

# 广西地区健康人群 miR-221 基因 rs2858060C/G 遗传多态性及其分布特征

黄晶晶<sup>1</sup>, 龚嘉琳<sup>1</sup>, 韦叶生<sup>2</sup>, 向阳<sup>2</sup>

- (1. 右江民族医学院医学检验学院 2015 级本科, 广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院附属医院检验科, 广西 百色 533000)

**摘要:**目的 研究 miR-221 基因 rs2858060C/G 单核苷酸多态性(SNP)各等位基因及基因型在广西地区健康人群中的频率分布, 比较其与欧洲人群、非洲人群、日本人群及北京人群之间的分布差异。方法 采用单碱基延伸的 PCR 技术和基因测序法检测 450 例右江民族医学院附属医院正常体检者的 miR-221 基因 rs2858060C/G 单核苷酸多态性, 结合文献与人类基因组计划已经公布的 4 组人群的 miR-221 基因型及等位基因的频率分布进行比较分析。结果 在广西健康人群中 miR-221 基因 rs2858060 位点分别有 CC、CG、GG 三种基因型, 其中以 CC 基因型多见, 占 74.00%, C 等位基因频率最高, 占 81.33%。基因型和等位基因的频率分布在男女间的差异无统计学意义( $P$  均  $>0.05$ ), 说明多态性分布与性别无关。与人类基因组计划公布的欧洲人群、北京人群、日本人群及非洲人群的 SNPs 分型数据比较发现, 广西地区健康人群 miR-221 基因 rs2858060C/G 位点频率分布与这四个地区人群的基因多态性分布的差异都具有统计学意义(基因型  $\chi^2$  分别为 12.708、198.214、179.586 和 49.799, 等位基因  $\chi^2$  分别为 20.214、306.588、126.462 和 71.606,  $P$  均  $<0.001$ )。结论 广西地区健康人群中存在 miR-221 基因 rs2858060C/G 基因多态性, 其基因多态性在男女间的频率分布差异无显著性, 但与其他种族人群比较存在显著性差异。这种差异对于与 miR-221 相关的疾病及遗传方面的研究可能起重要作用。

**关键词:** miR-221; rs2858060 位点; 基因多态性; 单核苷酸; 大陆人口群

**中图分类号:** R394.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2018)05-0414-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.05.003

## Genetic polymorphism and distribution characteristics of miR-221 gene rs2858060C/G in a Guangxi healthy population

Huang Jingjing<sup>1</sup>, Gong Jialin<sup>1</sup>, Wei Yesheng<sup>2</sup>, Xiang Yang<sup>2</sup>

- (1. Undergraduate of Grade 2015, College of Medical Laboratory Science, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To study allele and genotype frequency distribution in single nucleotide polymorphism (SNP) of miR-221 gene rs2858060C/G in Guangxi healthy population, and to compare their frequency distribution with HapMap-CEU, HapMap-YRI, HapMap-JPT and HapMap-HCB populations, respectively. **Methods** The miR-221 gene rs2858060C/G SNP detection was performed by using single base extension PCR technique and DNA sequencing for 450 individuals who received health examination in the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities. The frequency distributions of miR-221 genotypes and alleles from Guangxi healthy population were compared with those of the 4 mentioned above populations published in the Hap-Map database and the analysis was also performed by literature review. **Results** The rs2858060C/G

**基金项目:**国家自然科学基金(81260234, 81560552); 2015年广西研究生创新课题(YCSZ2015221); 右江民族医学院校级课题(yy2015ky003)

**第一作者简介:**黄晶晶(1996—), 女, E-mail: 2696687114@qq.com

**通信作者简介:**向阳(1989—), 男, 研究方向: 免疫遗传学, E-mail: xyang8519@163.com

locus of miR-221 gene presented with three genotypes of CC, CG and GG in Guangxi healthy population, and CC genotype was more common among them, accounting for 74.00%; the highest frequency was C allele, accounting for 81.33%. The comparison of genotype and allele frequency distribution between male and female showed that there were no significant differences (all  $P > 0.05$ ), indicating that the distribution of polymorphism was not related to sex. Compared with SNPs typing data from HapMap-CEU, HapMap-HCB, HapMap-JPT and HapMap-YRI populations published by the Human Genome Project, it was found that the frequency distribution of miR-221 gene rs2858060C/G locus in Guangxi population was significantly different from these four populations (the genotype  $\chi^2$  was 12.708, 198.214, 179.586 and 49.799, respectively, and the allele  $\chi^2$  was 20.214, 306.588, 126.462 and 71.606, respectively, all  $P < 0.001$ ). **Conclusion** There is miR-221 gene rs2858060C/G polymorphism in Guangxi healthy population, and no significant difference in the frequency distribution of miR-221 gene polymorphism between male and female, but there is significant difference compared with other populations. This difference may play an important role in the study on miR-221-related diseases and genetic aspect.

**Key words:** miR-221; rs2858060 locus; gene polymorphism, single nucleotide; continental population groups

微小RNA (microRNA, miRNA 或 miR) 是一类内源性非编码小RNA分子, 大约由21~23个碱基组成, 是由具有茎环结构的单链RNA前体经过Dicer酶加工后生成的。其通过碱基配对的方式结合到靶mRNA的3'UTR(3'untranslated region)从而抑制靶mRNA转录、翻译或者剪切靶mRNA并促进其降解, 但不影响其转录功能。而靶mRNAs又进一步调控着多种生物学行为, 如机体发育的进程、干细胞分化、细胞的增殖与凋亡, 以及肿瘤发生、发展<sup>[1]</sup>。所以, 微小核糖核酸是由细胞自身表达, 并作用于自身的调节物质。

人类miR-221, 又名hsa-miR-221, 定位于X染色体上, 具有类癌基因的功能。其编码基因在细胞核内经RNA聚合酶II转录成pri-miRNA, 在Drosha RNA酶的作用下形成miRNA前体(pre-miRNA)。在Dicer酶的作用下, miRNA前体被剪切成双链miRNA, 随后双链miRNA中的一条miRNA链结合到RNA诱导基因沉默复合物RISC中, 形成非对称RISC复合物。复合物通过miRNA与靶mRNA的3'UTR完全或不完全匹配结合从而降解mRNA或抑制mRNA翻译<sup>[2]</sup>。

研究表明, miR-221在大多数癌症中高度表达<sup>[3]</sup>, 其通过调控靶基因的表达从而促进肿瘤的发生、发展, 表现出癌基因的特征。此外, 据研究, 至少有三分之一的人类基因受miRNA调控, miRNA在包括胚胎发育、干细胞自我更新以及肿瘤的侵袭、转移和耐药等广泛的生理和病理过程中也起重要作用<sup>[4-5]</sup>。

为此, 本研究采用单碱基延伸的PCR技术和基因测序法来研究广西地区健康人群miR-221基因的单核苷酸多态性, 并将其分型数据与人类基因组计划已经公布的4组人群进行比较, 探讨基因多态性在不同

种族正常人群中的分布差异。为与miR-221相关的疾病和遗传等方面的研究提供一些基础性的参考资料。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 入选本组研究对象选自2015年4月~9月于右江民族医学院附属医院正常体检者, 共450例, 其中男270例、女180例, 年龄23~78岁。入选研究对象各项实验室检查正常, 心脑血管疾病及重要脏器疾病者除外。所有研究对象均为广西自然人群, 彼此之间无血缘关系, 并且签署知情同意书, 经伦理委员会批准。

1.2 基因组DNA提取 采集研究对象静脉血2ml, 加入EDTA-K2抗凝; 选择改良碘化钠的方法提取基因组DNA, 提取的DNA产物置于-70℃保存备用。

1.3 引物的设计与合成 根据NCBI上查找的和miR-221基因rs2858060C/G位点的序列, 选择包含位点的序列并输入引物设计软件Primer3, 得到用于特异性扩增rs2858060C/G上游引物5'-TGTGGCT-TGGAGCATTTTTGTTG-3'; 下游引物5'-CATGCTA-GTGAGCACCTGCTTTGA-3'。

1.4 PCR反应 miRNA基因的PCR扩增反应体系为20μl, 其中含1×GC缓冲液I (TAKARA) 2.0μl, 2.5mmol Mg<sup>2+</sup>, 0.2mmol dNTP, 上、下游引物各0.2μmol/L, TaqDNA聚合酶1.0U, DNA模板1μl, 余下体积用灭菌双蒸水补足。PCR产物用Qiagen公司的HotStarTaq进行多重PCR获取, PCR产物经虾碱酶(SAP, 购自Promega)和外切酶I(EXO I, 购自Epicentre)纯化后用ABI公司的SNaPshot Multiplex kit进行延伸反应。延伸产物用虾碱酶(SNP, 购自Promega)纯化后在ABI3130XL上样检测。SNP分型用GeneMapper 4.0软件(Applied biosystems公司生

产)来分析。

1.5 统计学方法 根据测序的结果直接计算出 rs2858060 位点的基因型和等位基因频率,并与 HapMap 数据库公布的 4 个人群(欧洲人群、非洲人群、日本人群及北京人群)的多态性分型结果进行比较。基因型和等位基因频率的比较及 Hardy-Weinberg 平衡符合程度均采用  $\chi^2$  检验,以  $P > 0.05$  认为达到遗传平衡,以  $P < 0.05$  认为多态性分布的差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-221 的基因型检测结果 miR-221 基因 rs2858060 位点扩增产物的大小为 211bp。经 ABI3130XL 基因检测单核苷酸多态性(SNP)分型结果显示 rs2858060 位点分别有 GG、CG、CC 三种基因型。经过基因测序后得到的数据进一步证实我们所检测到的结果(见图 1)。

2.2 miR-221 基因多态性在广西健康人群中的分布 根据检测的结果直接计算 miR-221 基因 rs2858060

多态性位点的基因型和等位基因频率。经  $\chi^2$  检验,本次实验样本 miR-221 基因 rs2858060 的多态性分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律,可认为已经符合遗传平衡,具有明显的群体代表性。分型结果统计显示,在广西人群中 miR-221 基因 rs2858060 位点以 CC 基因型多见,占 74.00%;C 等位基因频率最高,占 81.33%。基因型和等位基因的频率分布在男女间的差异无统计学意义( $P$  均  $> 0.05$ ),说明多态性分布与性别无关(统计结果见表 1)。

2.3 miR-221 基因多态性在不同地区人群间的比较

分别将广西人群 miR-221 基因 rs2858060 位点多态性分布频率与人类基因组计划公布的 4 个人群的 SNPs 分型数据进行比较,结果发现广西人群 miR-221 基因 rs2858060 位点频率分布与其他四个地区人群的基因多态性频率分布的差异都具有统计学意义(基因型  $\chi^2$  分别为 12.708、198.214、179.586 和 49.799,等位基因  $\chi^2$  分别为 20.214、306.588、126.462 和 71.606,  $P$  均  $< 0.001$ ),见表 2。

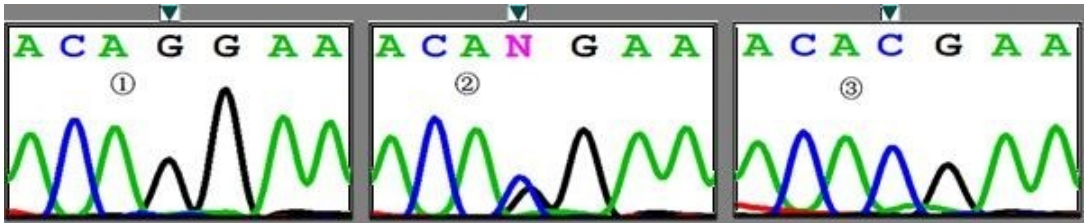


图 1 miR-221 基因 rs2858060C/G 测序图

注:①、②、③分别表示 GG、CG 和 CC 基因型;箭头所示基因突变点

表 1 rs2858060C/G 基因型和等位基因型在广西人群中的分布 (n, %)

SNP 位点	性别	n	基因型分布			等位基因型分布	
			CC	CG	GG	C	G
rs2858060	男性	270	203(75.19)	40(14.81)	27(10.00)	446(82.59)	94(17.41)
	女性	180	130(72.22)	26(14.44)	24(13.33)	286(79.44)	74(20.56)

注:基因型分布在男女间的比较,  $\chi^2 = 1.197, P = 0.550$ ;等位基因分布在男女间的比较,  $\chi^2 = 1.410, P = 0.235$

表 2 不同种族及地区人群 miR-221 基因 rs2858060C/G 多态性分布的比较

人群	n	基因型分布			等位基因型分布	
		CC	CG	GG	C	G
HapMap-CEU <sup>a</sup>	120	72(60.00)	20(16.67)	28(23.33)	163(67.92)	77(32.08)
HapMap-HCB <sup>b</sup>	90	8(8.89)	12(13.33)	70(77.78)	29(16.11)	151(83.89)
HapMap-JPT <sup>a</sup>	88	12(13.64)	10(11.36)	66(75.00)	33(31.73)	71(68.27)
HapMap-YRI <sup>a</sup>	120	58(48.33)	16(13.33)	46(38.00)	132(55.00)	108(45.00)
广西人群	450	333(74.00)	66(14.67)	51(11.33)	732(81.33)	168(18.67)

注:①a:与广西人群基因型与等位基因分布比较,  $P$  均  $< 0.001$ ;②HapMap-CEU:欧洲人群; HapMap-HCB:北京人群; HapMap-JPT:日本人群; HapMap-YRI:非洲人群

### 3 讨论

miRNA 是一类不编码蛋白质但具有重要生物学功能的 RNA 分子,现已成为潜在的肿瘤治疗的生物标志物和分子靶点<sup>[6]</sup>。miRNA-221 定位于 X 染色体 p11.3 区的 1 kb 区域内,是目前已知的 700 多种微 RN-A 之一<sup>[7]</sup>,与恶性肿瘤的发生发展有着密切的联系。近年来研究发现,miRNA-221 在多种恶性肿瘤中扮演着促癌和抑癌的角色<sup>[8]</sup>。其中,在前列腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、肝癌中表达上调<sup>[9-12]</sup>,表现为一种促癌作用,在胶质瘤<sup>[13]</sup>中表达下调,表现为一种抑癌作用。其发生机制可能是通过调控细胞增殖周期而参与肿瘤的发生发展。miR-221 在不同肿瘤中的差异表达及其与肿瘤的分类、诊断和治疗的相关性,提示 miRNA-221 有望成为治疗肿瘤的新靶点<sup>[14]</sup>。而 miR-221 rs2858060C/G 作为 miR-221 的一个重要位点,可能影响 miRNA-221 基因的功能,进而导致某些肿瘤的发生与发展。因此,研究正常人群 miR-221 rs2858060C/G 位点多态性就显得十分重要,其研究结果将为 miRNA-221 基因相关疾病的预防和治疗提供一些前瞻性资料。

因此,我们运用 DNA 测序和 PCR-RFLP 技术检测广西正常人群 miR-221 rs2858060C/G 位点基因型和等位基因频率的分布特点。结果显示,在广西正常人群中,miR-221 rs2858060C/G 位点有 CC、CG、GG 三种基因型,频率分别为 74.00%、14.67%、11.33%。等位基因 C 型和 G 型的频率分别为 81.33% 和 18.67%。基因型和等位基因的分布在性别间的差异无统计学意义。我们将研究结果进一步与欧洲人群、非洲人群、日本人群及北京人群多态性分型结果比较和分析后可以得出,广西人群 miR-221 rs2858060C/G 位点与这 4 个地区人群基因多态性的差异均有统计学意义。出现这种差异的原因可能是自然环境的选择及进化的结果,具有不同遗传背景的人群,对疾病的易感性不同,也可能是疾病在不同地理环境的分布差异所致。我国人口众多,占地面积大,地理环境的差异对人类的影响是不可忽视的,而广西壮族自治区位于西南地区,生活方式以及饮食习惯与欧洲人、非洲人、日本人、北京人存在较大的差异,因而导致基因多态性的差异,这些差异最终导致不同地区人群对疾病的易感性不同。

总之,研究广西地区健康人群 miR-221 rs2858060C/G 遗传多态性及其分布特点,将有助于了解该人群在这方面的医学背景,为相关疾病的预防和治疗打下坚实的基础。同时,将其基因多态性分布与不同地区人群比较,将为后人在 miR-221 rs2858060C/G 基因相关疾病的遗传学和人类学等方面提供一些前瞻性资

料。

#### 参考文献:

- [1] 庞新亚,高峰,权胜伟. miRNA-221 和 miRNA-222 在肝细胞肝癌中的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(12):2912-2915.
- [2] 程文婷,傅奕. miR-221 的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2016,24(3):473-475.
- [3] 高冬梅,张媛媛,张璐,等. 宫颈癌组织 miR-221 的表达及其与 HPV 感染的关联[J]. 实用肿瘤学杂志,2014,28(4):299-304.
- [4] 韩晓翠,左晓丽,李敏,等. 微 RNA 221/222 在乳腺癌中的研究进展[J]. 中华乳腺病杂志(电子版),2017,11(6):369-371.
- [5] 魏川江,刘娴,王策,等. miR-221 在脑胶质瘤中的表达及调控关系[J]. 中国临床神经外科杂志,2017,22(7):463-466.
- [6] Szabó Z, Szegedi K, Gombos K, et al. Expression of miRNA-21 and miRNA-221 in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and their possible role in the development of ccRCC[J]. Urol Oncol,2016,34(12):533. e21-533. e27.
- [7] Chen F, Li XF, Fu DS, et al. Clinical potential of miRNA-221 as a novel prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biomark,2017,18(2):209-214.
- [8] 韩双喜,王丽,王介营,等. miRNA-221 对肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 国际医药卫生导报,2016,22(8):1050-1054.
- [9] Shao N, Ma G, Zhang J, et al. miR-221-5p enhances cell proliferation and metastasis through post-transcriptional regulation of SOCS1 in human prostate cancer[J]. BMC Urol,2018,18(1):14.
- [10] Abak A, Amini S, Estiar MA, et al. Analysis of miRNA-221 Expression Level in Tumors and Marginal Biopsies from Patients with Breast Cancer (Cross-Sectional Observational Study)[J]. Clin Lab,2018,64(1):169-175.
- [11] Yin Z, Xu M, Li P. miRNA-221 acts as an oncogenic role by directly targeting TIMP2 in non-small-cell lung carcinoma[J]. Gene,2017,620:46-53.
- [12] Shaker O, Alhelf M, Morcos G, et al. miRNA-101-1 and miRNA-221 expressions and their polymorphisms as biomarkers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. Infect Genet Evol,2017,51:173-181.
- [13] 翟博智,张春智,韩磊,等. miR-221 与 miR-222 通过靶基因 TIMP3 调控胶质瘤细胞侵袭能力[J]. 中华神经外科杂志,2011,27(7):701-704.
- [14] 冯丽萍,罗亮,苏文媚. 血浆 miR-221 在小细胞肺癌患者血浆中的表达及其临床意义[J]. 中国癌症杂志,2014,24(3):217-224.

收稿日期:2018-06-13;修回日期:2018-09-19