

miR-196a2单核苷酸多态性与白血病发病风险的初步研究

张文娟¹, 田喆², 李有杰³, 商文静³, 谢宁⁴, 常靖⁵, 肖静¹, 鲍雪临¹

1. 烟台山医院血液内科, 山东烟台 264008;
2. 滨州医学院临床医学系, 山东烟台 264003;
3. 滨州医学院高校肿瘤分子生物学重点实验室, 山东烟台 264003;
4. 烟台山医院心胸外科, 山东烟台 264008;
5. 烟台山医院肾内科, 山东烟台 264008

[摘要] 背景与目的: *miR-196a2*在肿瘤的发生、发展中起类似于原癌基因的生物功能。其表达升高会促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移,有望成为重要的肿瘤标志物。该研究旨在探讨*miR-196a2*基因多态性位点rs11614913与白血病发病风险的关系。方法:采用病例-对照分析方法,收集2009年1月—2015年7月在烟台山医院检查确诊的210例白血病患者(病例组)及同期体格检查健康的250名正常体检者(对照组)的骨髓血或外周血,限制性片段长度多态性聚合酶链反应技术(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)检测*miR-196a2*基因多态性位点rs11614913的基因型,应用 χ^2 检验比较各基因型频率在病例组和对照组中的差异,采用Logistic回归分析计算SNP的等位基因的比值比(odds ratio, OR)和95%CI表示各基因型发生白血病的风险度。结果:病例组和对照组相比,*miR-196a2* rs11614913的T/T、C/C、C/T基因型频率的分布差异有统计学意义($P<0.05$),携带突变型纯合子C/C基因型的个体患白血病风险是野生纯合子T/T基因型个体的2.661倍,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:*miR-196a2*基因多态性位点rs11614913与白血病发病风险有关,突变型纯合子C/C或携带C等位基因可能是白血病发生的危险因素。

[关键词] *miR-196a2*; rs11614913; 单核苷酸多态性; 限制性片段长度多态性聚合酶链反应技术; 白血病

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2016.10.004

中图分类号: R733.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)10-0826-05

A preliminary study on relationship between single nucleotide polymorphism of *miR-196a2* and risk of leukemia ZHANG Wenjuan¹, TIAN Zhe², LI Youjie³, SHANG Wenjing³, XIE Ning⁴, CHANG Jing⁵, XIAO Jing¹, BAO Xuelin¹ (1.Department of Hematology, Yantaishan Hospital, Yantai 264008, Shandong Province, China; 2.Department of Clinical Medicine, Binzhou Medical College, Yantai 264003, Shandong Province, China; 3.Key Laboratory of Tumor Molecular Biology, Binzhou Medical College, Yantai 264003, Shandong Province, China; 4.Department of Cardiothoracic Surgery, Yantaishan Hospital, Yantai 264008, Shandong Province, China; 5.Department of Nephrology, Yantaishan Hospital, Yantai 264008, Shandong Province, China)

Correspondence to: ZHANG Wenjuan E-mail: zhwjjsq@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** *miR-196a2* functions as an oncogene during tumor initiation and progression. The up-regulation promotes tumor cell proliferation, invasion and metastasis. Therefore, it is promising to be an important tumor biomarker. The aim of this study was to investigate whether rs11614913, a gene polymorphic site of *miR-196a2*, is associated with the risk of leukemia. **Methods:** A case-control analysis was employed. Bone marrow or peripheral blood was collected from 210 leukemia patients diagnosed from Jan. 2009 to Jul. 2015 in Yantaishan Hospital (case group) as well as 250 healthy people who were physically examined during the same period (control group). Polymerase

chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–PFLP) was used to detect the genotype of rs11614913. Application test was used to compare the difference in the frequency of each genotype between case group and control group. The odds ratio (OR) of SNP allelic genes was calculated using logistic regression analysis and 95%CI represented the risk of leukemia for each genotype. **Results:** The distribution differences in the frequency of T/T, C/C, C/T genotype of *miR-196a2* rs11614913 between case group and control group were statistically significant ($P<0.05$). The risk of leukemia for individuals who carried mutant homozygous C/C was 2.661–fold higher than those carried wild–type homozygous T/T, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** The *miR-196a2* gene polymorphic site rs11614913 was associated with the risk of leukemia. Mutant homozygous C/C or C allelic gene carrying was probably a risk factor for leukemia.

[**Key words**] *miR-196a2*; rs11614913; Single nucleotide polymorphism; Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism; Leukemia

白血病是我国高发病率的恶性肿瘤之一，患者生存期短，死亡率高，对人类健康构成巨大威胁。明确白血病发病机制，提高治疗效果，是当前研究工作的重要目标。白血病是多种环境因素与遗传因素互相作用的结果，国内外学者对白血病相关基因多态性和发病风险已有不少研究，其中在HLA基因多态性^[1-2]、生物代谢酶基因多态性^[3-4]等方面有重大发现。MicroRNA(miRNA)是大小约为21~25个碱基的单链小分子，是一类在生物进化过程中高度保守的非编码小分子RNA。人类大约60%编码蛋白基因受到miRNA的调控，在大多数的基因通路上调节多种生物学过程^[5]。有研究显示，人类基因组广泛存在的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)被证明与多种肿瘤的发生、发展、浸润、转移、侵袭及增殖等过程相关^[6-8]。*miR-196a2*的rs11614913(T/C)是位于miRNA前体(pre-miRNA)区域的潜在功能SNP，该SNP基因位点与多种肿瘤的发生有关^[9]。目前国内外少见对于*miR-196a2*中rs11614913多态性与白血病相关性研究的文献报道。本研究通过病例-对照方法，利用限制性片段长度多态性聚合酶链反应技术(polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism, PCR–RFLP)研究两组人群中*miR-196a2*基因多态性，探讨*miR-196a2*遗传变异与白血病发病风险的相关性，为明确白血病的发病机制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

样本来源于2009年1月—2015年7月烟台山医院收治的白血病患者与同期体格检查健康的正常体检者(筛选程序符合伦理学标准，受试者知情且同意)。其中210例白血病患者(病例组)及250例年龄、性别相匹配的正常对照人群(对照组)的年龄范围为4~88岁。两组研究对象的年龄、性别等一般构成情况差异无统计学意义($P>0.05$ ，表1)。

表1 病例组与对照组一般情况的比较

Tab. 1 Comparison of general conditions between the case group and control group

Project	Case n(%)	Control n(%)	P value
Age/year			
< 45	96(45.7)	107(42.8)	
≥45	114(54.3)	143(57.2)	0.531
Gender			
Man	122(58.1)	137(54.8)	
Woman	88(42.1)	113(45.2)	0.478

1.2 实验准备

1.2.1 主要试剂

DNA抽提试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司，蛋白酶K购自生工生物工程(上海)股份有限公司，RNA酶购自宝生物工程(大连)有限公司，PCR试剂盒和限制性内切酶*Msp I*购自宝生物工程(大连)有限公司，引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成，琼脂糖购自宝生物

工程(大连)有限公司, DNA Ladder Maker购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2.2 实验仪器

DYY-BC双稳定时电泳仪购自北京六一生物科技有限公司, 6F-dox3-0818全自动数码凝胶图像处理系统购自上海天能科技有限公司, Eppendorf梯度PCR仪购自德国Eppendorf公司, DW-FL208超低温冷冻储存箱购自中科美菱低温科技股份有限公司。

1.2.3 引物设计

根据GenBank数据库中基因序列, 设计出*miR-196a2*基因扩增引物。上游引物序列: 5'-CCCCTTCCCTTCTCCTCCAGATA-3'; 下游引物序列: 5'-CGAAAACCGACTGATGTA ACTCCG-3'。

1.2.4 限制性内切酶选择

通过Pubmed SNP和Hapmap SNP等数据库, 确定*miR-196a2*基因(pri-miRNA)中rs11614913多态的位置。运用软件NEBcutter V2.0^[10]将长度为149 bp的*miR-196a2*基因片段序列输入后, 筛选出识别覆盖rs11614913多态位点的限制性内切酶Msp I。根据酶切位点, *miR-196a2*基因多态性位点rs11614913基因型C/T产生149、125和24 bp 3个片段, C/C有125和24 bp 2个片段, T/T有149 bp 1个片段。

1.3 DNA提取及基因型鉴定

经DNA抽提试剂盒推荐方法提取DNA, 放入-80℃冰箱保存备用。PCR反应体系共25.0 μL, 含上下游引物各1 μL、2×Buffer 12.5 μL、提取的DNA 0.1~0.2 μL、dNTP 2 μL、Taq DNA聚合酶 0.4 μL, 加蒸馏水定容至25.0 μL。PCR反应条件为: 94℃ 10 min预变性; 94℃变性30 s, 56℃ 30 s退火, 72℃ 20 s延伸, 30个循环; 最后再72℃充分延伸5 min。酶切反应体系为20.0 μL, 其中PCR产物3 μL, 10×Buffer 2 μL, 限制性内切酶(*Msp I*) 0.5 μL, 加蒸馏水定容至20 μL, 37℃水浴30~60 min。酶切产物经3%琼脂糖凝胶电泳, 稳压80 V, 电流200 mA, 紫外成像。

1.4 统计学处理

运用SPSS 17.0软件包对数据进行统计学处理。计数变量比较采用 χ^2 检验, 并用 χ^2 检验分析病例与对照的基因型频率是否符合哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg)平衡, 同时采用二元回归分析方法, 分析*miR-196a2*基因多态性与白血病之间的关系。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 210例白血病类型及其亚型统计结果

210例白血病类型及其亚型统计结果见表2。

表2 210例白血病类型及其亚型统计

Tab. 2 210 cases of leukemia and its subtypes

Type	Subtype	Number of cases	Ratio/%
ALL	L1	18	8.6
	L2	16	7.6
	L3	13	6.2
ANLL	M1	13	6.2
	M2	32	15.2
	M3	28	13.3
	M4	4	1.9
	M5	11	5.2
	M6	3	1.4
	M7	5	2.4
CLL		32	15.2
CML		18	8.6
CMML		16	7.6
Others		1	0.6

ALL: Acute lymphoblastic leukemia; ANLL: Acute non-lymphocytic leukemia; CLL: Chronic lymphocytic leukemia; CML: Chronic myelocytic leukemia; CMML: Chronic myelomonocytic leukemia

2.2 PCR-RFLP结果

*miR-196a2*基因PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图见图1。经限制性内切酶*Msp I*酶切后凝胶电泳图见图2。

2.3 *miR-196a2*(rs11614913)与白血病发病风险的关系

病例组和对照组*miR-196a2*基因型频率见表3。携带突变纯合子C/C基因型的个体患白血病的风险分别是野生纯合子T/T基因型个体以

及T基因的携带者(C/T+T/T)的2.661倍和2.218倍($P<0.05$),说明携带C/C基因型的个体其患白血病可能性较高;相对于T等位基因,携带C等位的基因型将可能是白血病发生的危险因素。

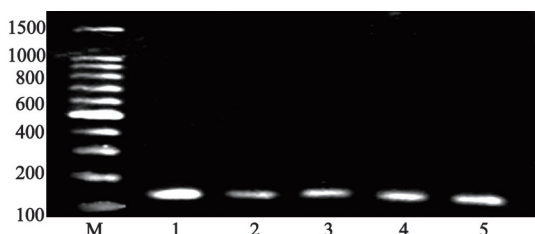


图1 PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products

M: 100 bp DNA ladder maker

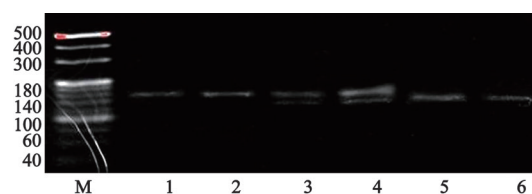


图2 Msp I 酶切后凝胶电泳

Fig. 2 Msp I gel electrophoresis figure after enzyme digestion

M: 20 bp DNA ladder maker

2.4 miR-196a2基因(rs11614913)多态性与白血病的相关性

miR-196a2基因多态性位点rs11614913基因型(T/T、C/C、C/T)在病例组和对照组中的分布差异有统计学意义($\chi^2=11.665, P<0.05$, 表4)。

表3 miR-196a2基因(rs11614916)多态在病例组和对照组中分布对比

Tab. 3 miR-196a2 gene polymorphism (rs11614913) distribution in the case group and the control group

SNP(rs11614913)	Case n(%)	Control n(%)	OR(95%CI)	P value
T/T	69(32.7)	111(44.5)	1*	
C/C	43(20.4)	26(10.2)	2.661(1.501~4.715)	0.001
C/T	98(46.9)	113 (45.3)	1.395(0.931~2.090)	0.106
C/T+T/T	167(79.6)	224(89.8)	1#	
C/C	43(20.4)	26(10.2)	2.218(1.310~3.756)	0.003

*: Compared with homozygous wildtype (T/T); #: Compared with heterozygous (C/T) and homozygous wildtype (T/T)

表4 miR-16a2基因(rs11614913)多态性与白血病相关性

Tab. 4 miR-196a2 genetic polymorphism (rs11614913) associated with leukemia

Group	SNP (rs11614913)			HWE	HWE
	C/C n(%)	T/T n(%)	C/T n(%)	χ^2	P value
Case	43(20.4)	69(32.7)	98(46.9)	11.665	0.003
Control	26(10.2)	111(44.5)	113(45.3)		

3 讨论

白血病的发病存在着种族和地域差异。有研究显示,油田、煤矿和生活污染区白血病发病率较高,而农村较低。全国白血病发病呈分散式,南、北无明显差异。1年中,第1季度发病较多,第4季度发病较少,其中ANLL和CML季节发病差异显著。白血病的总体发病率呈缓慢增长的趋势^[11]。

miRNA基因不编码蛋白质,但是其产物可以借助碱基互补的原则调节下游多达数千种编码蛋白质功能基因的表达,对肿瘤的发生可能有重要意义^[12]。近年来,miRNA的基因多态性的研究很受关注,尤其miR-196a2(rs11614913)是这两年研究的热点。miR-196a2基因定位于人类第12号染色体上,其表达产物(成熟miRNA)借助碱基互补与下游多种基因的3'-UTR区域结合,诱导靶基因mRNA沉默,在白血病的发病过程中可能起重要作用。在miR-196a2的成

熟miRNA互补区中存在的SNP(rs11614913)与乳腺癌^[13]、肺癌^[14]、胃癌^[15]和肝癌^[16-17]的发生风险呈正相关。Tian等^[18]通过研究1 058例肺癌患者和1 035例非癌症患者中*miR-196a2* 4种SNP(rs2910164、rs2292832、rs11614913和rs3746444)在前体miRNA和肺癌易感性之间的联系后发现,*miR-196a2*(rs11614913)变异纯合子C/C比野生纯合子T/T和杂合子C/T患肺癌风险高25%。

本研究表明,携带C/C基因型的个体其患白血病可能性较高;相对于携带T的基因型,携带C的基因型将可能是白血病发生的危险因素。Okubo等^[19]研究发现,携带T等位基因的个体罹患胃癌、食管癌的发病风险高于携带C等位基因的个体,说明*miR-196a2*基因中的rs11614913位点与肿瘤的易感性存在组织特异性。

*miR-196a2*作为一个肿瘤促进因子,未来可能成为肿瘤治疗的一个新靶点。然而,目前*miR-196a2*的复杂关系网络研究尚不成熟,其生物学功能和调控机制还需进一步研究;而且*miR-196a2*(rs11614913)与急、慢性白血病的关系的研究也需要进一步深入。

[参 考 文 献]

- [1] 刘楠,林晓娥,袁方,等. HLA-A/B/C/DRB1/DQB1基因多态性与急性淋巴细胞白血病关联分析[J]. 军事医学, 2013, 37(8): 574-577.
- [2] MACHULLA H K, MULLER L P, SCHAFF A, et al. Association of chronic lymphocytic leukemia with specific alleles of the HLA-DR4:DR53:DQ8 haplotype in German patients [J]. Int J Cancer, 2001, 92(2): 203-207.
- [3] AYDIN S M, HATIRNAZ O, ERENSOY N, et al. Role of *CYP2D6*, *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTT1* and *GSTM1* genes in the susceptibility to acute leukemias [J]. Am J Hematol, 2006, 81(3): 162-170.
- [4] 任艳飞,岳丽杰. 谷胱甘肽转移酶P1基因多态性与儿童急性白血病易感性关系的研究进展[J]. 广东医学, 2014, 35(17): 2779-2781.
- [5] ESQUELA-KERSCHER A, SLACK F J. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4): 259-269.
- [6] WOJCICKA A, DE LA CHAPELLE A, JAZDZEWSKI K.

- MicroRNA-related sequence variation in human cancers [J]. Hum Genet, 2014, 133(4): 463-469.
- [7] POSSEMATO R, MAK S K M, SHAUL Y D, et al. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer [J]. Nature, 2011, 476(7360): 346-350.
- [8] DJURANOVIC S, NAHVI A, GREEN R. A parsimonious model for gene regulation by miRNAs [J]. Science, 2011, 331(6017): 550-553.
- [9] WANG P, XIE S, CUI A, et al. *miR-196a2* polymorphisms and susceptibility to cancer: A meta-analysis involving 24 697 subjects [J]. Exp Ther Med, 2012, 3(2): 324-330.
- [10] New England Biolab Inc. NEBcutter V2.0 [J/O] <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>.
- [11] 刘玉琴,赵凤菊,陈万青,等. 中国2009年白血病发病和死亡资料分析[J]. 中国肿瘤, 2013, 22(7): 528-534.
- [12] LEE K H, GOAN Y G, HSIAO M, et al. MicroRNA-373(miR-373) post-transcriptionally regulates large tumor suppressor, homolog 2(LATS2) and stimulates proliferation in human esophageal cancer [J]. Exp cell Res, 2009, 315(15): 2529-2538.
- [13] HU Z, LIANG J, WANG Z, et al. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women [J]. Hum Mutat, 2009, 30(1): 79-84.
- [14] KIM M J, YOO S S, CHOI Y Y, et al. A functional polymorphism in the pre-microRNA-196a2 and the risk of lung cancer in a Korean population [J]. Lung Cancer, 2010, 69(1): 127-129.
- [15] PENG S, KUANG Z, CHENG C, et al. Association of microRNA-196a-2 gene polymorphism with gastric cancer risk in a Chinese population [J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(8): 2288-2293.
- [16] QI P, DOU T H, GENG L, et al. Association of a variant in MIR 196A2 with susceptibility to hepatocellular carcinoma in male Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. Hum Immunol, 2010, 71(6): 621-626.
- [17] LI X D, LI Z G, SONG X X, et al. A variant in microRNA-196a2 is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese patients with cirrhosis [J]. Pathology, 2010, 42(7): 669-673.
- [18] TIAN T, SHU Y, CHEN J, et al. A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(4): 1183-1187.
- [19] OKUBO M, TAHARA T, SHIBATA T, et al. Association between common genetic variants in pre-microRNAs and gastric cancer risk in Japanese population [J]. Helicobacter, 2010, 15(6): 693-702.

(收稿日期: 2015-11-24 修回日期: 2016-03-19)