

CD133 基因 3-UTR 区域变异位点与云南汉族人群宫颈癌的相关性*

周紫云¹, 姚宇峰¹, 张新文¹, 杨龙雨¹, 陈 琚¹, 戴书颖^{2,3}, 史 荔¹, 严志凌^{4**}

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院 医学生物学研究所, 云南 昆明 650118; 2. 昆明医科大学 基础医学院, 云南 昆明 650500; 3. 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500; 4. 昆明医科大学第三附属医院 妇科, 云南 昆明 650118)

[摘要] 目的: 研究 CD133 基因 3-UTR 区域的(rs2240688 和 rs3130)单核苷酸多态性位点(SNPs)与云南汉族人群宫颈癌的相关性。方法: 选取云南汉族宫颈癌患者 428 例作为病例组, 455 例云南汉族健康个体作为对照组; 采用 TaqMan 探针基因分型方法对 2 组受试者 CD133 基因中 rs2240688 和 rs3130 位点进行基因分型, 并采用 χ^2 检验分析上述两 SNPs 位点等位基因、基因型及构建的单倍型分布频率在病例组与对照组中的差异。结果: rs2240688 位点等位基因和基因型分布频率在病例组和对照组比较, 差异具有统计学意义($P = 0.019$ 、 0.040), 该位点等位基因 G 是宫颈癌的风险性因素($OR = 1.292$, 95% CI 为 $1.042 \sim 1.601$); 而 rs3130 位点等位基因和基因型分布频率在病例组和对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 单倍型分析结果显示, 单倍型 rs2240688G-rs3130C 是宫颈癌发生的风险性因素($P = 0.022$, $OR = 1.300$, 95% CI 为 $1.037 \sim 1.630$)。结论: CD133 基因 3-UTR 区域的 SNP 位点 rs2240688 与云南汉族人群宫颈癌的发病风险相关, 该位点等位基因 G 可能是宫颈癌发生的风险性因素。

[关键词] 宫颈肿瘤; 基因; CD133; 3-UTR; 多态性; 单核苷酸; 云南; 汉族

[中图分类号] R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)01-0031-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.01.006

Rs2240688 in CD133 Gene Was Associated with Cervical Cancer in A Chinese Han Population in Yunnan Province

ZHOU Ziyun¹, YAO Yufeng¹, ZHANG Xinwen¹, YANG Longyu¹,
CHEN Jun¹, DAI Shuying^{2,3}, SHI Li¹, YAN Zhiling⁴

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, Yunnan, China; 2. School of Basic Medical Science, Kunming Medical University, Kunming 650500, Yunnan, China; 3. School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming 650500, Yunnan, China; 4. Department of Gynaecologic Oncology, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650118, Yunnan, China)

[Abstract] **Objective:** To study the association of two single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs2240688 and rs3130 located at 3-UTR region of CD133 gene with cervical cancer in Han population from Yunnan province. **Methods:** A total of 428 patients with cervical cancer in Han population in Yunnan province were enrolled as the case group, and 455 healthy individuals from Yunnan Han population as the control group. The rs2240688 and rs3130 sites in the CD133 gene were detected using using TaqMan assays. The χ^2 test was used to analyze the differences in the frequency of alleles, genotypes and haplotype distribution frequency between the two SNPs in the case group and the control group.

*[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573206); 云南省应用基础研究重点项目(2016FA034); 中国医学科学院重大协同创新项目 2016-12M-2-001; 云南省应用基础研究计划-昆明医科大学联合专项(2017FE467-077, 2017FE467-012, 2018FE001-254); 云南省卫生厅科技处资助项目(2017NS189)

**通信作者 E-mail: yzlyyf@163.com

网络出版时间: 2019-01-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190118.1118.006.html>

Results: The allelic and genotypic distributions of rs2240688 were significantly different between case and control groups ($P = 0.019$ and 0.040 , respectively). The allele G is a risk factor of cervical cancer ($OR = 1.292$, $95\% CI: 1.042 \sim 1.601$). However, there is no difference of the allelic and genotypic frequencies of rs3130 between case and control groups ($P > 0.05$). Haplotype analysis showed that The haplotype rs2240688G-rs3130C was associated with a high risk of cervical cancer ($P = 0.022$, $OR = 1.300$; $95\% CI: 1.037 \sim 1.630$). **Conclusion:** rs2240688 in the 3-UTR region of CD133 gene is associated with the risk of cervical cancer in Yunnan Han population. The allele G may be a risk factor for cervical cancer.

[**Key words**] cervical cancer; gene; CD133; 3-UTR; polymorphisms, single nucleotide; Yunnan; Han population

宫颈癌是引起女性死亡的主要恶性肿瘤之一,发展中国家宫颈癌发病人数约占全球的 80%,死亡率接近 50%^[1]。CD133 是宫颈癌肿瘤干细胞表面的标记分子^[2],可通过 PI3K、FAK 及 Wnt/ β -catenin 等多种细胞信号通路调控细胞的生长、增殖、分化、迁移、凋亡和代谢^[3-6]。研究发现,CD133⁺宫颈癌干细胞显示出高度的致瘤性、耐药性及抗细胞凋亡等特征^[7],提示 CD133 分子可能在宫颈癌发生发展过程中发挥重要作用。CD133 基因中的多态性位点与多种人类疾病存在相关性^[8-15],因此本研究选取 CD133 基因 3-UTR 区域的两个单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphisms, SNPs) rs2240688 和 rs3130,研究其在云南汉族人群宫颈癌患者与健康对照人群中的分布差异,分析其与云南汉族人群宫颈癌的相关性。

1 材料与方法

1.1 样本来源

根据“知情同意”原则,选取 2012 年 10 月~2018 年 1 月在昆明医科大学第三附属医院收治的 428 例宫颈癌患者作为病例组,排除术前接受放、化疗等抗肿瘤治疗的患者,排除患有其他恶性肿瘤、或是合并心血管疾病患者,排除合并糖尿病、肝炎、肾病等疾病及资料不全患者。选取同期在昆明医科大学第三附属医院参加体检 HPV 阴性的正常健康女性 455 例作为对照组。

1.2 方法

1.2.1 样本基因组 DNA 提取 采集研究对象空腹静脉血,提取外周血基因组 DNA(QIAamp DNA Blood Mini Kit,货号 51106),检测浓度及纯度(微量紫外可见光光度计 ND-2000, Thermo Fisher Scientific)后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 SNP 位点的基因分型 CD133 基因中 rs2240688 和 rs3130 位点基因分型采用 Taqman 探针荧光定量 PCR 的方法进行。用于 CD133 基因 rs2240688 和 rs3130 位点的基因分型的试剂盒分别为 C_____89927_1_和 C_____89925_20,分型使用的 Master Mix 试剂均购自美国 ABI 公司(Applied Biosystems)。基因分型 PCR 反应体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$,反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, $92\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min(40 个循环), $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 最后延伸 5 min;以去离子水代替 DNA 模板作为基因分型的阴性对照。

1.3 统计学分析

统计学分析采用 SPSS 19.0 软件和 Microsoft Excell 软件,病例组和对照组间年龄的差异采用 Student t 检验,两组选取样本的群体代表性采用 Hardy-Weinberg 平衡检验;采用在线软件 SHEsis 分析 CD133 基因位点 rs2240688 及 rs3130 位点间的连锁不平衡^[8-9],并根据连锁不平衡结果构建两 SNPs 位点的单倍型;采用 χ^2 检验分析 CD133 基因 rs2240688 及 rs3130 等位基因、基因型及所构建的单倍型的分布频率在宫颈癌病例组和对照组中的差异, $P < 0.05$ 表明不同组间的数据比较差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基本信息及群体代表性

对照组共纳入正常健康女性 455 例,平均(46.98 ± 7.43)岁;病例组共纳入 428 例,平均(46.25 ± 9.59)岁,两组受试者年龄比较,差异无统计学意义($P = 0.179$)。Hardy-Weinberg 平衡检验结果显示,CD133 基因 rs2240688 和 rs3130 位点各基因型在病例组($P = 0.88$ 、 0.75)和对照组($P =$

0.99、0.37) 的分布均符合 *Hardy-Weinberg* 平衡检验 ($P>0.05$),表明本研究所选取的样本是具有群体代表性的随机样本。

2.2 CD133 基因 rs2240688 及 rs3130 位点与与宫颈癌的相关性

病例组和对照组 CD133 基因 rs2240688 及 rs3130 位点的等位基因和基因型分布频率见表 1。结果显示,rs2240688 位点等位基因和基因型分布

频率在病例组和对照组比较,差异具有统计学意义 ($P=0.019、0.040$),该位点等位基因 G 在病例组中的分布频率显著高于对照组,是云南汉族人群宫颈癌发生的风险性因素 ($OR=1.292,95\% CI$ 为 $1.042\sim1.601$)。而 rs3130 位点的等位基因和基因型分布频率在宫颈癌病例组和对照组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),提示该位点与云南汉族人群宫颈癌发生风险无相关性。

表 1 两组被检者 CD133 基因 rs22406882 和 rs3130 位点等位基因及基因型频率分布

Tab. 1 The distribution frequencies of alleles and genotypes of rs22406882 and rs3130 between case and control groups					
SNPs 位点	等位基因/基因型	病例组 (n, %)	对照组 (n, %)	P	OR(95% CI)
rs2240688	G	238 (27.8)	209 (23.0)	0.019	1.292 (1.042 ~ 1.601)
	T	618 (72.2)	701 (77.0)		
	G/G	26 (6.0)	15 (3.3)		
	G/T	186 (43.5)	179 (39.3)		
	T/T	216 (50.5)	261 (57.4)		
rs3130	C	560 (65.4)	564 (62.0)	0.133	1.161 (0.956 ~ 1.410)
	T	296 (34.6)	346 (38.0)		
	C/C	183 (42.7)	174 (38.2)		
	C/T	194 (45.3)	216 (47.5)		
	T/T	51 (11.9)	65 (14.3)		

2.3 rs22406882 及 rs3130 位点的连锁不平衡分析及单倍型构建

结果显示,CD133 基因 rs2240688 及 rs3130 位点完全连锁 ($D'=1.00$)。构建两位点的单倍型,并分析分布频率 $>3\%$ 的单倍型在病例组和对照组

中分布频率,结果显示,病例组单倍型 rs2240688G-rs3130C 的分布频率显著高于对照组 ($P=0.023$),提示单倍型 rs2240688G-rs3130C 是云南汉族宫颈癌发生的风险性因素 ($OR=1.300,95\% CI$ 为 $1.037\sim1.630$),见表 2。

表 2 两组被检者 CD133 基因 rs22406882 及 rs3130 位点的单倍型频率分布特征

Tab. 2 The distribution characteristic of haplotypes constructed by rs22406882 and rs3130 in CD133 gene					
rs2240688	rs3130	病例组 (n, %)	对照组 (n, %)	P	OR(95% CI)
G	C	213.38 (25.7)	181.39 (21.1)	0.023	1.300 (1.037 ~ 1.630)
T	C	333.62 (40.2)	356.61 (41.6)	0.626	0.953 (0.784 ~ 1.157)
T	T	275.38 (33.2)	316.39 (36.9)	0.129	0.856 (0.700 ~ 1.046)

3 讨论

CD133 编码基因位于人类染色体 4p15 上,被认为是与癌症易感性密切相关的区域^[10-12],其编码蛋白 CD133 被认为是肿瘤干细胞的重要标志分子^[13-15]。研究发现 CD133 蛋白的表达与细胞增殖、分化、凋亡等密切相关^[3-5,16-17]。基因的 3-UTR 区域可能通过与 microRNA 的相互作用参与基因表达的调控^[18-20]。已有研究发现,位于 CD133 基因 3-UTR 区域的 SNPs 位点与多种人类

肿瘤具有相关性^[21-23]。因此,本研究选取了位于 CD133 基因 3-UTR 区域的 rs2240688 和 rs3130 两个 SNPs 位点,研究其与云南汉族人群宫颈癌发病风险的相关性。结果显示 rs2240688 位点等位基因和基因型在宫颈癌病例组和对照组的分布频率比较,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。该结果与 Liu 等^[21]在肺癌以及 Wang 等^[22]在胃癌中的研究结果相一致。有研究显示 rs2240688 可能位于 microRNA-135a/b 的结合位点,而 microRNA-135b 在宫颈癌细胞的增殖中发挥重要调控作用^[24]。因此,推测 CD133 基因 rs2240688 位点可能是通过影

响靶向 CD133 mRNA 3-UTR 的 microRNA-135b 对 CD133 基因表达的调控,而在宫颈癌发生发展过程中发挥作用。本研究进一步分析了位于 CD133 基因 3-UTR 区域的 rs2240688 和 rs3130 位点间的连锁关系,发现两个位点存在强连锁。而对构建的单倍型与宫颈癌的相关性进行分析发现,rs2240688G-rs3130C 单倍型与宫颈癌患病风险增加具有相关性。这也与等位基因分析结果中 rs2240688 等位基因 G 可能是宫颈癌的风险因素的结果相符。

综上,宫颈癌是仅次于乳腺癌的引起女性死亡的恶性肿瘤,近几年宫颈癌在中国的发病率和死亡率呈逐年上升趋势^[25],宫颈癌的早期筛查对于降低宫颈癌的发病率和死亡率具有重要的意义。因此,寻找特异性的宫颈癌诊断和治疗靶标对于宫颈癌的早期诊断治疗非常重要。本研究发现位于宫颈癌肿瘤干细胞标志分子 CD133 基因 3-UTR 区域的 SNP 位点 rs2240688 与云南汉族宫颈癌的发生具有相关性,该位点等位基因 G 是云南汉人群宫颈癌发生的风险因素,这为寻找宫颈癌诊断治疗靶标提供了基础的研究数据,但因样本量的关系,本研究的结果需大样本研究来进行验证。

4 参考文献

[1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide; sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. International Journal of Cancer, 2015, 136(5): 359–386.

[2] TYAGI A, VISHNOI K, MAHATA S, et al. Cervical cancer stem cells selectively overexpress hpv oncoprotein E6 that controls stemness and self-renewal through upregulation of HES1[J]. Clinical Cancer Research; an official Journal of the American Association for Cancer Research, 2016, 22(16): 4170–4184.

[3] YUANYAN W, YIZHOU J, FEI Z, et al. Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(17): 6829–6834.

[4] JANG J W, SONG Y, KIM S H, et al. CD133 confers cancer stem-like cell properties by stabilizing EGFR-AKT signaling in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer letters, 2017, 389: 1–10.

[5] LIU C, LI Y, XING Y, et al. The interaction between cancer stem cell marker CD133 and src protein promotes

focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation and cell migration[J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(30): 15540–15550.

[6] GERMANA R, FARGEAS C A, LE T T, et al. Letter to the Editor: an intriguing relationship between lipid droplets, cholesterol-binding protein CD133 and Wnt/ β -Catenin signaling pathway in carcinogenesis[J]. Stem Cells, 2015, 33(4): 1366–1370.

[7] LIU C T, XIN Y, TONG C Y, et al. Production of interleukin-4 in CD133 + cervical cancer stem cells promotes resistance to apoptosis and initiates tumor growth[J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 13(6): 5068–5076.

[8] SHI Y Y, HE L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci[J]. Cell Research, 2005, 15(2): 97–98.

[9] LI Z, ZHANG Z, HE Z, et al. A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>) [J]. Cell Research, 2009, 19(4): 519–523.

[10] HU N, WANG C, NG D, et al. Genomic characterization of esophageal squamous cell carcinoma from a high-risk population in China[J]. Cancer Research, 2009, 69(14): 5908–5917.

[11] FENG B J, HUANG W, SHUGART Y Y, et al. Genome-wide scan for familial nasopharyngeal carcinoma reveals evidence of linkage to chromosome 4[J]. Nature Genetics, 2002, 31(4): 395–399.

[12] PETERSEN S, ANINAT-MEYER M, SCHLUNS K, et al. Chromosomal alterations in the clonal evolution to the metastatic stage of squamous cell carcinomas of the lung[J]. British Journal of Cancer, 2000, 82(1): 65–73.

[13] JANI KOVA M, SKARDA J, DZIECHCIARKOVA M, et al. Identification of CD133 +/nestin + putative cancer stem cells in non-small cell lung cancer[J]. Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia, 2010, 154(4): 321–326.

[14] CHEN Y L, LIN P Y, MING Y Z, et al. The effects of the location of cancer stem cell marker CD133 on the prognosis of hepatocellular carcinoma patients[J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 474.

[15] REN F, SHENG W Q, DU X. CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers[J]. World Journal of Gastroenterology, 2013, 19(17): 2603–2611.