



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.011  
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3986.shtml

· 基础研究 ·

# pre-miR-146a 基因 rs2910164 位点单核苷酸多态性与胆管癌的关系

樊晓静, 史志涛, 孙昕

(新疆医科大学附属自治区中医院 肿瘤外科, 新疆 乌鲁木齐 830000)

## 摘要

**目的:** 探讨 pre-miR-146a 基因表达及其 rs2910164 位点多态性与胆管癌的关系。

**方法:** 分别用基因直接测序与定量 PCR 方法检测 70 例胆管癌患者的胆管癌组织(胆管癌组)及 39 例胆管非肿瘤性疾病患者的胆管组织(对照组)中 pre-miR-146a 基因 rs2910164 位点单核苷酸多态性与 pre-miR-146a 表达, 分析不同基因型与 pre-miR-146a 表达量、胆管癌临床病理及其预后的关系。

**结果:** 胆管癌组的 pre-miR-146a 基因型分布与对照组有明显差异, 前者表现为 GG 和 GC 基因型比例明显高于 CC 基因型, 且 G 等位基因频率明显高于 C 等位基因(均  $P < 0.05$ ); 对照组 GG 和 GC 基因型人群的 pre-miR-146a 表达量较 CC 基因型低, 但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 胆管癌组织 pre-miR-146a 表达量明显低于对照组胆管组织( $P < 0.05$ ); Logistic 多元回归分析显示 GG 和 GC 基因型可能是胆管癌的危险因素( $P = 0.052$ ), 分层分析显示 GG 和 GC 基因型与胆管癌患者的临床分期和淋巴结转移有关(均  $P < 0.05$ ); 生存分析显示 GG 和 GC 基因型胆管癌患者的生存率低于 CC 基因型胆管癌患者, 但差异无统计学意义( $P = 0.178$ )。

**结论:** pre-miR-146a 基因 rs2910164 位点 G 等位基因频率升高可能是导致 pre-miR-146a 基因表达降低以及胆管癌发生发展的危险因素。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(8):1067-1071]

## 关键词

胆管肿瘤; 微 RNAs; 多态性, 单核苷酸

中图分类号: R735.8

## Association of single nucleotide polymorphism of rs2910164 in pre-miR-146a sequence with cholangiocarcinoma

FAN Xiaojing, SHI Zhitao, SUN Xin

(Department of Surgical Oncology, Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

Corresponding author: FAN Xiaojing, Email: 1152188223@qq.com

## ABSTRACT

**Objective:** To investigate the relations of pre-miR-146a gene expression and its rs2910164 allelic polymorphism with cholangiocarcinoma.

**Methods:** In 70 specimens of cholangiocarcinoma tissues from bile duct cancer patients (cholangiocarcinoma group) and 39 specimens of bile duct tissues from cases with non-neoplastic bile duct diseases (control group), the single nucleotide polymorphism of rs2910164 in pre-miR-146a sequence and pre-miR-146a expression was determined by direct DNA sequencing and the quantitative PCR method, respectively. The relations

收稿日期: 2014-05-16; 修订日期: 2014-07-19。

作者简介: 樊晓静, 新疆医科大学附属自治区中医院副主任医师, 主要从事肿瘤外科方面的研究。

通信作者: 樊晓静, Email: 1152188223@qq.com

of different pre-miR-146a genotypes with its expression, and clinicopathological profiles and prognosis of cholangiocarcinoma were analyzed.

**Results:** The genotype distribution in cholangiocarcinoma group was significantly different from that in control group, which in the former showed that the ratio of GG and GC genotypes was significantly higher than that of CC genotype, and the frequency of G allele was significantly higher than that of C allele (both  $P < 0.05$ ). In control group, the pre-miR-146a expression level in cases with GG and GC genotypes was lower than that in cases with CC genotype, but the difference did not reach a statistical significance ( $P > 0.05$ ), while the pre-miR-146a expression level in cholangiocarcinoma tissues was significantly lower than that in the bile duct tissues from control group ( $P < 0.05$ ). Multiple logistic regression analysis showed that GG and GC genotypes were possibly the risk factors for bile duct cancer ( $P = 0.052$ ), and the further factor-stratified analysis showed that GG and GC genotypes were associated with the clinical stage and lymph node metastasis of the patients (both  $P < 0.05$ ). Survival analysis for the cholangiocarcinoma patients demonstrated that the survival rate in cases with GG and GC genotypes was lower than that in cases with CC genotype, but the difference had no statistical significance ( $P = 0.178$ ).

**Conclusion:** The increased frequency of G allele at rs2910164 in pre-miR-146a sequence may be responsible for pre-miR-146a gene under-expression and the risk factor for the occurrence and development of bile duct cancer.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(8):1067-1071]

**KEYWORDS** Bile Duct Neoplasms; MicroRNAs; Polymorphism, Single Nucleotide

**CLC number:** R735.8

胆管癌是胃肠道恶性肿瘤之一，约占消化道恶性肿瘤的 3%，目前其发病率有不断上升的趋势，且认为手术治疗效果不佳，患者预后差，5 年生存率不高<sup>[1]</sup>。因此寻找其特异性 miRNA 对于胆管癌的早期诊治具有重要意义<sup>[2]</sup>。有研究<sup>[3]</sup>显示 pre-miR-146a 的 rs2910164 位点存在 C-G 基因多态性，且因这一位点位于编码调控区，因而可能具有调控其转录或表达的作用。国外有该基因位点与胆管癌关系的相关报道<sup>[4]</sup>，但国内关于 pre-miR-146a 基因多态性及其表达与胆管癌关系的研究鲜有报道。因此，本研究分析了 70 例患者 pre-miR-146a 基因多态性与胆管癌的关系，并进一步分析不同基因型与其表达、胆管癌临床病理及其预后的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 临床标本采集** 研究对象为本院 2006 年 10 月—2010 年 9 月收治的手术切除胆管癌患者共计 70 例（胆管癌组），以及同期 39 例胆管非肿瘤性疾病患者的胆管组织（对照组）。纳入患者的平均年龄为（52.7 ± 9.4）岁；其中男 37 例，女

33 例；肝内胆管癌 41 例，肝外胆管癌 29 例（包括肝门部胆管癌 16 例和胆管中下段癌 13 例）；高分化腺癌 12 例，中分化腺癌 40 例，低分化腺癌 18 例；I 期 12 例，II 期 11 例，III 期 34 例，IV 期 13 例；有淋巴结转移 38 例，无淋巴结转移 32 例。其中包括根治性切除 47 例，姑息性切除 19 例，剖腹探查 4 例。

**1.1.2 实验试剂** 组织用蛋白酶 K 和 RNA 逆转录试剂购于中国 QiaGEN 公司；RNA 提取试剂 TRIzol 购于日本 Takara 公司；实时荧光定量 SYBR Green Mix 试剂购于美国 Thermo 公司；pre-miR-146a 引物由中国华大科技生物公司合成，其余相关试剂或缓冲液由实验中心提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因测序** 使用组织用蛋白酶 K 充分消化 10 mg 胆管癌及其癌旁正常组织后，使用酚氯仿法抽提并纯化全基因组 DNA。使用 PCR 引物（上游引物 5'-ATT TTA CAG GGC TGG GAC AG-3'；下游引物 5'-TCT TCC AAG CTC TTC AGC AG-3'）扩增 pre-miR-146a 产物，长度约为 227 bp，并将其电泳切胶和回收后送 Invitrogen 公司进行基因直接测序。

**1.2.2 表达检测** 本研究采用实时荧光定量 PCR

的方法测定 pre-miR-146a 的转录表达情况,具体方法为组织 TRIzol 低温匀浆后用氯仿抽提总 RNA,再使用 QiaGEN 公司的 RNA 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,再进行实时荧光 PCR 扩增并分析数据,将  $\beta$ -actin 作为内参。

**1.2.3 随访** 纳入的 70 例胆管癌患者均参加随访调查研究,在为期 3 年的随访中无失访者出现,随访率达 100%,通过门诊影像学等手段进行,随访内容主要为胆管癌患者的 3 年总生存情况,即肿瘤性死亡和患者生存情况。

### 1.3 统计学处理

Hardy-Weinberg 平衡检测用在线免费分析软件进行 (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>); SPSS 11.5 软件进行数据的统计学分析,计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,计量资料根据数据是否符合正态分布使用成组  $t$  检验或秩和检验,计数资料用  $\chi^2$  检验进行分析,Logistic 多元回归方法用于多因素归因分析,不同基因多态性组的生存率用 Kaplan-Meier 法,而组间生存率比较采用 Log-rank 检验进行,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 pre-miR-146a 基因型及其表达

通过在线软件分析,对照组基因型符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 ( $P = 0.66$ )。胆管癌组的 pre-miR-146a 基因型分布与对照组比较存在明显差异,前者表现为 GG 和 GC 基因型比例明显高于 CC 基因型,且 G 等位基因比例明显高于 C 等位基因,差异均有统计学意义 ( $P = 0.045$  和  $0.022$ ) (表 1)。

表 1 胆管癌组和对照组的 pre-miR-146a 基因型分布情况  
Table 1 The pre-miR-146a genotype distributions in cholangiocarcinoma group and control group

pre-miR-146a 基因型	胆管癌组 (n=70)	对照组 (n=39)	OR (95% CI)	P
CC	19 (44.1)	18 (63.3)	2.301 (1.012~5.228)	0.045
GG+GC	51 (55.9)	21 (36.7)		
等位基因			1.944 (1.097~3.444)	0.022
C	69 (25.8)	51 (37.8)		
G	71 (74.2)	27 (62.2)		

为进一步揭示此基因型差异是否与其表达量相关,对照组经过定量 PCR 检测发现 GG 和 GC 基因型人群 pre-miR-146a 的表达量低于 CC 基因型,但差异并无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 胆管癌组织中 pre-miR-146a 的表达量较对照组胆管组织明显降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。

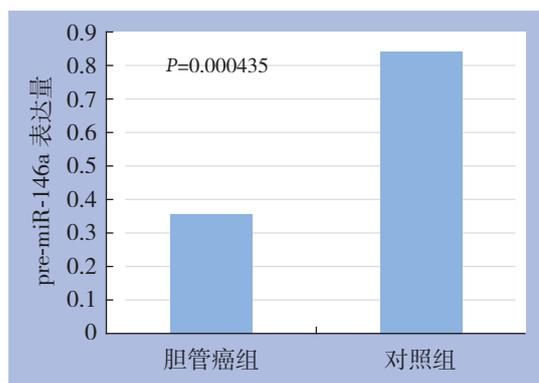


图 1 胆管癌组和对照组 pre-miR-146a 表达量比较  
Figure 1 Comparison of pre-miR-146a expression between bile duct cancer group and control group

### 2.2 pre-miR-146a 基因型与临床病理因素的关系

在以胆管癌试验组患者和正常胆管组织对照人群为因变量,和以年龄、性别和 pre-miR-146a 基因型为自变量的 Logistic 多元回归分析后发现,GG 和 GC 基因型可能是胆管癌的危险因素 ( $OR = 1.219$ ,  $95\% CI = 0.974 \sim 1.404$ ,  $P = 0.052$ ) (表 2)。对不同基因型的临床病理分层分析中发现,GG+GC 基因型患者的临床分期及淋巴结转移与 CC 基因型比较有差异统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

### 2.3 pre-miR-146a 基因型与胆管癌的临床预后

在为期 3 年的随访中,本研究发现 GG+GC 基因型患者的 3 年生存率和生存期分别为 25.5% 和  $(20.1 \pm 1.6)$  个月,而 CC 基因型患者为 42.1% 和  $(24.5 \pm 2.7)$  个月,但差异未达统计学意义 ( $P = 0.178$ ),不同基因型患者的预后生存曲线比较见图 2。

表 2 胆管癌相关危险因素的 Logistic 多元回归分析结果  
Table 2 Multivariate Logistic regression analysis for the risk factors associated with cholangiocarcinoma

自变量	$\beta$	Wald $\chi^2$	P	HR	95% CI
年龄	0.240	4.622	0.373	0.811	0.776~0.994
性别	0.366	7.011	0.465	1.743	0.198~3.177
pre-miR-146a 基因型	0.752	5.813	0.052	1.219	0.974~1.404

表 3 不同基因型胆管癌患者的临床病理分层分析  
Table 3 Factor-stratified analysis for cholangiocarcinoma patients with different genotypes

因素	GG+GC (n=51)	CC (n=19)	P
肿瘤部位			
肝内	31	10	0.538
肝外	20	9	
分化程度			
高	8	4	0.497
中	28	12	
低	15	3	
临床分期			
I/II	12	11	0.006
III/IV	39	8	
淋巴结转移			
有	33	5	0.004
无	18	14	

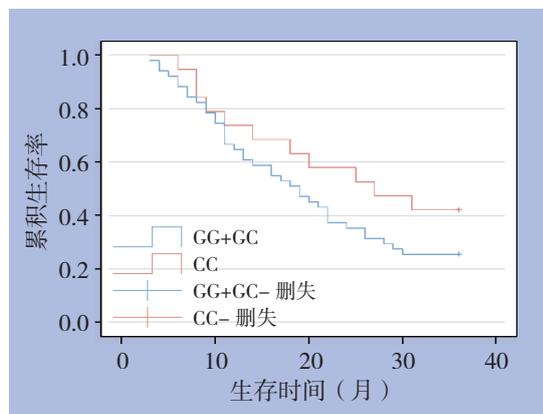


图 2 GG+GC 与 CC 基因型胆管癌患者的生存曲线比较  
Figure 2 Comparison of the survival curves between cholangiocarcinoma patients with GG+GC genotypes and CC genotype

### 3 讨论

目前已有报道显示 pre-miR-146a 在甲状腺、胰腺、胃及肝的恶性肿瘤中可能发挥重要生物学作用<sup>[5-8]</sup>，本研究主要探讨 pre-miR-146a 基因 rs2910164 位点多态性与胆管癌的相关性，并发现 pre-miR-146a 基因多态性与其表达相关，且在胆管癌患者中其表达量明显升高。再者，在进一步与临床病理及预后的分析中发现，GG 和 GC 基因型的 pre-miR-146a 可能是胆管癌发病危险因素，并且与临床分期和淋巴结转移相关，并且可能成为预测胆管癌患者 3 年临床预后的重要指标。

pre-miR-146a 基因多态性除与恶性肿瘤发生相关外，目前还认为可能与肿瘤转移等密切相关<sup>[9]</sup>。

已证实的 pre-miR-146a 的靶基因主要为表皮生长因子受体 (EGFR)<sup>[7]</sup>，是一种影响恶性肿瘤发生及转移的功能蛋白。EGFR 作为它的靶基因，已在前列腺癌中得到证明<sup>[10]</sup>，与本研究结果基本一致。EGFR 由于其在结构及功能上与其他某些癌基因极为相似，所以其可能通过如 ERK 信号通路等促进细胞增殖，且可激活核转录因子  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) 等，此细胞因子在恶性肿瘤中的重要功能已得到论证<sup>[11-12]</sup>。也有研究<sup>[13]</sup>发现 EGFR 可通过 ERK 及 p38 通路调节肿瘤转移相关的金属基质蛋白酶 9 (MMP-9)。同时，在胆管癌中也发现 EGFR 与其肿瘤进展密切相关<sup>[14]</sup>。因此，通过与基础研究实验结果进行比较，并结合本临床研究结果，可以得出 pre-miR-146a 基因多态性及其表达在病理及其预后方面的临床意义，可能是通过 EGFR 信号及其下游通路这一途径在胆管癌发生及转移中起重要作用。

由于本研究样本量较小，可能会涉及到研究结论可靠性的问题。但本研究初步揭示了 pre-miR-146a 基因多态性及其表达与胆管癌发生等的关系，并与临床病理及预后有关，同时结合基础研究提示了其基因多态性对胆管癌的影响可能是通过其表达与 EGFR 信号通路作用进而实现生物学功能的。目前对于 miRNA 与胆管癌的研究相对较少，但随着研究的不断深入，miRNA 在胆管癌诊断、治疗和预后预测方面的作用将会不断凸显，为临床诊疗胆管癌提供新的方法和依据。

### 参考文献

- [1] Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma[J]. *Semin Liver Dis*, 2004, 24(2):115-125.
- [2] Stutes M, Tran S, DeMorrow S. Genetic and epigenetic changes associated with cholangiocarcinoma: from DNA methylation to microRNAs[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(48):6465-6469.
- [3] Labbaye C, Testa U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2012, 5:13. doi: 10.1186/1756-8722-5-13.
- [4] Mihalache F, Hoblinger A, Acalovschi M, et al. A common variant in the precursor miR-146a sequence does not predispose to cholangiocarcinoma in a large European cohort[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Intm*, 2012, 11(4):412-417.
- [5] Wei WJ, Wang YL, Li DS, et al. Association between the rs2910164 polymorphism in pre-Mir-146a sequence and thyroid

- carcinogenesis[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56638.
- [6] Yu J, Li A, Hong SM, et al. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(4):981-992.
- [7] Zhou L, Zhao X, Han Y, et al. Regulation of UHRF1 by miR-146a/b modulates gastric cancer invasion and metastasis[J]. FASEB J, 2013, 27(12):4929-4939.
- [8] Xu T, Zhu Y, Wei QK, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(11):2126-2131.
- [9] Xu X, Yang X, Ru G, et al. miR-146a gene polymorphism rs2910164 and the risk of digestive tumors: A meta-analysis of 21 case-control studies[J]. Oncol Rep, 2014, 31(1):472-479.
- [10] Xu B, Wang N, Wang X, et al. MiR-146a suppresses tumor growth and progression by targeting EGFR pathway and in a p-ERK-dependent manner in castration-resistant prostate cancer[J]. Prostate, 2012, 72(11): 1171-1178.
- [11] Troiani T, Napolitano S, Vitagliano D, et al. Primary and acquired resistance of colorectal cancer cells to anti-EGFR antibodies converge on MEK/ERK pathway activation and can be overcome by combined MEK/EGFR inhibition[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(14):3775-3786.
- [12] Nottingham LK, Yan CH, Yang X, et al. Aberrant IKK  $\alpha$  and IKK  $\beta$  cooperatively activate NF- $\kappa$ B and induce EGFR/AP1 signaling to promote survival and migration of head and neck cancer[J]. Oncogene, 2014, 33(9):1135-1147.
- [13] Comincini S, Paolillo M, Barbieri G, et al. Gene expression analysis of an EGFR indirectly related pathway identified PTEN and MMP9 as reliable diagnostic markers for human glial tumor specimens[J]. J Biomed Biotechnol, 2009, 2009:924565. doi: 10.1155/2009/924565.
- [14] Clapéron A, Mergéy M, Nguyen Ho-Bouidoires TH, et al. EGF/EGFR axis contributes to the progression of cholangiocarcinoma through the induction of an epithelial-mesenchymal transition[J]. J Hepatol, 2014, 61(2):325-332.

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式: 樊晓静, 史志涛, 孙昕. pre-miR-146a 基因 rs2910164 位点单核苷酸多态性与胆管癌的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(8):1067-1071. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.011

**Cite this article as:** FAN XJ, SHI ZT, SUN X. Association of single nucleotide polymorphism of rs2910164 in pre-miR-146a sequence with cholangiocarcinoma[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(8):1067-1071. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.011

## 本刊 2015 年各期重点内容安排

本刊 2015 年各期重点内容安排如下, 欢迎赐稿。

- |                            |                           |
|----------------------------|---------------------------|
| 第 1 期 肝脏移植技术及肝脏外科          | 第 7 期 肝脏肿瘤基础与临床研究         |
| 第 2 期 胆道肿瘤及其外科治疗           | 第 8 期 胆道疾病及胆道外科           |
| 第 3 期 急性胰腺炎基础与临床研究         | 第 9 期 胰腺肿瘤及胰腺外科           |
| 第 4 期 胃肠道肿瘤及其转移癌的外科治疗      | 第 10 期 消化道肿瘤及胃肠外科疾病       |
| 第 5 期 乳腺、甲状腺肿瘤基础与临床研究      | 第 11 期 乳腺、甲状腺疾病外科治疗及内分泌外科 |
| 第 6 期 主动脉及外周血管疾病的腔内治疗与杂交治疗 | 第 12 期 血管外科及其他            |

中国普通外科杂志编辑部