

Let-7 家族启动子区多态性与胃癌的关联研究

张 麒, 艾 良

(云南省肿瘤医院腹部外科, 云南昆明 650118)

摘要:目的 探讨 let-7i 启动子区 rs10877887 和 let-7a-1/let-7f-1/let-7d 簇启动子区 rs13293512 多态性与胃癌发生的关系。方法 采用 TaqMan 探针法检测 172 例胃癌患者和 224 例健康对照中 rs10877887 和 rs13293512 的分布频率, 运用 χ^2 检验分析其与胃癌的相关性。结果 胃癌患者中 rs10877887 CC、CT/CC 基因型和 C 等位基因频率明显高于健康对照组(20.9% vs. 13.4%, 63.4% vs. 53.1%, 42.2% vs. 33.3%), 调整优势比(OR)分别为 1.98、1.53 和 1.46($P=0.02$ 、 0.04 和 0.01)。rs13293512 位点在胃癌组和健康对照组中的分布差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 let-7i 启动子区 rs10877887 多态性与中国汉族人群胃癌的发病有关。

关键词:微小 RNA; Let-7; 启动子; 单核苷酸多态性; 胃癌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.12.019 **中图法分类号:**R737

文章编号:1673-4130(2019)12-1489-04 **文献标识码:**A

Association between polymorphisms in the promoter region of let-7 family and risk of gastric cancer

ZHANG Qi, AI Liang

(Department of Abdominal Surgery, Yunnan Cancer Hospital, Kunming, Yunnan 650118, China)

Abstract: Objective To explore the association of rs10877887 in the promoter of let-7i and rs13293512 in the promoter of let-7a-1/let-7f-1/let-7d cluster with the risk of gastric cancer. **Methods** The rs10877887 and rs13293512 polymorphisms were genotyped in 172 patients with gastric cancer and 224 healthy controls using a TaqMan assay, and the association between the two polymorphisms and risk of gastric cancer was analyzed using chi-square test. **Results** The frequencies of rs10877887 CC, CT/CC genotypes and C allele in patients with gastric cancer were significantly higher than those in healthy controls (20.9% vs. 13.4%; 63.4% vs. 53.1%; and 42.2% vs. 33.3%), with adjusted odds ratio (OR) of 1.98, 1.53, and 1.46, respectively ($P=0.02$, 0.04 , 0.01). However, no significant difference of the distribution of rs13293512 was observed between patients with gastric cancer and healthy controls ($P>0.05$). **Conclusion** The rs10877887 in the promoter of let-7i is associated with the risk of gastric cancer in the Chinese Han population.

Key words: microRNA; Let-7; promoter; single nucleotide polymorphism; gastric cancer

微小 RNA(miRNA)来源于基因组 DNA, 经过多步加工, 由初始体 miRNA 发展到前体 miRNA, 再发展到成熟体 miRNA。虽然不编码蛋白质, 但是可与靶基因 3'-非翻译区结合发挥重要的调控功能。Let-7, 最早发现的 miRNA 之一, 包括 10 个家族成员, 多以簇的形式存在, 参与肿瘤的演变^[1-2]。胃癌组织中, let-7 多个家族成员低表达, 具有类似于抑癌基因的作用, 例如 let-7a、let-7f 和 let-7i 等^[1,3-4]。最近, 有研究报告, 位于 let-7 家族成员启动子区的 2 个多核苷酸多态性(SNP)rs10877887 和 rs13293512 不同等位基因可能与转录因子的亲和力不同, 引起 let-7 的异常表达和个体对肿瘤的易感性不同, 包括肝癌^[5-7]、甲状

腺乳头状癌^[8]、肺癌^[9]和宫颈癌^[10]。本研究探讨 rs10877887 和 rs13293512 与中国汉族人群胃癌的相关性, 旨在筛选胃癌新的易感基因, 为胃癌的精准治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院腹部外科住院的经组织病理学证实为胃癌的 172 例患者作为病例组, 另选取同期到本院参加临床试验的健康者 224 例作为对照组。胃癌诊断采用美国癌症联合研究会 2010(第七版)分期标准。病例组和对照组纳入标准: 同意参加本研究并愿意提供血液样本者。病例组排除标准: 有肿瘤家族史、胃癌复发或其他部位原发癌转移至胃者。对

作者简介:张麒,男,副主任医师,主要从事胃癌方面的研究。

本文引用格式:张麒,艾良. Let-7 家族启动子区多态性与胃癌的关联研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(12):1489-1492.

对照组排除标准:有肿瘤家族史和急慢性胃炎者。本研究经医院伦理委员会批准,所有入选对象均签署知情同意书。所有病例和对照临床资料通过查阅医院病历资料获得,查阅资料包括:性别、年龄、民族、家族史、居住地、肿瘤临床特征(分期、分化程度和淋巴结转移状态)。病例组中,男 117 例,女 55 例,平均(58.7±12.5)岁;临床 I~II 期和 III~IV 期患者分别为 82 例和 90 例;高中分化和低分化癌分别为 124 例和 48 例;有无淋巴结转移各 67 例和 105 例。所有患者均未经放化疗和抗癌药物治疗。对照组中,男 157 例,女 67 例,平均(57.7±9.9)岁。两组受试者来源于云南汉族人群,在性别、年龄、种族和居住地等方面匹配,彼此之间无血缘关系。

1.2 样本采集和 DNA 提取 采集入选研究对象空腹外周静脉血 2~3 mL,乙二胺四乙酸二钠抗凝,-20 °C 保存备用。按照全基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技公司,北京)操作说明提取基因组 DNA,运用 NanoDrop 分光光度计检测 DNA 纯度和浓度。DNA 纯度在 1.7~1.9 并且浓度大于 20 ng/μL 的样本符合要求,不符合要求者,重新提取 DNA。

1.3 Let-7 启动子区 rs10877887 和 rs13293512 多态性检测 采用 TaqMan 对 rs10877887 和 rs13293512 进行分型。根据文献[6]合成引物和探针,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列为:rs10877887 上游:5'-CCC ATT TCC TGC TTT CGA G-3',下游:5'-GCG TTC TGT ACG TCA GCC AC-3'; rs13293512 上游:5'-GCA GGG AAG ACA GTG AAT GTT AAA-3',下游:5'-CCA AGA AAG CAG TAT TAT CAA TGA AGT T-3'。探针序列为:rs10877887 探针:FAM-CGG CTC TCC CCG CAG GAC-TAMRA, HEX-AGC GGC TCT CTC CGC AGG AC-TAMRA。rs13293512 探针:FAM-CTG GTT GAG TTT TGC T-MGB, HEX-CTG GTT GAG TTT CGC TT-MGB。反应体系(10 μL)如下:基因组 DNA 20 ng,2×反应混合物 5.0 μL,引物和探针各 0.25 μL,无菌去离子水补足 10 μL。扩增产物经测序验证正确后进行定量 PCR 反应。ABI 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪上设定如下扩增程序:95 °C 10 min;95 °C 15 s,60 °C 60 s,45 个循环。反应结束后,分析记录数据,统计分析结果。双盲法判读结果如下:rs10877887CC 和 rs13293512TT 为蓝色荧光;rs10877887TT 和 rs13293512CC 为绿色荧光;rs10877887CT 和 rs13293512CT 均为青色荧光。SNP 分型结果经 Sanger 测序验证,2 种方法结果完全一致。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件包处理数据。定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异比较采用 *t* 检

验;定性资料采用例数(百分数)表示,差异比较采用 χ^2 检验。遗传吻合度检验分析基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。rs10877887 和 rs13293512 基因型和等位基因频率比较采用 χ^2 检验,与胃癌的风险度采用优势比(OR)和 95%置信区间(CI)评价。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 Hardy-Weinberg 遗传平衡吻合度检验 Hardy-Weinberg 遗传平衡吻合度检验见表 1。rs10877887 位点:病例组和对照组观察值和期望值吻合度较好, χ^2 值分别为 2.47 和 2.89, P 值分别为 0.12 和 0.09;rs13293512 位点:病例组和对照组观察值和期望值吻合度良好, χ^2 值分别为 0.80 和 0.08, P 值分别为 0.37 和 0.77,表明两位点均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,具有群体代表性。

表 1 病例组和对照组 rs10877887 和 rs13293512 基因型分布遗传平衡吻合度检验

多态性	对照组				病例组			
	观察值	期望值	χ^2	<i>P</i>	观察值	期望值	χ^2	<i>P</i>
rs10877887								
TT	105	100	2.47	0.12	63	58	2.89	0.09
CT	89	99			73	84		
CC	30	25			36	30		
rs13293512								
TT	80	83	0.80	0.37	58	60	0.08	0.77
CT	113	107			85	83		
CC	31	34			28	29		

2.2 rs10877887 和 rs13293512 多态性与胃癌发病风险的关系 rs10877887 和 rs13293512 多态性测序图见图 1、2。两位点多态性与胃癌发病风险的关系见表 2。rs10877887 CC 基因型携带者胃癌的发病风险较 TT 基因型携带者增加了 1.98 倍(95%CI:1.11~3.54, $P=0.02$);在显性遗传模型中,CT/CC 基因型携带者胃癌的发病风险较 TT 基因型携带者增加了 1.53 倍(95%CI:1.02~2.29, $P=0.04$)。rs10877887 C 等位基因携带者胃癌的发病风险较 T 等位基因携带者增加了 1.46 倍(95%CI:1.09~1.95, $P=0.01$)。

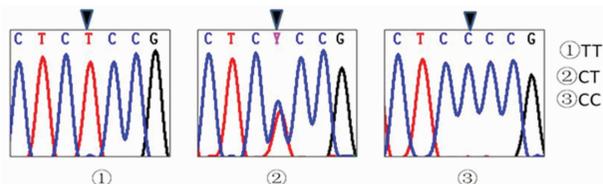


图 1 rs10877887 多态性测序图

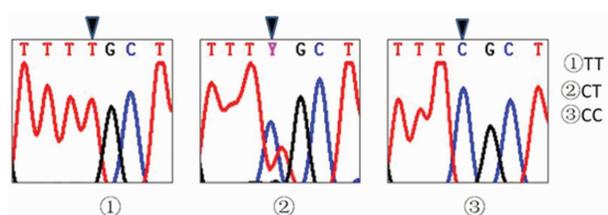


图 2 rs13293512 多态性测序图

表 2 Let-7 启动子区 rs10877887 和 rs13293512 多态性与胃癌风险的关系

多态性	对照组 [n(%)]	病例组 [n(%)]	调整 OR(95%CI)	调整 P 值
rs10877887				
TT	105(46.9)	63(36.6)	Reference	
CT	89(39.7)	73(42.4)	1.37(0.88~2.12)	0.16
CC	30(13.4)	36(20.9)	1.98(1.11~3.54)	0.02
显性模型				
TT	105(46.9)	63(36.6)	Reference	
CT/CC	119(53.1)	109(63.4)	1.53(1.02~2.29)	0.04
隐性模型				
TT/CT	194(86.6)	136(79.1)	Reference	
CC	30(13.4)	36(20.9)	1.71(1.00~2.91)	0.05
等位基因				
T	299(66.7)	199(57.8)	Reference	
C	149(33.3)	145(42.2)	1.46(1.09~1.95)	0.01
rs13293512				
TT	80(35.7)	59(34.3)	Reference	
CT	113(50.5)	85(49.4)	1.02(0.65~1.58)	0.94
CC	31(13.8)	28(16.3)	1.20(0.65~2.22)	0.57
显性模型				
TT	80(35.7)	59(34.3)	Reference	
CT/CC	144(64.3)	113(65.7)	1.06(0.70~1.61)	0.78
隐性模型				
TT/CT	193(86.2)	144(83.7)	Reference	
CC	31(13.8)	28(16.3)	1.21(0.69~2.10)	0.51
等位基因				
T	273(60.9)	203(59.0)	Reference	
C	175(39.1)	141(41.0)	1.08(0.81~1.44)	0.60

3 讨 论

MiRNA 虽然不编码蛋白,但是作为重要的调节因子调控靶基因表达参与多种疾病的病理生理学过程;不仅与肿瘤发生、发展和侵袭转移密切相关,而且有望作为肿瘤诊断、治疗和预后判断新的标记物^[11-13]。以往研究显示,miRNA 启动子区遗传变异可影响其表达进而影响肿瘤的易感性^[14-16]。Let-7 作为最早发现的一个 miRNA,在肿瘤中的抑癌作用已

经得到证实,然而,并非所有 let-7 低表达的个体肿瘤的风险均较低,提示不同个体存在遗传差异。2011 年,黄芳等^[6]报道了位于 let-7 启动子区的 2 个功能性多态位点 rs10877887 和 rs13293512:前者位于 let-7i 上游-286 bp 处,后者位于 let-7a-1/let-7f-1/let-7d 基因簇上游-8 496 bp 处。2 个多态性位点不同等位基因与转录因子骨髓锌脂 1 和干扰素调节因子 1 的亲合力不同,可能影响 let-7 的表达并影响个体对肿瘤的易感性差异^[5-6]。关于这 2 个功能性 SNPs 与胃癌风险的研究鲜有报道。本研究调查了 rs10877887 和 rs13293512 与胃癌的相关性,发现 rs10877887 CC 基因型和 C 等位基因增加了胃癌的发病风险,调整 OR 值分别为 1.98 和 1.46。

本研究结果与肝癌、肺癌和宫颈癌中观察到的结果一致。携带 rs10877887 C 等位基因的肝癌患者较 T 等位基因携带者生存期明显缩短,相对风险 1.22^[5-6]。rs10877887 CT/CC 基因型携带者较 TT 基因型携带者肺癌的风险增加了 103.2%,尤其 60 岁以上的人群,风险增加了 585.7%^[9]。rs10877887 CC 基因型携带者宫颈鳞状细胞癌的风险增加了 111%,并且 let-7i 表达量明显降低^[10]。与本研究结果不同的是,rs10877887 CT 基因型携带者在杂合子、显性遗传模型和超显性遗传模型对比中均降低了甲状腺乳头状癌的风险,相对风险度分别为 0.73、0.79 和 0.73;亚组分析显示 rs10877887 CC 基因型携带者更易出现多发性甲状腺乳头状癌;rs13293512 CT/CC 或者 CC 基因型携带者更不易发生淋巴结转移^[8]。许桂平等^[17]运用 meta 分析评价了 rs10877887 与癌症的相关性,纳入肝癌、头颈癌、口腔癌和甲状腺癌,发现 CT/CC 基因型降低了癌症的风险。导致以上结果不一致的可能原因是:(1)肿瘤类型不同,易感基因不同;(2)基因-基因和基因-环境交互作用的影响。

研究证实,胃癌中 let-7 多个家族成员(包括 let-7a、7f 和 7i 等)呈低表达,靶向丙酮酸激酶 M2 型(PKM2)和肌球蛋白重链 9(MYH9)抑制胃癌细胞增殖、侵袭和迁移^[1,3-4]。PKM2 的过表达与胃癌淋巴结转移、临床分期和不良预后有关,通过介导 PI3K/AKT 活化促进细胞迁移并抑制自噬,导致胃癌的恶性演变^[18-19]。MYH9 通过环状 RNA-miRNA-mRNA 的相互作用参与胃癌的发生、发展,沉默 MYH9 的表达可使胃癌细胞早期凋亡增加,细胞周期受阻于 G2/M 期^[20-21]。由于 rs10877887 和 rs13293512 不同等位基因与转录因子骨髓锌脂 1 和干扰素调节因子 1 的结合力不同,引起 let-7 的异常表达和个体对多种肿瘤的易感性不同^[5-6],由此认为 let-7 启动子 SNP-let-7 表达 PKM2/MYH9 轴可能是胃癌发病的一条重要途

径。基于以上背景,本研究观察到的 rs10877887 增加胃癌风险的可能机制是:位于 let-7i 启动子区的 rs10877887C 等位基因降低了具有抑癌作用的 let-7i 的表达量,对 PKM2 和/或 MYH9 的抑制作用减弱,致使胃癌的患病风险增加。准确机制有待进一步研究。

4 结 论

本研究发现 let-7i 启动子区的 rs10877887CC 基因型增加了中国汉族人群胃癌的发病风险,提示其为胃癌的易感基因之一。深入开展分子机制研究有助于全面了解 rs10877887 在胃癌中的作用。

参考文献

- [1] LIANG S, HE L, ZHAO X, et al. MicroRNA let-7f inhibits tumor invasion and metastasis by targeting MYH9 in human gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18409.
- [2] WANG Z, LIN S, ZHANG J, et al. Loss of MYC and E-box3 binding contributes to defective MYC-mediated transcriptional suppression of human MC-let-7a-1~let-7d in glioblastoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(35): 56266-56278.
- [3] TANG R, YANG C, MA X, et al. MiR-let-7a inhibits cell proliferation, migration, and invasion by down-regulating PKM2 in gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 5972-5984.
- [4] LIU K, QIAN T, TANG L, et al. Decreased expression of microRNA let-7i and its association with chemotherapeutic response in human gastric cancer [J]. *World J Surg Oncol*, 2012, 10(6): 225.
- [5] XIE K, LIU J, ZHU L, et al. A potentially functional polymorphism in the promoter region of let-7 family is associated with survival of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Epidemiol*, 2013, 37(6): 998-1002.
- [6] 黄芳, 胡铃敏, 刘继斌, 等. let-7 启动子区基因多态性与肝细胞肝癌遗传易感性的关联 [J]. *中华预防医学杂志*, 2011, 45(12): 1093-1098.
- [7] SUI Z Y, LI J, CHENG G L, et al. A single nucleotide polymorphism in the promoter region (rs10877887) of let-7 is associated with hepatocellular carcinoma in a Chinese population [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(2): 1-6.
- [8] WANG Y, WEI T, XIONG J, et al. Association Between Genetic Polymorphisms in the Promoter Regions of Let-7 and Risk of Papillary Thyroid Carcinoma: A Case-Control Study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(43): e1879.
- [9] SHEN L Q, XIE Y Z, QIAN X F, et al. A single nucleotide polymorphism in the promoter region of let-7 family is associated with lung cancer risk in Chinese [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 4505-4512.
- [10] LIU J, NI S. Association between genetic polymorphisms in the promoters of let-7 and risk of cervical squamous cell carcinoma [J]. *Gene*, 2018, 642(10): 256-260.
- [11] 刘雯, 沙银中, 李亚东, 等. 循环 microRNA 在常见肿瘤中的应用研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(16): 1950-1954.
- [12] 李巍, 信欣, 李旭. 肿瘤转移与 microRNA 的研究新进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(21): 3034-3036.
- [13] 张振, 潘晴. 血清游离 DNA、微小 RNA 在胃癌诊断中的研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(16): 2419-2421.
- [14] WANG S, LV C, JIN H, et al. A common genetic variation in the promoter of miR-107 is associated with gastric adenocarcinoma susceptibility and survival [J]. *Mutat Res*, 2014, 769(7): 35-41.
- [15] SUN R, LIANG Y, YUAN F, et al. Functional polymorphisms in the promoter region of miR-17-92 cluster are associated with a decreased risk of colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(47): 82531-82540.
- [16] YUAN F, SUN R, LI L, et al. A functional variant rs353292 in the flanking region of miR-143/145 contributes to the risk of colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(4): 30195.
- [17] 许桂平, 赵清, 王珂, 等. 中国人群 let-7 基因 rs10877887 多态性与癌症风险相关性的 Meta 分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(8): 1019-1022.
- [18] GAO Y, XU D, YU G, et al. Overexpression of metabolic markers HK1 and PKM2 contributes to lymphatic metastasis and adverse prognosis in Chinese gastric cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(8): 9264-9271.
- [19] WANG C, JIANG J, JI J, et al. PKM2 promotes cell migration and inhibits autophagy by mediating PI3K/AKT activation and contributes to the malignant development of gastric cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2886.
- [20] SUI W, SHI Z, XUE W, et al. Circular RNA and gene expression profiles in gastric cancer based on microarray chip technology [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(3): 1804-1814.
- [21] 朱显军, 邓海军, 叶耿泰, 等. TALEN 介导的 MYH9 基因沉默及对细胞周期与凋亡的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(3): 375-380.

(收稿日期:2018-12-08 修回日期:2019-02-22)