

中国人群 miR-449a 单核苷酸多态性与胃癌易感性的相关性研究*

张艳梅¹, 马靖华², 刘阳晨³, 刘君³, 周娟³ (1. 榆林市第二医院检验科, 陕西榆林 719000;
2. 榆林市第一医院检验科, 陕西榆林 719000; 3. 泰兴市人民医院肿瘤科, 江苏泰兴 225400)

摘要:目的 探讨 miR-449a rs112310158 基因多态性与胃癌易感性的关系。方法 共纳入 448 例胃癌患者和 452 例健康对照者。miR-449a rs112310158 基因型检测采用聚合酶链反应结合直接测序方法。miR-449a 表达水平检测采用荧光定量 PCR 方法。此单核苷酸多态性位点功能由 RT-PCR 和免疫组化试验验证。结果 相对于对照组, 胃癌病例组在吸烟者 (OR=1.345, 95%CI=1.028~1.761)、饮酒者 (OR=1.910, 95%CI=1.465~2.490)、有肿瘤家族史者 (OR=4.178, 95%CI=1.554~11.231)、幽门螺杆菌感染率较高者 (OR=1.428, 95%CI=1.098~1.857), 差异均具有统计学意义。相较 AA 基因型, GG 基因型显著增加胃癌的发病风险 (OR=2.542, 95%CI: 1.304~4.954, P=0.005)。相较于 A 等位基因, 携带 G 等位基因的个体罹患胃癌的风险升高 (OR=1.279, 95%CI: 1.012~1.617, P=0.043)。GG 型患者比 AA 型患者 miR-449a 表达水平下降。与 AA 基因型相比, miR-449a 靶基因 PRKCE 在 GG 基因型胃癌患者中有更高的表达。结论 该研究发现 miR-449a rs112310158 是胃癌的遗传易感因素之一。

关键词: 胃癌; miR-449a; 多态性

中图分类号: R735.2; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)04-014-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.04.004

Correlation Study on miR-449a Gene Polymorphism of Single Nucleotide and Susceptibility to Gastric Cancer in A Chinese Han Population

ZHANG Yan-mei¹, MA Jing-hua², LIU Yang-chen³, LIU Jun³, ZHOU Juan³ (1. Department of
Clinical Laboratory, the Second Hospital of Yulin City, Shaanxi Yulin 719000, China;
2. Department of Clinical Laboratory, the First Hospital of Yulin City, Shaanxi Yulin 719000,
China; 3. Department of Oncology, Taixing People's Hospital, Jiangsu Taixing 225400, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship of a genetic variant at miR-449a and the risk of gastric cancer. **Methods** The polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing were used to genotype sequence variants of miR-449a in 448 gastric cancer (GC) cases and 452 controls. The miR-449a levels were measured by quantitative real-time PCR. The function of rs112310158 was confirmed by RT-PCR and immunohistochemistry assay. **Results** GC cases were more likely to be cigarette smokers (OR=1.345, 95% CI=1.028~1.761) and alcohol drinkers (OR=1.910, 95% CI=1.465~2.490), had cancer history in the first relatives (OR=4.178, 95% CI=1.554~11.231), and have higher infection rate of Helicobacter pylori (OR=1.428, 95% CI=1.098~1.857). Individuals carrying the GG genotypes for the rs112310158 were associated significantly with increased risk of gastric cancer comparing with those carrying wild-type homozygous AA genotypes (OR=2.542, 95%CI: 1.304~4.954, P=0.005). Furthermore, the G allele increased the risk of occurrence of gastric cancer compared to the A allele (OR=1.279, 95% CI: 1.012~1.617, P=0.043). rs112310158 was associated with the expression of miR-449a and its target gene. **Conclusion** A genetic variant at miR-449a may play an important role in the development of gastric cancer.

Keywords: gastric cancer; miR-449a; polymorphisms

胃癌 (gastric cancer, GC) 是全球最常见的恶性肿瘤之一, 其病死率也位居恶性肿瘤前列^[1]。研究表明 GC 的形成是一个复杂的、持久的多步骤和多因子参与的演进过程^[2]。流行病学显示环境因素、高盐摄入、饮酒和抽烟以及幽门螺杆菌感染都会增加 GC 的发病风险^[3]。但是并不是所有暴露于上述因素的人都会罹患 GC, 这表明宿主或遗传因素可能也在 GC 的发生中发挥着作用^[4]。

近年来, 大量研究探讨了单核苷酸多态性

(single nucleotide polymorphisms, SNPs) 与 GC 易感性的潜在联系^[5]。其中微小 RNA 相关单核苷酸多态性 (miRNA-related single nucleotide polymorphisms, miR-SNPs) 引发学者关注^[6,7]。miR-SNPs 是与 microRNA 靶基因结合位点、microRNA 基因或 microRNA 加工基因相关的一类功能型 SNP 的总称。microRNA 是一种进化保守的非编码小片段 RNA, 长度约为 22 个核苷酸, 通过与靶基因 mRNA 的碱基互补配对来影响 mRNA 的

* 作者简介: 张艳梅 (1974—), 女, 本科, 主管检验师, 专业: 分子生物技术。

稳定性或抑制其翻译,实现对蛋白表达的调控^[8~10]。有报告称 miR-SNPs 或 miRNA 基因多态性可能与 miRNAs 功能表达和 GC 易感性相关^[11,12]。然而至今为止,miR-SNPs 与 GC 易感性的研究尚比较少。本研究中我们选取 GC 患者资料来探讨 miR-449a rs112310 基因多态性与 GC 易感性的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象 血液样本来自于 2012~2014 年在榆林市第二医院和泰兴市人民医院普外科接受手术治疗的 GC 患者 448 例,同时收集 452 例健康志愿者的血液样本作为对照组。经统计学分析,GC 患者与健康对照组在年龄、性别之间差异无统计学意义(P 均 >0.05)。本研究由榆林市第二医院和泰兴市人民医院伦理委员会监督和批准,并得到所有参与研究人员的书面同意。

1.2 试剂和仪器 基因组提取试剂盒为 QIAamp[®] Blood Mini Kit,购自 Qiagen 公司。RNA 提取试剂购自 Invitrogen 公司。PCR 引物由上海生工生物公司合成。PCR 试剂购自大连宝生物公司。主要仪器 PCR 仪为 S-1000 和 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪,伯乐公司产品。

1.3 方法

1.3.1 采用聚合酶链反应(PCR)-直接测序法对 rs112310158 进行多态基因分型:按照说明书使用血液 DNA 提取试剂盒提取血液基因组 DNA, -20℃ 保存备用。利用引物(上游引物为 5'-AGTG-GCTTGCTTCATAGCAGAA-3';下游引物为 5'-GTGCTCTGGATACCTGTGTGT-3)扩增出长度为 178 bp 含有多态位点的目标片段。PCR 扩增反应体系为 25 μ l,其中包括 50 ng 基因组 DNA,0.2

μ l Taq DNA 聚合酶(Takara 公司),0.5 μ l dNTP,上下游引物各 0.5 μ l,2 μ l 10 \times Buffer 和无菌蒸馏水。PCR 反应程序包括:94℃ 预变性 3 min,然后 94℃ 变性 45 s,60℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 30 s,共 40 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min(CFX-96, Bio-Rad)。采用 BigDye 终止序列标准在 ABI PRISM 3730XL 测序仪(Applied Biosystems)对纯化产物进行测序。

1.3.2 miR-449a 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR):按照说明书采用 Trizol 试剂(Invitrogen)从人体组织中提取总 RNA。使用 TaqMan MicroRNA Assays(Applied Biosystems)对 miR-449a 进行定量分析。使用 BIO-RAD CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, Hercules)运行 PCR 程序。U6 作为内参对 miR-449a 进行相对定量。

1.3.3 免疫组化分析:免疫组化(IHC)按照之前的方法操作^[13]。

1.4 统计学分析 采用 SPSS12.0 进行数据处理和分析。所有样本值可表达为均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)。用卡方检验比较不同基因型与等位基因在病例组与对照组之间频率分布的差异。多元回归模型计算比值比(odds ratios, ORs)和 95% 可信区间(confidence intervals, CI)来评价 rs112310158 多态性与 GC 易感性之间的关系。以 P 值 ≤ 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 病例组与对照组的临床资料 相对于对照组,GC 病例组在吸烟者、饮酒者、有肿瘤家族史者、幽门螺杆菌感染率较高者的差异具有统计学意义(P 均 <0.05)。

表 1 病例组和对照组临床资料[n(%)]

组 别		病例组(n=448)	对照组(n=452)	OR(95%CI)	P
年龄(男)	<55	179(40.0)	190(42.0)	1.090(0.835~1.422)	0.542
	≥ 55	269(60.0)	262(58.0)		
性别	女	148(33.0)	159(35.2)	1.100(0.835~1.449)	0.527
	男	300(67.0)	293(64.8)		
肿瘤家族史	否	428(95.5)	447(98.9)	4.178(1.554~11.231)	0.002
	是	20(4.5)	5(1.1)		
饮酒	否	202(45.1)	276(61.1)	1.910(1.465~2.490)	0.000
	是	246(54.9)	176(38.9)		
吸烟	否	260(58.0)	294(65.0)	1.345(1.028~1.761)	0.034
	是	188(42.0)	158(35.0)		
幽门螺杆菌	阴性	207(46.2)	249(55.1)	1.428(1.098~1.857)	0.009
	阳性	241(53.8)	203(44.9)		
病理类型	鳞癌	382(85.3)			
	腺癌	36(8.0)			
	腺鳞癌	30(6.7)			

2.2 miR-449a rs112310158 基因型分布与 GC 易感性之间的关系 见表 2。对照组 miR-449a rs112310158 多态位点基因分型呈以下分布: 72.6%CC, 24.5%CG 和 9.2% GG。 χ^2 检验分析

显示 miR-449a rs112310158 多态位点基因型分布遵循哈迪温伯格 (Hardy-Weinberg) 定律 ($\chi^2 = 0.069, P=0.792$), 表明本对照组健康志愿者能够代表普通人群的基因型分布。

表 2 GC 病例组和对照组 miR-449a rs112310158 多态位点基因型分布频率与 GC 易感性之间的关系 [$n(\%)$]

基因型	病例组 ($n=448$)	对照组 ($n=452$)	OR(95%CI)	P 值
rs112310158 AA	288(64.3)	307(67.9)		
AG	129(28.8)	132(29.2)	1.042(0.779~1.394)	0.824
GG	31(6.9)	13(2.9)	2.542(1.304~4.954)	0.005
等位基因 A	705(78.7)	746(82.5)		
G	191(21.3)	158(17.5)	1.279 (1.012~1.617)	0.043

非条件 Logistic 回归分析显示: 相对于 AA 基因型(野生型), GG 基因型(变异型)可增加个体罹患 GC 的风险 ($OR = 2.542, 95\% CI = 1.304 \sim 4.954, P=0.005$)。而 AG 基因型在 GC 发生风险上差异无统计学意义。具体地说, 相较于 A 等位基因, 携带 G 等位基因的个体罹患胃癌的风险降

低 ($OR = 1.279, 95\% CI = 1.012 \sim 1.617, P = 0.043$)。此外, 根据年龄进行分层分析表明, G 等位基因增加个体罹患 GC 风险的趋势在年龄 >55 岁的人群中更为明显 ($OR=3.461, 95\% CI=1.447 \sim 8.276, P=0.004$), 见表 3。

表 3 55 岁以上 miR-449a rs112310158 多态位点基因型分布频率与 GC 易感性之间的关系 [$n(\%)$]

基因型	病例组 ($n=269$)	对照组 ($n=262$)	OR(95%CI)	P 值
rs112310158 AA	169(62.8)	178(67.9)		
AG	77(28.6)	77(29.4)	1.053(0.721~1.540)	0.847
GG	23(8.6)	7(2.7)	3.461(1.447~8.276)	0.004
等位基因 A	415(77.1)	433(82.6)		
G	123(22.9)	91(17.4)	1.410(1.042~1.909)	0.027

2.3 miR-449a rs112310158 多态性与幽门螺杆菌易感性的关系 见表 4。非条件 Logistic 回归分析显示, 相比 AA 基因型, GG 基因型可降低发生幽门螺杆菌感染的风险 ($OR = 2.683, 95\% CI =$

$1.376 \sim 5.229$); 相对 A 等位基因, 携带 G 等位基因使发生幽门螺杆菌感染的风险降低 ($OR = 1.385, 95\% CI: 1.095 \sim 1.752, P$ 均 <0.05)。

表 4 miR-449a rs112310158 多态性与感染幽门螺杆菌风险的关系

	幽门螺杆菌阳性	幽门螺杆菌阴性	OR(95%CI)	P 值
rs112310158 AA	280	315		
AG	133	128	1.169(0.874~1.564)	0.653
GG	31	13	2.683(1.376~5.229)	0.003
等位基因 A	693	758		
G	195	154	1.385(1.095~1.752)	0.007

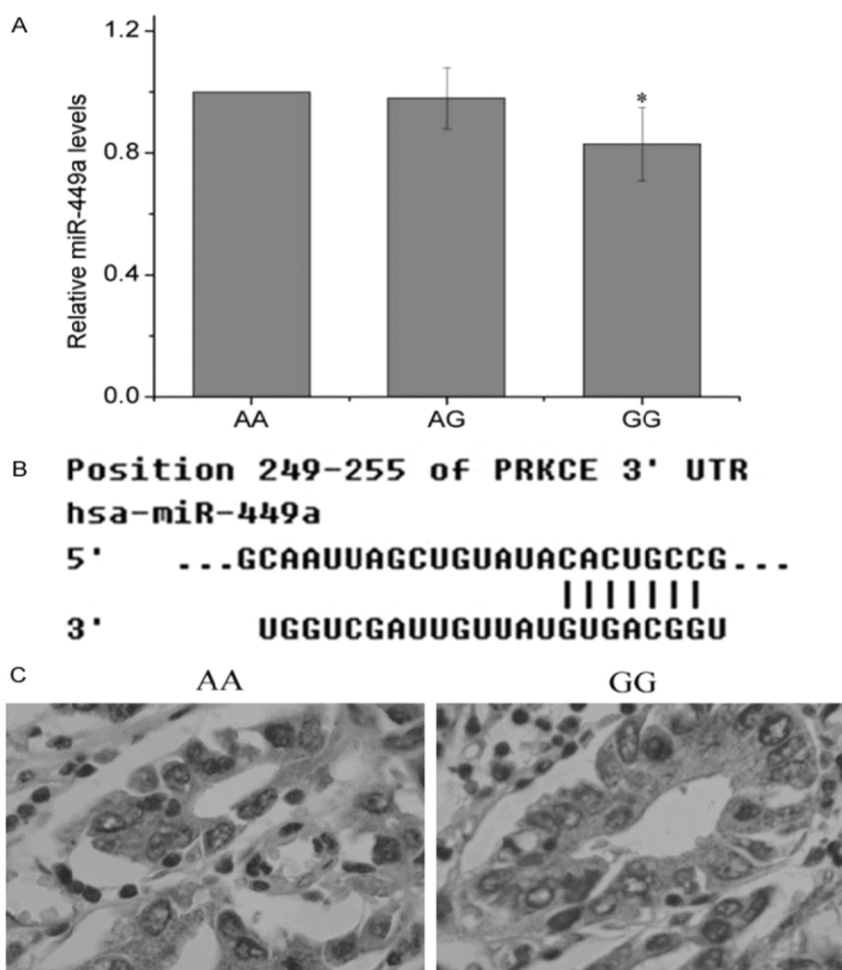
2.4 rs112310158 和 miR-449a 及其靶基因表达的相关性 采用荧光定量 PCR 检测方法, 从不同基因型的 GC 组织中检测 miR-449a 的表达。我们发现 GG 型患者比 AA 型患者 miR-449a 表达水平下降(图 1A) (0.98 ± 0.12 vs $0.81 \pm 0.11, P=0.023$)。此外, 利用公共数据库 TargetScan (<http://www.targetscan.org>) 寻找 miR-449a 的靶基因, 进一步研究选定 miR-449a 与蛋白激酶 C epsilon (protein kinase C epsilon, PRKCE) 的高度保守结合位点(图 1B)。我们进一步评估不同基因型患者 PRKCE 表达的临床意义。免疫组织化学染色(图 1C)表明, 与 AA 基因型相比, PRKCE 在 GG

基因型 GC 患者中有更高的表达。

3 讨论 miR-449a 作为一种抑癌基因, 与多种肿瘤密切相关, 包括肺癌、肝癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、胸腺癌、膀胱癌^[14~21]。一般情况下 miR-449a 在睾丸、肺、气管组织中高表达^[22], 在包括 GC 在内的多种癌症中表达下调。Li 等^[23]报道了 miR-449a 在 GC 细胞和 GC 组织中表达下调。他们发现 miR-449a/E2F3 调节机制在 GC 细胞增殖和凋亡中起到重要作用。类似地, Hu 等^[24]认为 miR-449a 在 SGC7901GC 细胞中通过调节 cyclin D1 和 BCL2 的表达调控调节细胞周期和细胞凋亡。但是 miR-449a 在 GC 中的确切作用仍是悬而未决的

问题。本研究中我们发现在中国人群中 miR-449a 的 rs112310158 基因多态性与 GC 易感性有关。相较 AA 基因型, GG 基因型增加了 GC 的发生风

险 (OR = 2.542, 95% CI: 1.304 ~ 4.954, P = 0.005)。



A:通过 QRT-PCR 检测 miR-449a 的表达。B:利用公共数据库 TargetScan(<http://www.targetscan.org>)寻找 miR-449a 的靶基因。C:用免疫组织化学染色方法检测 PRKCE 的表达。* P<0.05。

图1 rs112310158 与 miR-449a 表达相关性以及 miR-449a 的靶基因

激酶是信号传导的中心调控物质,其中蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)构成了 2% 的人类激酶家族^[25]。PKC 是一种多功能丝氨酸/苏氨酸激酶,根据结构特异性和对第二信使的反应 PKC 被划分为传统型、特异型、非典型三种类型^[26]。自从发现佛波酯(phorbol ester)通过激活 PKC,进而促进致癌物质诱导肿瘤形成。PKCs 如何在癌症中发挥作用逐渐成为研究热点^[27,28]。其参与细胞存活、增殖、凋亡、迁移和侵袭等多种生理过程^[29]。PKC ϵ 作为第一个被发现具有致癌功能的 PKC 同工酶,在很多种肿瘤中高表达。它与癌症的不同进程相关,如细胞转化、细胞存活、细胞增殖、上皮间充质转化、细胞骨架重组、细胞外基质(ECM)基因重排、细胞间崩解、细胞运动干细胞特性、耐药性^[30]。我们发现 PRKCE 与 miR-449a 有一段高

度保守的结合位点,可能是 miR-449a 的直接靶基因。我们发现 GG 型个体比 AA 型个体 miR-449a 表达水平显著降低,进一步发现 GG 型患者 PRKCE 的表达比 AA 患者高。这些发现证实了 miR-449a rs112310158 等位基因可能通过调控 PRKCE 的表达影响 GC 发生。

本研究中我们探讨了 miR-449a rs112310158 基因多态性与 GC 易感性的关系,研究结果显示:与 AA 型相比, GG 基因型与 GC 发生危险关系更为紧密。我们进一步发现 miR-449a rs112310158 基因多态性与 miR-449a 的表达和其靶基因(PRKCE)相关。最终,我们的研究结果表明 miR-449a rs112310158 多态位点是 GC 的一种基因易感因素,但这还需要良好设计的大样本临床试验进一步来验证。

参考文献:

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of world-wide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893-2917.
- [2] Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention[J]. *Cancer Res*, 1992, 52(24):6735-6740.
- [3] Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors[J]. *J Clin Epidemiol*, 2003, 56(1):1-9.
- [4] Milne AN, Carneiro F, O'Morain C, et al. Nature meets nurture; molecular genetics of gastric cancer[J]. *Hum Genet*, 2009, 126(5):615-628.
- [5] Condorelli G, Latronico MV, Cavarretta E. microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(21):2177-2187.
- [6] Link A, Kupcinskas J, Wex T, et al. Macro-role of microRNA in gastric cancer[J]. *Dig Dis*, 2012, 30(3):255-267.
- [7] Pan HW, Li SC, Tsai KW. MicroRNA dysregulation in gastric cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(7):1273-1284.
- [8] Bartel DP. MicroRNAs; genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-297.
- [9] Bartel DP. MicroRNAs; target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2):215-233.
- [10] Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs; Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions[J]. *Mol Cell Pharmacol*, 2011, 3(3):83-92.
- [11] Ni Q, Ji A, Yin J, et al. Effects of two common polymorphisms rs2910164 in miR-146a and rs11614913 in miR-196a2 on gastric cancer susceptibility[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2015(2015):764163.
- [12] Hua HB, Yan TT, Sun QM. miRNA polymorphisms and risk of gastric cancer in Asian population[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(19):5700-5707.
- [13] Chen WH, Xin PL, Pan QX, et al. ERCC1 single nucleotide polymorphism C8092A, but not its expression is associated with survival of esophageal squamous cell carcinoma patients from Fujian province, China[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e106600.
- [14] Jeon HS, Lee SY, Lee EJ, et al. Combining microRNA-449a/b with a HDAC inhibitor has a synergistic effect on growth arrest in lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2012, 76(2):171-176.
- [15] Buurman R, Gurlevik E, Schaffer V, et al. Histone deacetylases activate hepatocyte growth factor signaling by repressing microRNA-449 in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(3):811-820, e1-15.
- [16] Bou Kheir T, Futoma-Kazmierczak E, Jacobsen A, et al. miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2011(10):29.
- [17] Noonan EJ, Place RF, Pookot D, et al. miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2009, 28(14):1714-1724.
- [18] Noonan EJ, Place RF, Basak S, et al. miR-449a causes Rb-dependent cell cycle arrest and senescence in prostate cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2010, 1(5):349-358.
- [19] 张旗, 何湘君, 马丽萍, 等. p53 通路微小 RNA 在卵巢癌细胞和浆液性卵巢癌组织中的表达及意义[J]. *中华肿瘤杂志*, 2011, 33(12):885-890.
- [19] Zhang Q, He XJ, Ma LP, et al. Expression and significance of microRNAs in the p53 pathway in ovarian cancer cells and serous ovarian cancer tissues[J]. *Chin J Oncol*, 2011, 33(12):885-890.
- [20] Yang X, Feng M, Jiang X, et al. miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(20):2388-2393.
- [21] Chen H, Lin YW, Mao YQ, et al. MicroRNA-449a acts as a tumor suppressor in human bladder cancer through the regulation of pocket proteins[J]. *Cancer Lett*, 2012, 320(1):40-47.
- [22] Lize M, Pilarski S, Döbelstein M. E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(3):452-458.
- [23] Li X, Li H, Zhang R, et al. MicroRNA-449a inhibits proliferation and induces apoptosis by directly repressing E2F3 in gastric cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(5):2033-2042.
- [24] Hu J, Fang Y, Cao Y, et al. MiR-449a regulates proliferation and chemosensitivity to cisplatin by targeting cyclin D1 and BCL2 in SGC7901 cells[J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(2):336-345.
- [25] Cameron AJ, Escribano C, Saurin AT, et al. PKC maturation is promoted by nucleotide pocket occupation in dependently of intrinsic kinase activity[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(6):624-630.
- [26] Jain K, Basu A. The multifunctional protein kinase C-epsilon in cancer development and progression[J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 6(2):860-878.
- [27] Basu A. The potential of protein kinase C as a target for anticancer treatment[J]. *Pharmacol Ther*, 1993, 59(3):257-280.
- [28] 徐焰, 赵芳, 柯涛, 等. 铅暴露对大鼠体内离子浓度及相关 PKC 信号通路分子的影响[J]. *现代检验医学杂志*, 2012, 27(5):6-9.
- [28] Xu Y, Zhao F, Ke T, et al. Impact of lead exposure on the level of ion concentration and PKC signaling pathway molecules in rats[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2012, 27(5):6-9.
- [29] Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function[J]. *Physiol Rev*, 2008, 88(4):1341-1378.
- [30] Gorin MA, Pan Q. Protein kinase C epsilon; an oncogene and emerging tumor biomarker[J]. *Mol Cancer*, 2009(8):9.