

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.23.006

广西壮族人群 LINC01133 基因多态性分布研究*

石 凤, 王俊利[△]

右江民族医学院附属医院生殖医学中心, 广西百色 533000

摘 要:目的 探讨广西壮族人群 LINC01133 基因多态性位点 rs76477312 和 rs2840587 的分布情况, 为研究 LINC01133 基因多态性与不同地区的疾病易感性的关系提供理论基础。方法 运用多重高温连接酶检测反应技术和 DNA 测序检测 574 例广西壮族人群 LINC01133 基因多态性位点 rs76477312 和 rs2840587 基因型、等位基因频率, 并与 ensemble 数据库公布的千人基因组计划人群进行比较。结果 广西壮族人群 rs76477312 主要以 CC 基因型(69.0%)为主, rs2840587 主要以 TT 基因型(94.3%)为主, 广西壮族人群男女间 rs76477312、rs2840587 基因型、等位基因频率比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。广西壮族人群 rs76477312 基因型、等位基因频率与美国、欧洲人群比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 广西壮族人群 rs2840587 基因型、等位基因频率与美国、欧洲和南亚人群比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 不同人群 LINC01133 基因多态性位点 rs76477312 和 rs2840587 基因型和等位基因频率具有地区差异性, 为后续 LINC01133 基因多态性在不同人群疾病易感性的研究提供理论基础。

关键词:基因多态性; 等位基因; 基因型

中图分类号:R714.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)23-3410-04

Study on the distribution of LINC01133 gene polymorphism in Zhuang population in Guangxi*

SHI Feng, WANG Junli[△]

Reproductive Medical Center, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China

Abstract: Objective To investigate the distribution of LINC01133 gene polymorphism sites rs76477312 and rs2840587 in Guangxi Zhuang Population, and to provide a theoretical basis for the future study of the relationship between LINC01133 gene polymorphism and disease susceptibility in different regions. **Methods** The improved multiple ligase detection reaction and DNA sequencing were used to detect the genotyping and allele frequencies of LINC01133 gene polymorphism sites rs76477312 and rs2840587 in 574 Guangxi Zhuang populations and compared with the population of 1 000 Genomes Project published in ensemble database. **Results** In the Zhuang population of Guangxi, the genotype of rs76477312 was mainly CC (69.0%), and the genotype of rs2840587 was mainly TT (94.3%). There was no statistically significant difference of comparison of rs76477312, rs2840587 genotype and allele frequency between males and females in Guangxi Zhuang population ($P>0.05$). The distribution frequency of rs76477312 genotypes and alleles in Guangxi Zhuang population was significantly different from that in the United States and Europe ($P<0.05$), and the distribution frequency of rs2840587 genotypes and alleles in Guangxi Zhuang population was significantly different from that in the United States, Europe and South Asia ($P<0.05$). **Conclusion** There are regional differences in genotypes and allele frequencies of LINC01133 polymorphism sites rs76477312 and rs2840587 in different populations, which provide a theoretical basis for subsequent studies on the susceptibility of LINC01133 polymorphism to disease in different populations.

Key words: gene polymorphism; alleles; genotype

长链非编码 RNA (lncRNA) 是一种长度大于 200 nt 的不能编码为蛋白质的 RNA, 主要定位于细胞核, 表达水平低。lncRNA 在不同的生理和病理过程中起着重要的作用, 包括表观遗传控制、基因转录、转录后修饰及染色质结构和核转运的调节^[1]。

lncRNA 的主要功能是作为 ceRNA 网络与 microRNA 竞争性结合调控靶基因的转录和修饰^[2]。已有研究表明, lncRNA 表达紊乱可引起多种肿瘤的发生, 包括前列腺癌、肝癌、乳腺癌和鼻咽癌等^[3-5]。前期研究发现编码 RNA 及非编码 microRNA 的基因突变会引

* 基金项目: 广西自然科学基金项目(2018JJA140790)。

作者简介: 石凤, 女, 技师, 主要从事肿瘤的分子遗传学研究。 [△] 通信作者, E-mail: baisedwangjunli@163.com。

起基因表达水平改变,LINC01133 基因在肿瘤的发展和转移中起着重要作用^[6-10]。本研究拟采用多重高温连接酶检测反应(iMLDR)和 DNA 测序技术检测广西壮族人群 LINC01133 基因多态性位点 rs76477312 和 rs2840587 分布情况,并与 ensemble 数据库中公布的千人基因组计划进行对比,为后续在不同人群中 LINC01133 基因多态性与疾病易感性及群体遗传差异性疾病的研究提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018—2019 年在右江民族医学院附属医院体检健康的广西壮族人群 574 例作为研究对象,男性 275 例、女性 299 例,年龄 16~78 岁,所选人群之间无血缘关系,长期居住在广西地区,各项实验检测指标均在正常范围内,既往无慢性病史、肿瘤病史。该研究经研究对象知情同意并经右江民族医学院附属医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 清晨空腹采集志愿者全血 2~5 mL 于乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝管,轻轻摇晃混匀,采用深圳亚能公司 DNA 提取试剂盒,按照操作说明书提取全基因组 DNA,并于-70℃冰箱保存待用。

1.2.2 PCR 引物设计及反应体系 查阅美国国立生物技术信息中心数据库中 LINC01133 基因多态性位点 rs76477312 和 rs2840587 的碱基序列,根据在线引物软件设计 LINC01133 基因多态性位点的扩增引物,由上海天昊生物科技有限公司合成。rs76477312 正向引物为 5'-GCC CAT TAC CGG TTT TAA CTC TCC-3',反向引物为 5'-CTT GAG GAA CGT ACA ATG GGA GTC A-3';rs2840587 正向引物为 5'-CCA CAA CAG TCC CCG GTG T-3',反向引物为 5'-CTC CAT CAT GAA ACT GCC CAC AC-3'。PCR 反应体系(20 μL)包括:1 μL 样本 DNA,1 μL 多重 PCR 引物,0.3 mmol/L dNTP,1 U HotStarTaq 缓冲液,2 U 3.0 mmol/L Mg²⁺,1 U HotStarTaq 聚合酶(Qiagen Inc. 公司提供),剩余体积用超纯水补

足。连接反应体系:10×连接缓冲液 1 μL、5'连接引物混合液(1 μmol/L) 0.4 μL、高温连接酶 0.25 μL、3'连接引物混合液(2 μmol/L) 0.4 μL、纯化后多重 PCR 产物 2 μL、ddH₂O 6 μL 混匀。连接反应程序为 94℃ 1 min,56℃ 4 min,共计 38 个循环。

1.2.3 iMLDR 多重单核苷酸多态性(SNP)分型 先采用多重 PCR 将目标基因多态性位点所在区段在一个体系中获得扩增。扩增产物经外切核酸酶及虾碱酶(Exo I /SAP)纯化后用于后续连接酶反应的模板。在一个连接反应中,每个位点包含两个 5'端等位基因特异探针及紧挨其后的一条 3'端位点的荧光标记的特异探针。连接产物通过 ABI3730XL 的毛细管电泳来区分。原始数据文件用 GeneMapper4.1 软件来分析,委托上海天昊生物科技有限公司进行该研究。

1.3 统计学处理 采用哈迪-温伯格遗传平衡定律检测该研究对象是否来自于同一群体。LINC01133 基因多态性位点 rs76477312 和 rs2840587 的基因型和等位基因例数由 SPSS17.0 得出,不同人群的 LINC01133 基因多态性两位点的基因型、等位基因频率比较均由 SPSS17.0 的 χ^2 或 Fisher 精确检验计算,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 rs76477312 和 rs2840587 遗传平衡定律 rs76477312 和 rs2840587 基因型均符合哈迪-温伯格遗传平衡定律($\chi^2=1.27$ 、 0.50 , $P=0.26$ 、 0.48),表明该研究对象具有群体代表性。

2.2 LINC01133 基因多态性位点基因型和等位基因频率分布 rs76477312 主要以基因型 CC 和等位基因 C 为主,分别占 69.0%和 83.4%;rs2840587 主要以基因型 TT 和等位基因 T 为主,分别占 94.3%和 97.1%,比较广西壮族人群不同性别间 rs76477312、rs2840587 基因型和等位基因频率,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1、2。

表 1 广西壮族人群 LINC01133 基因 rs76477312 基因型和等位基因频率分布[n(%)]

性别	n	基因型			χ^2	P	等位基因		χ^2	P
		GG	GC	CC			G	C		
女性	299	4(1.3)	87(29.1)	208(69.6)			95(15.9)	503(84.1)		
男性	275	8(2.9)	79(28.7)	188(68.4)	1.729	0.421	95(17.3)	455(82.7)	0.399	0.528

表 2 广西壮族人群 LINC01133 基因 rs2840587 基因型和等位基因频率分布[n(%)]

性别	n	基因型			χ^2	P	等位基因		χ^2	P
		TT	TC	CC			T	C		
女性	299	286(95.7)	13(4.3)	0(0.0)			585(97.8)	13(2.2)		
男性	275	255(92.7)	20(7.3)	0(0.0)	2.262	0.133	530(96.4)	20(3.6)	2.195	0.138

2.3 不同人群的 LINC01133 基因多态性位点基因型和等位基因频率分布 广西壮族人群 rs76477312 基因型频率与美国和欧洲人群比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而与日本和南亚人群比较,差异无统计学意义($P>0.05$);广西壮族人群 rs76477312 等位基因频率与美国、日本和欧洲人群比较,差异有统计学

意义($P<0.05$),而与南亚人群比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。广西壮族人群 rs2840587 基因型和等位基因频率与美国、欧洲和南亚人群比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而与日本人群比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3、4。

表 3 不同人群 rs76477312 基因型和等位基因频率分布[n(%)]

人群	n	基因型			χ^2	P	等位基因		χ^2	P
		GG	GC	CC			G	C		
广西	574	12(2.1)	166(28.9)	396(69.0)			190(16.6)	958(83.4)		
美国	347	4(1.2)	48(13.8)	295(85.0)	29.682	<0.001	56(8.1)	638(91.9)	26.888	<0.001
日本	104	0(0.0)	23(22.1)	81(77.9)	4.627	0.099	23(11.1)	185(88.9)	4.013	0.045
欧洲	503	0(0.0)	1(0.2)	502(99.8)	183.650	<0.001	1(0.1)	1 005(99.9)	179.565	<0.001
南亚	489	13(2.7)	111(22.7)	365(74.6)	5.462	0.065	137(14.0)	841(86.0)	2.623	0.105

表 4 不同人群 rs2840587 基因型和等位基因频率分布[n(%)]

人群	n	基因型			χ^2	P	等位基因		χ^2	P
		TT	TC	CC			T	C		
广西	574	541(94.3)	33(5.7)	0(0.0)			1 115(97.1)	33(2.9)		
美国	347	193(55.6)	124(35.7)	30(8.6)	204.192	<0.001	510(73.5)	184(26.5)	232.549	<0.001
日本	99	92(92.9)	7(7.1)	0(0.0)	0.264	0.608	191(96.5)	7(3.5)	0.256	0.613
欧洲	271	218(46.5)	40(40.4)	13(13.1)	48.745	<0.001	644(64.0)	362(36.0)	392.490	<0.001
南亚	489	267(54.6)	189(38.7)	33(6.7)	230.231	<0.001	723(73.9)	255(26.1)	242.687	<0.001

3 讨 论

LINC01133 是位于 1q23.2 号染色体的 lncRNA,研究发现 LINC01133 降低肺鳞癌患者生存率且促进肺鳞癌细胞侵袭^[11]。此外,LINC01133 还促进胰腺癌和宫颈癌的发生、发展^[12-13]。YANG 等^[10]研究发现,LINC01133 在胃癌组织中呈低表达,并通过细胞功能学实验验证了 LINC01133 通过海绵 mir-106a-3p 调节 APC 基因的表达。KONG 等^[14]发现,LINC01133 抑制结直肠癌上皮间质转化和转移。SONG 等^[8]研究发现 LINC01133 在选自上海乳腺癌患者人群中呈低表达并与淋巴结转移和 TNM 分期呈负相关,并发现 LINC01133 在乳腺癌中通过 EZH2 基因下调 SOX4 的表达。TU 等^[15]研究表明,LINC01133 促进三阴性乳腺癌肿瘤干细胞样特性和肿瘤生长,并对来自 GEO 数据库中的人群进行生存分析,提示 LINC01133 表达水平高的乳腺癌患者总体生产率更低,该结果与 SONG 等^[8]的研究结果不一致,其可能的原因是所选择群体的遗传差异等。基因多态性直接影响基因的表达水平、基因突变可能导致不同人群对疾病易感性、疾病严重程度和治疗方案存在差异。因此,从分子水平上探讨基因多态性在不同人群中的分布情况尤为重要。

本研究结果表明,在广西壮族人群中,rs76477312 存在 GG、GC 和 CC 基因型,其频率分别为 2.1%、28.9%和 69.0%,两等位基因 G 和 C 频率分别为 16.6%和 83.4%;rs2840587 存在 TT 和 TC 两种基

因型,其频率分别为 94.3%和 5.7%,其两等位基因 T 和 C 频率分别为 97.1%和 2.9%,两基因多态性位点基因型均符合哈迪-温伯格遗传平衡定律。广西壮族人群不同性别间 rs76477312、rs2840587 基因型和等位基因频率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),提示 LINC01133 基因多态性位点基因型和等位基因频率可能与性别无关。不同种族地区 rs76477312、rs2840587 基因型和等位基因频率比较,结果显示:广西壮族人群的 rs76477312 的基因型、等位基因频率与美国、欧洲人群比较,差异有统计学意义($P<0.05$);广西壮族人群的 rs2840587 的基因型、等位基因频率与美国、欧洲和南亚人群比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

综上所述,不同人群 LINC01133 基因多态性位点 rs76477312 和 rs2840587 基因型和等位基因频率具有地区差异性,为后续 LINC01133 基因多态性在不同人群疾病易感性的研究提供理论基础,也为选择研究人群多元化的必要性提供理论依据。但本研究存在几点不足:(1)广西作为一个少数民族地区,本次研究所选人群均为壮族人群,未纳入广西其他少数民族进行分层分析;(2)本研究所选的人群均长期居住广西地区。因此,后续将进一步研究在不同人群中比较该两个基因多态性位点与疾病的关系并进行种族分层分析。

参考文献

[1] BATISTA P J, CHANG H Y. Long noncoding RNAs:

- cellular address codes in development and disease[J]. Cell, 2013, 152(6): 1298-1307.
- [2] QI X, ZHANG D H, WU N, et al. ceRNA in cancer: possible functions and clinical implications[J]. J Med Genet, 2015, 52(10): 710-718.
- [3] BHAN A, SOLEIMANI M, MANDAL S S. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm[J]. Cancer Res, 2017, 77(15): 3965-3981.
- [4] MISAWA A, TAKAYAMA K I, INOUE S. Long non-coding RNAs and prostate cancer[J]. Cancer Sci, 2017, 108(11): 2107-2114.
- [5] WU J H, TANG J M, LI J, et al. Upregulation of SOX2-activated lncRNA ANRIL promotes nasopharyngeal carcinoma cell growth[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 3333-3341.
- [6] WANG R, WANG C F, QIN H M, et al. Association between polymorphisms in the promoter region of miR-17-92 cluster and systemic lupus erythematosus in a Chinese population[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(1): 4016-4020.
- [7] PANG X X, LUO S D, ZHANG T, et al. Association of interleukin-27 gene polymorphisms with susceptibility to HIV infection and disease progression[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(4): 2410-2418.
- [8] SONG Z, ZHANG X, LIN Y, et al. LINC01133 inhibits breast cancer invasion and metastasis by negatively regulating SOX4 expression through EZH2[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(11): 7554-7565.
- [9] LIU M, SHEN C, WANG C. Long noncoding RNA LINC01133 confers tumor-suppressive functions in ovarian cancer by regulating leucine-rich repeat Kinase 2 as an miR-205 sponge[J]. Am J Pathol, 2019, 189(11): 2323-2339.
- [10] YANG X Z, CHENG T T, HE Q J, et al. LINC01133 as ceRNA inhibits gastric cancer progression by sponging miR-106a-3p to regulate APC expression and the Wnt/beta-catenin pathway[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 126-141.
- [11] ZHANG J, ZHU N, CHEN X. A novel long noncoding RNA LINC01133 is upregulated in lung squamous cell cancer and predicts survival[J]. Tumour Biol, 2015, 36(10): 7465-7471.
- [12] HUANG C S, CHU J, ZHU X X, et al. The C/EBPbeta-LINC01133 axis promotes cell proliferation in pancreatic ductal adenocarcinoma through upregulation of CCNG1[J]. Cancer Lett, 2018, 421(1): 63-72.
- [13] FENG Y, QU L, WANG X, et al. LINC01133 promotes the progression of cervical cancer by sponging miR-4784 to up-regulate AHDC1[J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(12): 1453-1461.
- [14] KONG J, SUN W, LI C, et al. Long non-coding RNA LINC01133 inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer by interacting with SRSF6[J]. Cancer Lett, 2016, 380(2): 476-484.
- [15] TU Z, SCHMOLLER L J, CUIFFO B G, et al. Microenvironmental regulation of long noncoding RNA LINC01133 promotes cancer stem cell-like phenotypic traits in triple-negative breast cancers[J]. Stem Cells, 2019, 37(10): 1281-1292.
- (收稿日期: 2020-02-03 修回日期: 2020-10-21)
- (上接第 3405 页)
- [9] 乌恩奇, 赵焕虎, 刘微. 中国不同地区宫颈癌中 HPV 型别分布数据横向比较分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(23): 1845-1851.
- [10] 李秀凤, 李宗明, 高同举. 人乳头瘤状病毒亚型在河南新乡的分布特征[J]. 当代医学, 2013, 19(34): 159-160.
- [11] 王小利, 常永超, 刘海花, 等. 洛阳地区女性 HPV 感染及病毒亚型分布特征研究[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(14): 1905-1907.
- [12] 张亚丽, 彭仁佳, 范毅凯, 等. 郑州地区 22 708 例女性 HPV 感染及基因亚型分布研究[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(11): 1537-1540.
- [13] 智艳芳, 李肖甫, 班振英, 等. 河南地区女性 HPV 感染及基因型分布研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(9): 660-664.
- [14] 李瑞敏, 宋文月, 尹保娜, 等. 女性 HPV 感染及基因分型年龄分布的临床调查[J]. 医学新知杂志, 2019, 29(1): 48-50.
- [15] THEODOROS A, KIMON C, TAXIARCHIS K, et al. Primary screening for cervical cancer based on high-risk human papillomavirus (HPV) detection and HPV 16 and HPV 18 genotyping, in comparison to cytology[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119755.
- [16] 雷晓琴, 陈汶, 于露露, 等. 2016 河南新密农村地区妇女生活方式、膳食因素与高危型 HPV 持续感染的关系研究[J]. 卫生研究, 2016, 45(1): 45-50.
- [17] WINER R L, KOUTSKY L A. The epidemiology of human papillomavirus infections[J]. J Clin Virol, 2005, 32(1): 16-24.
- [18] 刘敏, 王传新, 邓小梅, 等. 应用液相基因芯片技术筛查山东地区高危人群人乳头瘤病毒基因型[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(5): 487-490.
- [19] EUN HEE L, TAE HYUN U, HYUN-SOOK C, et al. Prevalence and distribution of human papillomavirus infection in Korean women as determined by restriction fragment mass polymorphism assay[J]. J Korean Med Sci, 2012, 27(9): 1091-1097.
- [20] LI H, ZHANG J, CHEN Z, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes among women in Hunan province, China[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013, 170(1): 202-205.
- [21] 郑红云, 杨鹏, 申复进, 等. 7 746 例妇女宫颈脱落细胞 HPV 基因分型结果研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(24): 3391-3392.
- (收稿日期: 2020-03-04 修回日期: 2020-10-10)