

本文引文格式:凌永嫦,仇雯丽,王俊利,等. 广西壮族女性人群 STK11 基因 rs2019107 和 rs741765 遗传多态性研究[J]. 右江民族医学院学报, 2021, 43(5): 622-626.

【论著与临床报道】

广西壮族女性人群 STK11 基因 rs2019107 和 rs741765 遗传多态性研究

凌永嫦^{1,2}, 仇雯丽², 王俊利^{1,2}, 李妹燕¹

(1. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨 STK11 单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphisms, SNPs)rs2019107 和 rs741765 在广西壮族正常女性人群中的分布情况,并与其他人群比较分析,为研究不同地区 STK11 基因突变与疾病易感性的关系提供参考依据。方法 采用 iMLDR 技术检测 351 例广西壮族正常女性人群 STK11 基因 rs2019107 和 rs741765 位点的基因型, DNA 测序技术验证,计算这两个位点的基因型和等位基因频率,并与千人基因组计划数据库中不同人群进行比较。结果 广西壮族正常女性人群中 rs2019107 和 rs741765 主要以 TC 基因型(52.99%和 50.71%)为主。rs2019107 基因型与美国、欧洲和印度正常女性人群分布频率差异有统计学意义($P < 0.05$),等位基因与欧洲人群正常女性分布频率差异有统计学意义($P < 0.05$)。rs741765 基因型和等位基因均与非洲、美国、北京汉族、欧洲和印度正常女性人群分布差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 在广西壮族正常女性人群中,STK11 基因 rs2019107 和 rs741765 存在遗传多态性,其基因型和等位基因具有种族差异。

关键词: STK11; 单核苷酸多态性位点; 基因多态性; 广西女性

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2021)05-0622-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.05.010

Genetic polymorphisms of rs2019107 and rs741765 of the STK11 gene in females of Guangxi Zhuang ethnic group

Ling Yongchang^{1,2}, Chou Wenli², Wang Junli^{1,2}, Li Meiyuan¹

(1. *The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;*

2. *Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China*)

Abstract: **Objective** To investigate the distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) loci rs2019107 and rs741745 of STK11 gene in normal females of Guangxi Zhuang ethnic group and to compare it with that of different ethnic groups. It aims to provide a reference for studying the relation between STK11 gene mutation and disease susceptibility in different regions. **Methods** The iMLDR technique was used to de-

基金项目: 2021 年研究生教育创新计划项目(YCSW2021344)

第一作者简介: 凌永嫦(1985—),女,硕士,主治医师,研究方向:恶性肿瘤的发病机制,E-mail:13607767168@163.com

通讯作者简介: 王俊利(1979—),男,博士,教授,博士/硕士研究生导师,研究方向:肿瘤的分子遗传学研究,E-mail:baise-wangjunli@163.com

test the genotypes of STK11 rs2019107 and rs741765 in 351 normal females of Guangxi Zhuang ethnic group. DNA sequencing was used for verification. The genotypes and allele frequencies of the two loci were calculated and compared with those of different populations in the Thousand Genome Project database. **Results** TC (52.99% and 50.71%) was the main genotype of rs2019107 and rs741765 in normal female population of Guangxi Zhuang ethnic group. The rs2019107 genotype of normal female population of Guangxi Zhuang ethnic group was significantly different from those of normal female population in The United States, Europe and India ($P < 0.05$), and the distribution frequency of rs2019107 allele was significantly different from that of European population ($P < 0.05$). The genotypes and alleles of rs741765 were significantly different from those of normal female populations in Africa, America, Beijing, Europe and India ($P < 0.05$). **Conclusion** The genetic polymorphism of STK11 rs2019107 and rs741765 is found in normal female population of Guangxi Zhuang ethnic group, and the genotypes and alleles of STK11 gene have racial differences.

Key words: STK11; single nucleotide polymorphisms loci; polymorphism; Guangxi females

丝氨酸/苏氨酸激酶 11(STK11)又称为肝激酶 B1(LKB1),该基因位于人类染色体 19p13.3 上,由 433 个氨基酸编码组成,编码丝氨酸-苏氨酸激酶,通过激活包括 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)在内的 12 种下游激酶家族,在调节细胞代谢、能量稳态、生长和极性方面发挥重要的作用^[1]。STK11 具有抑制肿瘤的作用^[2],该基因主要通过参与细胞代谢、细胞极性、细胞周期和信号转导调控等发挥抑癌作用^[3]。STK11 的缺失会破坏上皮细胞极性并促进癌症进展、转移^[4]。有研究报道,STK11 参与几种类型的人类癌症的发生和发展,其基因组改变与非鳞状细胞肺癌、乳腺癌、肝细胞癌和胃癌等癌症的侵袭性有关^[5]。国内外学者认为单核苷酸多态性位点(SNPs)是肿瘤的危险因素。Łaźniak S 等^[6]发现 CCAT2SNPs 位点 rs6983267 增加了宫颈癌中 MYC 基因的表达,进而促进荷兰人群宫颈癌细胞的侵袭及生长。LRRK2 rs10878441 CC 基因型与中国人人群中乳腺癌的不良预后相关^[7]。因此,本研究旨在分析 STK11 基因 rs2019107 和 rs741765 位点基因型和等位基因在不同女性人群中的分布差异,为 STK11 基因突变在不同人群与疾病易感性的研究提供参考依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 随机选取 2018—2019 年在广西右江民族医学院附属医院健康体检中心进行健康体检的壮族正常女性共 351 例,平均年龄(51.56 ± 8.85)岁,所研究人群各项临床检查和实验室指标均正常,且为长期居住在广西地区,无血缘关系,无恶性肿瘤、精神病、慢性病和自身免疫性疾病等。研究对象均经受试者签署知情同意书,并经右江民族医学院附属医院伦理委员会讨论批准。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采集研究对象的空腹静脉血 5 ml 于肝素抗凝管,使用深圳亚能公司 DNA 提取试剂盒提取研究外周血 DNA,放置 -80°C 冰箱备用。

1.2.2 引物合成和基因型检测 引物是上海天昊遗传分析中心有限公司用在线 Primer3 软件设计合成(见表 1)。首先取 $1 \mu\text{l}$ DNA 样本用 11% agarose 电进行质量检查以及浓度估计,然后根据估计的浓度将样本稀释到工作浓度 $5 \sim 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$;接着用 HotStar Taq(Qiagen 公司)进行多重 PCR,PCR 反应体系($20 \mu\text{l}$): $1 \times \text{GC-I buffer}$ (Takara 公司), 3.0 mM Mg^{2+} , 0.3 mM dNTP , $1 \text{ U HotStarTaq polymerase}$ (Qiagen 公司), $1 \mu\text{l}$ 样本 DNA 和 $1 \mu\text{l}$ 多重 PCR 引物。PCR 循环: 95°C 2 min; 11 个循环(94°C 20 s, 65°C 40 s, 72°C 1.5 min); 24 个循环(94°C 20 s, 59°C 30 s, 72°C 1.5 min); 72°C 2 min。多重 PCR 产物纯化:在 $20 \mu\text{l}$ PCR 产物中加入 5 U SAP 酶和 2 U Exonuclease I 酶, 37°C 温浴 1 h,然后 75°C 灭活 15 min 进行多重 PCR 产物纯化。连接反应体系: $10 \times$ 连接缓冲液 $1 \mu\text{l}$ 、高温连接酶 $0.25 \mu\text{l}$ 、 $5'$ 连接引物混合液($1 \mu\text{M}$) $0.4 \mu\text{l}$ 、 $3'$ 连接引物混合液($2 \mu\text{M}$) $0.4 \mu\text{l}$ 、纯化后多重 PCR 产物 $2 \mu\text{l}$ 、 ddH_2O $6 \mu\text{l}$ 混匀。连接程序: 38 个循环(94°C 1 min, 56°C 4 min)。接着取 $1 \mu\text{l}$ 稀释后的连接产物,与 $0.1 \mu\text{l}$ Liz500 size standard, $9 \mu\text{l}$ Hi-Di 混匀, 95°C 变性 5 min 后上 ABI3730XL 测序仪,通过毛细管电泳鉴别连接产物。SNP 分型用 GeneMapper4.1(Applied-Biosystems,USA)软件来分析,最后用 DNA 测序法验证。该试验委托上海天昊遗传分析中心进行。

表 1 rs2019107 和 rs741765 位点的引物信息

位点	引物
rs2019107	上游引物:5'-AGCACCATACCCTCCCTGTGGT-3'
	下游引物:5'-CGACCTGGCCTGGTAGGATCTC-3'
	连接引物:
	FC:5'-TCTCTCGGGTCAATTCGTCCTTCTGCTCCAGGGTGCCTCATGC-3'
	FP:5'-CGGTGCTGGCCGGCGTGTTTTTTTTT-3'
rs741765	上游引物:5'- TGGTTTGCCAGGTCCCTCAG -3'
	下游引物:5'- AGATGGACGGACGGCCAGT -3'
	连接引物:
	RC:
	RP:5'-GAGGGTGAACAGGGCCCATTTTTTTTTT-3'
	RT:5'-TACGGTTATTCTGGGCTCCTGTCCCTCTGGGGTGGGAGTGCA-3'

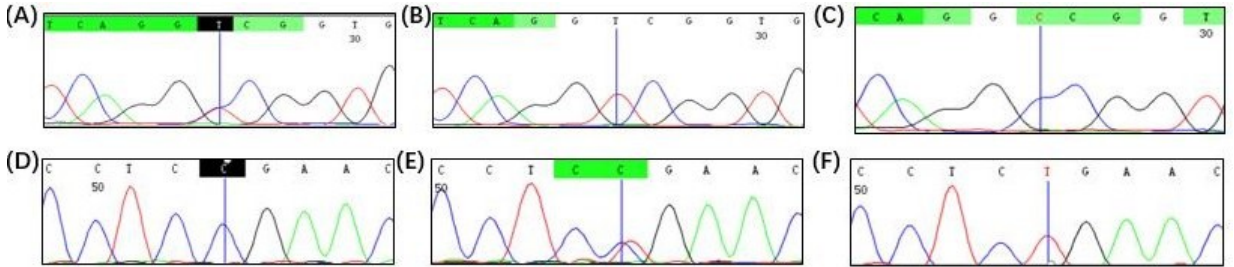
1.3 不同人群的基因型和等位基因分布频率数据获取 从千人基因组计划数据库获取非洲、美国、北京汉族、日本、欧洲和印度正常女性人群的基因型和等位基因分布频率。

1.4 统计学方法 使用 SPSS 24.0 软件进行数据的统计分析,采用 Hardy-Weinberg 平衡定律(hardy-weinberg equilibrium, HWE)验证研究对象是否均有

代表性,计数资料以百分率(%)表示。两组间基因型和等位基因分布差异比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rs2019107 和 rs741765 基因分型 在广西壮族正常女性人群中,rs2019107 和 rs741765 这两位点均存在 TT、TC 和 CC 三种基因型。测序图谱见图 1。



注:A~C 为 rs2019107 的基因型 TT、TC、CC;D~F 为 rs741765 的基因型 CC、CT、TT。

图 1 STK11 SNPs 测序图谱

2.2 rs2019107 和 rs741765 位点多态性的分布 本研究采用 HWE 遗传平衡定律检验样本的群体代表性,结果显示 rs2019107 和 rs741765 基因型均符合 HWE 遗传平衡 ($P > 0.05$),表明本研究对象具有群

体代表性。rs2019107 和 rs741765 在广西壮族女性人群中的基因型和等位基因分布频率,rs2019107 和 rs741765 均主要以基因型 TC 和等位基因 T 为主,见表 2。

表 2 rs2019107、rs741765 在广西壮族正常女性人群的分布

项目	基因型 (n = 351)			χ^2	P	等位基因 (n = 702)	
	TT	TC	CC			T	C
rs2019107	116(33.05)	186(52.99)	49(13.96)	3.503	0.061	418(59.54)	284(40.46)
rs741765	108(30.77)	178(50.71)	65(18.52)	0.310	0.578	394(56.13)	308(43.87)

注:表内计数资料数据用[n(%)]表示。

2.3 不同人群 rs2019107 和 rs741765 的基因型和等位基因分布频率 将广西壮族正常女性人群与千人基因组数据库中不同地区正常女性人群(包括非洲、美国、北京汉族、日本、欧洲、印度)进行基因型和等位基因的分布频率比较。结果表明:广西壮族正常女性 rs2019107 基因型分布频率与美国、欧洲和印度正常女性人群分布频率差异有统计学意义($P < 0.05$),而与非洲、北京汉族和日本正常女性人群分布频率差异无

统计学意义($P > 0.05$);其等位基因与欧洲正常女性人群分布频率差异有统计学意义($P < 0.05$)。广西壮族正常女性人群的 rs741765 的基因型分布频率与非洲、美国、北京汉族、欧洲和印度正常女性人群分布频率差异有统计学意义($P < 0.05$),而与日本正常女性人群分布频率无统计学意义($P > 0.05$);其等位基因与非洲、美国、欧洲和印度正常女性人群分布频率差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3、表 4。

表 3 rs2019107 在不同女性人群的分布频率

种族	n	基因型			χ^2	P	等位基因		χ^2	P
		TT	TC	CC			T	C		
广西壮族	351	116(33.05)	186(52.99)	49(13.96)			418(59.54)	284(40.46)		
非洲	319	113(35.42)	156(48.90)	50(15.67)	1.155	0.561	382(59.87)	256(40.13)	0.015	0.902
美国	170	55(32.35)	75(44.12)	40(23.53)	7.957	0.019	185(54.41)	155(45.59)	2.475	0.116
北京汉族	46	14(30.43)	21(45.65)	11(23.91)	3.171	0.205	49(53.26)	43(46.74)	1.326	0.250
日本	56	19(33.93)	26(46.43)	11(19.64)	1.469	0.480	64(57.14)	48(42.86)	0.231	0.631
欧洲	240	114(47.50)	95(39.58)	31(12.92)	13.153	0.001	323(67.29)	157(32.71)	7.316	0.007
印度	59	29(49.15)	20(33.90)	10(16.95)	7.682	0.021	78(66.10)	40(33.89)	1.818	0.178

注:表内计数资料数据用[n(%)]表示。

表 4 rs741765 在不同女性人群的分布频率

种族	n	基因型			χ^2	P	等位基因		χ^2	P
		TT	TC	CC			T	C		
广西壮族	351	108(30.77)	178(50.71)	65(18.52)			394(56.13)	308(43.87)		
非洲	319	14(4.39)	93(29.15)	212(66.46)	175.971	<0.001	121(18.97)	517(81.03)	195.051	<0.001
美国	170	9(5.29)	59(34.71)	102(60.00)	101.031	<0.001	77(22.65)	263(77.35)	103.646	<0.001
北京汉族	46	12(26.09)	18(39.13)	16(34.78)	6.673	0.036	42(45.65)	50(54.35)	3.604	0.058
日本	56	23(41.07)	24(42.86)	9(16.07)	2.352	0.309	70(62.50)	42(37.50)	1.601	0.206
欧洲	240	8(3.33)	89(37.08)	143(59.58)	128.820	<0.001	105(21.87)	375(78.13)	137.090	<0.001
印度	59	4(6.78)	32(54.24)	23(39.98)	20.619	<0.001	40(33.90)	78(66.10)	20.032	<0.001

注:表内计数资料数据用[n(%)]表示。

3 讨论

丝氨酸/苏氨酸激酶 11 (STK11)是肿瘤抑制基因,在调节细胞生长和细胞凋亡中起关键作用,且参与细胞周期进展和代谢、细胞极性和迁移,以及染色质重塑等,因此,又被称为多任务激酶。STK11/AMPK 通路负向调节癌细胞增殖和代谢,并且还参与肿瘤侵袭和迁移,可作为癌症进展的重要标志^[8]。Li 等^[9]研究发现乳腺癌 STK11 表达水平明显降低,并参与乳腺癌的转移和侵袭。STK11 在宫颈癌中发生了频繁的基因组改变,并发现该基因组改变指示宫颈癌患者预后较差^[10]。一项 Meta 分析^[11]表明,STK11 基因与乳腺癌、卵巢癌发病风险相关。以上研究表明,STK11 基因与女性恶性肿瘤,如宫颈癌、乳腺癌和卵巢癌等相

关。单核苷酸多态性 (SNP) 存在于人类基因组的每 200~300 个碱基对中,可作为遗传标记^[12]。除此之外,还对不同人群的疾病易感性存在差异。近年来,许多研究表明遗传多态性对疾病易感性起着重要的作用,可作为某些疾病的遗传标记和治疗效果的评价。目前鲜少见关于 STK11 基因多态性在广西壮族人群分布情况的文献报道。因此,本研究比较分析了 STK11 基因多态性位点 rs2019017 和 rs741765 的基因型和等位基因在不同地区人群中的分布差异,这有助于不同人群 STK11 基因突变与疾病易感性的探讨。

本研究结果显示,广西壮族正常女性人群 rs2019107 基因型分布与美国、欧洲人和印度人比较存在差异,而与北京汉族人之间的差异无统计学意义。

这可能是广西和北京地域差异小,且属于同一种族,所以基因多态性差异性小;而广西与美国、欧洲、北京地域差异大,无明显亲缘关系,因此 SNP 存在明显的差异性。广西壮族正常女性人群 rs741765 的基因型和等位基因均与非洲、美国、欧洲和印度正常女性人群分布差异均有统计学意义,而与日本人的差异无统计学意义,可能由于日本与中国相邻,地域差异较小有关。此外,还与生活环境和习惯、人口流动、文化差异以及通婚状况有关。STK11 基因位于人类染色体 19p13.3 上,据报道,rs741765 位点多态性可能与结直肠癌易感性有关^[13]。此外,Keshavarz P 等^[14]研究发现日本人群中的 rs741765 促进 2 型糖尿病发生发展,张娜娜等^[15]也发现 rs741765 与陕西汉族人群 2 型糖尿病的发生相关;这可能与中国和日本相邻,地域差异小,以及相近的亲缘性相关。Bassols J 等^[16]研究发现西班牙白人的 STK11 的 rs8111699 与妊娠期糖尿病有关;而与沙特妇女的妊娠糖尿病无相关性^[17],表明 STK11 基因多态性位点存在遗传异质性。这些研究结果表明由于种族和遗传背景差异,基因多态性与疾病易感性可能存在差异性。

综上所述,不同地区人群 STK11 基因多态性位点 rs2019107 和 rs741765 的基因型和等位基因分布差异具有统计学意义,表明不同种族和地区由于遗传背景和文化环境的差异,对疾病易感性也存在差异。广西是 G6PD 缺乏症和地中海贫血的高发地区,本研究为今后研究 STK11 基因多态性与不同种族人群疾病易感性的关系提供理论基础。

参考文献:

- [1] Skoulidis F,Goldberg ME,Greenawalt DM,et al. STK11/LKB1 mutations and PD-1 inhibitor resistance in KRAS-mutant lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Discov*,2018,8(7):822-835.
- [2] Lattouf H,Kassem L,Jacquemetton J,et al. LKB1 regulates PRMT5 activity in breast cancer[J]. *Int J Cancer*,2019,144(3):595-606.
- [3] Chung SJ,Nagaraju GP,Nagalingam A,et al. ADIPOQ/adiponectin induces cytotoxic autophagy in breast cancer cells through STK11/LKB1-mediated activation of the AMPK-ULK1 axis[J]. *Autophagy*,2017,13(8):1386-1403.
- [4] Peña CG,Nakada YJ,Saatcioglu HD,et al. LKB1 loss promotes endometrial cancer progression via CCL2-dependent macrophage recruitment [J]. *J Clin Invest*,2015,125(11):4063-4076.

- [5] Xiao J,Zou Y,Chen X,et al. The prognostic value of decreased LKB1 in solid tumors:a meta-analysis[J]. *PLoS One*,2016,11(4):e0152674.
- [6] Łaźniak S,Lutkowska A,Wareńczak-Florczak Z,et al. The association of CCAT2 rs6983267 SNP with MYC expression and progression of uterine cervical cancer in the Polish population [J]. *Arch Gynecol Obstet*,2018,297(5):1285-1292.
- [7] Zhang LW,Han L,Huang YB,et al. SNPs within microRNA binding sites and the prognosis of breast cancer [J]. *Aging (Albany NY)*,2021,13(5):7465-7480.
- [8] Li NS,Huang DQ,Lu NH,et al. Role of the LKB1/AMPK pathway in tumor invasion and metastasis of cancer cells (Review)[J]. *Oncol Rep*,2015,34(6):2821-2826.
- [9] Li J,Liu J,Li PP,et al. Loss of LKB1 disrupts breast epithelial cell polarity and promotes breast cancer metastasis and invasion [J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2014,33(1):70.
- [10] Hirose S,Murakami NY,Takahashi K,et al. Genomic alterations in STK11 can predict clinical outcomes in cervical cancer patients [J]. *Gynecol Oncol*,2020,156(1):203-210.
- [11] Angeli D,Salvi S,Tedaldi G. Genetic predisposition to breast and ovarian cancers:how many and which genes to test? [J] *Int J Mol Sci*,2020,21(3):1128.
- [12] Lee JE,Choi JH,Lee JH,et al. Gene SNPs and mutations in clinical genetic testing:haplotype-based testing and analysis[J]. *Mutat Res*,2005,573(1-2):195-204.
- [13] Lee SJ,Kang BW,Chae YS,et al. Genetic variations in STK11,PRKAA1, and TSC1 associated with prognosis for patients with colorectal cancer[J]. *Ann Surg Oncol*,2014,21(Suppl 4):S634-639.
- [14] Keshavarz P,Inoue H,Nakamura N,et al. Single nucleotide polymorphisms in genes encoding LKB1 (STK11),TORC2(CRTC2) and AMPK alpha2-subunit(PRKAA2) and risk of type 2 diabetes[J]. *Mol Genet Metab*,2008,93(2):200-209.
- [15] 张娜娜,王琼,石敏,等. LKB1 基因多态性与 2 型糖尿病相关性研究[J]. *现代生物医学进展*,2018,18(3):504-508,527.
- [16] Bassols J,Megia A,Soriano-Rodriguez P,et al. A common gene variant in STK11 is associated with metabolic risk markers and diabetes during gestation[J]. *Fertility Steril*,2013,100(3):788-792.
- [17] Alharbi KK,Khan IA,Eldrsouky MH,et al. The genetic polymorphism in the STK11 does not affect gestational diabetes[J]. *Acta Biochim Pol*,2015,62(3):569-572.

收稿日期:2021-08-29;修回日期:2021-09-08