

在 mRNA 水平 ABCC11 基因 SNP 538 不同基因型与腋臭间的研究

王萃 黄莎

[摘要] 目的 探讨中国人群中腋臭患者及非腋臭患者的 ABCC11 基因多态位点 SNP538 的基因型及两者 ABCC11 基因在 mRNA 水平表达量之间的差异,揭示腋臭的发病机制。方法 选取腋臭诊断的患者 12 名进入实验组,选取确诊乳癌、拟行乳癌根治术+腋窝淋巴结清扫术的 2 例患者为对照组。切取所有受试者的腋下皮肤组织进行组织学、RT-PCR 分析。结果 实验组、对照组均可见明显顶泌汗腺腺体,有完整的管腔结构,但不同标本内的分泌部的腺细胞高度不一。实验组有 11 例为 GA 型,1 例为 GG 型,对照组 2 例均为 AA 型。实验组目的基因 ABCC11/GAPDH 和 ABCC11/PolR2A 的比值均明显高于对照组($P<0.05$)。结论 ABCC11 基因多态位点 SNP538 的基因型与腋臭发生密切相关。腋臭患者的 ABCC11 基因表现型为 GG 或 GA 型,其在 mRNA 水平表达较 AA 型无腋臭患者明显增高,提示 ABCC11 基因 SNP538G 向 A 突变导致该基因在 mRNA 水平的表达减弱。

[关键词] 腋臭; 单核苷酸多态性

Relationship between a functional ABCC11 allele on mRNA level and biochemical formation of osmidrosis WANG Cui, HUANG Sha. Department of Plastic Surgery, Shu Lan (Hangzhou) Hospital, Hangzhou 310000, China

[Abstract] Objective To detect the expressions of ABCC11 gene (on mRNA level) in different genotypes. **Method** Totally 12 patients who were diagnosed with axillary osmidrosis were enrolled in the experimental group, and 2 patients with breast cancer who were underwent radical mastectomy and axillary lymph node dissection were selected as the control group. The axillary skin tissues of all subjects were taken for histological and RT-PCR analysis, and the results were statistically analyzed. **Results** In the experimental group and the control group, there were obvious glands in the apocrine glands, which had a complete lumen structure, but the gland cells in the secretory part of different specimens were highly different. In the experimental group, 11 cases were GA type, 1 case was GG type, and 2 cases in control group were AA type. The ratios of target gene ABCC11/GAPDH and ABCC11/PolR2A in the experimental group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusions** The genotype of ABCC11 polymorphism locus SNP538 is closely related to the axillary osmidrosis. The ABCC11 gene in axillary osmidrosis is expressed as GG or GA type. The expression of ABCC11 gene is higher in GA heterozygote and GG homozygote, rather than AA homozygote. It suggests that the ABCC11 gene SNP538 G to A causes the expression of the ABCC11 gene to be weakened on the mRNA level.

[Key words] osmidrosis; single nucleotide polymorphism

人类腋窝的皮下有大量的腺体,包括大汗腺(顶泌汗腺)、小汗腺、皮脂腺等。在上述腺体作用下,该区域能分泌大量的气化有机物质^[1]。人体的这种特殊体味,在某些国家将此定义为腋臭,一些

东方国家甚至将其归为疾病。腋臭在西方人群的发病率高达 95% 以上,东方人群中,据调查不足 5%。腋臭已经不再是一个生理学的表现,而是广义上涉及到心理学、经济学等多领域的社会生理症状。近来,随着基因技术的发展,腋臭的基因学发病机制渐渐明了。目前已明确 ABCC11 基因与腋臭密切相关。

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2018.03.006

作者单位: 310000 浙江杭州, 树兰(杭州)医院整形美容科

ABCC11 基因多态性位点的变化,是直接导致 ABCC11 蛋白结构的改变,还是仅仅改变 mRNA 二级结构从而导致蛋白表达水平的改变,目前尚无报道。本次研究旨在了解中国人群中腋臭患者及非腋臭患者的 ABCC11 基因多态位点 SNP538 的基因型,及两者 ABCC11 基因 mRNA 表达量之间的区别,从该基因 mRNA 水平进一步深入研究腋臭的发病机理。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 7 月至 12 月树兰(杭州)医院整形美容科所有首诊为腋臭的患者,纳入标准:经临床查体确诊为双侧腋臭、且自愿参加此项临床试验的患者;排除曾经接受过腋臭外科治疗(包括激光)以及腋下区域有瘢痕存在的患者。最终实验组纳入 12 例患者,其中男性 4 例、女性 8 例;中位年龄为 21.41 岁。同期选择在本机构确诊为乳癌,拟行乳癌根治术+腋窝淋巴结清扫术的患者 2 例为对照组。其中 2 例均为女性,中位年龄 48.12 岁。本次研究经过医院伦理委员会审核通过,并且均在术前告知受试者研究目的,与每个患者签署知情同意书及术前风险告知书。

1.2 实验仪器与试剂 主要仪器包括:Legend 低温水平离心机(由德国 Sorvall 公司生产)、OLYMPUS 光学显微镜(由日本 Olympus 公司生产)、恒温循环水浴箱(由丹麦 Heto 公司生产)、Kadok DC-120 凝胶图像分析系统(由美国 Life Technologies 公司生产)、紫外微量分光光度计(由美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司生产)、DYNEX MRXII 型酶标仪(由日本 Dynex 公司生产)、BG-Power 300 电泳仪(由北京百晶生物科技有限公司生产)。主要试剂包括:引物(由美国 IDT 生产)、Trizol 试剂(由美国 Invitrogen 生产)、逆转录酶系统(由美国 Promega 生产)、dNTP 混合(由美国 MBI 生产)、Taq 酶系统(由美国 Promega 生产)、琼脂糖(由美国 AMERSCO 生产)。

1.3 标本采集 实验组:由同一位整形美容科医生施行手术操作。所有手术在门诊手术室进行,术前刮除腋下毛发。患者身份核对后,仰卧位,双上肢上举以充分暴露术区,常规消毒铺巾。在术区皮下局部麻醉后,予大汗腺切除术,术中获取腋下全层皮肤标本。对照组:2 例对照组患者由同一组乳腺外科医生施行手术操作。手术在全麻手术室进行。完成腋窝淋巴结清扫后,切取小块腋下皮肤组织(不含淋巴结)。所有标本离体后 30 min 内放入冻存管内,进行标记后液氮保存。

1.4 观察指标及方法 从每一份组织标本中取出部分组织,经福尔马林固定后,行石蜡包埋、切片,苏木素-伊红染色,行光镜组织学检查。剩余部分先进行大汗腺组织总 RNA 的提取,再进行 cDNA 合成,随后进行 PCR 扩增。引物合成参考美国国立生物技术信息中心,使用 Primer 3.0 引物设计软件。5' 参考侧翼顺序为 AAGTCTGCCACTTACTGGCC,3' 参考侧翼顺序为 GAGTACACTGGCAATGCAGA。引物序列及产物大小见表 1。实验中使用 Qiagen 的 2*SYBR Quant Mast Mix 进行三重重复的定量 PCR 检测,以确保实验准确性;采取 $\Delta\Delta Ct$ 法对目的基因的表达进行相对定量;用目的基因与 GAPDH 或 PolR2A 的比值表示目的基因的相对表达水平。

表 1 引物序列及产物大小

基因	序列 (5'-3')	度/bp
GAPDH	Forward ATGGAGAAGGCTGGGGCTCA	20
	Reverse ATGGCATGGACTGTGGTCATGA	22
PolR2A	Forward GCAGAGAAGCTGGTGTCTCCGTA	22
	Reverse CAGCATGTTGGACTCGATGCAG	22
ABCC11	Forward CTCCCACATCCTCAATTCTCTGTC	23
	Reverse GCCATCCATCGTGTGGAAGAT	21

1.5 统计学方法 采用 SPSS 12.0 软件进行统计。数据采用中位数表示,采用非参数方法 Wilcoxon 检验进行组间比较。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组腋下皮肤组织组织学表现见封二图 1

由封二图 1 可见,实验组和对照组均可见明显顶泌汗腺腺体,有完整的管腔结构,周围的分泌部由腺细胞、肌上皮细胞、基底膜带所组成,但实验组中不同标本内的分泌部的腺细胞高度不一,对照组中顶泌汗腺腺体形态与实验组存在差异。

2.2 基因测序 共收集 14 例标本,经 TRIZOL 提取总 mRNA,RT-PCR 后,通过对 ABCC11 基因多态性位点 SNP538 的等位基因型检测发现实验组有 11 例为 GA 型,1 例为 GG 型,对照组 2 例均为 AA 型。

2.3 目的基因的相对表达水平 ABCC11/GAPDH、ABCC11/PolR2A 见图 1、2。

由图 1 可见,实验组目的基因 ABCC11/GAPDH 的比值明显高于对照组 ($P < 0.05$);由图 2 可见,实验组目的基因 ABCC11/PolR2A 的比值明显高于对照组 ($P < 0.05$)。

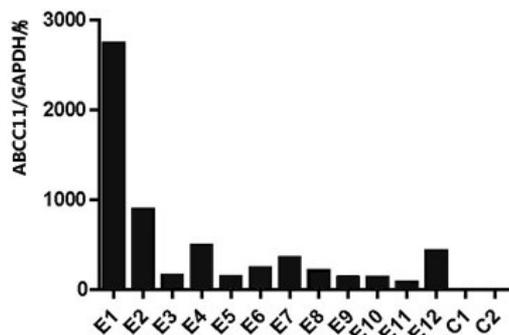


图1 目的基因相对表达水平 ABCC11/GAPDH 柱状图

注: E1 至 E12 为实验组 12 例患者, C1 和 C2 为对照组 2 例患者。其中 C1 为 0.30%, C2 为 0.08%。

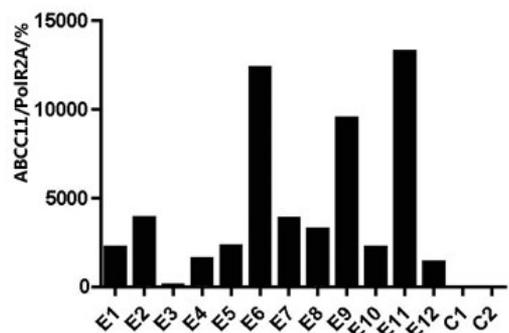


图2 目的基因相对表达水平 ABCC11/PolR2A 柱状图

注: E1 至 E12 为实验组 12 例患者, C1 和 C2 为对照组 2 例患者。其中 C1 为 0.10%, C2 为 0.60%。

3 讨论

ATP结合盒(ABC)蛋白是人类基因组编码的蛋白大家族,能参与细胞膜的转运。ABCC11蛋白属于ABC家族,迄今其10余种SNPs已经被发现^[2]。源于ABCC11 538位点的SNP G向A的点突变(东亚人群中占80%~95%,高加索人群仅占0%~3%)导致ABCC11三种等位基因的出现;该等位基因的表达与腋窝体味的消失密切相关,推测这在遗传学上是一个导致功能丧失的点突变。该点突变起源于亚洲北部(韩国)却迅速、大范围地“传遍”整个亚太地区,导致大规模的“无腋臭”人群出现^[3]。国内也有研究对腋臭个体和非腋臭个体的ABCC11基因多态性位点rs17822931进行检测,并分析等位基因类型,结果发现所有腋臭个体的基因型均为GG或者GA,而正常人等位基因型为AA^[4]。

ABCC11基因在转录水平上的表达(mRNA)仅存在于大汗腺的腺体组织,尤其是分泌细胞周围的肌上皮细胞层及分泌细胞中。有研究发现AA基因型和GG基因型中观察到的ABCC11 mRNA表达信

号类似,提示无功能的ABCC11蛋白依旧被转运到相应位点^[5]。但本次研究通过目的基因ABCC11双内参的对比,发现ABCC11基因在实验组(GA/GG型)高表达,而在对照组(AA型)是低表达的,提示ABCC11基因SNP538位点GA型和GG型个体的基因在mRNA水平表达功能强于AA型。

ABCC11的538位点G向A的点突变导致其表达蛋白中第1跨膜区180号谷氨酸(Gly 180)向精氨酸(Arg180)的改变。该单个氨基酸的变化导致缺乏N端链的糖基化,产物是一个表达中被错误折叠的蛋白,进而在内质网经由蛋白酶(主要泛素化)被降解,从而大汗腺腺体细胞颗粒和空泡中ABCC11转运蛋白的表达大大降低^[6],且对标准底物cGMP的转运能力也大大下降^[7]。有研究发现突变为AA型的ABCC11细胞内空泡膜对cGMP底物的转运活性明显降低,与阴性对照组相似^[8]。另有观察发现AA型大汗腺的形态显著区别于野生型^[9]。因此,转运机制的变化抑或基因突变所致大汗腺腺体的变化导致了腋臭的发生尚未证实,亟待进一步深入研究。

无论有无腋臭,人群中腋下组织均可见大汗腺结构,但形态有所差异,提示可能与不同的分泌期相关。中国人群中ABCC11基因多态位点SNP538的基因型与腋臭发生密切相关,腋臭患者的表现型为GG或GA型,AA型等位基因型则表现无腋臭。腋臭患者腋下组织中ABCC11基因在mRNA水平的表达较无腋臭者明显增高($P<0.05$)。因而提示,腋臭表现与ABCC11基因转运功能密切相关,ABCC11基因SNP538G向A点突变导致该基因在mRNA水平的表达减弱、功能丧失。

参考文献

- 1 Brown S. The pharmacogenetics of body odor: as easy as ABC[J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(7): 1709-1711.
- 2 Kruh GD, Guo Y, Hopper-Borge E, et al. ABCC10, ABCC11, and ABCC12[J]. *Pflugers Arch*, 2007, 453(5): 675-684.
- 3 Martin A, Saathoff M, Kuhn F, et al. A functional ABCC11 allele is essential in the biochemical formation of human axillary odor[J]. *J Invest Dermatol*, 2010, 130(2): 529-540.
- 4 孙杨, 龙剑虹, 王永洁. ABCC11基因单核苷酸多态性与中国汉族人群腋臭发病的相关性研究[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2013, 38(11): 1141-1145.

(下转第266页)

重构;保护血管内皮细胞并促进其增殖,促进内皮细胞向受损的血管壁迁移,促进血管修复和血管新生;抑制死亡受体信号转导途径而发挥神经保护作用等^[13-15]。因此,经鼻应用CGRP对SAH后脑损伤的保护作用可能涉及到多个不同的环节,其详细机制有待进一步的研究来阐明。

参考文献

- Zhang H, Wang X, Li X, et al. Reversible cerebral vasoconstriction syndrome and subarachnoid hemorrhage, which occurs first[J]. Intern Med, 2012(1): 135-137.
- Diringer MN. Management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Crit Care Med, 2009, 37(2): 432-440.
- Helbok R, Ko SB, Schmidt JM, et al. Global cerebral edema and brain metabolism after subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2011, 42(6): 1534-1539.
- Bian LH, Liu YF, Nichols LT, et al. Epidemiology of subarachnoid hemorrhage, patterns of management, and outcomes in china: a hospital-based multicenter prospective study[J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(11): 895-902.
- Omeis I, Neil JA, Mural IR, et al. Treatment of cerebral vasospasm with biocompatible controlled-release systems for intracranial drug delivery[J]. Neurosurgery, 2008, 63(6): 1011-1021.
- Shin HK, Hong KW. Importance of calcitonin in gene-related peptide, adenosine and reactive oxygen species in cerebral auto regulation under normal and diseased conditions [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004, 31(1-2): 1-7.
- Chu Y, Miller JD, Heistad DD. Gene therapy for stroke: 2006 overview[J]. Curr Hypertens Rep, 2007, 9(1): 19-24.
- Brasnjevic I, Steinbusch HW, Schmitz C, et al. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier[J]. Prog Neurobiol, 2009, 87(4): 212-251.
- Sun BL, Xia ZL, Zhang SM, et al. Studies on effects of L-arginine antagonism on endothelin in plasma and brain tissue in rats [J]. Chin Pharm J, 2003, 38(12): 919-921.
- Locatelli IM. The importance of substance P and calcitonin in gene related peptide as vasodilator neuropeptide during acute phase of experimental post hemorrhagic vasospasm [J]. J Neurosurg, 2000, 44(4): 186-191.
- Brasnjevic I, Steinbusch HW, Schmitz ZC, et al. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier[J]. Prog Neurobiol, 2009, 87(4): 212-251.
- Pathan SA, Iqbal Z, Zaidi SM, et al. CNS drug delivery systems: novel approaches[J]. Recet Pat Drug Deliv Formul, 2009, 3(1): 71-89.
- Yin MH, Xu XH, Li YJ. Protective effects of brevis caprine on cell apoptosis induced by cerebral ischemia-reperfusion in mice[J]. Chin Pharm J, 2008, 43(3): 184-188.
- Liu P, Wang JY, Liu WQ, et al. Protective effects of sodium ferulate on focal brain ischemia/reperfusion in rats by regulating ET/CGRP of brain tissue in rats [J]. Chin Pharm J, 2007, 42(24): 1859-1863.
- Recober A, Russo AF. Calcitonin in gene-related peptide: an update on the biology[J]. Curr Opin Neurol, 2009, 22(3): 241-246.

(收稿日期 2017-12-18)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第262页)

- Baumann T, Bergmann S, Schmidt-Rose T, et al. Glutathione-conjugated sulfanylalkanols are substrates for ABCC11 and γ -glutamyl transferase 1: a potential new pathway for the formation of odorant precursors in the apocrine sweat gland [J]. Exp Dermatol, 2014, 23(4): 247-252.
- Ishikawa T, Toyoda Y, Yoshiura K, et al. Pharmacogenetics of human ABC transporter ABCC11: new insights into apocrine gland growth and metabolite secretion[J]. Front Genet, 2013, 2(3): 306.
- Sosonkina N, Nakashima M, Ohta T, et al. Down-regulation of ABCC11 protein (MRP8) in human breast cancer [J]. Exp Oncol, 2011, 33(1): 42-46.
- Natsch A, Gfeller H, Gygax P, et al. A specific bacterial aminoacylase cleaves odorant precursors secreted in the human axilla[J]. J Biol Chem, 2003, 278(8): 5718-5727.
- Jonathan B, Sharon E, XQ Chen, et al. No evidence for an association between the earwax-associated polymorphism in ABCC11 and breast cancer risk in Caucasian women[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 126(1): 235-239.

(收稿日期 2018-03-08)

(本文编辑 蔡华波)