

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.08.011

· 临床研究 ·

线粒体DNA D-环区单核苷酸多态性与弥漫大B细胞淋巴瘤的相关性

赵桂敏,刁兰萍,刘丽宏,吴晓琳,高哲,高玉环(河北医科大学第四医院血液科,河北石家庄050000)

[摘要] **目的:**探讨线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) D-环区的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 与弥漫大B细胞淋巴瘤 (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 患者癌症风险和预后的关系。**方法:**选取1991年7月至2012年7月在河北医科大学第四医院血液科接受治疗的108例DLBCL患者的血液样本,同期159例健康成人血液样本作为对照。常规提取DNA,进行PCR扩增和SNP位点基因型分析,通过病例对照研究调查了D-环区SNP风险状况。**结果:**核苷酸微小等位基因73A/G、263A/G、315C/C插入与DLBCL的风险降低有关,核苷酸微小等位基因200G/A与DLBCL的风险增加有关。评估D-环SNP在DLBCL患者的预测能力,5个SNP位点通过对数秩检验被确认对DLBCL生存预测存在单因素分析统计学意义,多因素分析确认等位基因16304为DLBCL预后的独立预测因素,16304C患者的生存期明显短于16304T患者($RR=0.513$, 95% CI 为0.266~0.989; $P<0.05$)。**结论:**通过对mtDNA D-环区SNP分析可以帮助确定DLBCL的发生风险及高危预后亚组。

[关键词] 线粒体DNA; D-环区; 单核苷酸多态性; 弥漫大B细胞淋巴瘤; 预后

[中图分类号] R730.7; R733.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)08-0817-05

Correlation between D-loop SNPs of mitochondrial DNA and diffuse large B cell lymphoma

ZHAO Guimin, DIAO Lanping, LIU Lihong, WU Xiaolin, GAO Zhe, GAO Yuhuan (Department of Hematology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the D-loop of mitochondrial DNA (mtDNA) and the disease risk as well as the prognosis of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). **Methods:** Blood samples from 108 DLBCL patients treated at the Department of Hematology of the Fourth Hospital of Hebei Medical University during July, 1991 and July 2012 were collected for this study; in addition, blood samples from 159 healthy controls during the same period were also collected. DNA was extracted according to the standard protocols for PCR amplification and SNP locus genotype analyses. The risk of D-loop SNPs was investigated by case-control study. **Results:** The minor alleles of nucleotides 73A/G, 263A/G, 315C/C insert were associated with a decreased risk for DLBCL. The minor allele of the nucleotides 200G/A was associated with an increased risk for DLBCL. To further evaluate the predictive function of D-loop SNPs in DLBCL patients, five SNP sites were identified by Log-Rank test that with statistically significant prediction value of DLBCL survival in a univariate analysis. In a multivariate analysis, allele 16304 was identified as an independent predictor of DLBCL prognosis. The survival time of DLBCL patients with 16304C was significantly shorter than that of patients with 16304T ($RR=0.513$, 95% $CI=0.266-0.989$, $P<0.05$). **Conclusion:** The analysis of D-loop SNPs in mtDNA can help identifying the occurrence risks and poor prognosis subtypes of DLBCL.

[Key words] mitochondrial DNA (mtDNA); D-loop; single nucleotide polymorphisms (SNP); diffuse large B cell lymphoma (DLBCL); prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(8): 817-821. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.08.011]

人类线粒体基因组是一个16 kb闭环双分子,其包含37个基因,还包括2个核糖体RNA和一套完整的22个转移RNA^[1]。线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)与核DNA相比,更容易受到损伤和获得突变,归因于高浓度的活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、缺乏保护组蛋白和mtDNA修复能力有限^[2]。体细胞mtDNA突变与各种退行性疾病和肿瘤有关^[3]。在许多肿瘤中,体细胞突变和单核苷酸多态

性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位于一个所

[基金项目] 河北省科技支撑计划资助项目 (No. 135200)。Project supported by the Department of Science and Technology of Hebei Province (No. 135200)

[作者简介] 赵桂敏 (1978-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事淋巴瘤、白血病、骨髓瘤等血液肿瘤的研究, E-mail: zhao_gm@126.com

[通信作者] 高玉环 (GAO Yuhuan, corresponding author), 学士, 教授, 硕士生导师, 主要从事淋巴瘤、白血病、骨髓瘤等血液肿瘤的研究, E-mail: ydsyao@sina.com

谓D-环区(D-loop)mtDNA非编码区^[4]。此区是重要的调控线粒体基因组的复制和表达,因为它包含复制的前导链起源和转录的主要启动子^[5]。目前癌症患者D-环序列变化已被广泛研究^[6],但只有少数SNP被选定预测癌症的风险,而且它们的预测价值仍不清楚^[7]。本研究测序了一个1 kb区域在弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)患者血液DNA几乎所有D-环区侧面,以识别癌症风险相关的D-环区SNP,并评估这些SNP在DLBCL患者总体生存率(overall survival rate, OSR)的预测价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集从1991年7月至2012年7月期间在河北大学第四医院血液科接受治疗的108例DLBCL患者血液样本,同时也收集159例健康成人血液样本作为对照。病例纳入标准:依据WHO肿瘤分类诊断明确,且病历及随访资料完整者。排除标准:无明确病理诊断及病历及随访资料不完全者。所有入选者事前均告知并签署知情同意书,研究方案获得所在医院伦理委员会的批准(批准号:2016MEC066)。

1.2 主要试剂和仪器

PCR预混试剂盒(无色体系)购自美国Promega公司,DNA marker购自北京Solarbio科技有限公司,PCR扩增引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计。PCR仪(AB Applied Biosystems 9902)购自美国基因有限公司,测序仪(ABI 3730XL)购自Applied Biosystems公司,低温高速离心机(SCR20B型)购自日本Hitachi公司。

1.3 DNA提取

使用向导基因组DNA提取工具(Promega, Madison, WI)提取基因组DNA,并储存在-20℃冰箱。

采集DLBCL患者及健康对照者各5 ml外周静脉血,置于EDTA抗凝试管,于-4℃冰箱保存。将血液样本置于离心机以2 500×g离心15 min,取出离心管,弃上清液,加入少量0.1%的Trion-X,再次离心,可见白细胞沉淀物。后加入3 ml DNA提取液,依次加入150 ml的10% SDS、400 μl的蛋白激酶(PK)液,微振,水浴过夜。次日加入1 200 μl 5 mol/L的NaCl溶液,离心后弃上清,置无水乙醇玻璃瓶,数秒后DNA絮状物析出。将DNA絮状物移至高压灭菌含70%乙醇EP管中,离心,弃乙醇,倒置EP管,晾干。后加200 μl的TE液,置于4℃冰箱24 h以上,使DNA溶解。再将提取好的DNA标本置于-20℃冰箱中保存。

1.4 PCR扩增和SNP位点基因型分析

利用正向引物5'-CCCCATGCTTACAAGCAAGT-3'(核苷酸16190-16209)和反向引物5'-GCTTTGAGGAGGTAAGCTAC-3'(核苷酸602-583),从线粒体DNA D-环区扩增成一个982 bp产物。按照PCR混合试剂盒说明书操作程序,进行测序前纯化。用染料终结者循环测序反应试剂盒进行循环测序,然后把产物置于ABI PRISM基因分析仪3100上分离,反复分析两链多态性。

1.5 统计学处理

采用SPSS 18.0统计软件, χ^2 检验DLBCL患者和健康对照组单个SNP存在或缺失的意义;用Kaplan-Meier法计算生存曲线,并用对数秩检验比较生存率;采用Cox比例风险模型进行多因素生存分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BLBCL患者Ann Arbor分期和IPI评分与10年生存率相关

共有108例BLBCL患者的10年随访数据,通过对数秩检验分析结果显示,Ann Arbor分期和国际预后指数(international prognostic index, IPI)评分与患者10年生存率相关(均 $P<0.01$,表1)。

表1 DLBCL患者的临床特征与10年生存率的相关性
Tab.1 Correlation between clinical characteristics and survival rate of 10-year in DLBCL patients

Clinical characteristic	<i>n</i>	10-year survival rate (%)	<i>P</i>
Gender			
Male	69	6.9	0.571
Female	39	6.1	
Ages (<i>t/a</i>)			
≤60	61	2.0	0.147
>60	47	12.5	
Ann Arbor stage			
I-II	28	20.8	0.000
III-V	80	1.5	
IPI [*]			
0-2	76	9.4	0.000
3-5	32	0.0	

* International prognostic index

2.2 DLBCL患者SNP位点的基因类型

从健康对照组和DLBCL患者血液样本的982 bp线粒体D-环区检测到140个位点存在SNP,其中对照组或DLBCL患者26个SNP微小等位基因频率高于5%,通过分析比较DLBCL患者与健康对照组单个SNP发现,在DLBCL患者SNP频率显著减少的有

73A/G、263A/G、315C/C ($\chi^2_{73A}=52.193, P<0.01$; $\chi^2_{263A}=4.765, P<0.05$; $\chi^2_{315C}=29.127, P<0.01$), 结果表明患者携带这些等位基因可抵抗DLBCL; 而200G/A SNP与DLBCL的风险增加明显相关($\chi^2=8.435, P<0.05$; 表2)。

表2 DLBCL患者和健康对照组SNP位点显示频率比较
Tab.2 Frequency comparison of SNPs between DLBCL patients and control group

SNP	DLBCL group (n=108)	Control group (n=159)	P
73A/G	4/104	70/89	0.000
263A/G	1/107	10/149	0.030
315C/C insert ^a	2/106	43/116	0.000
200G/A	12/96	4/155	0.004

^a C and CC insert

2.3 SNP位点与DLBCL患者10生存率的相关性

表3 SNP位点与DLBCL患者10年生存率的相关性

Tab.3 The correlation between the SNP gene polymorphisms and survival rate of 10-year in patients with DLBCL

Polymorphism	n	10-year survival rate (%)	χ^2	P
146	C	13	27.3	1.343
	T	95	3.8	
199	C	9	25.0	1.491
	T	99	4.8	
309	C insert ^a	63	3.8	1.497
	C	45	10.5	
315	insert ^b	99	7.0	1.354
	C	9	0.0	
16304	C	15	0.0	1.342
	T	93	7.7	
16362	C	39	0.0	0.061
	T	69	10.3	

^a Including 1 C, 2 C and 3 C insert; ^b Including 1 C and 2 C insert

3 讨论

DLBCL是最常见非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)亚型, 许多肿瘤标志物已确定为DLBCL的预测因子, 但在常规临床检查中很少应用^[8]。PD-L1基因3'UTR的rs4143815位点SNP与BUC的发病风险和恶性进展可能具有相关性^[9]。有研究^[10]表明, 遗传因素对DLBCL发展很重要; 氧化应激通路基因的多态性也被确定与DLBCL的风险有关^[11]; 患癌症的风险与氧化应激增加, 从而导致DNA损伤有关^[12]。

YACOUB等^[13]发现, mtDNA D-环区的改变可以作为早期检测和诊断急性淋巴细胞白血病(acute

lymphoblastic leukemia, ALL)的危险因素和生物标志物。本课题组在某些类型的癌症中已经确定了与癌症风险和预后相关的D-环区SNP^[14]。本研究通过选择mtDNA D-环区SNP进行检测, 以评估其预测DLBCL患癌风险的能力, 结果显示核苷酸微小等位基因73A/G、263A/G、315C/C插入的SNP频率在DLBCL患者显著减少, 提示这些等位基因可使DLBCL患癌风险降低, 可能有抵抗DLBCL的作用。核苷酸微小等位基因200G/A的SNP频率在DLBCL患者显著增加, 提示该基因有增加DLBCL的患癌风险。KWOK等^[15]发现, mtDNA D-环区控制线粒体表达, 其中突变和mtDNA含量与肿瘤发生相关, 影响转录控制的多态性可能会影响mtDNA的复制。ALL患

2.4 16304等位基因是DLBCL预后的独立预测因子

预测因素包括这些SNP与临床特征, 经Cox比例风险模型进行多因素分析结果显示, 16304等位基因被确认为DLBCL预后的独立预测因子(表4)。在16304位点次要等位基因16304C基因型患者10年生存期显著低于常见16304T基因型患者($RR=0.513$; $95\%CI$ 为0.266~0.989; $P<0.05$)。结果表明, 16304核苷酸位点对DLBCL患者的预后有较强的预测能力。

者治疗后 mtDNA 含量降低可能会影响化疗的敏感性, 并可能成为儿童 ALL 预后良好的标志。进一步检测 DLBCL 化疗后外周血相关等位基因 SNP 频率

变化, 可能有助于早期区分患者敏感及耐药患者, 以便及时调整方案, 改善预后。

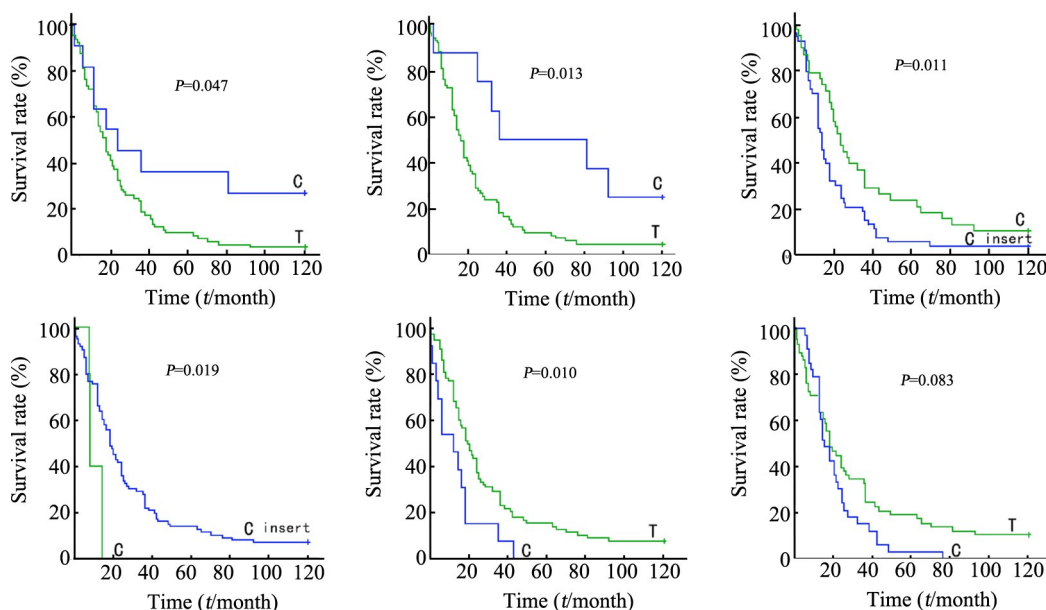


图1 不同D-环核苷酸位点DLBCL患者的生存曲线

Fig.1 The survival curves of DLBCL patients with different D-loop nucleotide sites

表4 DLBCL患者SNP与10年生存率的相关性

Tab.4 The correlation between SNPs and survival rate of 10-year in DLBCL patients

Polymorphism	RR(relative risk)	95%CI	P value
146	1.272	0.578-2.798	0.550
199	1.568	0.634-3.876	0.330
309	0.724	0.447-1.174	0.190
315	2.173	0.827-5.713	0.116
16304	0.513	0.266-0.989	0.046
16362	0.711	0.441-1.147	0.162
Ann arbor stage	1.749	0.939-3.256	0.078
IPI*	2.304	1.371-3.872	0.002

* International prognostic index

选择 mtDNA D-环区 SNP 评估其预测 DLBCL 预后的能力。在 16304 的 SNP 位点, 食管鳞癌发生体细胞突变^[16]。本研究同样确认核苷酸位点 16304 的 SNP 为 DLBCL 的独立预后因素。这个 SNP 属于控制 16192-16270-16304-150 区域区分线粒体单倍型 U5 亚型^[17]。确定了几个 DLBCL 风险相关 SNP, 但 16304 不属于这些 SNP。不同的 D-环区 SNP 位点似乎表现出独特的致癌和癌症预后作用, 在肝癌和非小细胞肺癌中也观察到此种现象, 各个癌症的预后和癌症风险相关的 SNP 是不同的^[18]。所有与患

癌风险及预后相关的 SNP 位点都位于高变区 (hyper-variable region, HV), 生殖系突变热点和肿瘤 mtDNA 优先发生突变^[19]。核苷酸 16362、16304 位点属于 HV-I, 而其他位点属于 HV-II。本研究的数据显示, mtDNA 高变区在修饰癌症发展中起重要作用。

线粒体基因组复制和表达受线粒体 D-环调控, 因为它是复制起始位点。这个区域的 SNP 可能影响 mtDNA 复制, 导致电子传递链的改变, 引起 ROS 释放和核基因组损伤以及癌症的发生和发展^[20]。

总之, 本研究发现 mtDNA D-环区某些 SNP 为 DLBCL 风险及预后的独立预测标志。通过对 D-环区 SNP 分析可能有助于识别 DLBCL 风险较高及高危预后的患者亚组, 从而有助于改善这些患者的治疗决策。

[参考文献]

[1] LAWLESS M W, O'BYRME K J, GRAY S G. Oxidative stress induced lung cancer and COPD: opportunities for epigenetic therapy [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(9A): 2800-2821. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00845.x.

[2] DIMAURO S, SCHON E A. Mitochondrial DNA mutations in human disease[J]. Am J Med Genet, 2001, 106 (1): 18-26. DOI: 10.1002/ajmg.1392.

[3] FLISS M S, USADEL H, CABALLERO O L, et al. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids[J]. Science, 2000, 287(5460): 2017-2019.

- [4] NASHIKAWA M, NISHIGUCHI S, SHIOMI S, et al. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 1843-1845.
- [5] TAANMAN J W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1410(2): 103-123.
- [6] YONEYAMA H, HARA T, KATO Y, et al. Nucleotide sequence variation is frequently in the mitochondrial DNA displacement loop region of individual human tumor cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2005, 3(1): 14-20.
- [7] WANG L, MCDONNELL S K, HEBBRING S J, et al. Thibodeau, polymorphisms in mitochondrial genes and prostate cancer risk[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17(12): 3558-3566. DOI: 10.1158/1055-9965.
- [8] DIAO L P, MA H, WEI G C, et al. Matrix metalloproteinase-2 promoter and tissue inhibitor of metallo-proteinase-2 gene polymorphisms in non-Hodgkin's lymphoma[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(5): 1095-1103. DOI: 10.1002/ijc.26483.
- [9] 刘静, 王永华, 于仑, 等. PD-L1 基因 3' UTR 单核苷酸多态性与膀胱尿路上皮癌关系的病例对照研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(7): 762-766. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.07.011.
- [10] LAN Q, WANG S S, MENASHE I, et al. Genetic variation in Th1/Th2 pathway genes and risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis of three population-based case-control studies[J]. *Br J Haematol*, 2011, 153(3): 341-350. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08424.x.
- [11] WANG S S, DAVIS S, CERHAN J R, et al. Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma[J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(9): 1828-1834. DOI: 10.1093/carcin/bgl013.
- [12] LOFT S, SVOBODA P, KAWAI K, et al. Association between 8-oxo-7,8-dihydroguanine excretion and risk of lung cancer in a prospective study[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 52(1): 167-172. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.439.
- [13] YACOUB H A, MAHMOUD W M, EL-BAZ H A. Novel mutations in the displacement loop of mitochondrial DNA are associated with acute lymphoblastic leukemia: a genetic sequencing study[J/OL]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(21): 9283-9289[2016-10-26]. https://journal.waocp.org/article_30113_b991507193214db1a0e813ddbe320876.pdf.
- [14] ZHANG R, ZHANG F, WANG C, et al. Identification of sequence polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA as a risk factor for hepatocellular carcinoma with distinct etiology[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(1): 130[2016-10-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2949825/>. DOI: 10.1186/1756-9966-29-130.
- [15] KWOK C S, QUAH T C, ARIFFIN H et al. Mitochondrial D-loop polymorphisms and mitochondrial DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia[J/OL]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2011, 33(6): e239-244[2016-10-26]. <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=21646920>. DOI: 10.1097/MPH.0b013e31820a5ece.
- [16] KUMIMOTO H, YAMANE Y, NISHIMOTO Y, et al. Frequent somatic mutations of mitochondrial DNA in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2004, 108(2): 228-231. DOI: 10.1002/ijc.11564.
- [17] PALA M, ACHILLI A, OLIVIERI A, et al. Mitochondrial haplogroup U5b3: a distant echo of the epipaleolithic in Italy and the legacy of the early Sardinians[J]. *Am J Hum Genet*, 2009, 84(6): 814-821. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.05.004.
- [18] DING C, LI R, WANG P, et al. Sequence polymorphisms of the mitochondrial displacement loop and outcome of non-small cell lung cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2012, 3(5): 861-864. DOI: 10.3892/etm.2012.490.
- [19] STONEKING M. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots[J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67(4): 1029-1032. DOI: 10.1086/303092.
- [20] GILLE J J, JOENJE H. Cell culture models for oxidative stress: superoxida and hydrogen peroxidative versus normobaric heperoxi[J]. *Mutant Res*, 1992, 275(3/6): 405-414. DOI: 10.1016/0921-8734(92)90043-O.

[收稿日期] 2018-02-28

[修回日期] 2018-05-31

[本文编辑] 党瑞山