

海南黎族人群miRNA146a单核苷酸多态性位点与肝细胞癌遗传易感性分析

许达峰, 周开伦, 李灼日, 武金才, 陈鑫革, 张震生, 郑进方, 王雨, 刘向梅 (海南省人民医院 肝胆胰外科, 海口 570031)

摘要: 目的 分析海南黎族人群miRNA146a单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点与肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 遗传易感性的关系。方法 选取2015年3月至2018年3月于海南省人民医院接受治疗的45例肝脏良性疾病患者为对照组, 选取2014年3月至2016年3月于本院接受治疗的142例HCC患者为观察组, 两组患者HBsAg均为阳性。取2组患者肝组织标本提取DNA后行PCR扩增, 查找包含miRNA146a外显子在内的SNP位点, 探究miRNA146a与肿瘤易感性、患者术后早期复发间的相关性。结果 HCC患者中miRNA146a rs2910164 C/C型54例, G/G型15例, C/G型73例, Logistic分析表明HCC发生的危险因素为miRNA146a rs2910164 C/G型和C/C型, HCC早期复发的危险因素为miRNA146a rs2910164 C/G型和肿瘤大小。结论 miRNA-146a rs2910164位点与海南黎族HCC患者肿瘤遗传易感性有关, HCC患者术后早期复发的危险因素为rs2910164 C/G型和肿瘤大小。

关键词: 肝细胞癌; 复发; 遗传易感性; microRNA

Analysis of miRNA146a single nucleotide polymorphism and susceptibility of patients with hepatocellular carcinoma of Li nationality in Hainan province

XU Da-feng, ZHOU Kai-lun, LI Zhuo-ri, WU Jin-cai, CHEN Xin-ping, ZHANG Zhen-sheng, ZHENG Jin-fang, WANG Yu, LIU Xiang-mei (Department of Hepatobiliary Pancreas Surgery, Hainan People's Hospital, Haikou 570031, China)

Abstract: Objective To analyze the miRNA146a single nucleotide polymorphism (SNP) and susceptibility of patients with hepatocellular carcinoma of Li nationality in Hainan province. **Methods** A total of 45 cases with benign liver disease in Hainan People's Hospital from March 2015 to March 2018 were selected as control group and 142 cases with hepatocellular carcinoma (HCC) who underwent hepatectomy in our hospital from March 2014 to March 2016 were selected as observation group. HBsAg of patients in both groups were positive. DNA was extracted from liver tissue samples of two groups and then PCR was used to search for SNP sites including miRNA146a exons to explore the correlation between miRNA146a and tumor susceptibility and early recurrence after operation. **Results** There were 54 cases of miRNA146a rs2910164 C/C type, 15 cases of G/G type and 73 cases of C/G type in patients with HCC. Logistic analysis showed that the risk factors of occurrence of HCC were miRNA146a rs2910164 C/G type and C/C type, and the risk factors of early recurrence of HCC were miRNA146a rs2910164 C/G type and tumor size. **Conclusions** The miRNA-146a rs2910164 locus is associated with the genetic susceptibility of HCC patients in Hainan Li nationality. The risk factors for early recurrence of patients with HCC after operation are rs2910164 C/G type and tumor size.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Recurrence; Genetic susceptibility; microRNA

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是临床常见肿瘤之一, 预后较差。HCC不仅与环境暴露等因素有关, 个体遗传易感性也有重要影响^[1,2]。因microRNA (miRNA) 的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP), 即机体基因水平

内某个碱基遗传表现为多态性, 造成miRNA调节表达有差异, 可对肿瘤的遗传易感性产生不同影响。当前miRNA的SNP和HCC遗传易感性的相关研究较少, 且结果存在分歧, 鲜少涉及患者术后前期复发问题^[3-5]。另外, 黎族是海南岛原住居民, 不同地区人种间肿瘤遗传易感性也存在差异^[6], 因此, 本研究通过分析海南黎族人群miRNA146a SNP位点与HCC遗传易感性的关系, 为患者的临床诊疗提供借鉴。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取2014年3月至2016年3月于海南省人民医院行肝切除术的142例HCC患者为观察组,随访至2018年3月;选取2015年3月至2018年3月于本院接受治疗的45例肝脏良性疾病患者(均经肝组织活检证实)为对照组,包括血管瘤、肝硬化结节、局灶性增生结节及肝囊肿患者;观察组与对照组均为海南黎族居民,乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)均阳性。排除标准:①原发病灶不显著,不能区别是HCC或其他肿瘤的患者;②患者系继发性肝癌;③脏器严重障碍或依从性较差者;④有严重精神类疾病、自身免疫性疾病、传染性疾病;⑤患者或监护人不同意参与此次研究。本研究经本院伦理委员会批准(编号:Q/KYLW-KL-L011),患者或家属知情并签署同意书。

1.2 HCC复发判断标准 将术后6个月内的复发定义是术后早期复发。根治性肝切除标准^[7]:①腹腔和肝周无远处转移者,术中肝内无新增病灶;②术前AFP为阳性,术后2个月内下降至正常,同时经皮股动脉穿刺造影显示无异常增生血管或行增强CT检查无新生病灶。术前AFP阴性者,以术后2个月增强CT检测无新生病灶或者经皮股动脉穿刺造影无异常增生血管判定为根治性切除。影像学检查不符合以上标准者判定为复发,术后AFP如快速增高,在排除药物性肝损伤、乙型肝炎发作、介入治疗后肝功能损伤等原因后,即使影像学检查未发现新病灶,依然以检测到AFP快速升高的时间判定为术后复发时间。

1.3 DNA提取和琼脂糖凝胶电泳 取患者穿刺组织或手术切除的石蜡标本进行常规脱蜡,提取DNA,DNA采用TBE缓冲液溶解后保存于-20℃冰箱内备用,取5ml进行1%琼脂糖凝胶电泳。

1.4 PCR引物设计及反应体系 从www.genecards.org网站查询miRNA-146a基因序列,采用Primer3网络软件进行PCR引物设计。反向引物为5'-TCGAGTCTCTAGGGAGCTC-3',正向引物为5'-CTCTGAGTGCGATAGTGAT-3',包含外显子386个碱基序列。采用欣佰诺公司的2×Taq预混液反应体系行PCR扩增,20ml反应体系包含1ml模板,

2.0ml 10×缓冲剂,16.2ml去离子水和上下游引物各0.4ml。反应条件:94℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 30s,35个循环,72℃延伸10min。扩增后取5ml进行2%琼脂糖凝胶电泳,由上海生工公司测序。依据测序图谱,寻找SNP位点,同时与基因库进行对比。

1.5 统计学处理 使用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,计数资料以百分比表示,采用 χ^2 检验,对影响HCC患者复发的基因型行单因素与多因素Logistic回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的基线资料 两组患者的性别、年龄、HBV DNA及ALT水平等基线资料的差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性,见表1。

2.2 SNP位点基因型 本研究仅找到miRNA-146a rs2910164 G > C位点,未发现基因库内其他的9个SNP位点,对照组基因型符合Hardy-Weinberg平衡,见表2。

2.3 miRNA-146a rs2910164位点多态性与HCC发生的多因素Logistic回归分析 142例HCC患者中C/C基因型54例,G/G基因型15例,C/G基因型73例,以HCC为因变量(非HCC为0,HCC为1),以miRNA-146a(C/G为3,C/C为2,G/C为1,参照为G/G,设立亚变量)、性别(女性为0,男性为1)及年龄为自变量,逐步向前法行Logistic回归分析,变量标准0.05,结果表明HCC发生的危险因素为miRNA-146a rs2910164 C/G和C/C型,见表3。

2.4 miRNA146a rs2910164位点基因型与HCC复发的关系 采用逐步向前法行Logistic回归分析,因变量为肝癌早期复发(无复发为0,复发为1),自变量为年龄、miRNA146a(C/G为3,C/C为2,G/G为1,参照G/G设立亚变量)、肿瘤大小、肿瘤最大直径、性别(女性为0,男性为1)、AFP(阴性为0,阳性为1,>7mg/L为阳性)、位置(两个不同部位为4,中肝为3,左肝为2,右肝为1,参照右肝,设立亚变量),变量标准0.05,结果表明肝癌早期复发的危险因素为miRNA146A rs2910164位点C/G基因型和肿瘤大小,见表4、表5。

表1 142例HCC患者和45例肝脏良性疾病患者的基线资料

组别	性别(男/女,例)	年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	HBV DNA ($\bar{x} \pm s, \times 10^7$ 拷贝/ml)	ALT($\bar{x} \pm s$,U/L)
观察组($n=142$)	121/21	51.05 \pm 8.63	2.38 \pm 0.40	174.76 \pm 23.01
对照组($n=45$)	38/7	50.74 \pm 8.42	2.16 \pm 0.41	175.03 \pm 26.98
统计量值	$\chi^2=0.184$	$t=0.073$	$t=0.114$	$t=0.107$
P值	0.794	0.651	0.863	0.673

表 2 45 例对照组患者 miRNA-146a rs2910164C > G 基因 Hardy-Weinberg 遗传平衡检测 [例 (%)]

基因型	实际频数	理论频数	χ^2 值	P值
C/G	17 (37.78)	22.45 (49.89)	0.174	0.206
C/C	13 (28.89)	12.37 (27.49)		
G/G	15 (33.33)	10.18 (22.62)		

表 3 miRNA-146a rs2910164 位点多态性与 HCC 发生的多因素 Logistic 回归分析

项目	SE	β	Walds	P值	OR (95%CI)
常量	0.359	0.840	5.388	0.018	2.317 (1.042~5.083)
miRNA146a (G/G)	0.420	1.064	7.710	0.004	1.905 (1.185~4.372)
miRNA146a (C/G)	0.446	1.125	6.398	0.009	3.090 (1.290~7.388)
miRNA146a (C/C)	0.475	1.109	5.497	0.017	3.029 (1.198~7.671)

表 4 miRNA146a rs2910164 位点基因型与 HCC 复发情况对比 [例 (%)]

项目	C/G	G/G	C/C	χ^2 值	P值
复发 (n = 55)	38 (69.09)	2 (3.64)	15 (27.27)	7.053	0.002
无复发 (n = 87)	35 (40.23)	13 (14.94)	39 (44.83)		
合计 (n = 142)	73 (51.41)	15 (10.56)	54 (38.03)		

注: “-” 为无相关数据

表 5 HCC 复发的 Logistic 回归分析

项目	SE	β	Walds	P值	OR (95% CI)
常量	0.798	-2.797	15.801	0.001	0.059 (0.028~0.101)
miRNA146a (G/G)	0.709	1.783	15.628	0.001	0.074 (0.031~0.104)
肿瘤大小	0.049	0.130	6.189	0.012	1.140 (1.030~1.259)
miRNA146a (C/G)	0.660	2.099	10.169	0.002	8.180 (2.250~29.760)
miRNA146a (C/C)	0.686	1.028	2.270	0.129	2.810 (0.731~10.760)

3 讨论

SNP主要指在基因组水平上由单个核苷酸变异引起的DNA序列多态性,临床多种疾病的发生与SNP密切相关。研究表明,miRNA的单核苷酸多态性可使其功能发生改变,从而影响肿瘤易感性^[8-10]。因此本研究采用病例对照寻找miRNA146a rs2910164基因序列内的SNP,在基因库的10个SNP位点中仅找到1个。为降低偏倚,均选取有乙型肝炎背景的患者,结果表明C/G型、C/C型相对G/G型是乙型肝炎患者发生HCC的危险因素。本研究前期通过高通量外显子检测黎族HCC患者血液的标本,经过海南省公共数据平台(COSMIC)数据库比对出该人群高频易感基因,同时进行转录组RNA测序,初步鉴定出具有差异性的基因,其中仅miRNA146a可能与HCC的发生存在相关性。

miRNA146a的SNP位点与包括HCC在内的许多肿瘤易感性有关^[11-13]。Jazdzewski等^[14]研究表明,rs2910164位点G/C基因型患者发生甲状腺乳头状癌

的几率高于纯合型(C/C或者G/G基因型)。Orsis等^[15]研究表明,头颈部位鳞状细胞癌患者的易感性与C/C基因型有关。Lung等^[16]研究表明,中国南部地区鼻咽癌患者的易感性与基因型C/C有关。一项Meta分析表明高加索地区人群的肿瘤易感性与此位点无相关性^[17],但Ma等^[18]对miRNA146a等5个SNP位点的Meta分析显示,C/G和C/C基因型是结肠癌、膀胱癌、脑膜癌及前列腺癌的保护因素,同时也是头颈癌和甲状腺癌的危险因素。本研究表明,有乙型肝炎背景的海南黎族人群其miRNA146a的SNP位点C/G和C/C基因型具有HCC易感性,但考虑到种族、试验手段和样本等因素的影响,可能会出现结论不一致情况,仍需其他相关试验进一步证实。

Poon等^[19]以1年为HCC早期复发的分界点;吴力群等^[20]研究表明HCC患者复发高峰为术后1年,而非多中心复发一般在术后6个月内。故本研究将早期复发定义为术后6个月内,其复发危

险因素为rs2910164 C/C基因型, C/G基因型与患者术后早期复发有关。有关杂合型基因为遗传风险因素的研究较少, 有专家推测可能为遗传上位效应^[21-23]。Jazdzewski等^[24]研究表明, 携带杂合子基因型患者表达的3种成熟且有不同靶基因谱的microRNA146a, 两个来自3'端, 一个来自pre-mir-146a 5'端, 而携带纯合子基因型的个体只表达上述3种中的2种。Yue等^[25]研究表明, C/C基因型宫颈癌患者microRNA146a的表达量高于G/G型, 提示SNP除对microRNA表达种类有影响外, 还会对其他表达产生影响, 同时也间接验证患者预后和杂合子基因型有相关性。rs2910164 C/G型肝癌患者易早期复发可能是由于SNP造成miRNA146a表达数量和种类有差异。

综上所述, miRNA146a rs2910164位点与海南黎族HCC患者肿瘤遗传易感性有关, 患者术后早期复发的危险因素为rs2910162 C/G型。

参考文献

- [1] 李天驹, 秦波, 李朋. microRNA-206单核苷酸多态性与乙型肝炎病毒相关原发性肝癌关系的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(16): 1843-1848.
- [2] 张剑, 崔玉兰, 方磊. MicroRNA 146a基因单核苷酸多态性与卵巢上皮性肿瘤易感性的研究[J]. 国际遗传学杂志, 2016, 39(1): 8-14.
- [3] 叶莉霞, 付朝伟, 江峰, 等. microRNA-149和microRNA-499基因多态性与肝癌易感性的Meta分析[J]. 中华预防医学杂志, 2016, 50(5): 445-450.
- [4] 黄波, 肖影群, 罗达亚, 等. 肝细胞癌中microRNA-375调控的基因网络分析[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(2): 363-370.
- [5] 汪君君, 谢薇佳, 袁帅, 等. miRNA基因单核苷酸多态性与非小细胞肺癌易感性的关联研究[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(9): 904-912.
- [6] 时红, 吴元凯, 林国莉, 等. OPN基因启动区-156delG多态性与中国HBV相关肝细胞癌的易感性[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2017, 38(5): 717-721.
- [7] 周翔, 覃夏川, 罗燕, 等. 超声造影廓清率预测富血供肝癌分化程度和微血管侵犯的临床研究[C]. 国际超声分子影像学术会议. 2014.
- [8] 王野, 畅智慧, 赵相轩, 等. 血清中microRNA在预测肝细胞癌患者预后作用的研究探讨[J]. 实用肿瘤学杂志, 2016, 30(2): 142-145.
- [9] 王传鹏, 苏成豪, 林勇, 等. CCND1基因多态性与肝细胞癌遗传易感性的病例对照研究[J]. 现代预防医学, 2017, 5(3): 73-76.
- [10] 何斐, 林剑波, 俞婷婷, 等. 福建省汉族人群肺癌相关microRNA基因SNP与吸烟交互作用研究[J]. 中华预防医学杂志, 2016, 5(2): 168-174.
- [11] 魏斐斐, 廖燕, 赵瑞强, 等. NEK2基因rs10494938、rs10158205位点多态性与肝细胞癌家系遗传易感性的关系[J]. 山东医药, 2017, 57(24): 1-4.
- [12] 李敬华, 王萍玉. MicroRNA及SNP在非小细胞肺癌易感性和早期诊断中的作用研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(3): 446-451.
- [13] 刘志强, 蔡琳. miRNA相关SNPs与肺癌遗传易感性关系的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(12): 1090-1094.
- [14] Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, et al. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(20): 7269-7274.
- [15] Orsós Z, Szanyi I, Csejtei A, et al. Association of pre-miR-146a rs2910164 polymorphism with the risk of head and neck cancer[J]. Anticancer Res, 2013, 33(1): 341-346.
- [16] Lung RW, Wang X, Tong JH, et al. A single nucleotide polymorphism in microRNA-146a is associated with the risk for nasopharyngeal carcinoma[J]. Mol Carcinogen, 2013, 52 Suppl 1: E28-E38.
- [17] Srivastava K, Srivastava A. Comprehensive review of genetic association studies and Meta-analyses on miRNA polymorphisms and cancer risk[J]. Plos One, 2012, 7(11): 50966.
- [18] Kou J, Fan H, Han D, et al. Association between four common microRNA polymorphisms and the risk of hepatocellular carcinoma and HBV infection[J]. Oncol Lett, 2014, 8(3): 1255-1260.
- [19] Poon RT, Fan ST, Ng I O, et al. Different risk factors and prognosis for early and late intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 2000, 89(4): 500-507.
- [20] 吴力群, 邱法波, 张顺, 等. 原发性肝细胞癌肝切除术后短期复发的危险因素[J]. 中华外科杂志, 2011, 49(9): 784-788.
- [21] 刘剑荣, 陈小林. MicroRNA-124 rs531564、microRNA-26A rs7372209和microRNA-126 rs4636297多态性与结直肠癌易感性关联研究[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(24): 33-38.
- [22] 魏斐斐, 廖燕, 赵瑞强, 等. 广西扶绥县壮族人群ATF 5基因多态性与肝癌家系遗传易感性的关系[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(6): 835-839.
- [23] 顾丽华, 黄晓丹, 季国忠. miRNA-146a基因多态性与肝癌易感性的meta分析[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2017, 13(9): 1222-1226.
- [24] Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, et al. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-MiR-146a contribute to thyroid cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(5): 1502-1505.
- [25] Yue C, Wang M, Ding B, et al. Polymorphism of the pre-miR-146a is associated with risk of cervical cancer in a Chinese population[J]. Gynecol Oncol, 2011, 122(1): 33-37.

收稿日期: 2018-06-25

许达峰, 周开伦, 李灼日, 等. 海南黎族人群miRNA146a单核苷酸多态性位点与肝细胞癌遗传易感性分析[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2019, 11(2): 21-24.