

RTN4 基因 rs2864052 和 rs6545468 与广西壮族 人群鼻咽癌易感性相关研究*

覃海媚¹ 王荣¹ 韦贵将¹ 韦宝斌¹ 韦叶生¹ 王俊利¹

[摘要] 目的:研究 RTN4 多态性 rs2864052 和 rs6545468 位点及其单倍型与广西壮族人群鼻咽癌易感性相关关系。方法:运用单碱基延伸 PCR 技术和 DNA 测序法对广西壮族 282 例鼻咽癌患者(鼻咽癌组)和 199 例健康体检者(对照组)的 RTN4 基因 rs2864052 和 rs6545468 位点进行基因分型,并分析 RTN4 基因的单倍型频率。结果:RTN4 基因 rs2864052 存在 AA、GA、GG 三种基因型和 A、G 等位基因,其在鼻咽癌组与对照组中的基因型、等位基因频率的分布差异无统计学意义;rs6545468 位点存在 CC、GC、GG 三种基因型和 C、G 等位基因,其在鼻咽癌组与对照组中的基因型、等位基因频率的分布差异亦无统计学意义。但单倍型分析发现鼻咽癌组单倍型 AG 频率显著低于对照组($P=0.004, OR=0.14, 95\%CI$ 为 $0.31-0.68$)。结论:RTN4 基因多态性 rs2864052 和 rs6545468 位点的单倍型 AG 可降低广西壮族人群个体鼻咽癌易感性。

[关键词] 鼻咽肿瘤;RTN4 基因;多态性;单倍型

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2016.24.010

[中图分类号] R739.63 **[文献标志码]** A

Association of RTN4 gene rs2864052 and rs6545468 with the susceptibility of nasopharyngeal carcinoma in Guangxi Zhuang population

QIN Haimei WANG Rong WEI Guijiang WEI Baobin WEI Yesheng WANG Junli

(Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi, 533000, China)

Corresponding author: WANG Junli, E-mail: 13907768146@163.com

Abstract Objective: To study the relationship of the polymorphism of RTN4 gene rs2864052 and rs6545468 and haplotype with the susceptibility of nasopharyngeal carcinoma in Guangxi Zhuang population. **Method:** The polymorphism of Nogo gene (rs2864052, rs6545468) and haplotype were analyzed using the method of single-base extension PCR and DNA sequencing in 282 cases of nasopharyngeal carcinoma (NPC) and 199 healthy persons (control group) in Guangxi Zhuang Autonomous Region. **Result:** There were no differences between the NPC patients and controls in the genotype and allele frequencies of RTN4 gene rs2864052 site, or rs6545468 site. The frequency of AG haplotype in the NPC patients was significantly lower than in the controls ($P=0.004, OR=0.14, 95\% CI=0.31-0.68$). **Conclusion:** The haplotype AG of RTN4 gene rs2864052 and rs6545468 sites may reduce the risk of nasopharyngeal carcinoma in Guangxi Zhuang population.

Key words nasopharyngeal neoplasms; RTN4 gene; polymorphism; haplotype

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma)是一种上皮源性的头颈部恶性肿瘤,具有明显的地理分布和民族倾向,高发于中国南部。经流行病学资料表明,鼻咽癌是由遗传因素、生活环境、年龄等多种因素相互作用而诱导的疾病,其中遗传因素在鼻咽癌发病机制中起重要作用,鼻咽癌遗传易感基因成为鼻咽癌遗传机制研究的热点^[1-2]。RTN4 基因是一种轴索生长抑制因子,属于网状蛋白家族成员之一,有研究表明 RTN4 基因在肿瘤的发生发展中扮演重要角色,尤其是参与炎症调控及介导肿瘤细

胞凋亡和迁移等生物学特性,有望成为肿瘤诊治的新靶点^[3-4]。目前 RTN4 基因及其单核苷酸多态性与鼻咽癌发生发展的研究较少。因此,本研究通过单碱基延伸 PCR 技术和 DNA 测序法,检测广西壮族鼻咽癌患者和健康体检者的 RTN4 基因多态性 rs2864052 和 rs6545468 位点基因型和等位基因频率,探究 RTN4 基因单核苷酸多态性与广西壮族人群鼻咽癌易感性的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

2014-04-01—2015-04-01 在我院就诊的鼻咽癌患者 282 例(鼻咽癌组),男 164 例,女 118 例;年龄 24~92 岁,平均(50.94±13.38)岁;均符合以下标

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81560461)
¹ 右江民族医学院附属医院检验科(广西百色,533000)
通信作者:王俊利, E-mail: 13907768146@163.com

准:三代及以上世居广西壮族人群,病理确诊为鼻咽癌,未进行放疗或化疗。对照组 199 例,男 118 例,女 81 例;年龄 25~86 岁,平均(54.02±14.57)岁;均为健康体检者,无慢性鼻炎、变应性鼻炎、鼻窦炎等病史。全部研究对象为无血缘关系的广西壮族自治区人群。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 从已采集受试者静脉血的采血管中吸出 2.5 ml,经碘化钠法提取基因组的 DNA^[5]。

1.2.2 引物的设计及合成 根据在线 Primer3 软件设计([http://bioinfo. ut. ee/primer3-0. 4. 0/](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/))引物^[6],由上海天昊遗传分析中心合成。用于特异性扩增 RTN4 基因 rs2864052 位点的一段 DNA 序列,上游引物:5'-TGAAACACGGCARAAGCT-CAAA-3',下游引物:5'-GGAACATCTTCTGAC-CAACAAGCAC-3';RTN4 基因 rs6545468 位点的 DNA 序列,上游引物:5'-CGACTGAGCCGAGG-GACCTACT-3',下游引物:5'-CGCTGGCCT-CACTCCTAGCTC-3'。

1.2.3 PCR 扩增 RTN4 基因 PCR 反应体系总共 20 μ l,其含 2.0 μ l 10 \times PCR 缓冲液、2.0 μ l dNTPs、上游、下游引物和模板 DNA 各 1.0 μ l、TaqDNA 聚合酶 1.0 U。如体积不足用已灭菌好的双蒸水补足 20 μ l 即可。PCR 产物采用 Hot-StarTaq 方法获得,其经虾碱酶和外切酶 I 纯化,用 ABI 公司的 SNaPshot Multiplex kit 进行延伸。纯化后的延伸产物在 ABI3730xl 上样。SNP 分型则用 GeneMapper4.1 (Appliedbiosystems) 来分析^[7]。

1.3 统计学方法

所有数据运用 SPSS17.0 和 SHEsis 软件分析,基因型及其等位基因则直接用计算法计算。用

四格表 χ^2 检验比较研究对象 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度,比较两组间的性别和年龄分布差异,平均年龄则用 t 检验计算。再用 χ^2 检验鼻咽癌组和对照组基因型及其等位基因型分布频率之间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。RTN4 基因多态性与鼻咽癌易感性的相关性用 OR 值和 CI95% 表示,可通过 Logistic 回归分析获得。单倍型用 SHEsis 软件分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 RTN4 基因型测定

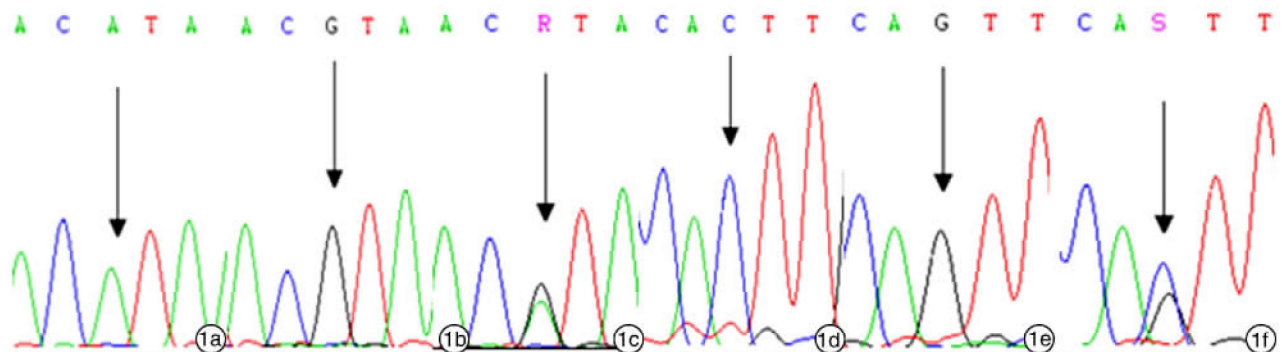
RTN4 基因 rs2864052 和 rs6545468 PCR 位点扩增的产物片段分别为 185 bp、139 bp。SNP 分型结果如图 1 显示:rs2864052 存在 AA、GG 和 GA 三种基因型,rs6545468 位点有 CC、GG 和 GC 三种基因型。也可从基因测序中证实。

2.2 Hardy-Weinberg 平衡定律检验及临床特征比较

经卡方检验得出对照组与鼻咽癌组的 RTN4 基因 rs2864052 位点和 rs6545468 位点基因型频率分布都符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,对照组中两个位点的基因型分布 P 值分别为 0.718、0.093,鼻咽癌组中两个位点的基因型分布 P 值分别为 0.411、0.585,因此两组样本均具有群体代表性。表 1 结果显示:对照组和鼻咽癌组的性别分布差异无统计学意义($\chi^2 = 0.063, P > 0.05$);但平均年龄及年龄分布均差异有统计学意义(前者 $t = 2.389, P = 0.017$,后者 $\chi^2 = 5.023, P = 0.025$)。

2.3 鼻咽癌组与对照组 RTN4 基因多态性比较

鼻咽癌组与对照组 RTN4 基因 rs2864052 和 rs6545468 位点基因型及等位基因频率比较见表 2。以 rs2864052 位点 AA 基因型的相对风险值 (OR) 为 1,分别与 GA、GG 基因型比较,差异无统计学意义 ($P = 0.247, OR 0.72, 95\% CI 0.41 -$



a~c:rs2864052 位点 AA、GG、GA 基因型;d~f:rs6545468 位点 CC、GG、GC 基因型。

图 1 RTN4 基因各位点基因分型图

表 1 对照组和鼻咽癌组的一般临床特征比较

组别	例数	性别		平均年龄/岁	年龄/岁	
		男	女		<55	≥55
对照组	199	118(59.3)	81(40.7)	54.02±14.57	93(46.7)	106(53.3)
鼻咽癌组	282	164(58.2)	118(41.8)	50.94±13.38 ¹⁾	161(57.1) ¹⁾	121(42.9)

与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 RTN4 基因 rs2864052 和 rs6545468 位点多态性与鼻咽癌易感性

组别	rs2864052					rs6545468				
	AA	GA	GG	A	G	CC	GC	GG	C	G
对照组	31(15.6)	92(42.2)	76(38.2)	154(38.7)	244(61.3)	130(65.3)	66(33.2)	3(1.5)	326(82.0)	72(18.0)
鼻咽癌组	33(11.7)	136(48.2)	113(40.1)	202(35.8)	362(64.2)	181(64.2)	88(31.2)	13(4.6)	450(80.0)	114(20.0)

1.26, $\chi^2 = 1.340$; $P = 0.250$, $OR 0.72$, 95% $CI 0.41 - 1.27$, $\chi^2 = 1.326$), 即 GA 和 GG 基因型不增加鼻咽癌风险性; A 与 G 等位基因相比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.363$, $OR 0.88$, 95% $CI 0.67 - 1.15$, $\chi^2 = 0.829$), 亦不增加鼻咽癌风险性。以 rs6545468 位点 CC 基因型 OR 值为 1, 分别与 GC、GG 基因型比较, 差异均无统计学意义 ($P = 0.828$, $OR 1.04$, 95% $CI 0.71 - 1.54$, $\chi^2 = 0.047$; $P = 0.067$, $OR 0.32$, 95% $CI 0.90 - 1.15$, $\chi^2 = 3.351$), 这两个基因型不增加鼻咽癌易感性。同时进行 C 与 G 等位基因比较也不增加鼻咽癌易感性 ($P = 0.412$, $OR 0.87$, 95% $CI 0.63 - 1.21$, $\chi^2 = 0.674$)。

2.4 RTN4 基因的单倍型分析

通过 SHEsis 软件计算单倍型结果如表 3, 在广西壮族人群中 RTN4 基因 rs2864052 和 rs6545468 位点存在 AC、AG、GC、GG 这 4 种单倍型, 以 AC 单倍型的 OR 值为 1, 分别与其他三个单倍型比较, 结果显示单倍型 AG 携带者可降低鼻咽癌的易感性 ($P = 0.004$, $OR = 0.14$, 95% $CI 0.31 - 0.68$, $\chi^2 = 8.125$)。AC 单倍型分别与 GC、GG 比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.940$, $OR = 0.99$, 95% $CI 0.74 - 1.32$, $\chi^2 = 0.006$; $P = 0.171$, $OR = 1.30$, 95% $CI 0.89 - 1.90$, $\chi^2 = 1.871$)。

表 3 RTN4 基因 rs2864052 和 rs6545468 位点多态性单倍型在两组中的分布

单倍型	对照组 (2n=398)	鼻咽癌组 (2n=564)
AC	200(35.4)	144(36.2)
AG	2(0.4)	10(2.5) ¹⁾
GC	250(44.4)	182(45.7)
GG	112(19.8)	62(15.6)

与 AC 比较,¹⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

随着鼻咽癌发病率的逐渐上升, 其发病机制的研究取得了一定的进展, 特别是细胞因子对鼻咽癌肿瘤细胞的抑制和迁移等作用^[8]。RTN4 基因表达于中枢神经系统髓磷脂, 其编码一种跨膜功能 Noog 蛋白。人类 RTN4 基因位染色体 2p16, 长度 75 kb, 含 8 个内含子和 14 个外显子。RTN4 基因存多个位点的基因多态性, 其多态性可影响转录和翻译的效率, 进而影响肿瘤的发生发展。我们推断 RTN4 基因多态性与肿瘤易感性密切相关。

近年来有学者研究 RTN4 基因单核苷酸多态性与肿瘤遗传易感性关系。Shi 等^[6]检测 450 例健康对照者和 336 例宫颈鳞状细胞癌患者的 RTN4 基因 3'UTR 的 TATC 和 CAA 多态性, 结果表明, 该基因多态性与宫颈鳞状细胞癌的临床分期密切相关, 并且可增加宫颈鳞状细胞癌易感性。Zhang 等^[9]检测 286 例子宫肌瘤女性与 450 例健康女性 RTN4 基因 TATC (rs71682890) 和 CAA (rs34917480) 多态性的基因型和等位基因频率, 结果发现 RTN4 基因 3'UTR 遗传多态性与子宫肌瘤易感性相关, RTN4 基因 CAA(rs34917480) 插入等位基因纯合子的携带者可增加子宫肌瘤风险性。但该研究样本量存在一定的局限性, 确认这种关联性需进一步探究。Lu 等^[10]研究表明位于中国人群中 RTN4 基因 3'UTR 的 CAA(rs34917480) 多态性可增加非小细胞肺癌风险性, 特别是对老年男性和吸烟者更为明显。为了探究 RTN4 基因多态性及其单倍型与广西壮族人群鼻咽癌易感性的相关关系, 本研究运用病例对照研究方法对 RTN4 基因 rs2864052 和 rs6545468 位点进行分析, 比较结果显示: 鼻咽癌组与对照组 RTN4 基因多态性 rs2864052 和 rs6545468 位点基因型和等位基因频率的分布差异均无统计学意义, 而单倍型分析发现鼻咽癌组 AG 单倍型频率显著低于对照组 ($P < 0.01$)。

综上所述,鼻咽癌是由多种因素所致的病因未明的疾病,其中年龄和遗传基因多态性都是重要的病因因素。RTN4 基因多态性 rs2864052 和 rs6545468 位点的 AG 单倍型与鼻咽癌具有相关性,单倍型 AG 的携带者可降低广西壮族人群鼻咽癌的易感性,即单倍型 AG 可作为鼻咽癌的保护因素。但仍需进一步扩大样本量的研究,及严格控制各种流行病学风险因素的影响,如饮食、EB 病毒感染等,进一步探究 RTN4 基因多态性与鼻咽癌之间确切的分子作用机制。

参考文献

- [1] 刘叶花,杨磊,丘福满,等. 核因子- κ B1 基因启动子区多态性与广东地区鼻咽癌的关联研究[J]. 现代预防医学, 2013, 40(12): 2185-2188.
- [2] 鲁明寿,孔庆志,许新华,等. MKK4 基因启动子区-1304T/G 多态性与散发性鼻咽癌易感性的关系[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 30(4): 287-290.
- [3] 周华茂,张志伟,刘重元,等. RNT4 在胃癌组织中的表达及意义[J]. 诊断病理学杂志, 2014, 21(11): 704-707.
- [4] TENG F Y, TANG B L. Cell autonomous function of Nogo and reticulons; The emerging story at the endoplasmic reticulum [J]. J Cell Physiol, 2008, 216: 303-308.
- [5] 韦贵将,杨凤莲,陆璐,等. OPN 基因多态性与广西壮族人群鼻咽癌易感性的关系[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(7): 489-492.
- [6] SHI S, ZHOU B, WANG Y, et al. Genetic variation in RTN4 3'-UTR and susceptibility to cervical squamous cell carcinoma [J]. DNA Cell Biol, 2012, 31: 1088-1094.
- [7] 韦叶生,韦传东,王俊利,等. CD40 基因单核苷酸多态性及单倍型与缺血性脑卒中的相关性研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(3): 283-286.
- [8] 李玉媚,王辉,康敏,等. AS-miR-21 对鼻咽癌转移潜能及其对 Bcl-2 调控作用研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(21): 1671-1675.
- [9] ZHANG K, BAI P, SHI S, et al. Association of genetic variations in RTN4 3'-UTR with risk of uterine leiomyomas [J]. Pathol Oncol Res, 2013, 19: 475-479.
- [10] LU D Y, MAO X H, ZHOU Y H, et al. RTN4 3'-UTR insertion/deletion polymorphism and susceptibility to non-small cell lung cancer in Chinese Han population [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15: 5249-5252.
- (收稿日期:2016-08-26)
- (上接第 1941 页)
- [8] JIANG S J, DI Z H, HUANG D, et al. R75Q de novo dominant mutation of GJB2 in a Chinese family with hearing loss and palmoplantar keratoderma [J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2014, 78: 1461-1466.
- [9] PIAZZA V, BELTRAMELLO M, MENNITI M, et al. Functional analysis of R75Q mutation in the gene coding for Connexin 26 identified in a family with non-syndromic hearing loss [J]. Clin Genet, 2005, 68: 161-166.
- [10] LOSSA S, CHINETTI V, CORVINO V, et al. R75Q dominant mutation in GJB2 gene silenced by the in Cis recessive mutation c. 35delG [J]. Am J Med Genet A, 2010, 152A: 2658-2660.
- [11] CHEN Y, DENG Y, BAO X, et al. Mechanism of the defect in gap-junctional communication by expression of a connexin 26 mutant associated with dominant deafness [J]. FASEB J, 2005, 19: 1516-1518.
- [12] MINEKAWA A, ABE T, INOSHITA A, et al. Cochlear outer hair cells in a dominant-negative connexin26 mutant mouse preserve non-linear capacitance in spite of impaired distortion product otoacoustic emission [J]. Neuroscience, 2009, 164: 1312-1319.
- [13] ROUAN F, WHITE T W, BROWN N, et al. trans-dominant inhibition of connexin-43 by mutant connexin-26: implications for dominant connexin disorders affecting epidermal differentiation [J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 11): 2105-2113.
- [14] YUM S W, ZHANG J, SCHERER S S. Dominant connexin26 mutants associated with human hearing loss have trans-dominant effects on connexin30 [J]. Neurobiol Dis, 2010, 38: 226-236.
- [15] PANDEY N, XAVIER D F, CHATTERJEE A, et al. Functional Analysis of a Novel Connexin30 Mutation in a Large Family with Hearing Loss, Pesplanus, Ichthyosis, Cutaneous Nodules, and Keratoderma [J]. Ann Hum Genet, 2016, 80: 11-19.
- (收稿日期:2016-08-01)