

# VGLLA 基因多态性与非贲门胃癌遗传易感性的关系

杨霞<sup>1</sup>, 董文杰<sup>1</sup>, 高芳<sup>2</sup>, 武金宝<sup>3</sup>, 马立聪<sup>3</sup>, 党彤<sup>3</sup>, 孟宪梅<sup>3</sup>, 贾彦彬<sup>1,3,4</sup>

**摘要** 目的 探讨残留样蛋白质家族成员 4 (VGLLA) 基因单核苷酸多态性 (SNP) 与非贲门胃癌发病风险的关系。方法

采用病例-对照关联研究的方法,在包头地区汉族人群中收集 450 例经病理学确诊的非贲门胃癌病例,同时收集 450 例正常体检人群作为对照;采用聚合酶链式反应 (PCR)-限制性片段长度多态性 (RFLP) 技术对 VGLLA SNP rs1803489、rs7617620、rs13078528 位点进行基因分型。结果 在包头地区汉族人群中 VGLLA rs1803489 与非贲门胃癌的发病风险关联,与 GG 基因型携带者相比,AG 基因型携带者非贲门胃癌的发病风险增加 (AG vs GG: OR = 1.511, 95% CI = 1.095 ~ 2.085); VGLLA rs7617620、rs13078528 与非贲门胃癌的发病风险没有关联。结论 在包头地区汉族人群中, VGLLA rs1803489 在非贲门胃癌的发病中起到了一定的作用; VGLLA rs7617620、rs13078528 在非贲门胃癌的发病中不起主要作用。

**关键词** 残留样蛋白质家族成员 4; 单核苷酸多态性; 非贲门胃癌; 遗传易感性

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0636-04  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.024

近年来,有研究<sup>[1-2]</sup>表明一些疾病的发生发展与个体的遗传易感性密切相关。一些单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 可以作为胃癌筛查的重要遗传标志物以及防治的重要靶点。残留样蛋白质家族成员 4 (vestigial like family member 4, VGLLA) 在胃癌的发生发展中发挥了重要作用, VGLLA 是研究胃癌变的重要候选基因<sup>[3-5]</sup>。然而,目前关于 VGLLA 基因多态性与胃癌的关系还未见

有报道。因此,该研究在包头汉族人群中分析了 VGLLA 基因多态性与非贲门胃癌遗传易感性的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 选取 2008 年至 2020 年包头市肿瘤医院经组织病理学诊断为非贲门胃癌的 450 例患者为病例组。所有患者均排除继发病例和复发病例,且未接受过手术治疗及放、化疗。其中男性 336 例,女性 114 例,年龄 26 ~ 83 岁,平均年龄为 (60.76 ± 10.64) 岁。450 例正常对照来自同期社区体检人群,均排除癌症病史和明显的胃部疾病史,且排除遗传病史。其中男性 336 例,女性 114 例,年龄 26 ~ 93 岁,平均年龄为 (59.66 ± 11.43) 岁;病例组和对照组在年龄和性别方面相匹配 (年龄:  $t = -1.489$ ,  $P = 0.137$ ; 性别:  $\chi^2 = 0$ ,  $P = 1.000$ )。900 例研究样本均为在包头地区居住 5 年以上的汉族人群,相互之间无血缘关系。所有纳入研究的对象均签署了知情同意书,本研究已获得包头医学院伦理学委员会的批准 [包医伦审人体 2021 第 (006) 号]。

## 1.2 方法

**1.2.1 SNPs 的筛选** 在 HapMap 数据库 (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) 中筛选 VGLLA 的标记单核苷酸多态性 (Tag-SNPs)。要求 SNP 在中国汉族人群中最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) > 5%, 连锁不平衡值  $r^2 > 0.8$ , 在筛选出的 Tag-SNPs 中优先选择文献报道的可能和疾病关联的 SNPs 进行初步研究。最终选择了 SNP rs1803489、rs7617620、rs13078528 进行研究。

**1.2.2 基因分型** 对研究对象静脉采血 2 ml, 用 EDTA-K2 抗凝。静脉血液离心后分层,将血浆和血细胞分离分装,并分别编号置于 -20 °C 医用冰箱保存备用。用人血液基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技 (北京) 有限公司) 提取外周血白细胞中的人基因组 DNA。用 Primer 5 软件设计引物,设计好的引物送北京博迈德基因技术有限公司合成。PCR 反应体系共 25  $\mu$ l, 包含 DNA 50 ng、2  $\times$  Taq Master

2022-01-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81650017); 内蒙古自治区自然科学基金项目 (编号: 2020LH08004)

作者单位: 包头医学院<sup>1</sup> 基础医学与法医学院、<sup>2</sup> 技术与麻醉学院、<sup>4</sup> 护理学院, 包头 014060

<sup>3</sup> 包头医学院第二附属医院内蒙古消化病研究所, 包头 014030

作者简介: 杨霞, 女, 硕士研究生;

贾彦彬, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: jyb690318@hotmail.com;

孟宪梅, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: mxmxhk@163.com

Mix 12.5  $\mu$ l、上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ l。PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s 58  $^{\circ}$ C 退火 30 s 72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s 35 个循环 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。具体引物序列及 PCR 产物长度见表 1。PCR 产物用相应的限制性内切酶进行酶切,内切酶购自北京全式金生物技术有限公司。酶切反应体系共 10  $\mu$ l,包含 PCR 产物 3  $\mu$ l、10  $\times$  NE Buffer 1  $\mu$ l、限制性内切酶 5 U,并置于内切酶最适反应温度下作用 60 min。对酶切产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳 根据片段大小判断基因型。具体内切酶及相应的反应温度和酶切片段长度见表 1。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。在对照组中用拟合优度  $\chi^2$  检验来检测 *VGLL4* 基因各 SNP 位点的基因型分布是否符合 Hardy-Weniberg 平衡,以验证研究样本在包头地区汉族人群中是否具有群体代表性和可比性,若  $P > 0.05$  则表示各位点的基因型分布符合 Hardy-Weniberg 平衡。采用独立样本 *t* 检验比较分析年龄在病例组和对照组间的分布差异;采用  $\chi^2$  检验比较性别在病例组和对照组的分布差异。在共显性、显性、隐性、超显性 4 种遗传模式下评估各 SNP 位点非贲门胃癌的关系。用非条件性 Logistic 回归计算出比值比(odds ratio, OR)和 95% 可信区间(confidence interval, CI),OR 和 95% CI 经年龄、性别调整。采用 Haploview 4.2 软件对 *VGLL4* 基因各 SNP 位点的连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)进行分析并构建单体型 构建的单体型与非贲门胃癌的关联性采用多重 Logistic 回归进行分析。

## 2 结果

**2.1 各 SNP 位点在不同遗传模型下与非贲门胃癌发病风险的关系** 对照组中 *VGLL4* 基因 SNP rs1803489、rs7617620、rs13078528 位点的基因型频

数分布符合 Hardy-Weniberg 平衡(rs1803489:  $\chi^2 = 0.117, P = 0.943$ ; rs7617620:  $\chi^2 = 5.374, P = 0.068$ ; rs13078528:  $\chi^2 = 1.200, P = 0.549$ )。

在共显性、显性、隐性和超显性 4 种遗传模型下,分析 *VGLL4* 基因各 SNP 位点与非贲门胃癌发病风险的关系。结果显示 SNP rs1803489 在共显性、显性和超显性模型中均与非贲门胃癌的发病风险关联,其中共显性模型为最佳遗传模型,其最小信息准则(akaike information criterion, AIC)和贝叶斯信息准则(bayesian information criterion, BIC)值最小。与携带 GG 基因型相比,携带 AG 基因型者非贲门胃癌的发病风险增加(AG vs GG, OR = 1.511, 95% CI = 1.095 ~ 2.085)。SNP rs7617620、rs13078528 与非贲门胃癌的发病风险均没有关联( $P > 0.05$ )。见表 2。

**2.2 *VGLL4* 基因单体型与非贲门胃癌发病风险的关系** 对 *VGLL4* 基因的 3 个 SNP 进行连锁不平衡分析发现:rs1803489、rs7617620、rs13078528 三个位点连锁程度低,未能构建出单体型块。

## 3 讨论

*VGLL4* 基因位于染色体 3p25.3 - 3p25.2,包含 14 个外显子,编码 *VGLL4*。*VGLL4* 的羧基末端有两个 TDU 结构域,可以与转录因子 TEA 域蛋白质家族成员(TEA domain family members, TEADs)结合并执行抑制癌细胞生长和进展的功能<sup>[6]</sup>。

Hippo 信号通路是一条肿瘤抑制通路,转录共激活因子 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)作为其下游至关重要的效应因子可以与 TEADs 结合,并激活其靶基因的转录,从而驱动细胞增殖、转化、侵袭。在多种人类消化系统肿瘤包括胃癌、结肠直肠癌和肝癌等的研究中发现 YAP 与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[3, 7-8]</sup>。然而, *VGLL4* 可以通

表 1 PCR 引物序列和长度及酶切反应条件

SNP	引物序列(5'-3')	PCR 长度 (bp)	限制性 内切酶	反应温度 ( $^{\circ}$ C)	酶切后片段 长度(bp)
rs1803489	F: CTGTTTTCTTTGCTAGCCA R: AACCGAACCTAAGAAACGCC	250	ScaI	37	GG 基因型: 188.62 AG 基因型: 250, 188.62 AA 基因型: 250
rs7617620	F: AGACTCCGAGTTCAGAAAGAGAA R: CTGTTGGCTGAAACCTCTCG	227	AlwNI	37	TT 基因型: 177.50 CT 基因型: 227, 177.50 CC 基因型: 227
rs13078528	F: CCATCTTCCAAAGCGCCATTC R: AAGTGGTTTTGCAGGATGTATGAAC	242	BsrI	65	GG 基因型: 54, 93, 95 AG 基因型: 188, 93, 95, 54 AA 基因型: 188, 54

表2 SNP 与非贲门胃癌发病风险的关联 [n( % )]

SNP	模型	基因型	对照组	非贲门胃癌组	OR( 95% CI) *	AIC	BIC
rs1803489	共显性	GG	365 ( 81.1)	334 ( 74.2)	1	1 234.1	1 243.7
		AG	81 ( 18.0)	112 ( 24.9)	1.511 ( 1.095 ~ 2.085)		
		AA	4 ( 0.9)	4 ( 0.9)	1.093 ( 0.271 ~ 4.404)		
	显性	GG	365 ( 81.1)	334 ( 74.2)	1	1 245.5	1 255.1
		AG + AA	85 ( 18.9)	116 ( 25.8)	1.491 ( 1.086 ~ 2.047)		
	隐性	GG + AG	446 ( 99.1)	446 ( 99.1)	1	1 251.6	1 261.3
		AA	4 ( 0.9)	4 ( 0.9)	1 ( 0.249 ~ 4.023)		
	超显性	GG + AA	369 ( 82.0)	338 ( 75.1)	1	1 245.3	1 254.9
		AG	81 ( 18.0)	112 ( 24.9)	1.510 ( 1.094 ~ 2.082)		
	rs7617620	共显性	TT	325 ( 72.2)	322 ( 71.6)	1	1 245.5
CT			123 ( 27.3)	122 ( 27.1)	1.001 ( 0.746 ~ 1.343)		
CC			2 ( 0.5)	6 ( 1.3)	3.028 ( 0.607 ~ 15.114)		
显性		TT	325 ( 72.2)	322 ( 71.6)	1	1 251.9	1 261.2
		CT + CC	125 ( 27.8)	128 ( 28.4)	1.034 ( 0.773 ~ 1.382)		
隐性		TT + CT	448 ( 99.5)	444 ( 98.7)	1	1249.5	1259.1
		CC	2 ( 0.5)	6 ( 1.3)	3.027 ( 0.608 ~ 15.078)		
超显性		TT + CC	327 ( 72.7)	328 ( 72.9)	1	1 251.6	1 261.3
		CT	123 ( 27.3)	122 ( 27.1)	0.989 ( 0.737 ~ 1.326)		
rs13078528		共显性	AA	348 ( 77.3)	365 ( 81.1)	1	1 238.1
	AG		99 ( 22)	80 ( 17.8)	0.770 ( 0.554 ~ 1.071)		
	GG		3 ( 0.7)	5 ( 1.1)	1.589 ( 0.377 ~ 6.699)		
	显性	AA	348 ( 77.3)	365 ( 81.1)	1	1 249.7	1 259.3
		AG + GG	102 ( 22.7)	85 ( 18.9)	0.795 ( 0.575 ~ 1.098)		
	隐性	AA + AG	447 ( 99.3)	445 ( 98.9)	1	1 251.1	1 260.8
		GG	3 ( 0.7)	5 ( 1.1)	1.674 ( 0.398 ~ 7.047)		
	超显性	AA + GG	351 ( 78)	370 ( 82.2)	1	1 249.1	1 258.7
		AG	99 ( 22)	80 ( 17.8)	0.767 ( 0.552 ~ 1.065)		

\* 表示平衡了性别和年龄因素

过其 TDU 结构域竞争性结合 TEADs 并抑制 YAP 和 TEADs 之间的相互作用,从而抑制癌基因的表达<sup>[9]</sup>。

目前,关于 *VGLL4* 与胃癌的相关性研究较多。在人胃癌中, *VGLL4* 在肿瘤组织中的 mRNA 和蛋白质表达水平显著低于正常组织和肿瘤周围组织<sup>[3-4]</sup>。 *VGLL4* mRNA 及蛋白质的表达水平与肿瘤大小、肿瘤分期、浆膜浸润、淋巴管侵袭和淋巴结转移呈负相关<sup>[3,5]</sup>。同时, *VGLL4* 的表达水平与胃癌患者的 5 年存活率呈负相关,是胃癌的预后标志物<sup>[5]</sup>。综上所述, *VGLL4* 蛋白在胃癌组织中低表达,并与淋巴结转移、TNM 分期、侵袭性和 5 年生存率等临床病理特征存在相关性,是人类胃癌的潜在肿瘤抑制因子。同时,研究也提示 *VGLL4* 基因是研究胃癌变的重要候选基因之一。因此,本研究在包头地区汉族人群中检测了 *VGLL4* 的基因多态性与非贲门胃癌遗传易感性的关系,为胃癌变的筛查、诊断和防治提供实验基础和理论依据。

本研究显示,在包头汉族人群中 *VGLL4* 基因 SNP rs1803489 与非贲门胃癌的发病风险相关联。

在共显性模型中,与 GG 基因型携带者相比,AG 基因型携带者非贲门胃癌的发病风险增加(  $OR = 1.511$ ,  $95\% CI = 1.095 \sim 2.085$ );在显性模型中与 GG 基因型携带者相比,AG + AA 基因型携带者非贲门胃癌的发病风险增加(  $OR = 1.491$ ,  $95\% CI = 1.086 \sim 2.047$ );在超显性模型中,与 GG + AA 基因型携带者相比,AG 基因型携带者非贲门胃癌的发病风险增加(  $OR = 1.510$ ,  $95\% CI = 1.094 \sim 2.082$ );其中共显性模型为最佳模型,其 AIC 和 BIC 值最小,因此 AG 基因型可能是包头汉族人群非贲门胃癌发生的危险因素。本研究结果和 *VGLL4* SNP rs1803489 与肺癌遗传易感性研究<sup>[10]</sup>的结果一致,提示 rs1803489 可能是 *VGLL4* 在肺癌、胃癌等癌症发生的共同作用通路上的遗传标记,AG 基因型是发病的危险因素。SNP rs13078528 在一项 meta 分析研究中被鉴定为与成人身高相关的突变<sup>[11]</sup>;SNP rs7617620 在全基因组关联研究分析中与合并尼古丁依赖和严重抑郁症相关<sup>[12]</sup>。本研究结果显示 SNP rs13078528、rs7617620 与非贲门胃癌的发病风险没有关联,说明 SNP rs13078528、rs7617620 可能

在非贲门胃癌的发病中不起主要作用。本研究结果与上述研究结果有差异,提示相同的 SNP 在不同的疾病中所起的作用可能不同。然而,由于本研究的样本量偏低,还需要扩大样本量进一步研究,以明确 SNP rs1803489、rs13078528、rs7617620 与非贲门胃癌遗传易感性的确切关系。

### 参考文献

- [1] 高芳,卫星如,马立聪,等. TLR5 基因多态性与非贲门胃癌的关联研究[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(1): 114-7.
- [2] Han Z, Sheng H, Gao Q, et al. Associations of the MTHFR rs1801133 polymorphism with gastric cancer risk in the Chinese Han population[J]. *Biomed Rep*, 2021, 14(1): 14.
- [3] Li N, Yu N, Wang J, et al. miR-222/VGLL4/YAP-TEAD1 regulatory loop promotes proliferation and invasion of gastric cancer cells[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(3): 1158-68.
- [4] Jiang W, Yao F, He J, et al. Downregulation of VGLL4 in the progression of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(2): 1289-97.
- [5] Shu B, Zhai M, Miao X, et al. Serotonin and YAP/VGLL4 balance correlated with progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9739.
- [6] Li H, Wang Z, Zhang W, et al. VGLL4 inhibits EMT in part through suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in gastric cancer[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(3): 83.
- [7] Jiang L H, Zhang J W, Xu Q X, et al. YAP promotes the proliferation and migration of colorectal cancer cells through the Glut3/AMPK signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(4): 312.
- [8] 徐瑞,李丽娜,王文娟. Hippo 信号通路介导 PTEN 调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路影响肝癌细胞增殖能力[J]. 山西医科大学学报, 2020, 51(12): 1277-83.
- [9] Li H, Wang Z, Zhang W, et al. VGLL4 inhibits EMT in part through suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in gastric cancer[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(3): 83.
- [10] 黄小丽. VGLL4 和 NOTCH4 基因单核苷酸多态性与肺癌易感性的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [11] Wood A R, Esko T, Yang J, et al. Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(11): 1173-86.
- [12] Zhou H, Cheng Z, Bass N, et al. Genome-wide association study identifies glutamate ionotropic receptor GRIA4 as a risk gene for comorbid nicotine dependence and major depression[J]. *Transl Psychiatry*, 2018, 8(1): 208.

## Association analysis between SNPs in *VGLL4* and risk of non-cardia gastric cancer

Yang Xia<sup>1</sup>, Dong Wenjie<sup>1</sup>, Gao Fang<sup>2</sup>, Wu Jinbao<sup>3</sup>, Ma Licong<sup>3</sup>, Dang Tong<sup>3</sup>, Meng Xianmei<sup>3</sup>, Jia Yanbin<sup>1,3,4</sup>  
 (<sup>1</sup>*School of Basic Medicine and Forensic Medicine*, <sup>2</sup>*School of Medical Technology and Anesthesiology*,  
<sup>4</sup>*School of Nursing, Baotou Medical College, Baotou 014060*; <sup>3</sup>*Inner Mongolia Institute of Digestive Diseases*,  
*The Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014030*)

**Abstract Objective** To investigate the associations of the single nucleotide polymorphism (SNP) rs1803489, rs7617620 and rs13078528 in vestigial like family member 4 (*VGLL4*) gene with the risk of non-cardia gastric cancer. **Methods** The case-control study design was used. 450 cases with non-cardia gastric cancer confirmed by pathology and 450 normal controls were collected in the Han population in Baotou; SNP rs1803489, rs7617620, and rs13078528 in *VGLL4* were genotyped using polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) technology. **Results** *VGLL4* gene SNP rs1803489 was associated with the risk of non-cardia gastric cancer in the Han population in Baotou. Compared with the carriers of GG genotype, the carriers of AG genotype had a higher risk of non-cardia gastric cancer ( $OR = 1.511$ , 95%  $CI = 1.095 - 2.085$ ,  $P < 0.05$ ). SNP rs7617620 and rs13078528 were not associated with non-cardia gastric cancer ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** SNP rs1803489 in *VGLL4* may have an effect on the risk of non-cardia gastric cancer in the Han population in Baotou. SNP rs7617620 and rs13078528 may not play a major role in the risk of non-cardia gastric cancer.

**Key words** vestigial like family member 4; single nucleotide polymorphism; non-cardia gastric cancer; genetic susceptibility