· 流行病学研究 ·

人微小 RNAs 成熟体多态与鼻咽癌易感性关系*

丘福满, 杨小蓉, 杨荣荣, 吕嘉春

摘　要: 目的　探讨 hsa-miR-499 (miR499) 和 hsa-miR-608 (miR608) 成熟体常见单核苷酸多态位点 (rs3746444 T→C 和 rs4919510 C→G) 的遗传变异与中国南方人群鼻咽癌发病关系。**方法**　采用病例对照研究方法, 收集原发性鼻咽癌患者 612 例和正常对照 612 人, 采用 TaqMan 技术检测 miR499 和 miR608 成熟体单核苷酸多态 (rs3746444 T→C 和 rs4919510 C→G) 基因型, 运用 SAS 9.13 软件进行非条件 logistic 回归分析, 校正混杂因素影响, 分析基因多态与鼻咽癌发病关系。**结果**　以 rs3746444 TT 基因型为参照, 携带变异基因型 (TC + CC) 的个体发生鼻咽癌危险增加 44% (OR = 1.44, 95% CI = 1.13 ~ 1.82); 而携带 rs4919510 (GC + GG) 基因型个体发生鼻咽癌风险是携带 rs4919510 CC 基因型的 1.58 倍 (OR = 1.58, 95% CI = 1.21 ~ 2.07); 且 rs3746444 C 和 rs4919510 G 变异的等位基因个数与鼻咽癌发病风险均存在明显剂量反应关系 (P < 0.01)。**结论**　人 miR499 (rs3746444 T→C) 和 miR608 (rs4919510 C→G) 成熟体遗传变异可明显增加南方人群鼻咽癌发病风险。

关键词: hsa-miR-499; hsa-miR-608; 单核苷酸多态; 鼻咽癌

中图分类号: R 181.3+3　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2013)07-0957-04　DOI: 10.11847/zgggws2013-29-07-06

Association between genetic variations in mature region of microRNAs and risk of nasopharyngeal carcinoma

QIU Fu-man, YANG Xiao-rong, YANG Rong-rong, et al. (*Institute for Chemical Carcinogenesis, State Key Lab of Respiratory Disease, Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong Province* 510182, China)

Abstract: Objective　To investigate the association between the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of hsa-miR-499 (miR499) and hsa-miR-608 (miR608) and the risk of nasopharyngeal carcinoma (NPC) in southern Chinese population. **Methods**　A hospital-based case-control study was conducted among 612 patients with NPC and 612 healthy controls, and the SNPs in mature region of miR499 and miR608 of the participants were genotyped by TaqMan assays. SAS 9.13 software was used to analyze the association between the miR499 as well as miR608 polymorphism and the susceptibility of NPC. **Results**　The distribution frequencies of genotype of miR499 (rs3746444 T→C) and miR608 (rs4919510 C→G) were significantly different between the cases and controls ($P = 2.50 \times 10^{-4}$ and 2.71×10^{-4}, respectively). Compared with homozygous genotype (rs3746444 TT), the risk for NPC was increased by 44% in the carriers of variant genotypes (rs3746444 TC + CC) (adjusted odd ratio [OR] = 1.44, 95% confidence interval [95% CI]: 1.13 – 1.82). And the carriers of the rs4919510 (GC + GG) genotypes had a 1.58 fold risk of NPC compared to those of the rs4919510CC genotype (adjusted OR = 1.58, 95% CI = 1.21 – 2.07). There was a significantly increased trend in the risk for NPC along with the increased number of variant C allele of rs3746444 as well as variant G allele of rs4919510 ($P_{trend} = 2.0 \times 10^{-4}$ and P = 0.0001, respectively). **Conclusion**　The findings demonstrate that miR499 (rs3746444 T→C) and miR608 (rs4919510 C→G) polymorphisms may contribute to an increased risk of NPC.

Key words: hsa-miR-499; hsa-miR-608; single nucleotide polymorphism; nasopharyngeal carcinoma

鼻咽癌是一种头颈部上皮来源的恶性肿瘤, 好发于中国南方地区, 起病隐匿, 转移早, 易复发, 严重危害人类生命健康[1]。研究认为鼻咽癌发病与爱波斯坦 – 巴尔病毒 (Epstein Barr virus, EBV) 感染、环境因素以及遗传因素密切相关[2]。微小 RNA (microRNA, miRNAs) 是一类内源性非编码小 RNA, 由 21 ~ 24 个核苷酸组成, 参与重要的生物学过程, 与肿瘤发生密切相关[3-4]。研究显示, miRNAs与鼻咽癌发生亦存在密切关联[5]。为探讨鼻咽癌病因, 本研究采用病例对照方法和分子生物学检测手段, 分析了 miR499 和 miR608 成熟体的遗传变异与中国南方人群鼻咽癌发病风险关系。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　对象　收集 2010 年 5 月—2011 年 5 月广州医学院附属肿瘤医院和广州医学院第一附属医院的原发性鼻咽癌病例, 共 612 例, 其中男 368 例, 女 244 例, 年龄 16 ~ 93 岁, 平均 (54.2 ± 10.2) 岁。按性别相同、年龄 (± 3 岁) 进行匹配, 从参加社区健康体检的人群中选取 612 名对照。其中男性 364 人, 女性 248 人, 年龄 18 ~ 85 岁, 平均 (55.1 ± 11.3) 岁。纳入和排除标准: 病例为经组织病理学检查确诊, 尚未

* **基金项目**: 国家自然科学基金 (81072366); 广东省自然基金 (8251018201000005); 广东省高等学校高层次人才项目 (2010 – 79)

作者单位: 广州医科大学化学致癌研究所 呼吸疾病国家重点实验室, 广东 广州 510182

作者简介: 丘福满 (1984 –), 男, 广东清远人, 硕士, 研究方向: 肿瘤分子流行病学。

通讯作者: 吕嘉春, E-mail: jcLu@gzhmc.edu.cn

进行化疗或放疗的原发性鼻咽癌病例。该研究经广州医学院伦理委员会同意,且调查之前被调查者签署知情同意书。

1.2　问卷调查及标本收集　采用自行编制的流行病学问卷,调查内容包括人口学基本资料、吸烟、饮酒、癌症家族史、EBV 病毒感染等项目。由经统一培训的调查员,在鼻咽癌病例确诊后的 1 周内进行面对面访谈,询问并填写有关项目;亦以相同的调查方式收集对照组资料,并随机抽取 5% 病例和对照进行复查,以保证问卷质量。抽取调查对象 5 mL 血液用于 DNA 提取及基因分型检测。

1.3　基因分型

1.3.1　DNA 提取　用 TianGen 公司的 0.1 ~ 20 mL 血液基因组 DNA 提取试剂盒(DP319 - 02),取 2 mL 抗凝外周血,依其说明书提取研究对象的基因组 DNA。

1.3.2　SNP 位点选择　以 GenBank 和 miRbase (version 16.0)生物信息学数据库为基础,按照较少等位基因频率(minor allele frequency, MAF)不小于 5% 原则,发现在中国人群中位于 miRNAs 成熟体的单核苷酸多态位点只有 hsa-miR-499(rs3746444 T→C)和 hsa-miR-608(rs4919510 C→G)。因此选取这 2 个位点进行分析。

1.3.3　TaqMan 基因型检测方法　利用 Primer Express 3.0 软件(Applied Biosystems, USA) 设计所选取多态位点的引物和 MGB 荧光探针序列,委托 ABI 公司合成和校验(rs3746444 T→C 引物 F: GGCTGTTAAGACTTGCAGTGATGT, R: ACGGGAAGCAGCACAGACTT;探针 P1: FAM-CACGTGAACTTCACAG-MGB, P2: HEX-CACGTGAACCTCACAG-MGB;rs4919510 C→G 引物 F: TCCCCAGCCCCATTTTCT, R: AAGATCCACTGGGCCAAGGT;探针 P1: FAM-TAAACGGAGCTGTCC-MGB, P2: HEX-TAAACGCAGCTGTCC-MGB)。PCR 反应体积为 10 μL,内含约 200 ng 的 DNA 1 μL, Master mix 5 μL, 上下游引物与探针各 0.1 μL, ddH_2O 3.6 μL。在 PCR 基因扩增仪(Applied Biosystems 2720)上进行 PCR 扩增,扩增条件为 95℃ 预热 10 min, 95 ℃变性 15 s, 60 ℃退火延伸 60 s, 共 45 个循环。用 Applied Biosystems 7500 仪器上的基因分型程序判断每个检测样本基因型。

1.4　测序验证　用随机数字表法抽取病例和对照组各 30 例样本,以测序引物(rs3746444 T→C 引物 F: CTTCACTTCCCTGCCAAATCC, R: GCCCACAGAGCGACATTCC;rs4919510 C→G 引物 F: AGCATCAGCCCTTTCCAG, R: CCAGCAGCATCAACTTCAC)进行普通 PCR 扩增,扩增产物送Invitrogen公司测序,以验证 TaqMan 检测结果真实性与准确性。

1.5　统计分析　运用 SAS 9.13 软件进行两独立样本 t 检验, χ^2 检验,并对所研究位点基因型在对照组中的分布进行 Hardy-Weinberg 平衡检验;非条件 logistic回归分析多态位点与人群发生鼻咽癌关联。*OR* 值及 95% *CI* 表示关联强度; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　研究对象基本特征　鼻咽癌病例按临床分期, Ⅰ期 25 例(4.0%), Ⅱ期 157 例(25.7%), Ⅲ期 258 例(42.2%), Ⅳ期 172 例(28.1%);EBV 病毒感染阳性 393 例(64.2%),阴性 184 例(30.1%),不详 35 例(5.7%)。性别、年龄、吸烟、饮酒和癌症家族史等因素在病例与对照 2 组之间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 基因型判断及验证(图 1)　应用 TaqMan 技术检测研究对象的多态位点基因型,随机抽取的 60 例样本经测序验证,证实其基因型与 TaqMan 方法检测结果一致,表明 TaqMan 检测方法准确可靠。

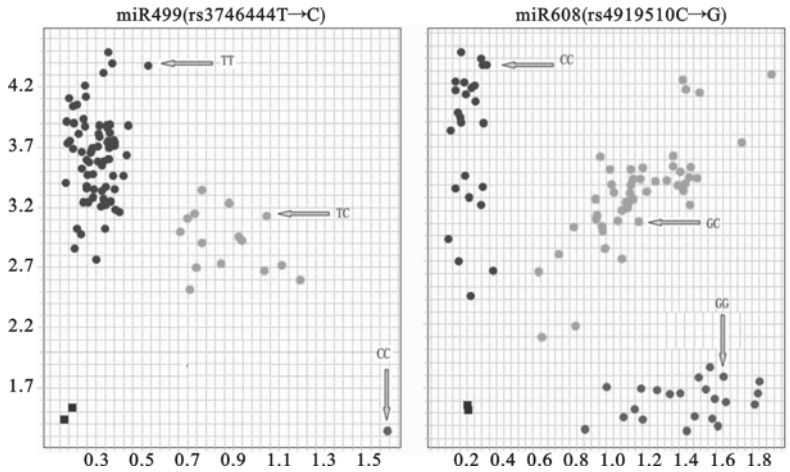

图 1　miR499(rs3746444 T→C)和 miR608(rs4919510 C→G)多态位点基因分型图

中国公共卫生 CPH

2.3　基因型频率分布与鼻咽癌发病的关联(表 1)　miR499(rs3746444 T→C)和 miR608(rs4919510 C→G)各基因型频率在病例与对照组之间差异具有统计学意义($P<0.01$)。多因素非条件logistic 回归分析显示,以 rs3746444 TT 基因型为参照,携带 rs3746444 C 变异基因型(TC + CC)个体发生鼻咽癌的危险增加 44%($OR=1.44$, 95% $CI=1.13\sim1.82$);而携带 rs4919510(GC + GG)基因型个体发生鼻咽癌的风险是携带 CC 基因型的 1.58 倍($OR=1.58$, 95% $CI=1.21\sim2.07$);有明显剂量-效应关系($P<0.01$)。

表 1　miR499 和 miR608 基因型频率分布与鼻咽癌风险性

单核苷酸多态位点	基因型	病例		对照[a]		P 值	粗 OR 值(95% CI)	校正 OR[b] 值(95% CI)
		例数	%	例数	%			
miR499:rs3746444(T→C)	TT	402	65.7	449	73.3		1.00	1.00
	TC	163	26.6	145	23.7		1.26(0.97~1.63)	1.27(0.98~1.61)
	CC	47	7.7	18	3.0		2.92(1.70~5.00)	2.91(1.69~4.97)
	组间 P 值					$P<0.01$		
	加性模型					$P<0.01$[c]	1.46(1.19~1.77)	1.45(1.19~1.76)
	C 等位基因	257	21.0	182	14.8	$P<0.01$		
	TC + CC	210	34.3	163	26.7		1.44(1.13~1.84)	1.44(1.13~1.82)
miR608:rs4919510(C→G)	CC	124	20.3	176	28.7		1.00	1.00
	GC	308	50.3	304	49.7		1.44(1.09~1.90)	1.44(1.08~1.89)
	GG	180	29.4	132	21.6		1.94(1.41~2.67)	1.95(1.42~2.67)
	组间 P 值					$P<0.01$		
	加性模型					$P<0.01$[c]	1.39(1.18~1.63)	1.39(1.18~1.62)
	G 等位基因	668	54.6	568	46.4	$P<0.01$		
	GC + GG	488	79.7	214	71.3		1.59(1.22~2.07)	1.58(1.21~2.07)

注:a 对照组各基因型频率符合 Hardy-Weinberg 平衡(miR499:$\chi^2=2.194$, $P=0.139$;miR608:$\chi^2=0.0012$, $P=0.973$);b 校正因素包括年龄、性别、吸烟、饮酒和癌症家族史;c 趋势性检验 P 值。

3　讨　论

鼻咽癌是中国南方及东南亚地区常见的一种恶性肿瘤,其发生发展是一个多因素、多阶段、多步骤遗传变异积累的复杂过程。目前鼻咽癌发病的分子遗传机制仍未完全阐明。miRNAs 是一类内源性非编码小 RNA,通过与靶基因信使 RNA 3′非翻译区(3′-untranslated region, 3′-UTR)的互补配对,降解靶信使 RNA 或者抑制其翻译过程,调节靶基因表达水平。大量研究发现 miRNAs 参与了细胞生长、分化、增殖、凋亡等多种生物学过程,尤其在肿瘤发生发展过程中扮演了重要角色,起着癌基因或抑癌基因的类似功能[3-4]。miRNAs 成熟体的遗传变异,包括单核甘酸多态性可影响其加工过程及对靶基因的结合,引起不同生物学效应[6]。研究表明 miRNAs 单核苷酸多态与肺癌、乳腺癌等肿瘤的发生及预后密切关联[7-9]。miRNAs 在鼻咽癌发生发展及转移等过程亦起着重要作用[10]。Deng 等人报道了 miR216 通过调节靶基因基尔斯滕大鼠肉瘤病毒癌基因(v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS)的蛋白表达水平而抑制鼻咽癌肿瘤细胞生长及转移[10]。本研究结果显示 miR499(rs3746444 T→C)和 miR608(rs4919510 C→G)的遗传变异均可增加鼻咽癌发病危险,与凌晓璇等[7]结果一致,推测这 2 个位点可能是通过影响与鼻咽癌发病相关基因表达,进而促进鼻咽癌发生,但具体肿瘤生物学机制需通过功能学实验进一步验证。

综上所述,miR499(rs3746444 T→C)和 miR608(rs4919510 C→G)多态与南方人群鼻咽癌发病风险存在关联,为鼻咽癌易感人群的筛选提供了一个潜在的遗传标志。但本研究是基于医院的病例对照研究,所获关联结果仍需在多种族、大样本人群中去验证。

参考文献

[1] Chin D, Boyle GM, Porceddu S, et al. Head and neck cancer: past, present and future[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2006, 6(7): 1111-1118.

[2] Deyrup AT. Epstein-Barr virus-associated epithelial and mesenchymal neoplasms[J]. Hum Pathol, 2008, 39(4): 473-483.

[3] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4): 259-269.

[4] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435(7043): 834-838.

中国公共卫生 CPH

[5] Li T, Chen JX, Fu XP, et al. microRNA expression profiling of nasopharyngeal carcinoma [J]. Oncol Rep, 2011, 25 (5): 1353 – 1363.
[6] Duan R, Pak C, Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA[J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(9): 1124 – 1131.
[7] 凌晓璇, 黎银燕, 杨磊, 等. 肺癌与人微小 RNA miR-499-3p 种子序列遗传变异关系[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(9): 1105 – 1107.
[8] Hu Z, Chen J, Tian T, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival[J]. J Clin Invest, 2008, 118(7): 2600 – 2608.
[9] 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.
[10] Deng M, Tang H, Zhou Y, et al. miR-216b suppresses tumor growth and invasion by targeting KRAS in nasopharyngeal carcinoma[J]. J Cell Sci, 2011, 124(Pt 17): 2997 – 3005.

收稿日期: 2012 – 03 – 26　　(解学魁编校)

· 流行病学研究 ·

基于中医理论胃癌生活质量评价量表研制*

杨铮[1], 陆金根[2], 花永强[2], 尤圣富[2], 万崇华[3], 郑培永[2], 宋毅[2], 柳涛[2]

摘　要: 目的　研制基于中医理论的恶性肿瘤生活质量评价体系之胃癌量表 QLASTCM-Ga 并对其测量学特性进行评价。**方法**　采用程序化决策方式(议题小组和核心小组)和量表开发理论分别研制共性模块与特异模块, 二者结合形成量表, 并通过 240 例胃癌患者生命质量测定对量表的测量学特性(信度、效度、反应度)进行评价, 采用相关分析、因子分析及配对 t 检验等进行统计分析。**结果**　该量表及各领域的重测信度在为 0.90 ~ 0.94, 各领域内部一致性 α 值为 0.86 ~ 0.93; 相关分析与因子分析显示较好的结构效度; 与 QLQ-STO 52 为效标的效标关联效度较好; 已知组比较显示较好的临床效度; 治疗后各领域及总量表得分均有统计学意义, 且标准化反应均数 SRM 与 QLQ-STO 52 接近。**结论**　QLASTCM-Ga 具有较好的信度、效度及一定的反应度, 可用于胃癌患者的生命质量测定。

关键词: 胃癌; 生命质量; 量表; 测量学特性
中图分类号: R 181.2　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2013)07-0960-05　DOI: 10.11847/zgggws2013-29-07-07

Development of quality of life assessment instrument for gastric cancer patients (QLASTCM-Ga) based on traditional Chinese medicine

YANG Zheng*, LU Jin-gen, HUA Yong-qiang, et al. (* *Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong Province* 523808, China)

Abstract: Objective　To develop a quality of life assessment scale for gasric cancer patients (QLASTCM-Ga) based on traditional Chinese medicine and to evalucte its psychometric property. **Methods**　The structured group method (nominal group and focus group) and the theory in developing rating scale were employed to establish the general and the specific module, respectively. The full instrument was formed by combination of two modules and psychometric properties (reliability, validity, and responsiveness) were evaluated by quality of life (QOL) data measured in 240 gastric cancer patients. Statistical methods used were correlation analysis, factor analysis and paired t test. **Results**　Test-retest reliability of the overall scale and all domains were from 0.90 to 0.94, and internal consistency α were from 0.86 to 0.93. Correlation and factor analyses demonstrated that the scale was good in construct validity and known-group comparisons displayed a good clinical validity of the scale. Criterion-related validity was confirmed wtih European Organization for Research and Treatment of Cancer-Quality of Life Questionnaire-Stomach Cancer (QLQ-STO 52) as the criterion. Statistically significant changes were found for each domain and the overall scale, with the standardized response means (SRMs) being close to those of QLQ-STO 52. **Conclusion**　The QLASTCM-Ga could be used to measure QOL for patients with gastric cancer with good validity, reliability, and reasonable responsiveness.

Key words: gastric cancer; quality of life; instrument; psychometric property

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤, 是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一[1-2]。据 2000 年资料统计, 全球每年新发胃癌 876 000 例, 占所有新发癌症病例的 9%, 仅次于肺癌、乳腺癌和肠癌, 位居第 4 位; 每年约有 647 000 人因胃癌死亡, 位居癌症死因的第 2 位, 仅次于肺癌, 其中中国胃癌位于恶性肿瘤死因顺位的第 3 位[1-2]。胃癌患者最常见的主诉是上

* **基金项目**: 国家重点基础研究发展"973"计划(2006CB504604); 广东省高等学校人才引进专项资金(GK1003); 广东医学院校级重点学科经费(XZ1105)
作者单位: 1. 广东医学院公共卫生学院流行病与卫生统计教研室, 广东 东莞 523808; 2. 上海中医药大学附属龙华医院; 3. 广东医学院人文与管理学院
作者简介: 杨铮(1974 –), 女, 云南个旧人, 副教授, 硕士, 主要从事流行病学与卫生统计学工作。
通讯作者: 郑培永, E-mail: zpychina@ sina. com