

## MicroRNA 相关基因 Dicer rs1057035 多态性与脑胶质瘤的相关性研究

董发达, 马晓虎

咸阳市第一人民医院神经外科, 陕西 咸阳 712000

**摘 要:**目的 探讨陕西地区汉族人群中, Dicer 基因 rs1057035 多态性与脑胶质瘤的相关性。方法 200 例陕西地区脑胶质瘤患者作为病例组, 随机选择同期在我科住院治疗的非肿瘤疾病患者 184 例作为对照组, 收集所有入住患者相关临床资料, 并采用聚合酶链反应-限制性内切酶分析(PCR-RFLP)法检测 Dicer 基因 rs1057035 单核苷酸多态性。结果 病例组患者 Dicer 基因 rs1057035 位点等位基因 C 分布频率明显低于对照组( $\chi^2 = 5.137, P = 0.023$ )。分层分析, 携带突变等位基因 C 可降低酗酒者, 无肿瘤性疾病家族史者以及 III 型、IV 型胶质瘤患者发病风险( $OR = 0.253, 95\% CI 0.067 \sim 0.949, P = 0.036$ ;  $OR = 0.561, 95\% CI 0.339 \sim 0.930, P = 0.024$ ;  $OR = 0.525, 95\% CI 0.284 \sim 0.969, P = 0.037$ )。结论 Dicer 基因 rs1057035 多态性可能与脑胶质瘤遗传易感性相关。

**关键词:** MicroRNA 相关基因; Dicer; rs1057035; 胶质瘤; 单核苷酸多态性

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2018.02.011

## Association of the microRNA-related gene Dicer rs1057035 polymorphism and glioma

DONG Fa-da, MA Xiao-hu. Department of Neurosurgery, the First people's Hospital of Xianyang, Shanxi Xianyang, 712000

**Abstract:** **Objective** To investigate the association between the Dicer gene rs1057035 polymorphism and glioma in the Han Chinese population in Shaanxi Province, China. **Methods** A total of 200 patients with glioma in Shaanxi Province were enrolled as case group, and 184 patients without tumor diseases who were hospitalized and treated in our department during the same period of time were enrolled as control group. Their clinical data were collected, and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism was used to analyze the single nucleotide polymorphism of Dicer gene rs1057035. **Results** The case group had a significantly lower frequency of C allele of Dicer gene rs1057035 than the control group ( $\chi^2 = 5.137, P = 0.023$ ). The stratified analysis showed that Dicer rs1057035 C allele significantly reduced the risk of glioma in alcoholics (odds ratio [OR] = 0.253, 95% confidence interval [CI]: 0.067 - 0.949,  $P = 0.036$ ), patients without a family history of tumor disease ( $OR = 0.561, 95\% CI: 0.339 - 0.930, P = 0.024$ ), or patients with type III/IV glioma ( $OR = 0.525, 95\% CI: 0.284 - 0.969, P = 0.037$ ). **Conclusions** The Dicer rs1057035 polymorphism may be associated with the genetic susceptibility to glioma.

**Key words:** microRNA-related gene; Dicer; rs1057035; Glioma; Single nucleotide polymorphism

MicroRNA (miRNA) 是一类广泛存在于真核生物中的长度约 22 ~ 24 个核苷酸的非编码小 RNA, 目前研究认为其参与人体约 60% 蛋白质合成的调控, 在胚胎发育, 细胞分化、增殖、凋亡等诸多病理生理过程中均起到重要调节作用<sup>[1]</sup>。近年来, 还研究发现 miRNA 参与包括胶质瘤在内的多种肿瘤性疾病的发生发展过程<sup>[2-4]</sup>。Dicer 蛋白是一种细胞质核糖核酸内切酶, 属于 RNase III 家族中的一员, 可

将 pre-miRNA 剪切为成熟 miRNA, 是 miRNA 生成的关键酶之一。越来越多研究结果显示 Dicer 与恶性肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[5,6]</sup>。有荟萃分析结果显示 Dicer 基因 rs1057035 多态性与恶性肿瘤易感性密切相关<sup>[7]</sup>, 然而目前研究所涉及的恶性肿瘤主要包括膀胱癌、宫颈癌、乳腺癌、结直肠癌及肝癌等, 国内外关于 Dicer 基因 rs1057035 多态性与脑胶质瘤的相关性研究目前鲜有报道。因此, 本

收稿日期: 2107-12-22; 修回日期: 2018-03-05

作者简介: 董发达 (1983-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 脑血管、脑动脉瘤、胶质瘤。

研究推测 rs1057035 位点基因多态性与脑胶质瘤遗传易感性相关,通过比较 200 例脑胶质瘤患者和 184 例非肿瘤对照组患者 rs1057035 位点基因型和等位基因分布频率,探讨 rs1057035 基因多态性与脑胶质瘤的关系,为临床工作提供参考。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择 2015 年 1 月至 2017 年 1 月于我科住院治疗的脑胶质瘤患者作为病例组,所有脑胶质瘤患者诊断均经病理检查证实,且样本采集前未经过放化疗治疗,病例组共纳入 200 例患者,其中男性 111 例,女性 89 例,平均年龄(46.1±9.8)岁。随机选择同期在我科住院治疗的非肿瘤患者作为对照组,各项检查均排除合并有肿瘤性疾病可能,且无肿瘤家族史,对照组共纳入 184 例患者,其中男性 106 例,女性 78 例,平均年龄(45.8±9.3)岁。所有人组患者均为陕西汉族人,且彼此无血缘关系。本研究通过本院伦理委员会审核批准,所有人组成员均充分知情同意。

1.2 主要仪器和试剂

DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,引物为上海化工生物技术服务有限公司提供,PCR 仪及高速低温离心机均购自德国 Eppendorf 公司,垂直电泳槽购自北京六一仪器厂,紫外透射仪购自无锡君达仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 临床资料收集 采集内容主要包括患者年龄、性别、吸烟及酗酒史,放射线职业暴露史、肿瘤性疾病家族史等基本信息,病例组患者还需记录肿瘤 WHO 病理分级结果。本研究将吸烟定义为每天≥1 支香烟,持续≥3 个月;酗酒定义为每周至少 1 次饮乙醇≥60g,或每天饮乙醇≥20g,持续≥3 个月;放射线职业暴露史定义为从事接触放射线的相关工作≥1 年;肿瘤家族史定义为一级直系亲

属中存在恶性肿瘤患者。

1.3.2 基因多态性检测 采集清晨空腹时外周静脉血用于实验室检查,留取部分样本采用 DNA 提取试剂盒提取全血基因组 DNA。采用聚合酶链反应-限制性内切酶分析法检测 Dicer 基因 rs1057035 位点单核苷酸多态性。PCR 反应体系(25μL)包括:上、下游引物各 1μL(上游:5'-AGT-TAGGACTGCCGAAAG-3';下游:5'-GCAATGT-GAGACCGAATG-3'),模板 DNA 1μL,dNTP 混合物 2μL,TaqDNA 聚合酶 0.25μL,10×Buffer 2.5μL,其余部分由灭菌蒸馏水补足。反应条件:首先 95℃ 预变性 5min,然后按照 95℃ 变性 30s、58℃ 退火 30s、72℃ 延长 30s 的顺序循环 34 周期,最后 72℃ 延长 7min。取 0.5μL 延伸产物使用限制性内切酶 Hha I 进行酶切,酶切体系(20μL)包括:PCR 产物 17μL,10×Buffer 2μL 和内切酶 1μL,反应条件为 37℃ 16h,然后 65℃ 下酶切 10min 终止反应。取酶切产物进行电泳,紫外灯下观察并摄影。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件分析处理,本研究计量资料均符合正态分布及方差齐性的计量资料,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,计数资料结果以构成百分比(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。基因型分布采用 Hardy-Weinberg 平衡定律检验。采用比值比(Odd Ratio, OR)及其 95% 可信区间(Confidence Interval, CI)表示相对风险度。 $p < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基线资料比较

如表 1,病例组与对照组比较,两组在年龄,性别,吸烟,酗酒,放射线职业暴露史和肿瘤性疾病家族史等多项指标差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。

表 1 两组基线资料比较

组别	例数	年龄(岁)	男性[n(%)]	吸烟[n(%)]	酗酒[n(%)]	放射线职业暴露史[n(%)]	肿瘤性疾病家族史[n(%)]
病例组	200	46.1±9.8	111(55.5)	68(34.0)	27(13.5)	3(1.5)	20(10.0)
对照组	184	45.8±9.3	106(57.6)	76(41.3)	19(10.3)	2(1.1)	16(8.7)
$\nu\chi^2$		0.328	0.173	2.182	0.916	-	0.192
P		0.747	0.677	0.140	0.339	1.000*	0.661

\* Fisher 精确检验

2.2 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验结果

如图 1,Dicer 基因 rs1057035 位点基因型包括

TT,TC 和 CC 三种,本研究中两组患者 rs1057035 位点基因型分布经检验均符合 Hardy-Weinberg 遗传

平衡 ( $P > 0.05$ ), 具有群体代表性。

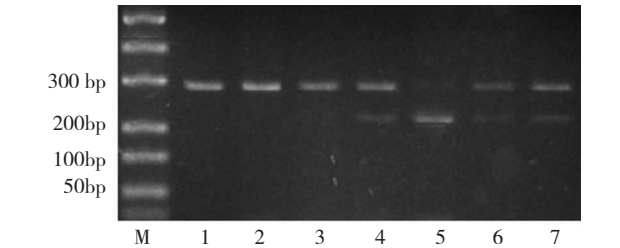


图 1 Dicer 基因 rs1057035 位点 PCR-RFLP 电泳图 (1, 2, 3: TT; 4, 6, 7: TC; 5: CC; M: maker)

2.3 Dicer 基因 rs1057035 多态性与脑胶质瘤易感性的关系

如表 2, 对照组与病例组比较, Dicer 基因 rs1057035 位点等位基因分布频率差异均具有统计学意义 ( $\chi^2 = 5.137, P = 0.023$ ), 但基因型分布频率差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 5.133, P = 0.077$ )。

2.4 分层分析

如表 3, 按照年龄、性别、吸烟分层, 各分层中

对照组与病例组在显性基因模型和隐性基因模型下差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ); 按照是否酗酒分层, 携带突变等位基因 C 可降低酗酒者胶质瘤发病风险 ( $OR = 0.253, 95\% CI 0.067 \sim 0.949, P = 0.036$ ); 按照有无肿瘤性疾病家族史分层, 携带突变等位基因 C 可降低无肿瘤性疾病家族史患者胶质瘤发病风险 ( $OR = 0.561, 95\% CI 0.339 \sim 0.930, P = 0.024$ ); 按照胶质瘤 WHO 分型分层, 携带突变等位基因 C 可降低 III 型、IV 型胶质瘤发病风险 ( $OR = 0.525, 95\% CI 0.284 \sim 0.969, P = 0.037$ )。

表 2 Dicer 基因 rs1057035 多态性与脑胶质瘤易感性的关系

	病例组 (n = 200)	对照组 (n = 184)	$\chi^2$	P
TT	161 (80.5)	130 (70.7)	5.133	0.077
TC	36 (18.0)	49 (26.6)		
CC	3 (1.5)	5 (2.7)		
T	358 (89.5)	309 (84.0)	5.137	0.023
C	42 (10.5)	59 (16.0)		

表 3 Dicer 基因 rs1057035 多态性与乳腺癌易感性的分层分析

项目	病例组			对照组			显性基因模型 (TT vs TC + CC)		隐性基因模型 (TT + TC vs CC)	
	TT	TC	CC	TT	TC	CC	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
年龄										
≤45 岁	87	19	0	53	19	2	0.551 (0.271 ~ 1.119)	0.097	0.973 (0.937 ~ 1.011)	0.168
>45 岁	74	17	3	67	30	3	0.549 (0.288 ~ 1.047)	0.067	1.066 (0.210 ~ 5.417)	0.939
性别										
男	90	19	2	74	30	2	0.540 (0.287 ~ 1.014)	0.053	0.954 (0.132 ~ 6.899)	0.963
女	71	17	1	56	19	3	0.645 (0.316 ~ 1.319)	0.228	0.284 (0.029 ~ 2.789)	0.251
吸烟										
是	52	15	1	51	24	1	0.628 (0.300 ~ 1.311)	0.214	1.119 (0.069 ~ 18.249)	0.937
否	109	21	2	79	25	4	0.575 (0.309 ~ 1.068)	0.078	0.400 (0.072 ~ 2.227)	0.280
酗酒										
是	22	5	0	10	8	1	0.253 (0.067 ~ 0.949)	0.036	0.947 (0.852 ~ 1.053)	0.228
否	139	31	3	120	41	4	0.652 (0.392 ~ 1.084)	0.098	0.710 (0.157 ~ 3.223)	0.656
肿瘤性疾病家族史										
有	14	5	1	10	6	0	0.714 (0.177 ~ 2.875)	0.635	1.053 (0.952 ~ 1.164)	0.364
无	147	31	2	120	43	5	0.561 (0.339 ~ 0.930)	0.024	0.366 (0.070 ~ 1.914)	0.216
WHO 分型										
I 型 + II 型	83	20	2	130	49	5	0.638 (0.362 ~ 1.125)	0.119	0.695 (0.132 ~ 3.647)	0.666
III 型 + IV 型	78	16	1				0.525 (0.284 ~ 0.969)	0.037	0.381 (0.044 ~ 3.307)	0.364

注:放射线职业暴露史患者例数较少, 分层分析未列出。

3 讨论

MiRNA 本身不编码蛋白质, 却可通过与靶 mRNA 3' 端非编码区结合, 直接降解靶 mRNA, 或抑制靶 mRNA 翻译过程, 从而参与蛋白质合成的调控, 有研究估计体内约 60% 蛋白质合成过程与 miRNA

相关<sup>[1]</sup>。近年来相继有研究发现 miRNA-221、miRNA-218、miRNA-16 等多种 miRNA 与胶质瘤遗传易感性相关<sup>[2,4,8]</sup>。miRNA 相关单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是指一系列与 miRNA 生成、成熟及发挥作用相关的 SNPs, 包括 miR-

NA 核酸序列 SNP, miRNA 生物合成酶 SNP 和 miRNA 结合位点 SNP 三大类别<sup>[9,10]</sup>, Dicer 基因 SNPs 均属于 miRNA 生物合成酶 SNP。

Dicer 酶是 miRNA 成熟的关键酶之一, Dicer 酶表达异常可直接影响 miRNA 生理功能发挥。既往多数研究均认为 Dicer 是一种抑癌因子, 多种恶性肿瘤患者被发现存在 Dicer 表达下降, 然而有研究发现前列腺癌和 Burkitt's 淋巴瘤患者 Dicer 基因表达上调<sup>[11,12]</sup>。同样, 在研究 Dicer 与恶性肿瘤预后之间关系时也得到相似结论, 黑色素瘤和结直肠癌患者预后不佳可能与 Dicer 高表达相关, 而乳腺癌患者预后不佳可能与 Dicer 低表达相关<sup>[13,14]</sup>。笔者分析认为这些研究结果提示针对不同部位肿瘤性疾病与 Dicer 关系有必要分别进行探讨。

Dicer 基因 rs1057035 位点突变广泛存在亚洲人群中, 既往研究发现该位点多态性与多种恶性肿瘤易感性相关, Yu 等<sup>[7]</sup>一项纳入 12675 例患者的荟萃分析结果显示 rs1057035 多态性与恶性肿瘤易感性密切相关, 携带 Dicer 基因 rs1057035 位点等位基因 C 可降低肿瘤性疾病发病风险, 然而目前尚缺乏 rs1057035 多态性与胶质瘤相关性的研究报告。本研究发现 Dicer 基因 rs1057035 位点等位基因 C 在对照组人群中分布频率为 16%, 与既往研究相似。本研究结果还显示病例组与对照组比较, rs1057035 位点等位基因分布频率差异均具有统计学意义, 携带突变等位基因 C 可降低胶质瘤患病风险。本研究进一步按照年龄, 性别, 吸烟, 酗酒, 肿瘤性疾病家族史和胶质瘤 WHO 分型进行分层, 分别探讨与胶质瘤易感性的关系, 结果提示携带突变等位基因 C 可降低酗酒者、无肿瘤性疾病家族史患者胶质瘤发病风险, 也可降低发生Ⅲ型、Ⅳ型胶质瘤发病风险, 但其中具体机制目前尚不清楚, 可能在于本研究纳入患者例数较少, 期待后期大样本研究加以验证。

综上所述, Dicer 基因 rs1057035 多态性可能与胶质瘤易感性密切相关, 等位基因 C 可降低胶质瘤发病风险, 但本研究纳入对象有限, 需要更多相关研究结果验证。另外, 关于 Dicer 在肿瘤性疾病中发挥功能的具体机制, rs1057035 位点与其他 SNPs 相互作用等问题也期待后续进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(6):321-333.
- [2] Tu Y, Gao X, Li G, et al. MicroRNA-218 inhibits glioma invasion, migration, proliferation, and cancer stem-like cell self-renewal by targeting the polycomb group gene Bmi1 [J]. Cancer Res, 2013, 73(19):6046-6055.
- [3] Yang TQ, Lu XJ, Wu TF, et al. MicroRNA - 16 inhibits glioma cell growth and invasion through suppression of BCL2 and the nuclear factor- $\kappa$ B1/MMP9 signaling pathway [J]. Cancer Sci, 2014, 105(3):265-271.
- [4] Palumbo S, Miracco C, Pirtoli L, et al. Emerging roles of microRNA in modulating cell-death processes in malignant glioma [J]. J Cell Physiol, 2014, 229(3):277-286.
- [5] Heravi-Moussavi A, Anglesio MS, Cheng SW, et al. Recurrent somatic DICER1 mutations in nonepithelial ovarian cancers [J]. N Engl J Med, 2012, 366(3):234-242.
- [6] Anglesio MS, Wang Y, Yang W, et al. Cancer-associated somatic DICER1 hotspot mutations cause defective miRNA processing and reverse-strand expression bias to predominantly mature 3p strands through loss of 5p strand cleavage [J]. J Pathol, 2013, 229(3):400-409.
- [7] Yu YY, Kuang D, Yin XX. Association between the DICER rs1057035 polymorphism and cancer risk: evidence from a meta-analysis of 1,2675 individuals. [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(1):119-124.
- [8] 付胜伟. 微小分子 RNA 在胶质瘤中的研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2012, 39(4):373-376.
- [9] 刘于海, 牛朝诗. MicroRNA 与胶质母细胞瘤的相关性研究 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2009, 36(5):412-416.
- [10] Rah H, Jeon YJ, Lee BE, et al. Association of polymorphisms in microRNA machinery genes (DROSHA, DICER1, RAN, and XPO5) with risk of idiopathic primary ovarian insufficiency in Korean women [J]. Menopause, 2013, 20(10):1067-1073.
- [11] Kurzynskakokorniak A, Koralewska N, Pokornowska M, et al. The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(9):4365-4380.
- [12] Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, et al. Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 2007, 67(5):2345-2350.
- [13] Jafarnejad SM, Ardekani GS, Ghaffari M, et al. Sox4 Mediated Dicer Expression is Critical for Suppression of Melanoma Cell Invasion [J]. Oncogene, 2013, 32(17):2131-2139.
- [14] Michael S, Marina S, Daniel S, et al. Comparative microarray analysis of microRNA expression profiles in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases, and benign melanocytic nevi [J]. Cell Tissue Res, 2013, 351(1):85-98.