

· 论 著 ·

microRNA 相关基因 rs895819、rs6505162 和 rs2292832 的 SNP 变异与 B 细胞淋巴瘤患者生存关系的研究*

张 博, 陈洁平[△]

(第三军医大学西南医院血液病中心, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨 has-mir-27a 基因(rs895819)、pre-mir-423 区域(rs6505162)和 miR-149(rs2292832) miRNA 的编码基因区域单核苷酸多态性变异与 B 细胞淋巴瘤患者的生存关系。方法 收集 2008 年 10 月至 2010 年 3 月北京肿瘤医院 100 例 B 细胞淋巴瘤患者外周血样并提取 DNA。采用 PCR-RFLP 方法对 3 个基因 miRNA 的编码基因区域位点的单核苷酸多态性进行检测, 采用 log-rank 和 Cox 模型分析 3 个基因变异与 B 细胞淋巴瘤患者的生存关系。结果 rs2292832 位点中 CC 基因型占 6%, 病死率为 50.0%, CT 基因型占 53%, 病死率为 41.5%, TT 基因型占 39%, 病死率为 61.5%。log-rank 和 Cox 模型分析无统计学意义, $P > 0.05$ 。rs895819 位点中 AA 基因型占 50%, 病死率为 50.0%; AG 基因型占 41%, 病死率为 46.3%; TT 基因型占 9%, 病死率为 66.7%。log-rank 和 Cox 模型分析显示差异无统计学意义($P > 0.05$)。rs6505162 位点中 AA 基因型占 6%, 病死率为 66.7%; AC 基因型占 39%, 病死率为 51.3%; CC 基因型占 52%, 病死率为 48.1%。log-rank 和 Cox 模型分析显示差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 本研究未发现 has-mir-27a 基因(rs895819)、pre-mir-423 区域(rs6505162)和 miR-149(rs2292832)3 基因位点的变异与 B 细胞淋巴瘤患者的生存有关联。

关键词:淋巴瘤, B 细胞; 多态性, 单核苷酸; 基因型; 多态现象, 遗传; 生存分析

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.16.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)16-1801-03

MicroRNA genes rs895819, rs6505162 and rs2292832 SNP variation with B cell lymphoma patients survival relationship research*

Zhang Bo, Chen Jieping[△]

(Center for Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the gene rs895819, rs6505162 and rs2292832 miRNA coding genetic regions SNP variation with B cell lymphoma patients survival relationship. **Methods** We collected 100 cases of B cell lymphoma patients peripheral blood sample and extract DNA from October 2008 to March 2010. By PCR-RFLP methods three miRNA genes encoding gene regional sites of single nucleotide polymorphisms inspection, used log-rank and Cox model analysis three genes variation with B cell lymphoma patients survival relationship. **Results** Rs2292832 in CC genotype was accounts for 6%, the fatality rate was 50.0%, CT genotype is accounts for 53%, the fatality rate was 41.5%, TT genotype was accounts for 39%, the fatality rate was 61.5%. Log-rank and Cox model analysis no statistical significance($P > 0.05$). Rs895819 of AA genotype was accounts for 50%, the fatality rate was 50.0%, AG genotype was accounts for 41%, the fatality rate was 46.3%, TT genotype was accounts for 9%, the fatality rate was 66.7%. Log-rank and Cox model analysis no statistical significance($P > 0.05$). Rs6505162 of AA genotype was accounts for 6%, the fatality rate was 66.7%, AC genotype was occupied 39%, the fatality rate was 51.3%, CC genotype 52%, the fatality rate was 48.1%. Log-rank and Cox model analysis no statistical significance($P > 0.05$). **Conclusion** This study has not been found has-mir-27a (rs895819), pre-mir-423(rs6505162) and mir-149(rs2292832) variation with B cell lymphoma patients survival are linked.

Key words: lymphoma, B-cell; polymorphism, single nucleotide; genotype; polymorphism, genetic; survival

淋巴造血系统肿瘤中最常见的类型为 B 细胞淋巴瘤, 其分类繁多、复杂, 诊断困难, 复发率较高, 预后参差不齐。近年来, 其发病率逐年上升。非霍奇金淋巴瘤(NHL)按目前常规的治疗方案, 5 年无病生存率约 41%~80%, 但仍有 20%~59% 的患者常规治疗失败和复发, 挽救性治疗的效果较差^[1]。许多因素与 B 细胞淋巴瘤的预后相关, 其中 MicroRNAs(miRNA)在 B 细胞淋巴瘤预后中的作用是近年来人们关注的热点。

miRNA 是一类 21-24 核苷酸的非编码 RNA, 它在恶性肿瘤发生、发展中的作用倍受人们关注。研究表明, miRNA 的表达谱可以鉴定瘤组织和非瘤组织, 具有肿瘤特异性; miRNA 的

成熟受限与细胞的恶性转化相关; 单个 miRNA 功能异常与肿瘤的发生和预后密切相关^[2]。由于单个 miRNA 的变化可能对众多下游 mRNA 功能产生影响, 研究 miRNA 及其多态性有望成为一类新的肿瘤发生和预后的候选标志物。miRNA 通过和靶基因的 mRNA 碱基配对并引导沉默复合体(RISC)降解 mRNA 和阻碍其翻译^[3-4]。研究表明, 在一些 miRNA 的编码基因区域存在多态性位点, 这些位点可能会对 miRNA 表达或剪切、成熟过程产生影响, 进而影响其对靶基因的调控效应, 从而影响患者的预后及生存率。has-mir-27a 基因(rs895819)、Pre-mir-423 区域(rs6505162)和 miR-149(rs2292832)的 miRNA 的编码基因区域位点的单核苷酸多态性与胰腺癌、胃癌、

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(NSFC, 30971066, 81270605); 重庆市自然科学基金重点项目(CSTC, 2008BA5001); 重庆研究生教改项目(yjg123114); 第三军医大学重大临床和科学基金项目(2101XLC03)。作者简介: 张博(1986~), 硕士研究生在读, 主要从事白血病的基础和临床的研究。△ 通讯作者, Tel: (023)68765196; E-mail: chenjpxn@yahoo.com.cn。

小细胞癌、乳腺癌等多种肿瘤的预后相关^[5-7]。本研究通过检索 miRNA 多态性位点数据库,对 mir-27a(rs895819)、mir-423(rs6505162)和 mir-149(rs2292832)这 3 个位点的单核苷酸多态性与 B 细胞淋巴瘤生存关系进行分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究病例 100 例标本均来自北京肿瘤医院 2008 年 10 月至 2010 年 3 月经活组织病理检查证实明确诊断的新发 NHL。经形态及免疫组化 B 细胞亚型检查证实为 B 细胞型 NHL。患者来自北京市及其周边省区,均为中国大陆汉族人,可以代表华北地区患者人群。

1.2 随访 自确诊之日起,全部病例采用门诊复查或电话随访进行数据收集。随访截止日期为 2010 年 5 月 31 日,其中 4 例失访而不具有完整数据资料,随访率为 92.2%。失访病例以失访日期作为死亡日期。随访过程中,患者死于其他疾病或意外、未能随访到患者或其亲属、在随访截止日期尚生存的患者为截尾数据,统计学上按删失计算。

1.3 基因 DNA 提取 取静脉血 2 mL,EDTA 抗凝。应用北京康为世纪 DNA 提取试剂盒提取 DNA(按说明书操作)。

1.4 基因分型 PCR 扩增目的片段引物、目的片段及限制性内切酶见表 1。

1.5 PCR 反应 PCR 反应体系为 25 μ L,其中包含 ddH₂O 17.15 μ L,10 \times Buffer 2.5 μ L,MgCl₂ 2.5 μ L,dNTP 0.5 μ L,P₁ 0.3 μ L,P₂ 0.3 μ L,r Taq 酶 0.25 μ L,将各组依次加入至灭菌的 PCR 用 EP 管中,混匀,放入热循环仪中。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,然后 94 $^{\circ}$ C 30 s,rs895819:67 $^{\circ}$ C、rs2292832:62 $^{\circ}$ C、rs6505162:61 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 30 s。进行 35 个循环最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

1.6 RFLP 酶切反应 PCR 产物 8 μ L 与内切酶 0.25 μ L 酶切,在 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴箱温育 4 h,4 000 r/min 离心 1 min 后加入 3 μ L Loading-Buffer。酶切产物在 3% 琼脂糖凝胶上电泳分析,进行基因型分析。酶切体系为 10 μ L。包括 PCR 产物 8 μ L;限制性内切酶 0.25 μ L;用无菌蒸馏水补至 10 μ L。rs895819 上游引物:TGC TTG TGA GCA GGG TCC GC,下游引物:CAG CAG GAT GGC AGG CAG ACA G;内切酶 Hha I。rs2292832 上游引物:TGT CTT CAC TCC CGT GCT TGT CC,下游引物:TGA GGC CCG AAA CAC CCG TA;内切酶 Pvu II。rs6505162 上游引物:GGC CCC TCA GTC TTG CTT CGT A,下游引物:TTC TGC CAA GGA GAA CAA GGC C;内切酶 Rsa I。

1.7 统计学处理 采用 χ^2 检验对研究对象的基本资料进行分析;用 log-rank 和 Cox 模型对所得数据进行生存分析。用 SPSS16.0 统计软件分析数据,均为双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 随访结果 在 100 例研究对象中,其中,男 46 例,占 46%,随访期间内死亡 26 例,病死率为 56.5%;女 54 例,占 54%,随访期间内死亡 24 例,病死率为 44.4%。不同性间病死率比较差异无统计学意义($\chi^2 = 1.45, P = 0.229$);年龄分布上,35 岁及以下 63 例,占 63%,随访期间内死亡 35 例,病死率为 55.6%;35 岁以上 37 例,占 37%,随访期间内死亡 15 例,病死率为 40.5%。两组病死率比较差异无统计学意义($\chi^2 = 2.10, P = 0.147$)。

2.2 rs2292832 位点不同基因分型病死率比较 rs2292832 位点中 CC、CT、TT 基因型病例数与死亡病例数如表 1 所示,

log-rank 和 Cox 模型分析差异无统计学意义($P > 0.05$)。不同基因分型在不同时间的累积病死率,见图 1。

表 1 rs2292832 位点不同基因分型病死率比较

基因型	n	死亡 [n(%)]	Log-rank P	Cox P	HR(95%CI) ^a
CC	6	3(50.0)			1.00
CT	53	22(41.5)		0.214	0.50(0.17~1.49)
TT	39	24(61.5)	0.422	0.316	0.58(0.20~1.69)

^a:经性别和年龄校正。

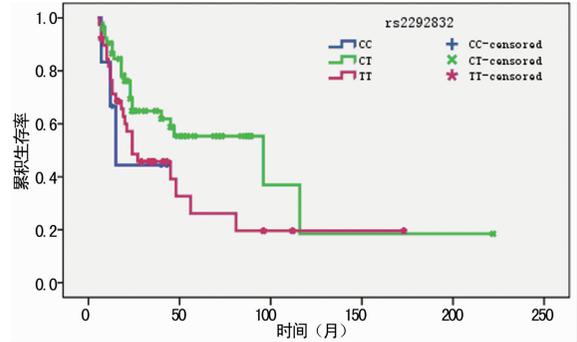


图 1 rs2292832 位点不同基因分型病死率比较

2.3 rs895819 位点不同基因分型病死率比较 rs895819 位点中 AA、AG、GG 基因型病例数与死亡病例数如表 2 所示, log-rank 和 Cox 模型分析差异无统计学意义($P > 0.05$)。不同基因分型在不同时间的累积病死率,见图 2。

表 2 rs895819 位点不同基因分型病死率比较

基因型	n	死亡 [n(%)]	Log-rank P	Cox P	HR(95%CI) ^a
AA	50	25(50.0)			1.00
AG	41	19(46.3)		0.704	0.89(0.47~1.66)
GG	9	6(66.7)	0.174	0.200	1.89(0.71~5.02)

^a:经性别和年龄校正。

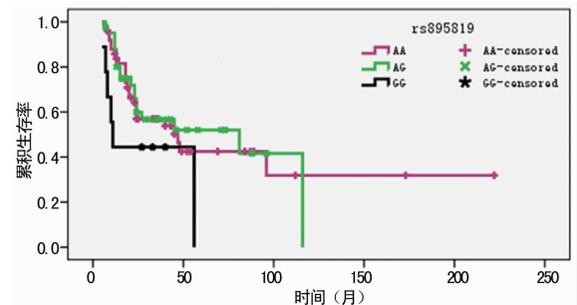


图 2 rs895819 位点不同基因分型病死率比较

表 3 rs6505162 位点不同基因分型病死率比较

基因型	n	死亡 [n(%)]	Log-rank P	Cox P	HR(95%CI) ^a
AA	6	4(66.7)			1.00
AC	39	20(51.3)		0.214	0.50(0.17~1.49)
CC	52	25(48.1)	0.501	0.316	0.58(0.20~1.69)

^a:经性别和年龄校正。

2.4 rs6505162 位点不同基因分型病死率比较 rs6505162 位点中 AA、AC、CC 基因型病例数与死亡病例数如表 3 所示,

log-rank 和 Cox 模型分析差异无统计学意义 ($P>0.05$)。不同基因型在不同时间的累积病死率,见图 3。

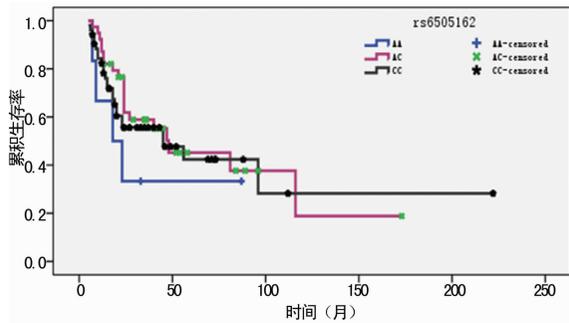


图 3 rs6505162 位点不同基因型病死率比较

3 讨论

成熟的 miRNA 是一类长为 19~22 nt 的非编码小 RNA, 其中每个 miRNA 可以调节数百个靶基因, 并参与调节多种生物学信号通路, 在细胞生长、分化、代谢、凋亡等一系列过程中发挥作用^[8]。已有大量文献报道肿瘤组织与正常组织的 miRNA 表达谱存在差异。在肿瘤细胞中, 大多数抑癌基因和癌基因都是从 DNA 转录成 miRNA, 然后翻译成蛋白质, 行使其生物学功能。miRNA 通过碱基不完全配对与靶 miRNA 的 3' UTR 结合, 导致翻译的抑制, 少数情况下引起 miRNA 降解^[9]。特定的 miRNA 可看做是癌基因或者抑癌基因^[10]。miR-149 通过调控 E2F1 和 Akt 的表达诱导肿瘤细胞的凋亡, 该研究证实 E2F1 和 Akt 为 miR-149 的靶基因^[11]。而 E2F1 和 Akt 在信号转导和细胞增殖、凋亡以及分化的调控过程中发挥重要的作用^[12-13]。miR-27a 作为致癌因子, 参与了肿瘤的发生、发展的过程, 其在胰腺癌及胃癌组织中高表达, 通过抑制 miR-27a 可以延缓胃癌和胰腺癌细胞的生长, Spry2 与 Prohibitin 是 miR-27a 的直接靶基因^[14]。miR423 其预测靶基因 PABPC1、FGFR2 在食管癌的发生、进展过程中发挥重要功能^[15]。有研究发现 miR-423 基因 C/A 多态和高加索人群食管癌易感性有关, 提示 miR-423 基因 C/A 多态能够降低食管癌风险。B 细胞淋巴瘤的预后判断的指标在国际有很多指标, 目前尚无 B 细胞淋巴瘤的预后的判断标准。本研究对人群对 mir-27a(rs895819)、mir-423(rs6505162) 和 mir-149(rs2292832) 这 3 个位点的单核苷酸多态性与 B 细胞淋巴瘤生存进行分析, 没有发现 has-mir-27a 基因 (rs895819)、pre-mir-423 区域 (rs6505162) 和 miR-149(rs2292832) 3 基因位点的变异与 B 细胞淋巴瘤患者的生存有关联。由于 B 细胞淋巴瘤分类多及预后存在差异, 加之本研究选取的 SNP 个数和标本的数量都相对偏少, 得到的研究结果有待进一步证实。下一步需要针对 B 细胞淋巴瘤的不同类型增加病例数量, 进一步进行相关基因 miRNA 相关基因的 SNP 分析, 同时进行 miRNA 相关 SNP 的功能学研究, 以更好地指导 B 细胞淋巴瘤的临床实践。

参考文献:

[1] Coloma PA, Bocardo FG, Teba PF, et al. Endoscopic treatment of a giant fibroepithelial polyp of the ureter [J]. Arch Esp Urol, 2010, 63(4): 305-308.

[2] Calin GA, Sevignani C, Dan Dumitru C, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101(19): 2999-3004.

[3] Du T, Zamore PD. MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA [J]. Development (Cambridge) England J, 2005, 132(21): 4645-4652.

[4] Lee Y, Jeon K, Lee JT, et al. MicroRNA maturation: step-wise processing and subcellular localization [J]. The EMIR J, 2002, 21(17): 4663-4670.

[5] Ma Y, Yu S, Zhao W, et al. MiR-27a regulates the growth, colony formation and migration of pancreatic cancer cells by targeting Sprouty2 [J]. Cancer Letters, 2005, 29(2): 150-158.

[6] Yoon KA, Yoon H, Park S, et al. The prognostic impact of microRNA sequence polymorphisms on the recurrence of patients with completely resected non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2012, 144(4): 794-807.

[7] Smith RA, Jedlinski DJ, Gabrovaska PN, et al. A genetic variant located in miR-423 is associated with reduced breast cancer risk [J]. Cancer Genomics Proteomics, 2012, 9(1): 115-118.

[8] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature, 2004, 431(3): 350-355.

[9] Li SC, Tang P, Lin WC. Intronic microRNA: discovery and biological implications DNA [J]. Cell Biol, 2007, 26(4): 195-207.

[10] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007, 23(2): 175-178.

[11] Lin RJ. miR-149 induces apoptosis by inhibiting Akt1 and E2F1 in human cancer cells [J]. Molecular Carcinogenesis, 2010, 49(8): 719-727.

[12] Zhang XP, Uu F, Wang W. Coordination between cell cycle progression and cell fate decision by the p53 and E2F1 pathways in response to DNA damage [J]. J Biol Chem, 2010, 285(41): 31571-31580.

[13] Qi H, Fan L. P13 K/Akt/mTOR signaling pathway and non-small cell lung cancer [J]. Chinese J Lung Cancer, 2010, 13(12): 1149-1154.

[14] Liu T, Tang H, Lang Y, et al. MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin [J]. Cancer Lett, 2009, 273(2): 233-242.

[15] Takashima N, Ishiguro H, Kuwabara Y, et al. Expression and prognostic roles of PABPC1 in esophageal cancer: correlation with tumor progression and postoperative survival [J]. Oncol Rep, 2006, 15(6): 667-771.

(收稿日期: 2012-12-08 修回日期: 2013-01-22)