



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.009
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3755.shtml

· 基础研究 ·

miR-22 启动子区域的遗传变异与 HBV 相关肝癌发病风险的关系

王勇, 段鑫, 李凯

(湖北省武汉市中心医院肝胆胰外科, 湖北 武汉 430014)

摘要

目的: 探讨微小 RNA 22 (miR-22) 启动子区域的遗传变异与中国人乙型肝炎病毒 (HBV) 相关肝癌易感性的关系。

方法: 采用病例-对照方法, 收集 1 020 例确诊的乙型肝炎病毒 (HBV) 阳性 HCC 患者 (病例组) 和 1 046 例健康对照个体 (对照组) 静脉血标本。用 TaqMan 等位基因分型方法对 miR-22 启动子区域多态位点 rs6502892 (C → T) 和 rs721576 (A → G) 进行基因型检测, 结合研究对象的基本资料, 应用 Logistic 回归法分析不同基因型与 HBV 相关肝癌发病风险的关系。

结果: rs6502892 的基因型分布在病例组与对照组间差异有统计学意义 ($P=0.018$), 而 rs721576 的基因型的分布在两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 rs6502892 野生型 (CC) 比较, rs6502892 突变基因型 (CT/TT) 的 HBV 相关肝癌的发病风险明显增加 (调整后 $OR=1.23$, 95% $CI=1.02\sim 1.47$, $P=0.029$)。进一步的分层分析表明, rs6502892 突变基因型 (CT/TT) 的危险效应在 52 岁以下年龄组、女性、吸烟者和饮酒者中更明显 (均 $P<0.05$); 而 rs721576 突变基因型 (AG/GG) 在男性和非吸烟者中 HBV 相关肝癌的发病风险降低 (均 $P<0.05$)。

结论: miR-22 rs6502892 突变基因型 (CT/TT) 增加中国人乙型肝炎病毒 (HBV) 相关肝癌的发病风险, 而 rs721576 突变基因型 (AG/GG) 降低男性和非吸烟者患 HBV 相关肝癌的风险。这一结论有待进一步的关联研究以及功能学研究的证实。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(1):43-47]

关键词

癌, 肝细胞; 微 RNAs; 多态性, 单核苷酸; 肝细胞肝癌

中图分类号: R735.7

Association of genetic variation in the promoter region of miR-22 gene and risk of HBV-related hepatocellular carcinoma

WANG Yong, DUAN Xin, LI Kai

(Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Wuhan Central Hospital, Wuhan 430014, China)

Corresponding author: WANG Yong, Email: chenshiwang001@126.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the association of the genetic variation in the promoter region of microRNA 22 (miR-22) and the susceptibility of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC) in Chinese population.

Methods: Using a case-control approach, the venous blood samples from 1 020 HBV-positive HCC patients

收稿日期: 2013-11-08; 修订日期: 2013-12-23。

作者简介: 王勇, 湖北省武汉市中心医院主治医师, 主要从事肝胆胰疾病方面的研究。

通信作者: 王勇, Email: chenshiwang001@126.com

(case group) and 1 046 healthy subjects (control group) were collected. The genotypes of the polymorphic sites, rs6502892 (C→T) and rs721576 (A→G), in the promoter region miR-22 gene were determined by TaqMan allelic discrimination assay. According to the general data of the enrolled subjects, the relationships between different genotypes and risk of HBV-related liver cancer were analyzed by Logistic regression.

Results: The rs6502892 genotype distributions had statistical difference between case group and control group ($P=0.018$), while the rs721576 genotype distributions showed no statistical difference ($P>0.05$). Compared with the rs6502892 wild-type (CC), the variant rs6502892 genotypes (CT/TT) showed a significantly increased risk of HBV-related liver cancer (adjusted OR=1.23, 95% CI=1.02–1.47, $P=0.029$). Further stratified analysis showed that the risk effect of variant rs6502892 genotypes (CT/TT) was more evident in those less than 52 years of age, and in females, smokers and alcoholics (all $P<0.05$), however, the variant rs721576 genotypes (AG/GG) showed decreased risk of HBV-related liver cancer in males and non-smokers (both $P<0.05$).

Conclusion: In Chinese population, the variant rs6502892 genotypes (CT/TT) of miR-122 gene are associated with an increased risk of HBV-related liver cancer, whereas, the risk of HBV-related liver cancer is decreased in men and non-smokers with variant rs721576 genotypes. However, this conclusion still needs further confirmation with genetic association and functional studies. [Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(1):43-47]

KEYWORDS Carcinoma, Hepatocellular; MicroRNAs; Polymorphism, Single Nucleotide

CLC number: R735.7

肝癌为人类常见恶性肿瘤之一，90%以上的原发性肝癌为肝细胞肝癌（hepatocellular carcinoma, HCC）^[1]。我国肝癌发病率和病死率呈不断上升趋势，2008年我国男性肝癌的发病率为37.4/10万，女性为13.7/10万，居世界首位^[2]。肿瘤流行病学研究^[3-4]表明，肝癌的发生是多因素作用的结果，乙型肝炎病毒（hepatitis B virus, HBV）、丙型肝炎病毒（hepatitis C virus, HCV）、饮水污染和黄曲霉毒素是肝癌发生的主要危险因素。然而暴露于同样环境的个体，其患病差异较大，说明肝癌的发生发展在很大程度上还取决于个体的遗传易感性。

微小RNA（microRNA, miRNA）是一类大小约21~24 nt的高度保守的非编码单链RNA，它通过与mRNA 3'端序列互补识别靶mRNA来调控基因的表达，导致靶mRNA的降解或者翻译的抑制^[5]。每个miRNA可以调节数百个靶基因，在细胞生长、分化、代谢、凋亡及器官形成等一系列过程中发挥重要作用。miRNA的表达失调与肿瘤的发生、发展密切相关^[6]。近年来，miRNA作为一类新型的癌基因和抑癌基因逐渐被关注。miR-22可通过调控核因子 κ B（NF- κ B）辅活化因子的表达来抑制NF- κ B的活性；NF- κ B作为转录因子可调控多个基因，涉及多个生物现

象，包括肝癌的发生发展^[7]。研究^[8]表明，miR-22能促进男性HBV相关的HCC的发生发展。单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP）是人类基因组中最重要的遗传变异，miRNA基因及其附近区域的SNP可能通过影响miRNA的成熟进程及其与靶基因的结合而发挥功能。UCSC Genome Browser数据库提示，rs6502892和rs721576多态位点位于miR-22的启动子区，该miRNA启动子区SNP可能会影响转录因子结合的改变，从而改变各种生物学过程，导致肿瘤发生。然而这2个SNP与HCC易感性的关联研究尚未报道。因此，本研究选择rs6502892和rs721576为靶点，探讨其多态性与中国人群HCC易感性的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本次病例-对照研究包括1 020例HBV为阳性的HCC患者和1 046名正常对照。病例来自于2011年1月—2013年5月在武汉市中心医院收治的确诊新发HCC患者。HCC的诊断标准为：临床免疫学检验或病理学检查甲胎蛋白（AFP） $>400 \mu\text{g/L}$ ，同时需要经过计算机扫描成像和磁共振成像判断。

以武汉地区没有肿瘤病史的健康人群作为对照,根据性别和年龄(± 5 岁)与病例频数来进行配对。所有纳入本研究的对象之间都是没有亲缘关系的中国汉族人群,经患者家属签署知情同意后进行面访调查,主要是收集每位患者 5 mL 的外周静脉血,同时对患者详细的肿瘤病史、吸烟饮酒情况以及人口学资料等内容做进一步的调查。

1.2 提取基因组 DNA 的方法

采用经典酚-氯仿法抽提基因组 DNA,并使其溶于 TE 中。通过使用紫外分光光度计对 DNA 纯度与浓度进行检测,同时将其统一稀释到 1 g/L,分装于 4 °C 以备实验使用,剩下的 DNA 则保存在 -20 °C 的环境中。

1.3 基因型分析方法

采用 TaqMan 等位基因分型方法进行多态性检测。通过单纯随机方法从中抽取 10% 的样本,同时运用双盲法重复检测对其进行验证,所获得的验证结果是完全一致的。

1.4 HBsAg 和 anti-HCV 的检测方法

按照酶联免疫试剂盒(珠海丽珠试剂有限公司)的说明书,采用酶联免疫法检测每个样本血浆中 HBsAg 和 anti-HCV。每个包被板中包括试剂盒中设置的 2 个阳性对照,3 个阴性对照和 1 个空白对照。此外,随机选择 10% 的样本进行重复检测,结果 100% 一致。

1.5 统计学处理

本研究中所有数据均采用 SAS 9.1.3 进行统计学分析。Hardy-Weinberg 平衡检验选择拟合优度 χ^2 检验进行。基因型分布和人口学资料在病例与对照之间的差异比较采用 t 检验和 χ^2 检验。OR 值及其 95% CI 采用单因素和多因素 Logistic 回归计算,以表示相对危险度。所有检验均为双侧检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC 病例组和对照组的一般情况

年龄和性别在病例组和对照组间差异无统计学意义($P=0.522, 0.930$),两组间均衡可比,但肝癌组中吸烟者和饮酒者多于对照组,差异有统计学意义($P=0.039, 0.000$)(表 1)。

表 1 病例组和对照组的一般情况 [$n(\%)$]

Table 1 The general data of case group and control group [$n(\%)$]

变量	病例组 ($n=1\ 020$)	对照组 ($n=1\ 046$)	P
平均年龄(岁)	51.7 ± 10.5	51.4 ± 10.5	0.522
年龄(岁)			
≤ 52	557 (54.6)	554 (53.0)	0.454
> 52	463 (45.4)	492 (47.0)	
性别			
男	810 (79.4)	829 (79.3)	0.930
女	210 (20.6)	217 (20.7)	
吸烟情况			
是	620 (60.8)	589 (56.3)	0.039
否	400 (39.2)	457 (43.7)	
饮酒情况			
是	630 (61.8)	405 (38.7)	<0.001
否	390 (38.2)	641 (61.3)	

2.2 多态位点基因型分布及其与 HCC 的易感性分析

由表 2 可见, miR-22 rs6502892 和 rs721576 这两位点基因型频率在对照组中的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P=0.734, 0.493$),说明对照组具有人群代表性。在病例和对照组中,rs6502892 的 3 种基因型的分布差异具有统计学意义($P=0.018$),TT 基因型频率高于对照组。在对年龄、性别、吸烟和饮酒情况进行调整后,TT 基因型与野生型 CC 相比能够明显增加 HBV 相关肝癌的发病风险($OR=1.61, 95\% CI=1.22\sim 2.11$)。与野生型 CC 相比,T 等位基因携带者(CT/TT)发病风险增加 23% ($95\% CI=1.02\sim 1.47$)。而 rs721576 的 3 种基因型的分布在两组间差异无统计学意义,调整年龄、性别、吸烟和饮酒情况后,差异仍无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 多态位点基因型分布与 HCC 易感性的分层分析

本研究进而按年龄、性别、吸烟和饮酒情况对 rs6502892 和 rs721576 进行分层分析(表 3),发现 rs6502892 位点 T 突变等位基因携带者(CT/TT)增加肝癌发病风险的效应在 52 岁以下年龄组、女性、吸烟者和饮酒者中更为明显;而 rs721576 位点 G 突变等位基因携带者(AG/GG)在男性和非吸烟者中可降低肝癌的发病风险。

表 2 多态位点基因型分布及其与 HCC 的易感性分析 [n (%)]

Table 2 Relationship between genotype distributions of the polymorphic sites HCC susceptibility [n (%)]

基因型	病例组 (n=1 020)	对照组 (n=1 046)	OR (95%CI)	P	OR (95%CI) ¹⁾	P ¹⁾
rs6502892						
CC	391 (39.3)	457 (44.5)	1		1	
CT	428 (43.0)	438 (42.6)	1.14 (0.95~1.38)	0.170	1.11 (0.92~1.36)	0.280
TT	177 (17.8)	133 (12.9)	1.56 (1.20~2.02)	0.001	1.61 (1.22~2.11)	0.001
CT/TT	605 (60.7)	571 (55.5)	1.24 (1.04~1.48)	0.018	1.23 (1.02~1.47)	0.029
rs721576						
AA	695 (70.1)	690 (66.6)	1		1	
AG	268 (27.0)	310 (29.9)	0.86 (0.71~1.04)	0.124	0.86 (0.71~1.06)	0.153
GG	28 (2.8)	36 (3.5)	0.77 (0.47~1.28)	0.316	0.73 (0.43~1.23)	0.238
AG/GG	296 (29.9)	346 (33.4)	0.85 (0.70~1.02)	0.088	0.85 (0.70~1.03)	0.099

注: 1) 调整年龄、性别、吸烟和饮酒情况

Note: 1) Adjusted distribution by age, sex, smoking and alcohol consumption

表 3 多态位点基因型分布与 HCC 易感性的分层分析 [n (%)]

Table 3 Stratification analysis for relationship between genotype distributions of the polymorphic sites HCC susceptibility [n (%)]

项目	rs6502892				rs721576			
	病例组 / 对照组		OR (95%CI) ¹⁾	P ¹⁾	病例组 / 对照组		OR (95%CI) ¹⁾	P ¹⁾
	CC	CT/TT			AA	AG/GG		
年龄 (岁)								
≤ 52	213(39.2)/247(45.3)	331(60.8)/298(54.7)	1.28(1.00~1.65)	0.049	387(71.5)/376(68.6)	154(28.5)/172(31.4)	0.89(0.68~1.16)	0.396
> 52	178(39.4)/210(43.5)	274(60.6)/273(56.5)	1.17(0.89~1.53)	0.261	308(68.4)/314(64.3)	142(31.6)/174(35.7)	0.82(0.62~1.08)	0.163
性别								
男	319(40.1)/354(43.6)	477(59.9)/458(56.4)	1.13(0.92~1.39)	0.245	565(71.7)/539(65.6)	223(28.3)/283(34.4)	0.74(0.60~0.93)	0.008
女	72(36.0)/103(47.7)	128(64.0)/113(52.3)	1.86(1.23~2.84)	0.003	130(64.0)/151(70.6)	73(36.0)/63(29.4)	1.39(0.90~2.14)	0.134
吸烟情况								
是	146(37.9)/210(46.5)	239(62.1)/242(53.5)	1.43(1.08~1.88)	0.012	266(68.4)/310(68.4)	123(31.6)/143(31.6)	1.00(0.75~1.34)	0.984
否	245(40.1)/247(42.9)	366(59.9)/329(57.1)	1.10(0.86~1.41)	0.446	429(71.3)/380(65.2)	173(28.7)/203(34.8)	0.74(0.57~0.96)	0.025
饮酒情况								
是	146(38.4)/288(45.7)	234(61.6)/342(54.3)	1.34(1.03~1.75)	0.028	260(68.6)/426(67.2)	119(31.4)/208(32.8)	0.95(0.72~1.25)	0.715
否	245(39.8)/169(42.5)	371(60.2)/229(57.5)	1.12(0.87~1.46)	0.379	435(71.1)/264(65.7)	177(28.9)/138(34.3)	0.77(0.59~1.01)	0.063

注: 1) 调整年龄、性别、吸烟和饮酒情况 (除分层因素外)

Note: 1) Adjusted distribution by age, sex, smoking and alcohol consumption (with exclusion of the stratified factors)

3 讨 论

本研究采用病例-对照研究设计探讨了 miR-22 启动子区域 2 个常见位点 rs6502892 (C → T) 和 rs721576 (A → G) 与 HCC 遗传易感性之间的关联。结果发现 rs6502892 突变基因型 (CT/TT) 能显著增加 HBV 相关肝癌的发病风险, 而 rs721576 与 HCC 发病风险的关联无统计学意义。进一步的分层分析表明, rs6502892 (CT/TT) 的危险效应在 52 岁以下年龄组、女性、吸烟者和饮酒者中更明显; 而 rs721576 (AG/GG) 在男性和非吸烟者中具有保护效应。

成熟 miRNA 主要是由一类长约 21~24 个核

昔酸的小分子非编码 RNA 组成的, 它主要是通过与靶 mRNA 的 3'-非翻译区、5'-非翻译区和编码区域的碱基互补配对, 从而实现抑制靶 mRNA 翻译, 在转录后水平调控靶基因表达^[9-10]。研究显示, 单个 miRNA 分子可以通过与数百个功能各异的目标 mRNA 相结合, 从而发挥其调节的作用^[5]。目前, 已有越来越多的研究结果显示, miRNA 在肿瘤的发生发展中起着重要作用。miRNA 可通过原癌基因和抑癌基因的表达, 或通过 miRNA 自身丢失、突变来参与肿瘤的发生发展^[11-12]。miRNA 与多种肿瘤的发生也存在着密切关系, 研究发现, miRNA 在肿瘤组织和正常组织中的表达显著不同, 说明 miRNA 在肿瘤发

生发展中有着潜在的作用。如肺癌患者中 let-7、miR-99a 和 miR-26a 表达水平降低; miR-145 和 miR-143 在结肠癌中表达下降; 在宫颈癌中, miR-199 下降可抑制细胞生长; 在胆管癌中, miR-21、miR-141 和 miR-200 表达下降亦可抑制细胞的生长; 揭示 miRNA 具有潜在的抑制肿瘤的作用。相反, miRNA 同样具有致癌作用的潜能, 如 miR-17 在 B 细胞淋巴瘤中高表达, miR-155 在博基特肉瘤中高表达等等^[6, 13-14]。关于 miR-22 与肿瘤发生发展的报道不多, 然后有研究^[7]表明, miR-22 可通过调控 NF- κ B 辅活化因子的表达来抑制 NF- κ B 的活性; NF- κ B 作为转录因子可调控多个基因, 涉及多个生物现象, 包括肝癌的发生发展。此外, miR-22 能促进男性 HBV 相关的 HCC 的发生发展^[8]。而 rs6502892 和 rs721576 多态位点位于 miR-22 的启动子区, 该 miRNA 启动子区 SNP 可能会影响转录因子结合的改变, 从而改变各种生物学过程, 导致肿瘤发生。

综上所述, 本研究发现 miR-22 rs6502892 单核苷酸多态性改变能够显著增加中国人群 HBV 相关肝癌的发病风险, 而 rs721576 单核苷酸多态性改变能够显著降低男性和非吸烟者患 HBV 相关肝癌的风险。这一结论有待进一步大样本、不同种族人群的关联研究以及功能学研究的证实。

参考文献

- [1] He J, Gu D, Wu X, et al. Major causes of death among men and women in China[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(11):1124-1134.
- [2] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893-2917.
- [3] Kuper H, Tzonou A, Kaklamani E, et al. Tobacco smoking, alcohol consumption and their interaction in the causation of hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2000, 85(4):498-502.
- [4] Chuang SC, La Vecchia C, Boffetta P. Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection[J].

Cancer Lett, 2009, 286(1):9-14.

- [5] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15-20.
- [6] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11):857-866.
- [7] Takata A, Otsuka M, Kojima K, et al. MicroRNA-22 and microRNA-140 suppress NF- κ B activity by regulating the expression of NF- κ B coactivators[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411(4): 826-831.
- [8] Jiang R, Deng L, Zhao L, et al. miR-22 promotes HBV-related hepatocellular carcinoma development in males[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(17):5593-5603.
- [9] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355.
- [10] Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5'UTR as in the 3'UTR[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(23):9667-9672.
- [11] Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(6):776-780.
- [12] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435(7043):834-838.
- [13] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis[J]. *Cancer cell*, 2006, 9(3):189-198.
- [14] Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(7):2113-2129.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 王勇, 段鑫, 李凯. miR-22 启动子区域的遗传变异与 HBV 相关肝癌发病风险的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(1):43-47. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.009
Cite this article as: WANG Y, DUAN X, LI K. Association of genetic variation in the promoter region of miR-22 gene and risk of HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(1):43-47. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.009