

## MDS1-EVI1 基因多态性与鼻咽癌相关性研究

陈 灿<sup>1)</sup>, 蒋永新<sup>2)</sup>

(1) 昆明医科大学, 云南 昆明 650118; 2) 云南省肿瘤医院, 云南 昆明 650118)

**[摘要]** **目的** 探讨 MDS1-EVI1 基因 SNP rs6774994 多态性与云南鼻咽癌之间的相关性研究. **方法** 采用 TaqMan-PCR 方法检测 MDS1-EVI1 基因 rs6774994 基因型与等位基因频率. **结果** (1) 鼻咽癌组和对照组 MDS1-EVI1 基因 rs6774994 各基因型 ( $P=0.843$ ) 和等位基因频率 ( $P=0.784$ ) 组间分布差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); (2) 鼻咽癌患者 MDS1-EVI1 基因 rs6774994, 有家族遗传史患者 GG 基因型携带者高于无家族遗传史患者 ( $P<0.01$ ), 且病理分化类型为非低分化鳞癌的患者 GG 基因型携带者高于低分化鳞癌患者 ( $P<0.01$ ). **结论** MDS1-EVI1 基因 rs6774994 可能不增加云南人罹患鼻咽癌的风险. MDS1-EVI1 基因 rs6774994GG 等位基因可能与家族遗传史和病理分化类型有一定相关性.

**[关键词]** 鼻咽癌; MDS1-EVI1 基因; 多态性; TaqMan-PCR

**[中图分类号]** R739.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2013) 06-0085-05

## Correlation between MDS1-EVI1 Gene Polymorphism and Nasopharyngeal Carcinoma

CHEN Can<sup>1)</sup>, JIANG Yong-xin<sup>2)</sup>

(1) Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650118, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the correlation of MDS1-EVI1 gene polymorphism rs6774994 with nasopharyngeal carcinoma in Yunnan population. **Methods** The allele frequencies of the genotypes of rs6774994 were detected by utilizing real-time fluorescent PCR method based on TaqMan probe. **Results** (1) There was no significant difference in the genotypes ( $P=0.843$ ) and allele frequency ( $P=0.784$ ) of MDS1-EVI1 rs6774994 between the nasopharyngeal carcinoma group and the control group ( $P>0.05$ ). (2) In nasopharyngeal carcinoma patients with MDS1-EVI1 rs6774994, the GG genotype of patients with a family history was significantly higher than that of patients with no family history ( $P<0.001$ ), and the GG genotype of patients with no poorly-differentiated squamous cell carcinoma was significantly higher than that of patients with poorly-differentiated squamous cell carcinoma ( $P<0.001$ ). **Conclusion** MDS1-EVI1 rs6774994 may be not associated with nasopharyngeal carcinoma in Yunnan population. The GG alleles with MDS1-EVI1 rs6774994 may be related to family history of genetic and pathological differentiation type.

**[Key words]** Nasopharyngeal carcinoma; MDS1-EVI1 gene; Polymorphism; TaqMan-PCR

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 为上皮来源的恶性肿瘤, 中国是鼻咽癌发病率最高的国家, 近年来在中国云南地区鼻咽癌发病率有明显的上升趋势, 且覆盖各年龄阶段. 本研究选

择全基因组关联性研究最新发现的脊髓发育不良因子 1-嗜亲性病毒插入位点 1 融合蛋白 (myelodysplasia 1 and ecotropic viral insertion site 1 fusion proteins MDS1-EVI1) 为研究靶点, 探讨

**[基金项目]** 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2009CD); 昆明医科大学研究生创新基金资助项目 (2012N03)

**[作者简介]** 陈灿 (1986~), 女, 辽宁盘锦市人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤学研究工作.

**[通讯作者]** 蒋永新. E-mail: jiyongx99@126.com。

MDS1-EVI1 基因 rs6774994 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 与云南鼻咽癌发病风险的关系, 为今后鼻咽癌高危人群的筛查提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

所有对象均进行详细既往病史询问、体检。血标本采集: (1) 病例组共 87 例: 收集 2011 年 5 月至 2012 年 5 月至云南省肿瘤医院就诊无血缘关系的云南籍 (在云南生活居住至少三代) 鼻咽癌患者外周血标本, 其中男性 61 例, 女性 26 例, 最大年龄 77 岁, 最小年龄 17 岁, 平均  $(49.1 \pm 13.4)$  岁。病例组均有典型临床表现, 并且纤维鼻咽镜下鼻咽部活检诊断为鼻咽癌的病例; (2) 对照组共 100 例: 无血缘关系的云南籍接受常规体检的人群, 并且无肿瘤家族病史及其他疾病的健康人。其中男性 65 例, 女性 35 例, 最大年龄 77 岁, 最小年龄 17 岁, 平均  $(47.8 \pm 14.2)$  岁。病例组及对照组的年龄、性别比较, 差异无统计学意义 ( $P_{\text{性别}}=0.457$ ;  $P_{\text{年龄}}=0.513$ )。

### 1.2 人外周血白细胞基因组 DNA 提取

清晨抽取研究对象空腹外周静脉血 3~5 mL, 采用人类基因组 DNA 提取试剂盒提取外周静脉血基因组 DNA。

### 1.3 用 TaqMan-PCR 方法鉴别等位基因

使用 ABI-7500 实时荧光定量 PCR 系统, 通过检测两种标记的等位基因探针的相对荧光强度来确定基因型, 利用终点法对等位基因进行定性的检测, 分析处理 PCR 扩增后的 FAM 和 VIC 荧光信号, 再将 96 孔板上每一孔的原始数据转化成数据点呈现在图上, 2 种不同等位基因纯合子数据点分别沿水平轴、垂直轴分布, 杂合子数据点沿对角线分布。

### 1.4 基因 SNPs 探针、引物设计

将选定的 MDS1-EVI1 基因 rs6774994 多态性位点在 Applied Biosystems 公司网站上查找, 存在设计完成的针对该位点的 TaqMan-MGB 探针, 将探针标号及 SNP 位点一起送至 Applied Biosystems 公司合成引物及探针。并订购基因分型试剂盒 Master Mix, PCR 反应体系如下:

上游: 60\_10\_F

下游: 60\_10\_R

报告名称 1: C\_29376860\_10\_V;

报告基因染料 1: VIC;

淬灭基因 1: NFQ;

报告名称 2: C\_29376860\_10\_M;

报告基因染料 2: FAM;

淬灭基因 2: NFQ;

相关序列: ATTTAATTTTACAGGCCATGGC-TT[A/G]GTGACATATTGACTGTTTCCTTAA;

分类位置: 3 号染色体。

建立 25 uL 反应体系, 依次加入  $2 \times$  TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂 ( $2 \times$ ) 12.50  $\mu$ L,  $20 \times$  单核苷酸多态性基因分型试剂 ( $20 \times$ ) 1.25  $\mu$ L, 余下用无 DNA/RNA 酶水稀释浓度为 100 ng/ $\mu$ L 样本 11.25  $\mu$ L; 将混匀的试剂加入 96 孔板。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 保持 10 min, PCR (50 循环): 92  $^{\circ}$ C 解链 15 sec, 后 60  $^{\circ}$ C 延伸 90 sec。要求恒温避光保存。

### 1.5 统计学处理

所有资料采用 SPSS 软件包建立数据库。根据基因型计算各组基因型频率及等位基因频率, 采用  $\chi^2$  检验分析 A、G 等位基因和各基因型频率分布差异, 若统计数据值较小可采用秩和检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MDS1-EVI1 基因 rs6774994 荧光扩增曲线

图 1 所示为无模板空白对照 (no template control, NTC) 的实时 PCR 反应曲线: 横坐标代表 PCR 进行的循环数目, 纵坐标代表荧光积累量, 图中的绿色、红色曲线分别代表 VIC 和 FAM 荧光反应曲线, 蓝色 ROX 标记的荧光探针作为校正和内参基线。每一个样本可得到两条反应曲线, 一条是 VIC 探针反应曲线, 另一条是 FAM 探针反应曲线。图中两条荧光信号随着 PCR 反应的进行均无增高, 为 NTC。图 2 所示为纯合子实时 PCR 反应曲线, AA 基因型样本的反应曲线表现为随着 PCR 反应进行, VIC 标记的探针产生荧光信号增强, 而 FAM 标记的探针无荧光信号或仅有很低的荧光信号。图 3 所示为杂合子实时 PCR 反应曲线, AG 基因型的反应曲线表现为随着 PCR 反应进行, FAM 标记的探针和 VIC 标记的探针产生荧光信号均增高, 且增高基本平行一致。图 4 所示为纯合子实时 PCR 反应曲线, GG 基因型样本的反应曲线表现为随着 PCR 反应进行, FAM 标记的探针产生荧光信号增强, 而 VIC 标记的探针无荧光信号或仅有很低的荧光信号。

### 2.2 MDS1-EVI1 基因 rs6774994 基因分形图

分析结果如图 5 所示: ABI-7500 型荧光定量 PCR 仪软件中, SNP 结果的等位基因鉴别试验图谱中每一个符号 (□、○、◇、△、×) 代表一个样品, 横坐标 X 代表 VIC 荧光信号, 纵坐标 Y 代表 FAM 荧光信号. 正常的信号分布应分为 4 组, “□” 靠近原点处为 NTC (无模板空白对照); “○” 靠近 X 轴的是 VIC 信号, 是携带 VIC 信号的探针所表示的等位基因的纯合子 (即 AA 基因型); “◇” 靠近 Y 轴的是 FAM 信号, 是携带 FAM 信号的探针所代表的等位基因的纯合子 (即 GG 基因型); “△” 靠近对角线位置的信号既包含有 VIC

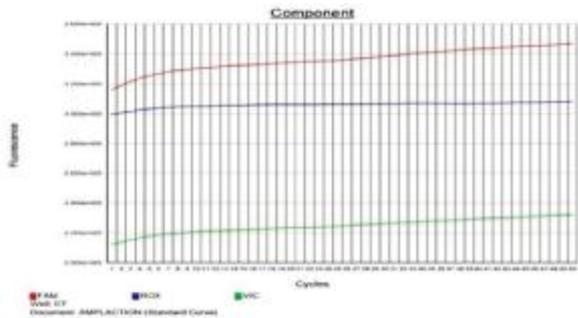


图 1 无模板空白对照实时荧光定量扩增曲线  
Fig. 1 Real-time fluorescent quantitative amplification curve of NTC

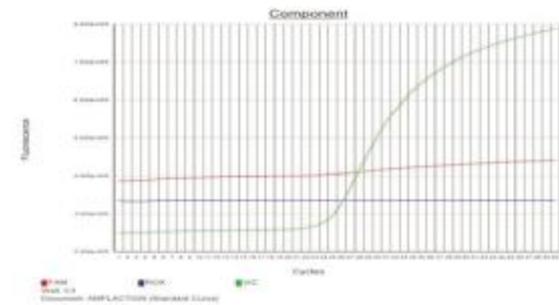


图 2 纯合子 AA 基因型实时荧光定量扩增曲线  
Fig. 2 Real-time fluorescent quantitative amplification curve of homozygote AA genotype

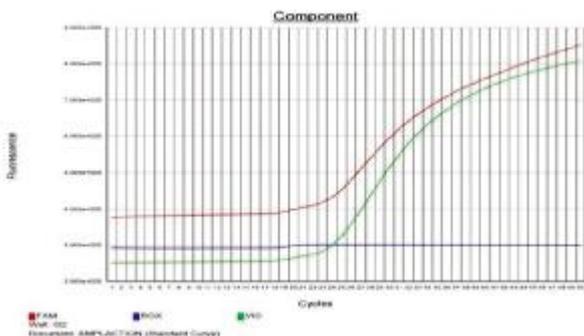


图 3 杂合子 AG 基因型实时荧光定量扩增曲线  
Fig. 3 Real-time fluorescent quantitative amplification curve of heterozygote AG

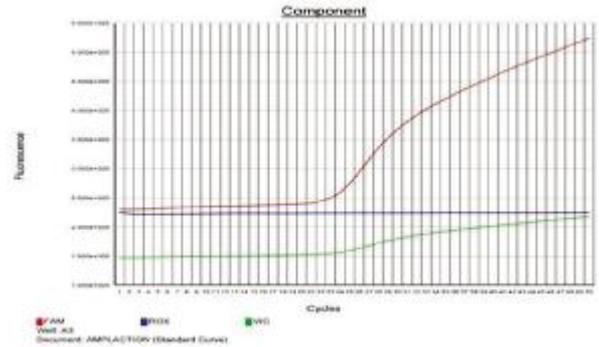


图 4 纯合子 GG 实时荧光定量扩增曲线  
Fig. 4 Real-time fluorescent quantitative amplification curve of homozygote GG genotype

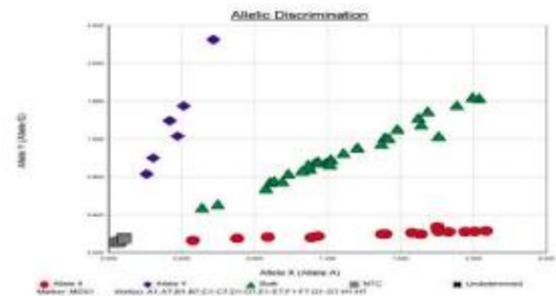


图 5 MDS1-EVI1 基因 rs6774994 多态性的检测图  
Fig. 5 MDS1-EVI1 gene SNP rs6774994 allele distribution plot

信号也包含有 FAM 信号, 是杂合子 (即 AG 基因型)。

### 2.3 2 组基因型和频率分布

(1) 鼻咽癌组和健康对照组 AA、AG、GG 基因型差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 鼻咽癌组和健康对照组 A 和 G 等位基因频率, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1; (2) MDS1-EVI1 基因 rs6774994 AA、AG、GG 基因型与鼻咽癌患者性别、吸烟、饮酒以及临床分期之间, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); (3) 在鼻咽癌患者中有家族遗传史患者 GG 基因型携带者显著高于无家族遗传史患者, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 病理分化类型为非低分化鳞癌的患者纯合子 GG 基因型携带者显著高于低分化鳞癌患者, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见表 2。

## 3 讨论

Mucenski 等于 1988 年第一次在 AKXD 鼠髓系恶性肿瘤 DNA 中发现了 EVI1 基因. 通过建立小鼠逆转录病毒诱发的急性髓系白血病 (acute myelocytic leubemia, AML) 模型, 观察到 EVI1 是病毒

表 1 NPC 组和正常对照组 MDS1-EVI1 基因 rs6774494 基因型及等位基因频率分布 (%)

Tab. 1 The distribution of genotype and allele frequency of MDS1-EVI1 gene rs6774494 in NPC group and normal control group (%)

组别	基因型 (n)			基因频率 (%)	
	AA	AG	GG	A	G
NPC	34(39.1)	44(50.6)	9(10.3)	112(64.4)	62(35.6)
正常对照	39(39.0)	48(48.0)	13(13.0)	126(63.0)	74(37.0)
$\chi^2$	0.342			0.075	
<i>P</i>	0.843			0.784	

表 2 鼻咽癌患者 MDS1-EVI1 基因 rs6774494 各基因型基本资料比较

Tab. 2 The comparison of basic information in each genotype of MDS1-EVI1 gene rs6774494 of NPC patients

基因型	性别		吸烟		饮酒		家族遗传史		临床分期*		病理类型	
	男	女	是	否	是	否	有	无	早	晚	低分化	非低分化
AA	22	12	15	19	9	25	2	31	8	26	30	3
AG	31	13	20	24	15	29	1	43	14	30	37	7
GG	8	1	6	3	2	7	3	7**	1	8	5	5 $\Delta\Delta$
<i>P</i>	0.37		0.46		0.666		0.000		0.389		0.000	

\*注: 早期临床分期为 I、II 期, 晚期为 III、IV 期. 与有家族遗传史比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与低分化比较,  $\Delta\Delta P < 0.01$ .

常见的插入位点<sup>[1,2]</sup>. EVI1 (ecotropic virus integration site-1) 基因定位于人类基因组 3 号染色体 (3q26.2) 上, 编码 16 个外显子, 其中 10 个编码蛋白质, 第一个框架内 ATG 的起始密码子存在于外显子 3 内<sup>[3]</sup>. 人 EVI1 基因 cDNA 含 3 587 bp, 包括 5' 非编码序列 267 bp, 开放阅读框 3 153 bp 以及 3' 非编码序列 167 bp<sup>[4]</sup>. EVI-1a、EVI-1b、EVI-1c、EVI-1d、EVI-3L 是位于 5' 非编码区所有的亚型, 仅 EVI-1a 为非人类细胞所特有<sup>[5]</sup>. EVI1 基因产物是一个位点特异且与 RNA 转录调节有关的 DNA 结合蛋白. EVI1 蛋白还有一种更短的缺乏锌指 6 和 7 的同种型, 选择性剪接形成的相对分子质量为 8.8 万, 在人和鼠均可见<sup>[5,6]</sup>.

MDS1 基因, 又称 MDS 相关基因 (MDS-associated gene), 于 1994 年由 Nucifora 等<sup>[7]</sup>首先在骨髓增生异常综合征 (MDS) 患者骨髓细胞中发现, MDS1 定位于 EVI1 上游 170 ~ 400 kb 处<sup>[7,8]</sup>, 转录本大约为 115 和 210 kb, 编码一种相对分子质量 2.8 万的蛋白<sup>[1,9,10]</sup>. Fears 等<sup>[8]</sup>证实 MDS1 既能作为一个独立的基因, 又可以与 EVI1 结合形成融合基因 MDS1-EVI1, 已从正常人基因文库中分离出编码 MDS1-EVI1 的 cDNA 克隆.

MDS1-EVI1 编码 3 种蛋白, EVI1、MDS1 和融合蛋白 MDS1-EVI1. Kreider<sup>[11]</sup>等已证实 EVI1 在红系造血中能明显抑制 GATA-1 依赖的转录激活作用. Soderholm<sup>[12]</sup>等比较了 MDS1-EVI1 和 EVI1

的作用, 进一步证实 MDS1-EVI1 是一个含 GATA 基序启动子的强激活物, 而 EVI1 则抑制了由 GATA-1 介导的激活作用. 当去除 MDS1-EVI1 氨基端 188 个氨基酸变成 EVI1 后, 由激活物转变为抑制物, 且 MDS1-EVI1 本身也受 EVI1 的抑制. 许多研究表明, EVI1 基因过度表达本身也有阻碍髓系细胞分化促进其转化的作用. EVI1 作为转录因子参与造血细胞白血病转化过程, 可以抑制 TGF- $\beta$  (转化生长因子 transforming growth factor -  $\beta$ ) 在生长抑制发面的效能<sup>[13]</sup>, 反过来促进肿瘤生长; EVI1 还可以通过抑制 c-JNK 保护细胞免受诱导凋亡<sup>[13,14]</sup>. 相比之下, 当 EVI1 与 MDS1 融合时, 其抑制 TGF- $\beta$  信号的能力明显削弱<sup>[15]</sup>. 众所周知, TGF- $\beta$  和 JNK 信号通路与 EB 病毒相关的鼻咽癌肿瘤形成相关, 因此 EVI1 和 MDS1-EVI1 之间平衡的中断对于鼻咽癌的发病机制至关重要<sup>[16,17]</sup>.

本研究试图以 MDS1-EVI1 基因 rs6774994 (A/G) 位点作为候选 SNP 位点在云南鼻咽癌人群中寻找发病易感性. 然而, 并未发现 MDS1-EVI1 基因 rs6774994 各基因型及 A、G 等位基因频率在鼻咽癌与对照组中差异有统计学意义, 未发现 G 等位基因增加鼻咽癌的发病风险. 但是研究发现: 鼻咽癌患者 MDS1-EVI1 基因 rs6774994 有癌症家族遗传史的者中携带 GG 基因型较无家族遗传史的者更易患鼻咽癌, 病理分化类型为非低分化鳞癌的者 GG 基因型携带者比例高于低分化鳞癌者.

因此提出 MDS1-EVI1 基因 rs6774994GG 等位基因可能与家族遗传史和病理分化类型有一定相关性, 尚需进一步扩大样本证实。

本研究采用 TaqMan-PCR 技术研究 MDS1-EVI1 基因 rs6774994A→G 与云南鼻咽癌发病相关性, 发现 MDS1-EVI1 基因 rs6774994A→G 各基因型与鼻咽癌发病无关并且 rs6774994G 的等位基因不增加云南鼻咽癌发病的危险。首次提出了与全基因组关联性研究相悖的结论, 这是非常有意义的研究结果。然而鼻咽癌作为复杂的多基因疾病, 其众多可干预、不可干预的危险因素的存在, 在一定程度上可能会影响结果的判定。同时, 样本量的大小、人种的选择都是可能导致研究结果差异的原因。因此, 认为在本研究基础上继续扩大样本量且重复进行实验, 并进一步探索其中具体机制将是非常有现实意义。

#### [参考文献]

- [1] NUCIFORA G. The Evi1 gene in myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 1997, 11(12):2 022 - 2 031.
- [2] NUCIFORA G, ROWLEY J D. AML1 and the 8 ;21 and 3 ;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia [J]. *Blood*, 1995, 86(1): 12 - 14.
- [3] METAIS J Y, DUNBAR C. The MDS1-EVI1 gene complex as a retrovirus integration site: impact on behavior of hematopoietic cells and implications for gene therapy[J]. *Mol Ther*, 2008, 16(3):439 - 449.
- [4] LOPINGCO M C, PERKINS A S. Molecular Analysis of E-vi1, a zinc finger oncogene involved in myeloid leukemia [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, 211:211 - 222.
- [5] WIESER R. The oncogene and developmental regulator E-VI1: expression, biochemical properties, and biological functions[J]. *Gene*, 2007, 396(2):346 - 357.
- [6] BUONAMICI S, CHAKRABORTY S, SENYUK V, NUCIFORA G. The role of EVI1 in normal and leukemic cells [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2003, 31(2):206 - 212.
- [7] NUCIFORA G, BEGY C R, KOBAYASHI H, et al. Consistent intergenic splicing and production of multiple transcripts between AML at 21q22 and unrelated genes at 3q26 in (3;21) (q26;q22) translocations [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(9):4 004 - 4 008.
- [8] FEARS S, MATHIEU C, ZELENKLE N, et al. Intergenic splicing of MDS1 and Evi1 occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(4):1 642 - 1 647.
- [9] PETERS P, WLODARSKA I, BAENS M, et al. Fusion of E-TV 6 to MDS1/ Evi1 as a result of t (3;12)(q26;p13) in myeloproliferative disorders [J]. *Cancer Res*, 1997, 57:564 - 569.
- [10] ZENT C, KIM N, HIEBERT S, et al. Rearrangement of the AML1/CBFA2 gene in myeloid leukemia with the 3 ;21 translocation: expression of coexisting multiple chimeric genes with similar functions as transcriptional repressor, but with opposite tumorigenic properties[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, 211:243 - 252.
- [11] KREIDER B L, ORKIN S H, IHLE J N, et al. Loss of erythropoietin responsiveness in erythroid progenitors due to expression of the Evi1 myeloid transforming gene [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(14):6 454 - 6 458.
- [12] SODERHOLM J, KOBAYASHI H, MATHIEU C, et al. The leukemia-associated gene MDS1/Evi1 is a new type of GATA2 binding transactivator [J]. *Leukemia*, 1997, 11(3):352 - 358.
- [13] METAIS J Y, DUNBAR C. The MDS1 EVI1 gene complex as a retrovirus integration site: impact on behavior of hematopoietic cells and implications for gene therapy[J]. *Mol Ther*, 2008, 16(3):439 - 449.
- [14] KUROKAWA M. The evi-1 oncoprotein inhibits c-Jun N-terminal kinase and prevents stress-induced cell death [J]. *EMBO J*, 2000, 19(12):2 958 - 2 968.
- [15] NITTA. Oligomerization of Evi-1 regulated by the PR domain contributes to recruitment of corepressor CtBP[J]. *Oncogene*, 2005, 24(40):6 165 - 6 173.
- [16] XU J, MENEZES J, PRASADU, et al. Elevated serum levels of transforming growth factor beta1 in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma patients[J]. *J Cancer*, 1999, 84(4):396 - 399.
- [17] CHOU J. Nasopharyngeal carcinoma review of the molecular mechanisms of tumorigenesis [J]. *Head Neck*, 2008, 30(7):946 - 963.

(2013-02-10 收稿)