

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.34.014

MKK4 基因启动子区-1044A>T 多态与鼻咽癌易感性的研究*

鲁明骞^{1,2},孔庆志^{3△},许新华²,卢宏达³,卢忠心³,徐冰清²,史克志²,郭 蓉²

(1.湖北中医药大学中医临床学院,湖北武汉 430061;2.三峡大学第一临床医学院肿瘤研究所 & 湖北省宜昌市中心人民医院肿瘤内科,湖北宜昌 443003;3.武汉市中心医院肿瘤科 & 武汉市肿瘤研究所,湖北武汉 430061)

[摘要] **目的** 探讨 MKK4 基因启动子区-1044A>T 位点单核苷酸多态基因型与散发性鼻咽癌遗传易感性的关系。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法(PCR-RFLP)检测 30 例健康人和 90 例鼻咽癌患者的 MKK4 基因-1044A>T 位点(rs3809728)单核苷酸多态性。**结果** MKK4 基因-1044A>T 位点基因多态性在病例组和对照组中分布差异无统计学意义,AT 基因型($OR=0.726,95\%CI=0.333\sim 2.151$),TT 基因型($OR=0.952,95\%CI=0.094\sim 9.663$), $P=0.712$ 。**结论** MKK4 基因-1044A>T 位点的单核苷酸多态性:可能与散发性鼻咽癌易感性无关。

[关键词] 鼻咽肿瘤;MKK4;多态性,单核苷酸**[中图分类号]** R739.6**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)34-4793-03

Research of association between functional polymorphism(1044A>T)in the MKK4 gene and the susceptibility of nasopharyngeal carcinoma*

Lu Mingqian^{1,2},Kong Qingzhi^{3△},Xu Xinhua²,Lu Hongda³,
Lu Zhongxin³,Xu Bingqing²,Shi Kezhi²,Guo Rong²

(1 Postgraduate College, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430061, China;

2. Oncology Institute, the First Medical College, Three Gorges University & Department of Oncology, Yichang Central People's Hospital, Yichang, Wuhan 443003, China;

3. Oncology Institute, Wuhan Central Hospital & Wuhan Oncology Institute, Hubei 430061, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the association between the functional polymorphism(1044A>T) of the MKK4 gene and the genetic susceptibility of sporadic nasopharyngeal carcinoma. **Methods** Detected the mononucleotide polymorphism of MKK4 gene (1044A>T) in 30 healthy people and 90 patients with nasopharyngeal carcinoma by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP). **Results** There was no statistical significance of the MKK4 gene (1044A>T) between experimental and control group(AT: $OR=0.726,95\%CI:0.333-2.151$;TT: $OR=0.952,95\%CI:0.094-9.663$; $P=0.712$). **Conclusion** Mononucleotide polymorphism of MKK4 gene (1044A>T) may not relate to the susceptibility of sporadic nasopharyngeal carcinoma.

[Key words] nasopharyngeal neoplasms;MKK4;polymorphisms, single nucleotide

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)是头颈部最常见的恶性肿瘤,好发于中国南方各省,具有明显的地区聚集性,世界上 80% 的鼻咽癌发生在中国,其 5 年生存率约 40%~60%^[1],10 年生存率约 40%~50%^[2]。细胞信号传导在恶性肿瘤的发生、发展、侵袭和转移中具有重要作用,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases,MAPKs)是胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,能将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内,对细胞增殖、分化、转化、凋亡、血管形成、肿瘤转移等有一定调控效应^[3-4]。有丝分裂原激活蛋白激酶 4(mitogen-activated protein kinase kinase 4,MKK4)作为 MAPK 信号传导通路的构成部分,在受到细胞内、外信号刺激后,能对肿瘤细胞的生长、增殖、凋亡和转移等有一定的作用^[5-6]。目前,发现 MKK4 启动子区多态性与多种肿瘤关系密切,但其多态性与鼻咽癌关系研究较少。本研究将对 MKK4 启动子基因-1044A/T 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)与鼻咽癌发生易感性的关系进行分析,进而对鼻咽癌的

临床诊断和治疗研究提供分子依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集三峡大学第一临床医学院肿瘤研究所经病理学检查确诊的新发鼻咽癌患者 90 例,其中,男 54 例,女 36 例,年龄 22~73 岁,平均(45.3±5.2)岁。同期收集社区人群中 30 例健康者,其中,男 22 例,女 8 例,男女比例为 11:4,年龄 23~65 岁,平均(49.6±6.4)岁,所有受试者均无血缘关系。每位参加者签知情同意后均采集 3 mL 外周血冰冻待测。

1.2 多肽性分析

1.2.1 冻血提取 DNA 用 QIAGEN 公司的 FlexiGene DNA kit 试剂盒提取冻血 DNA,每个样提 500 μL,测浓度,稀释至 20~30 ng/μL。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 扩增的引物序列,正向:5'-AGT GGG GAG TAG TAA ATG ATG-3',反向:5'-CTA ACA CAA GTC GTG AAA GGA-3'。用所给 DNA 样本做模板,先

* 基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2014CFB675);湖北省教育厅重点基金资助项目(D20141205);2012 年宜昌市科技研究与开发基金资助项目(A12301-03)。 作者简介:鲁明骞(1973-),副主任医师,在读博士,主要从事肿瘤中西医结合临床及基础研究。 △ 通讯作者,Tel:13886181108;E-mail:whzlkqz@sina.com。

通过外侧引物扩增包含 SNP 位点的小片段,PCR 体系如下:高保真 DNA 聚合酶(2.5 U)0.2 μ L,10 \times Buffer 1.5 μ L,dNTP Mixture(2.5 mM)0.8 μ L,模板 DNA(20 ng/ μ L)2 μ L,引物 KF(10 μ M)0.15 μ L,引物 KA(10 μ M)0.15 μ L,ddH₂O 10.2 μ L,补充反应体积至 15.0 μ L。扩增程序:起始高温 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,循环适温度延伸 94 $^{\circ}$ C 30 s,低温退火 72 $^{\circ}$ C 60 s,扩增阶段 72 $^{\circ}$ C 10 s 共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,PCR 扩增产物 12 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 对 PCR 产物进行酶切 MKK4-1044A>T 的 PCR 产物用核酸内切酶 TSP509 I 消化扩增好的片段(65 $^{\circ}$ C 过夜),然后置于 2% 琼脂糖凝胶分离。所有的结果均由经验丰富的实验者采用单盲法评价,随机选取 2 个 SNP 位点提纯片段 10% 的片段进行测序列确定效果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析处理。采用直接计数法计算基因型及等位基因频率,采用拟合优良度 χ^2 检验分析两组中的 Hardy-Weinberg 平衡来比较预期基因型频率和实际基因型频率的吻合程度,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 凝胶电泳结果 采用核酸内切酶 TSP509 I 处理后,-1044TT 基因型共产生了 70 bp 和 152 bp 两条带,而-1044AA 基因型仅产生了 222 bp 一条带,而杂合子共产生了 70、152 bp 和 222 bp 三条带(图 1)。

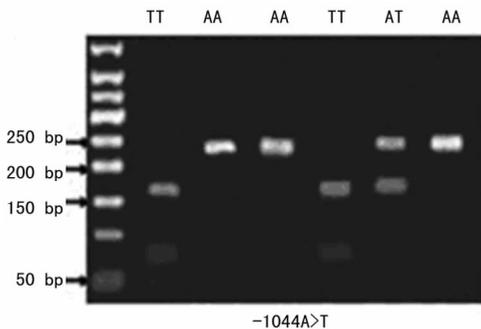


图 1 MKK4-1044A>T 基因扩增产物凝胶电泳结果

2.2 遗传平衡检验 两组基因型分布(-1044A>T)的实际频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡(表 1、表 2),证明两组基因型分布具有群体代表性。

表 1 正常人 SNP-1044 基因型的 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验

基因型	实验值	预期值	总人数(n)	P
AA	21	20.8	30	>0.05
AT	8	4.2		
TT	1	0.8		

表 2 鼻咽癌 SNP-1044 基因型的 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验

基因型	实验值	预期值	总人数(n)	P
AA	60	60.1	90	>0.05
AT	27	13.5		
TT	3	3.0		

2.3 MKK4 的 SNP-1044A>T 的基因型和基因频率的分布 正常对照组-1044A>T AA、TT 基因型频率分别为 70.0% 和 3.3%。病例组中 AA、TT 基因型频率为 66.7% 和 3.3%,统计学分析显示-1044A>T 基因型在鼻咽癌患者和正常对照组中的分布差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。与 AA 基因型相比,-1044TT 基因型与鼻咽癌的发病风险无相关性(校正后 $OR = 0.952$,95% $CI = 0.094 \sim 9.663$),变异基因型 AT+TT 并未改变鼻咽癌的发病率(校正后 $OR = 0.952$,95% $CI = 0.094 \sim 9.663$)。

表 3 基因型和等位基因的分布情况[n(%)]

基因型 等位基因	病例组 (n=90)	对照组 (n=30)	调整后 OR(95%CI)
1044A>T			
AA	60(66.7)	21(70.0)	1.00(ref.)
AT	27(30.0)	8(26.7)	0.726(0.333~2.151)
TT	3(3.3)	1(3.3)	0.952(0.094~9.663)
趋势度检验 P			0.712
AT+TT	30(33.3)	9(30.0)	0.857(0.350~2.099)

OR 值和 95%CI 以 AA 基因型为参照,由 Logistic 回归模型计算得出,经年龄和性别校正。

3 讨论

MKK4 作为 MAPK 通路的重要成员,在肿瘤的发生和发展中具有重要作用。研究表明,MKK4 作为抑制肿瘤的重要蛋白,对恶性肿瘤生长及其转移具有抑制作用^[7]。Sousa 等^[8]对 124 例鼻咽癌和 509 例健康对照的 SNP309 T/G 多态性研究发现 MDM2 SNP309 可作为早期鼻咽癌预测的标志物。Xu 等^[9]对 444 例鼻咽癌患者和 464 例健康对照的 SNP-139 GG 和-939 AA 多态性研究发现 DC-SIGN 启动子的多态性与鼻咽癌的遗传易感性有关。Farhat 等^[10]研究认为 IL-18 启动子 SNP-607 C/A 和-137 G/A 多态性与鼻咽癌的发生和发展具有促进作用。Cao 等^[11]在对鼻咽癌患者的 Fas-SNP 1377G/A 和 FasL-SNP 844T/C 的多态性研究发现此位点与鼻咽癌的发病风险相关,在吸烟患者尤为明显。

启动子作为基因转录的重要元件,在蛋白质的表达中具有重要的作用,目前已筛选出多种恶性肿瘤启动子区域的 SNP,关于鼻咽癌启动子 SNP 的研究也有相关报道^[12]。目前,已发现 MKK4 启动子有 2 个 SNP 位点与肿瘤关系密切,即-1304T>G 和-1044A>T。Yoshida 等^[13]对 706 例大肠癌和 723 例健康对照组-1304T>G 和-1044A>T 的多态性研究发现 SNP-1304T>G 对于大肠癌的发生和遗传风险性有关,但未发现 SNP-1044A>T 与大肠癌的相关性。该研究显示了 MKK4 基因在恶性肿瘤的发生中起着极为复杂的作用。但目前的研究主要为 MKK4 基因启动子单核苷酸多态性与卵巢癌、乳腺癌、大肠癌、胰腺癌、胃癌等关系密切,但关于 MKK4 基因启动子单核苷酸多态性与鼻咽癌的相关性目前研究较少。刘斌等^[14]收集了 500 例 EB 病毒感染的鼻咽癌患者,同期随机选取 500 例健康人群作为对照,发现鼻咽癌患者 TG 基因型和 GG 基因型危险性分别下降了 22% 和 36%,且随着保护性等位基因(G)个数的增加,鼻咽癌发病的风险呈逐渐下降趋势。启动子 SNP 对于肿瘤的保护或者是抑制作用主要是通过降低或者是上调该基因对应的蛋白得以实现的。本研究-1044A>T 的基

因型和基因频率的关系表明,病例组和对照组 SNP(-1044A>T)的实际频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡,证明两组基因型分布具有群体代表性。病例组中 AA、AT、TT 基因型频率分别为 66.7%、30.0%、3.3%,对照组分别为 70.0%、26.7%、3.3%。Logistic 多因素回归分析表明,与-1044AA 基因型比较,经年龄和性别校正后-1044AT $OR = 0.726, 95\% CI = 0.333 \sim 2.151$, -1044TT 基因型 $OR = 0.952, 95\% CI = 0.094 \sim 9.663$,表明 TT 基因型与散发性鼻咽癌患者发病风险无关。变异基因型 AT+TT $OR = 0.952, 95\% CI = 0.094 \sim 9.663$,这表明该位点对鼻咽癌风险无等位基因剂量效应。

随着对分子生物学的不断深入研究,目前,对 SNP 的认识更加深入,也逐渐揭开其在生命系统的重要作用^[15],如疾病的诊断、预防与治疗,尤其是将 SNP 作为一种新的研究策略去揭示其在肿瘤等多基因疾病的发病基础、基因与药物代谢和敏感性的关系、基因与环境的相互作用等,更加有助于疾病的高危人群的筛选。同时,高通量、高自动化的 SNP 检测技术,更方便了高密度 SNP 的筛查,如直接测序、单链构象多态性分析、限制性片段长度多态性分析等,以及近年来发展起来的基因卷片技术、焦测序技术、滚环扩增技术、磁珠阵列技术、变性高效液相色谱、飞行时间质谱法等,同时这些技术与荧光检测原理和质谱仪相结合,形成了荧光检测平台和质谱仪检测平台。尽管目前已经发现 MKK4-1044 A>T 基因多态型与鼻咽癌可能无明显相关性,但是还必须指出本研究的不足:(1)研究的对象较少;(2)研究对象较局限,没有足够的代表性;(3)实验设计样本量不足以精确检测基因与环境的相互关系。在今后的研究中,作者将扩大样本量进一步来验证上述实验结果。

参考文献

- [1] Chen L, Hu CS, Chen XZ, et al. Concurrent chemoradiotherapy plus adjuvant chemotherapy versus concurrent chemotherapy alone in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: a plus 3 multicentre randomised controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(2):163-171.
- [2] Zhou X, Cui J, Macias V, et al. The progress on genetic analysis of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Comp Funct Genomics*, 2007;57513.
- [3] Dong X, Liu Y, Du M, et al. P38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates pulmonary inflammatory response in a rat cardiopulmonary bypass model[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2006, 30(1):77-84.
- [4] 鲁明骞. 丝裂原活化蛋白激酶信号传导通路在恶性肿瘤中的研究现状[J]. *实用癌症杂志*, 2013, 28(3):320-321.
- [5] Cheng YJ, Lee CH, Lin YP, et al. Caspase-3 enhances lung metastasis and cell migration in a protease-independent mechanism through the ERK pathway[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(6):1278-1285.
- [6] 鲁明骞, 许新华. MKK4 与恶性肿瘤相关性的研究进展[J]. *山东医药*, 2011, 51(19):110-111.
- [7] Spillman MA, Lacy J, Murphy SK, et al. Regulation of the metastasis suppressor gene MKK4 in ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 105(2):312-320.
- [8] Sousa H, Pando M, Breda E, et al. Role of the MDM2 SNP309 polymorphism in the initiation and early age of onset of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2011, 50(2):73-79.
- [9] Xu YF, Liu WL, Dong JQ, et al. Sequencing of DC-SIGN promoter indicates an association between promoter variation and risk of nasopharyngeal carcinoma in cantonese[J]. *BMC Med Genet*, 2010, 11:161.
- [10] Farhat K, Hassen E, Bouzgarrou N, et al. Functional IL-18 promoter gene polymorphisms in Tunisian nasopharyngeal carcinoma patients[J]. *Cytokine*, 2008, 43(2):132-137.
- [11] Cao Y, Miao XP, Huang MY, et al. Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL and risk of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2010, 49(11):944-950.
- [12] Cunningham SC, Kamangar F, Kim MP, et al. MKK4 status predicts survival after resection of gastric adenocarcinoma[J]. *Arch Surg*, 2006, 141(11):1095-1099.
- [13] Yoshida BA, Dubauskas Z, Chekmareva MA, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase 4/stress-activated protein/Erk kinase 1 (MKK4/SEK1), a prostate cancer metastasis suppressor gene encoded by human chromosome 17[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(21):5483-5487.
- [14] 刘斌, 黄斌, 芳杨磊, 等. EB 病毒-MKK4 基因遗传变异的交互作用与鼻咽癌危险性研究[J]. *实用医学杂志*, 2012, 28(2):175-177.
- [15] Dérrijard B, Raingeaud J, Barrett T, et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms[J]. *Science*, 1995, 267(5198):682-685.

(收稿日期:2015-05-08 修回日期:2015-07-11)

(上接第 4792 页)

Long-term low-molecular-weight heparin versus usual care in proximal-vein thrombosis patients with cancer[J]. *Am J Med*, 2006, 119(12):1062-1072.

- [14] Kearon C, Akl EA, Comerota AJ, et al. Antithrombotic therapy for VTE disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed; American College of

Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines[J]. *Chest*, 2012, 141(2 Suppl):e419S-e494S.

- [15] Lyman GH, Khorana AA, Kuderer NM, et al. Cancer and thrombosis: back to the future renewed interest in an old problem[J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(5):472-473.

(收稿日期:2015-05-15 修回日期:2015-07-04)