组中的频率(37.7% *vs.* 24.9%, *P* = 0.006),校正 *OR* 为 1.989(95% *CI*: 1.223~3.236)。与 TT 基因型相比,AA 基因型携带者患肺癌的风险显著降低(校正 *OR* = 0.317,95% *CI*: 0.174~0.575, *P* < 0.001),而在 AT 基因型的携带者中未发现显著关联。此外,SNP 位点 rs807185 多态性在隐性模型(校正 *OR* = 0.315,95% *CI*: 0.178~0.556, *P* < 0.001)和加性模型(校正 *OR* = 1.612,95% *CI*: 1.228~2.115, *P* = 0.001)中均显示与肺癌风险显著相关。非条件 Logistic 回归分析表明 rs807185 的等位基因与肺癌风险降低相关(校正 *OR* = 0.605,95% *CI*: 0.456~0.803, *P* < 0.001)。见

表 2。



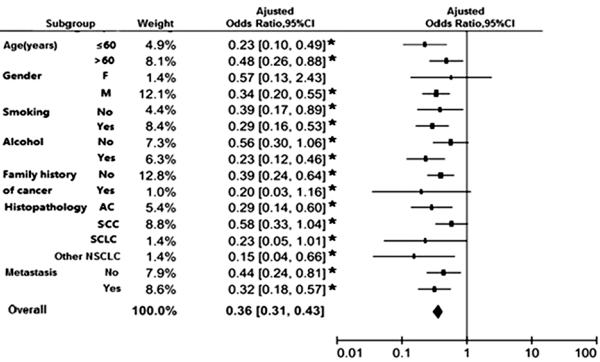
注:A 图为 PCR-RFLP 产物分析,泳道 1、5、6、7、9、10、14 和 15 显示 TT 基因型(222 bp),泳道 2、8、11、12 和 13 显示 AA 基因型(134 bp 和 88 bp),泳道 3 和 4 显示 AT 基因型(222、134、88 bp)。B 图中不同基因型的部分序列显示在该色谱图和等位基因上,rs807185 标有箭头,每个波代表色谱图中的一种核苷酸(A、T、G 或 C),TT 和 AA 具有一个波,然而,AT 具有两个波,其中一个(较高波)代表 T,另一个代表 A。

图 1 采用 PCR-RFLP 和 DNA 测序对 SNP rs807185 进行基因分型

表 2 病例组和对照组中 ATG4A 内含子 SNP rs807185 与肺癌风险的关联

SNP	基因型	病例组		对照组		原始 <i>P</i>	原始 <i>OR</i> (95% <i>CI</i>)	校正 <i>P</i>	校正 <i>OR</i> ^a (95% <i>CI</i>)
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%				
ATG4A rs807185	TT	169	75.1	160	62.3		1		1
	AA	31	13.8	78	30.3	<0.001	0.376(0.235~0.601)	<0.001	0.317(0.174~0.575)
	AT	25	11.1	19	7.4	0.497	1.246(0.669~2.350)	0.431	1.367(0.628~2.975)
显性模型	任意 A <i>vs.</i> TT	56	24.9	97	37.7	0.003	1.830(1.234~2.712)	0.006	1.989(1.223~3.236)
隐性模型	任意 T <i>vs.</i> AA	194	86.2	179	69.6	<0.001	0.367(0.231~0.583)	<0.001	0.315(0.178~0.556)
加性模型	AA <i>vs.</i> AT <i>vs.</i> TT	31/25/169		78/9/16		<0.001	1.54(1.235~1.936)	0.001	1.612(1.228~2.115)
等位基因	A <i>vs.</i> T	87/363		175/339		<0.001	0.64(0.517~0.810)	<0.001	0.605(0.456~0.803)

注:^a 校正后的非条件 Logistic 回归模型,校正因素包括年龄、性别、吸烟史、饮酒状况、肿瘤家族史以及肺癌组织病理学分型和转移程度。



注:ATG4A SNP 基因型与隐性模型不同亚组间肺癌风险的分层分析,不同亚组具有不同的校正后的年龄、性别、吸烟史、饮酒状况、肿瘤家族史,肺癌的组织病理学分型和转移程度。* 表示重要的 *OR*。AC 为腺癌;NSCLC 为非鳞状细胞癌;SCC 为鳞状细胞癌;SLC 为小细胞肺癌。

图 2 分层组中 rs807185 的校正优势比(*OR*)森林图

2.3 分层分析 为了排除其他因素对结果的影响,本研究进一步进行了分层分析以评估 rs807185 的 AA 基因型对隐性模型中不同亚组肺癌风险的影响,结果如图 2。在分别调整年龄、性别、吸烟史、饮酒状况、肿瘤家族史、肺癌组织病理学分类和转移程度后,

rs807185 位点的 AA 基因型与不同亚组肺癌发病风险的降低存在相关性,但在本研究的女性中没有观察到相关性。

3 讨论

目前,自噬机制在癌症发生和发展中的作用尚未明确,部分研究者认为在不同的肿瘤类型和微环境中可能有着不同的作用。有报道认为在肺癌中自噬可能发挥抑制肿瘤的作用^[6]。然而,一些研究仍支持自噬能够提高癌细胞存活率的观点^[7]。自噬相关基因 ATG4 的表达增加与肿瘤发展和抑制以及癌症治疗抗性相关。因此,相关研究认为这些蛋白质可能在癌症治疗中发挥潜在或新靶点的作用^[8]。至今,已经在哺乳动物中鉴定出 4 种自噬相关基因 ATG4 亚型(A~D)。ATG4B 在结直肠癌细胞中的表达明显增加,ATG4B 的抑制可降低自噬活性,从而使癌细胞对治疗剂敏感^[9]。ATG4C 与营养应激条件下自噬的减少相关,并最终导致对纤维肉瘤的易感性增加^[10]。ATG4C 过表达可阻止由共济失调-毛细血管扩张症突变基因(ATM)下调引起的乳腺癌干细胞微球体缺陷的发生^[11]。ATG4D 可作为结直肠癌发生中的癌

抑制因子,有研究发现结直肠癌细胞中 ATG4D 的表达水平较癌旁组织明显下调^[12]。WOLF 等^[3]曾报道过乳腺癌与自噬调节因子 ATG4A 之间的相关性。但 ATG4A 在自噬和致瘤性中的具体作用仍有待研究。以往研究报道 ATG4A 自噬基因突变(rs5973822)与克罗恩病中的肉芽肿有关($OR=4.13, 95\%CI:0.97\sim17.63, P=0.03$),但在比利时和以色列患者的病例对照研究中却未发现 rs807185 位点的差异^[13]。ATG4A SNP 的相互作用可能影响中国西南地区人群的 HPV 感染,由此 ATG4A 可能是宫颈癌的致病因子^[14]。本研究结果表明,在 AA 基因型或 A 等位基因的携带者中,肺癌发展的风险显著降低。rs807185 位点位于 Xq22.1 染色体 ATG4A 基因的内含子区上。有研究表明,内含子多态性处于连锁不平衡状态,具有一些功能多态性或一些与癌症或其他疾病风险相关的遗传转录^[15]。因此,自噬相关基因 ATG4A rs807185 位点的突变,等位基因 A 或 AA 基因型可能对某些功能多态性或与肺癌患病风险相关的一些遗传转录产生影响。rs807185 位点突变体可能调节 ATG4A 的表达水平,也可能影响其他一些蛋白质的表达与功能,并反过来影响自噬机制。究竟该位点如何发挥作用从而降低肺癌患病风险的具体机制尚不清楚,还需更多研究来阐明此现象。并且由于本研究是自噬相关基因 ATG4A rs807185 位点与肺癌易感性关联的初步研究,虽然发现了此现象,但样本量不够大,因此其结果仍需进一步扩大样本深入研究。

癌症与基因多态性的相关性研究日益受到重视,并且自噬也成为近年来癌症研究中的热点。但是目前,自噬通路中的自噬相关基因 ATG4A rs807185 位点与癌症易感性的相关研究仍较少。本文就自噬相关基因 ATG4A rs807185 位点 SNP 与重庆地区人群肺癌风险的相关性进行研究,结果显示,在重庆地区人群中,rs807185 位点 SNP 与肺癌易感性降低存在相关性。因此笔者认为 rs807185 位点突变可能是肺癌的保护因子,其具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] GAO L, THAKUR A, LIANG Y, et al. Polymorphisms in the TERT gene are associated with lung cancer risk in the Chinese Han population[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2014, 23(6):497-501.
- [2] BETIN V M, SINGLETON B K, PARSONS S F, et al. Autophagy facilitates organelle clearance during differentiation of human erythroblasts: evidence for a role for ATG4 paralogs during autophagosome maturation [J]. *Autophagy*, 2013, 19(6):881-893.

- [3] WOLF J, DEWI D L, FREDEBOHM J, et al. A mammosphere formation RNAi screen reveals that ATG4A promotes a breast cancer stem-like phenotype [J]. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(6):R109-R112.
- [4] LIAO Y P, CHEN L Y, HUANG R L, et al. Hypomethylation signature of tumor-initiating cells predicts poor prognosis of ovarian cancer patients [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(7):1894-1906.
- [5] MAZOR Y, KARBAN A, NESHER S, et al. Granulomas in Crohn's disease: are newly discovered genetic variants involved? [J]. *J Crohns Colitis*, 2010, 4(4):438-443.
- [6] ARAYA J, HARA H, KUWANO K. Autophagy in the pathogenesis of pulmonary disease [J]. *Intern Med*, 2013, 52(20):2295-2303.
- [7] DEGENHARDT K, MATHEW R, BEAUDOIN B, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(1):51-64.
- [8] ZHANG L, LI J, OUYANG L, et al. Unraveling the roles of Atg4 proteases from autophagy modulation to targeted cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2016, 373(1):19-26.
- [9] FU Y, HONG L, XU J, ZHONG G, GU Q. Discovery of a small molecule targeting autophagy via ATG4B inhibition and cell death of colorectal cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Autophagy*, 2019, 15(2):295-311.
- [10] MARINO G, SALVADOR-MONTOLIU N, FUEYO A, et al. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(25):18573-18583.
- [11] ANTONELLI M, STRAPPAZZON F, ARISI I, et al. ATM kinase sustains breast cancer stem-like cells by promoting ATG4C expression and autophagy [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13):21692-21709.
- [12] GILL J, RAMSEY D, PAWLOWSKI P, et al. The influence of tumor microenvironment on ATG4D gene expression in colorectal cancer patients [J]. *Med Oncol*, 2018, 35(12):159-162.
- [13] BRINAR M, VERMEIRE S, CLEYNEN I, et al. Genetic variants in autophagy-related genes and granuloma formation in a cohort of surgically treated Crohn's disease patients [J]. *J Crohns Colitis*, 2012, 6(1):43-50.
- [14] MAO J J, WU L X, WANG W, et al. Nucleotide variation in ATG4A and susceptibility to cervical cancer in Southwestern Chinese women [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3):2992-3000.
- [15] ORTIZ-CUARAN S, COX D, VILLAR S, et al. Association between TP53 R249S mutation and polymorphisms in TP53 intron 1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2013, 52(10):912-919.