

线粒体 DNA 单倍群 N9a 与胃肠胰神经内分泌肿瘤发病风险的关系

尔丽绵,吴明利,李 勇,檀碧波,徐志彬,郭占军,杨会钗
(河北医科大学第四医院,河北 石家庄 050010)

摘 要:[目的] 探讨线粒体 DNA(mtDNA)非编码区 D-loop 区单核苷酸多态性及归属单倍群与胃肠胰神经内分泌肿瘤(Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasm,GEP-NEN)发病风险的关系。[方法] 对 130 例 GEP-NEN 及 148 例正常健康对照组外周血 mtDNA D-loop 区序列进行 DNA 测序,通过与线粒体文库中的 Revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) 比对分析两组人群中 mtDNA D-loop 区多态位点出现频率的差异。[结果] 在 GEP-NEN 组和对照组中 mtDNA D-loop 区共检测到 148 个单核苷酸多态性(SNP)位点。筛选出 23 个 SNP 位点等位基因频率>5% 的单核苷酸多态位点用于肿瘤发病风险分析。GEP-NEN 组患者 mtDNA D-loop 区的 73G、150T、151T、492C、16257A、16261T 和 16399G 出现的频率明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),其中 150T、16257A、16261T 均属于 N9a 单倍群。[结论] mtDNA D-loop 区多态性位点线粒体 D-loop 区的突变分析对 GEP-NEN 高危人群具有诊断价值,线粒体 DNA 单倍群 N9a 可能与 GEP-NEN 发病风险相关。

关键词:单核苷酸多态性;胃肠胰神经内分泌肿瘤;D-loop

中图分类号:R735 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2018)04-0355-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2018.04.B013

The Relationship of N9a Haplogroup of Mitochondrial DNA with the Risk of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasm

ER Li-mian, WU Ming-li, LI Yong, et al.

(The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050010, China)

Abstract: [Objective] To observe the relationship between single nucleotide polymorphism in the D-loop genomic region of the mitochondrial DNA noncoding region and Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasm(GEP-NEN). [Methods] The D-Loop region of mtDNA was sequenced for 130 cases of GEP-NEN and 148 healthy controls. Compared with the Revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) in the mitochondrial library, the frequencies of polymorphism in the mtDNA D-loop region were analyzed between the two groups. [Results] a total of 148 single nucleotide polymorphisms (SNP) were detected in the D-loop mtDNA region of the control group and the GEP-NEN group. Allele frequency >5% single nucleotide polymorphism loci were used to analyze the risk of cancer, and 23 SNP loci were screened out. Compared with the healthy control group, GEP-NEN group of patients with mtDNA D-loop 16293G District of 73G, 150T, 151T, 492C, 16257A, 16261T and 16399G frequency significantly increased, the difference was statistically significant ($P<0.05$) There was significant difference ($P=0.001$) loci 150T, 16257A, 16261T belong to haplogroup N9a. Conclusion: SNPs in the mtDNA D-Loop were found to be valuable markers for GEP-NEN risk evaluation, and the mitochondrial DNA haplotype N9a may be associated with the risk of GEP-NEN.

Subject words: single nucleotide polymorphism; gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors; D-loop

胃肠胰神经内分泌肿瘤(gastroenteropancreatic

neuroendocrine neoplasm,GEP-NEN) 的发病率在过去几十年里大幅增加^[1,2]。其临床发病过程隐匿,进展缓慢,约三分之二的患者在疾病确诊时肿瘤已发生转移,确定 GEP-NEN 的肿瘤标志物及浸润转移的早期预警因素极其重要。近年来随着内镜诊断技

基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划(20160620;ZL20140022)

通讯作者:李 勇,科主任,主任医师,教授,博士;河北医科大学第四医院外三科,河北省石家庄市健康路 12 号(050010);E-mail:hbsyelm@163.com

收稿日期:2017-05-24;**修回日期:**2017-11-29

术的提高及生长抑素受体核素扫描的临床应用,使得这些肿瘤的临床诊断率明显提高^[3-5]。线粒体DNA(mtDNA)是核外唯一遗传物质,缺乏组蛋白保护和完整的修复系统,与核内基因组相比,mtDNA更易发生突变^[6,7]。多项研究表明D-loop区的基因突变与肝癌^[9]、食管癌^[10]、肺癌^[11]等肿瘤的发生密切相关,线粒体DNA D-loop区基因位点突变可作为肿瘤发病风险因素及预后标志物,对肿瘤的早期检测和诊断具有重要作用,目前mtDNA D-loop基因突变与GEP-NEN发病的关系尚少见报道。本研究旨在通过对GEP-NEN在线粒体基因组的突变分析,寻找这类具有异质性的特殊肿瘤早期诊断的标志物,以期为其后续治疗提供可能的靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2010年1月至2014年12月河北医科大学第四医院收治的GEP-NEN患者130例,其中男性77例,女性53例,平均年龄 55.4 ± 3.7 岁,患者术前未进行任何临床治疗,通过病理及免疫组化确认病理类型均为神经内分泌肿瘤。对照组为同期138名健康查体者,其中男性89名,女性59名,平均年龄 56.3 ± 4.6 岁,两组病例年龄、性别比较差异无统计学意义(Table 1)。

Table 1 The clinical characteristics between GEP-NEN patients and the healthy controls

Index	GEP-NEN (n=130)	Control (n=138)	χ^2	P
Age(years)				
≤55	76	80	0.007	0.935
>55	54	58		
Gender				
Male	78	75	0.873	0.350
Female	52	63		

1.2 研究方法

患者术前清晨空腹抽取2 ml静脉血,Wizard基因组DNA纯化试剂盒(Promega公司)迅速提取mtDNA,于-80℃冰箱保存备用。进行PCR扩增,上游引物:5'-CCCCATGCTTACAAGCAAGT-3';下游引物:5'-GCTTTGAGGAGGTAAGCTAC-3',产物大小为982 bp,PCR产物纯化并双相重复测序(由上海生工

生物工程技术服务有限公司完成)。PCR反应条件为:95℃预变性3min,94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸45s,35个循环,最后于72℃延伸5min。反应体系为25μl。利用DNAMAN软件分析GEP-NEN患者和健康人的mtDNA D-loop区序列,并与人mtDNA文库记录的剑桥序列(revised cambridge reference sequence, rCRS)进行比对,筛选出mtDNA D-loop区的多态性位点。

1.3 结果判断

根据单核苷酸多态性数据库中对普通变异的单核苷酸多态的定义,即这些位点的最小等位基因频率均>5%对结果进行判定^[12]。

1.4 统计学处理

采用SPSS 16.0软件包进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行t检验;计数资料以例(构成比)表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mtDNA D-loop 基因多态性位点的分布

GEP-NEN组与对照组中的mtDNA D-loop区共发现148个多态性位点,23个多态性位点出现频率大于5%,分别是146、150、151、152、330、425、453、195、249、263、309-310、489、492、16257、16261、16298、16304、16311、16319、16327、16362、16399、16519。

2.2 mtDNA D-loop 区基因多态性与 GEP-NEN 间的关系

GEP-NEN组患者的mtDNA D-loop区的73G、150T、151T、492C、16257A、16261T和16399G出现频率明显高于对照组(P 均<0.05)(Table 2)。其中150T、16257A、16261T均属于N9a单倍群(Figure 1)。

3 讨论

mtDNA是人类mtDNA是除核基因外唯一存在的遗传物质,是一长约16569bp的超螺旋双链环状DNA分子,包含两个不对称的核苷酸链,即重链(H链)和轻链(L链)^[13]。近年来研究发现,糖尿病、衰老及肿瘤等疾病的发生与mtDNA氧化损伤关系密切^[14],已有报道胃癌^[9]、结肠癌^[10]、肝癌^[11]等多种实体恶

Table 2 The frequency difference of SNP sites in the D-loop between GEP-NEN patients and the healthy controls

Nucleotide	GEP-NEN	Control	χ^2	P
73			27.445	<0.001
A	12	50		
G	118	88		
150			20.000	<0.001
C	68	108		
T	62	30		
151			17.051	<0.001
C	79	115		
T	51	23		
492			6.100	0.014
T	120	136		
C	10	2		
16257			33.406	<0.001
C	83	128		
A	47	10		
16261			10.698	0.001
C	87	116		
T	43	22		
16399			6.100	0.014
A	120	136		
G	10	2		

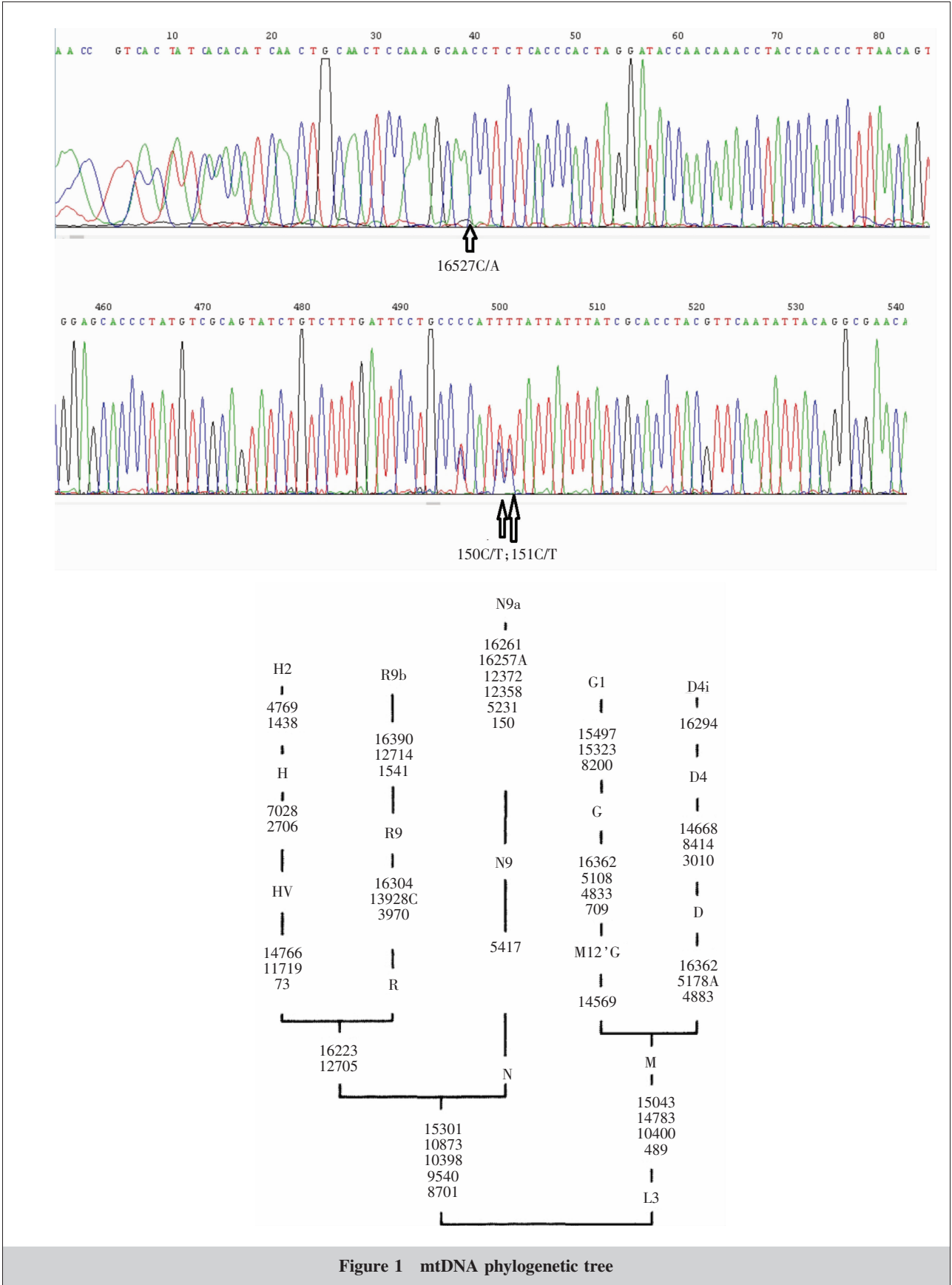
性肿瘤中存在 mtDNA 的高频率突变。D-loop 区(第 16 024 至 576 核苷酸之间的 1122 bp 片段) 是 mtDNA 的非编码区,由三个高变区(hypervariable region, HVR1,HVR2,HVR3)组成,mtDNA 突变主要集中在该区域^[9]。D-loop 区是 mtDNA 复制和转录的调控中心,此区域的突变会引起整个线粒体功能的紊乱,最终导致肿瘤的发生。基因多态性是指基因组水平上单个核苷酸变异引起的 DNA 序列多态性改变,在多基因疾病的易感基因研究领域广泛应用,mtDNA 与多种肿瘤的致癌风险有关,其变异位点多位于 D-loop 区^[15,16]。本研究结果发现,GEP-NEN 患者中多态性位点 73G、150T、151T、492C、16257A、16261T 和 16399G 的出现频率均明显高于对照组,多态位点 16257A、16261T、16399G 属于 mtDNA D-loop 高变区,173G、150T、151T 属于高变区 2,而 492C 位于高突变区 3,多数突变位点位于突变频率较高的 1、2 区,这与文献此序列具有高突变频率一致,但其具体作用机制尚不清楚^[17],可能是由于其突变和多态性抑制电子传递链,进而导致高水平的活性氧自由基 ROS 释放,大量的 ROS 堆积不仅可加速 D-loop 区基因的变异,形成恶性循环,同时可导致核基因的损

伤及突变,从而促进了肿瘤的发生、发展。

本研究同时发现在本研究结果中差别有统计学意义的 150T、16257A、16261T 均属于 N9a 单倍群,粒线体 DNA 单倍群类群是根据 mtDNA 上的特异性变异位点,将线粒体分为不同的世系,来自同一祖先的单倍群,具有相同的核苷酸突变位点。不同地区的单倍群集合是人类 mtDNA 种系发生树的一个分支,是由放射性的母系谱系连续积累的 mtDNA 突变所导致。随着祖先世代的迁移及环境的改变,线粒体积累的适应性突变或有害突变形成了不同的单倍群分支,而不同 mtDNA 单倍群上碱基突变也不同,所以对氧化磷酸化的修饰及效率也就不同,这可能影响不同 mtDNA 单倍群背景的个体对某些疾病的易感性,尽管既往研究显示某些单倍群可作为特定疾病的标记,但 mtDNA 单倍群的重要作用以及与人类行为的关系尚未明确,150 位点和 16257 位点多态性在其他肿瘤发病风险研究中尚少见报道。以往有研究报道 16257(C/A)可能与散发性乳腺癌风险密切相关^[18]。c16257a 多态位点曾经在日本及中国人群中有相应的检出报道^[19,20]。16257 位于基因高变区 1 (HV1)区域,是 mtDNA 突变主要发生的区域^[21]。我们的研究表明,该位点与 GEP-NEN 的发病风险及预后有明显的相关性 (D-loop 突变的意义),并且 c16257a 独立归属于 N9A 单倍群。由此推测线粒体 DNA 单倍体群 N9a 可能与 GEP-NEN 发病风险相关,当然这还有待大宗病例的收集及验证,mtDNA D-loop 区多态位点分析平台的建立将有助于筛选出 GEP-NEN 的高危人群,采取内镜筛查等手段早期发现并阻断病变临床进程,对于 GEP-NEN 这类少见肿瘤具有较为重要的临床意义。

参考文献:

- [1] Yao JC,Hassan M,Phan A,et al.One hundred years after "carcinoid":epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States[J].J Clin Oncol,2008,26(18):3063-3072.
- [2] Niederle MB,Hackl M,Kaserer K,et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours:the current incidence and staging based on the WHO and European Neuroendocrine Tumour Society classification;an analysis based on prospectively collected parameters [J]. Endocrine-Related Cancer,2010,17(4):909-918.



- [3] Modlin IM, Oberg K, Chung DC. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours[J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9(1): 61–72.
- [4] Gong TT, Hu DM, Zhu Q. Contrast-enhanced EUS for differential diagnosis of pancreatic mass lesions: a meta-analysis[J]. *Gastrointest Endosc*, 2012, 76(2): 301–309.
- [5] Iglesias-Garcia J, Domínguez-Muñoz JE. Endoscopic ultrasound image enhancement elastography [J]. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2012, 22(2): 333–348.
- [6] Marcelino LA, Thilly WG. Mitochondrial mutagenesis in human cells and tissues [J]. *Mutat Res*, 1999, 434(3): 177–203.
- [7] Yu M. Somatic mitochondrial DNA mutations in human cancers[J]. *Adv Clin Chem*, 2012, 57(57): 99–138.
- [8] Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer [J]. *Oncogene*, 2006, 25(34): 4663–4674.
- [9] Zhang R, Wang R, Zhang F, et al. Single nucleotide polymorphisms in the mitochondrial displacement loop and outcome of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 26(29): 155.
- [10] Zhang R, Zhang F, Wang C. Identification of sequence polymorphism in the D-Loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for hepatocellular carcinoma with distinct etiology[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 18(29): 130.
- [11] Wang H, Wang Y, Zhao Q, et al. Identification of sequence polymorphisms in the D-Loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for gastric cancer[J]. *Mitochondrial DNA*, 2016, 27(2): 1045–1047.
- [12] David A, Razali R, Wass MN, et al. Protein-protein interaction sites are hot spots for disease-associated nonsynonymous SNPs Sternberg [J]. *MJ Mutat*, 2012, 3 (2): 359–363.
- [13] Ding C, Li R, Wang P, et al. Identification of sequence polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for lung cancer [J]. *Mitochondrial DNA*, 2012, 23(4): 251–254.
- [14] Sharawat SK, Bakhshi R, Vishnubhatla S, et al. Mitochondrial D-loop variations in paediatric acute myeloid leukaemia: a potential prognostic marker[J]. *Br J Haematol*, 2010, 149(3): 391–398.
- [15] Clayton DA. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA[J]. *Annu Rev Cell Biol*, 1991, 7: 453–478.
- [16] Suzuki H, Suzuki S, Sakurai T. A bovine mtDNA-binding protein to a conserved sequence adjacent to the termination associated sequence in the vertebrate mitochondrial displacement loop region [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1996, 38(2): 275–283.
- [17] Dement GA, Maloney SC, Reeves R. Nuclear HMGA1 nonhistone chromatin proteins directly influence mitochondrial transcription, maintenance, and function[J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(1): 77–87.
- [18] Cheng M, Guo Z, Li H, et al. Identification of sequence polymorphisms in the mitochondrial displacement loop as risk factors for sporadic and familial breast cancer[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(5): 4773–4777.
- [19] Nagai A, Nakamura I, Shiraki F, et al. Sequence polymorphism of mitochondrial DNA in Japanese individuals from Gifu Prefecture[J]. *Leg*, 2003, (Suppl 1): S210–S213.
- [20] Young WY, Zhao L, Qian Y, et al. Extremely low penetrance of hearing loss in four Chinese families with the mitochondrial 12S rRNA A1555G mutation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328(4): 1244–1251.
- [21] Stoneking M. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67(4): 1029–1032.