

· 临床研究 ·

白细胞介素-27 的基因多态性与大肠癌的遗传易感性之间的相关性研究*

郭俊宇¹, 覃安强¹, 李如锟², 杨昌谋¹, 黄甫达¹, 黄展易¹, 郭厚基¹
(右江民族医学院附属医院: 1. 肛肠科; 2. 检验科, 广西百色 533000)

摘要:目的 探讨白细胞介素-27(IL-27)基因单核苷酸多态性及其单倍型与大肠癌易感性之间的关系。方法 以 170 例大肠癌患者和 160 例健康对照者为研究对象,应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法对 IL-27 基因-964 A/G、2905 T/G 单核苷酸多态性进行基因分型,同时用 SHEsis 软件分析 IL-27 基因的连锁不平衡及单倍型频率。结果 IL-27 基因 2905 T/G 多态性在大肠癌组和对照组的分布差异无统计学意义($P>0.05$),而 IL-27 基因-964 A/G 多态性在两组人群中的分布差异有统计学意义($P<0.05$),等位基因频率的相对风险分析发现,-964 G 等位基因携带者患大肠癌的风险是 A 等位基因的 1.640 倍($OR=1.640, 95\%CI:1.194\sim 2.251$)。联合基因型分析发现,IL-27 基因-964 A/G、2905 T/G 单核苷酸多态性存在着强烈的连锁不平衡($|D'|=0.937$),-964 G/2905 G 单倍型频率在大肠癌组中显著高于对照组($P<0.05$)。-964 G/2905 G 单倍型携带者显著增加了大肠癌的发病风险($OR=2.100, 95\%CI:1.176\sim 3.749$)。结论 IL-27 基因-964 A/G 多态性和-964 G/2905 G 单倍型与大肠癌的发病具有相关性,其中-964 G 等位基因可能是大肠癌的遗传易感基因。

关键词:白细胞介素-27;大肠癌;多态性;单核苷酸;单倍型

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.10.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)10-0948-03

Association of interleukin-27 gene polymorphism with genetic susceptibility to colorectal cancer*

Guo Junyu¹, Qin Anqiang¹, Li Rukun², Yang Changmou¹, Huang Fuda¹, Huang Zhanyi¹, Guo Houji¹

(1. Department of Coloproctology; 2. Department of Med Lab Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China)

Abstract: Objective To investigate the single nucleotide polymorphisms (SNPs) and its haplotypes of interleukin-27 (IL-27) gene are associated with susceptibility to colorectal cancer (CRC) in a Chinese population. **Methods** We analyzed two single nucleotide polymorphisms of IL-27 gene promoter -964 A/G and 2905 T/G in 170 patients with CRC and 160 age and sex matched controls in a Chinese population, using a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) strategy. Frequency of haplotypes and linkage disequilibrium of IL-27 gene in different groups were analyzed by SHEsis programs. **Results** The distributions of IL-27 gene 2905 T/G polymorphism was not different between CRC and control group, but the IL-27 gene -964 A/G polymorphism was significantly different($P<0.05$). The relative risk suffered from CRC of G allele was 1.640 times of the A allele carriers ($OR=1.640, 95\%CI:1.194\sim 2.251$). Consistent with the results of the genotyping analyses, IL-27 -964 A/G and 2905 T/G polymorphisms showed strong linkage disequilibrium($|D'|=0.937$), frequency of the -964 G/2905 G haplotype in patients with CRC was significant higher than that in controls($P<0.05$). The -964 G/2905 G haplotype was associated with a significantly increased risk of CRC ($OR=2.100, 95\%CI:1.176\sim 3.749$). **Conclusion** IL-27 gene -964 A/G polymorphism and its -964 G/2905 G haplotype are associate with CRC, -964 G allele is an important genetic susceptibility gene for CRC.

Key words: interleukin-27; colorectal cancer; polymorphism, single nucleotide; haplotype

白细胞介素-27(interleukin-27, IL-27) 是最近发现的一种与 IL-12 相关的细胞因子,它由抗原提呈细胞产生,通过广泛表达于各种免疫细胞表面的 IL-27 受体 WSX-1/gp130 发挥生物学效应^[1]。IL-27 对 Th1 型免疫反应具有重要的调节作用,IL-27 可以促进初始 CD4⁺ T 细胞的增殖,也可以促进其向 Th1 细胞的分化及产生 IFN- γ , IL-27 在抗感染免疫,抗肿瘤免疫及自身免疫性炎症等 Th1 型免疫主导的病理过程中起重要作用^[2]。最近研究发现 IL-27 在肿瘤发生、发展中可能起着重要的作用^[3]。但是,IL-27 在大肠癌中的疾病进程和免疫系统损伤中的分子机制还尚未清楚。IL-27 基因位于 16 染色体短臂上(16p11),由 5 个外显子和 4 个内含子组成,分子生物学研究表明 IL-27 基因存在着单核苷酸多态性,这种基因多态性与人类多种疾病的关系,已成为国内外学者研究的热点。目前,有关 IL-27 基因多态性与大肠癌(colorectal cancer, CRC) 关系

的研究国内外尚未见文献报道。为此,本研究采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法,研究 IL-27 基因多态性与大肠癌的关系,为揭示大肠癌的发病机制提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集来自于右江民族医学院附属医院住院的大肠癌患者,全部研究对象均经病理证实,诊断参照 1986 年全国大肠癌病理研究协作组制定的标准,共 170 例,其中男 107 例,女 63 例,年龄(52.7 ± 10.3)岁;选择年龄、性别相匹配的 160 例无血缘关系的同期健康体检者为对照组,其中男 105 例,女 55 例,年龄(48.2 ± 9.4)岁。全部研究对象均为广西籍人。该研究获得右江民族医学院附属医院研究委员会批准,且以上标本采集均由本人知情同意。

1.2 研究方法

* 基金项目:广西教育厅基金资助项目(200810LX085)。

1.2.1 基因组 DNA 提取 采集体检健康者静脉血 3 mL,用 EDTA-K₂ 抗凝;采用改良碘化钠法提取白细胞基因组 DNA, -70 °C 保存备用。

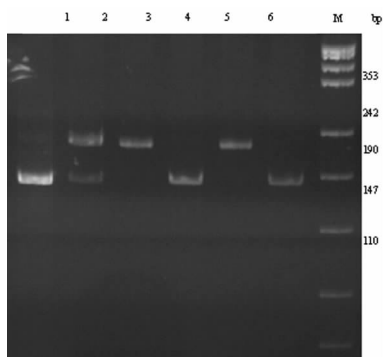
1.2.2 PCR 扩增 参照 Genbank 公布的序列(EF064720)设计 2 对引物,由上海英俊生物有限公司合成。用于特异性扩增 IL-27 基因包含 -964 A/G (rs153109)位点碱基的 DNA 片段的引物,上游引物序列为:5'-ACC AAG AAA CCC CAT CCT CT-3',下游引物序列为:5'-TCA GTC AGT GAC CAG GAT CG-3';用于特异性扩增 IL-27 基因包含 2905 T/G (rs17855750)位点碱基的 DNA 片段的引物,上游引物序列为:5'-ATC TCG CCA GGA AGC TGC GC-3';下游引物序列为:5'-CTG TTA GTG GGG GCC AGA AGG GA-3',IL-27 的 PCR 扩增反应体系均为 25 L,其中含 10×PCR 缓冲液 2.5 L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 L,上、下游引物各 20 pmol,模板 DNA 2.0 L,TaqDNA 聚合酶 1.25 U,不足体积用灭菌双蒸水补足至 25 L。置热循环仪(Bio-Rad)中 94 °C 预变性 5 min;再按下列程序循环 35 次,即 94 °C 变性 30 s,62 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 45 s;末次循环后,72 °C 延伸 5 min。

1.2.3 扩增产物的限制性酶切 在 10 μL 的酶切体系中,取 PCR 扩增产物 3 L,10×Buffer 1.0 L,双蒸水 5.5 L,分别用 0.5 μL(2 U) 限制性内切酶 PaeR7 I 和 BstI (英国 Biolabs 公司)酶切 IL-27 基因-964 和 2905 位点,37 °C 孵育 3 h,反应终止后,消化片段在 8% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,EB 染色,染色后通过凝胶成像系统判断结果。

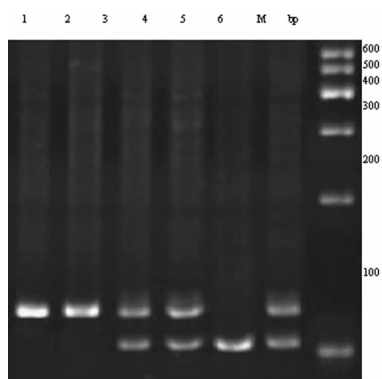
1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件包进行分析。基因型和等位基因频率采用基因直接计数法计算,研究对象与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度及各组间基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验,并以比值比(OR)及其 95% 可信区间(CI)表示相对风险度。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IL-27 基因型检测结果 IL-27 基因 -964 A/G 多态性,PCR 扩增产物片段大小为 224 bp,根据限制性内切酶 PaeR7 I 酶切片段的情况,检测到基因型有 3 种,AA 型(224 bp 1 条带),AG 型(224 bp、179 bp 和 45 bp 3 条带),GG 型(179 bp 和 45 bp 2 条带)(注:45 bp 小片段已跑出胶外)。IL-27 基因 2905 T/G 多态性,PCR 扩增产物片段大小为 120 bp,根据限制性内切酶 BstI 酶切片段的情况,检测到基因型有 3 种,TT 型(120 bp 1 条带),TG 型(120 bp、101 bp 和 19 bp 3 条带),GG 型(101 bp 和 19 bp 2 条带)(注:19 bp 小片段已跑出胶外),见图 1、2。



1、4、6:GG 基因型;2:AG 基因型;3、5:AA 基因型; M:标准分子量。
图 1 IL-27 基因 -964 A/G 多态性 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图



1、2:TT 基因型;3、4、6:TG 基因型;5:GG 基因型;M:标准分子量。

图 2 IL-27 基因 2905 T/G 多态性 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

表 1 大肠癌组与对照组 IL-27 基因多态性分布频率的比较[n(%)]

基因型或等位基因	对照组 (n=160)	大肠癌组 (n=170)	χ^2	P
IL-27 -964A/G				
AA	75(46.9)	53(31.2)	9.416	0.009
AG	66(41.3)	84(49.4)		
GG	19(11.9)	33(19.4)		
A	216(67.5)	190(55.9)	9.398	0.002
G	104(32.5)	150(44.1)		
IL-27 2905T/G				
TT	122(76.3)	120(70.6)	1.723	0.423
TG	33(20.6)	41(24.1)		
GG	5(3.1)	9(5.3)		
T	277(86.6)	281(82.6)	1.934	0.164
G	43(13.4)	59(17.4)		

表 2 大肠癌组与对照组 IL-27 基因单倍型分布频率的比较[n(%)]

IL-27 基因单倍型	对照组 2(n=320)	大肠癌组 2(n=340)	比值比(95% 信区间)	P
-964 A/2905 T	189(59.1)	171(50.3)	1.000	
-964 A/2905 G	79(24.7)	90(26.5)	1.259(0.873~1.816)	0.217
-964 G/2905 T	32(10.0)	41(12.1)	1.416(0.853~2.350)	0.177
-964 G/2905 G	20(6.3)	38(11.2)	2.100(1.176~3.749)	0.011

2.2 大肠癌组与对照组 IL-27 基因多态性的比较 IL-27 基因 2905 T/G 多态性在大肠癌组与对照组中分布频率差异无统计学意义($P > 0.05$)。而 IL-27 基因 -964 A/G 多态性在两组人群中的分布差异有统计学意义($P < 0.05$);等位基因频率的相对风险分析发现,-964 G 等位基因携带者患大肠癌的风险是 -964 A 等位基因的 1.640 倍(OR = 1.640, 95% CI: 1.194~2.251),见表 1。

2.3 大肠癌组与对照组 IL-27 基因的连锁不平衡及单倍型分

析 应用单倍型 SHEsis 分析软件对 IL-27 基因-964 A/G 和 2905 T/G 这 2 个位点的单核苷酸多态性进行连锁不平衡分析,结果显示 IL-27 基因-964 A/G 和 2905 T/G 单核苷酸多态性存在强烈的连锁不平衡 ($|D'| = 0.937$)。联合基因型分析发现,-964 G /2905 G 单倍型携带者显著增加了大肠癌的发病风险 ($OR=2.100, 95\%CI:1.176\sim 3.749$),见表 2。

3 讨 论

大肠癌是一种严重危害着人类身体健康最常见的一种消化道恶性肿瘤,但至今其发病机制仍未阐明。近年来的研究表明,细胞因子在其中的作用越来越引起研究者的高度关注。

IL-27 是新近发现的一种属于 IL-12 家族的一种新的细胞因子,由 p28 和 EBI3 两个片段组成的异源二聚体细胞因子,主要是由抗原呈递细胞产生的细胞因子,能促进 T 细胞增殖,并向 Th1 细胞方向分化产生 IFN- γ ,在抗感染免疫及抗肿瘤免疫等方面发挥重要作用,参与了机体多种疾病的演变过程^[4-11]。近年来,许多在动物模型研究中表明 IL-27 在抗肿瘤和抗血管形成中起重要作用。Salcedo 等^[12]利用神经母细胞瘤小鼠模型研究发现 IL-27 主要通过活化 CD8⁺ T 细胞发挥抗肿瘤活性和抑制肿瘤转移作用。Hisada 等^[13]在 2004 年首次证实了 IL-27 的抗肿瘤活性,他们将稳定表达 IL-27 的小鼠结肠癌细胞 Colon26 移植到小鼠体内,发现肿瘤生长大大受抑制,脾细胞分泌 IFN- γ 增多,IL-27 对 Colon26 细胞有特异性的杀伤活性,并发现主要由 CD8⁺ T 细胞、IFN- γ 和 T-bet 介导其抗肿瘤作用。研究还发现在 IFN- γ 敲除小鼠和非肥胖性糖尿病重症联合免疫缺陷小鼠 IL-27 仍然可以发挥抗肿瘤作用,IL-27 可以不依赖 IFN- γ 通过 JAK/STAT 途径发挥抗肿瘤和抗血管形成作用^[14]。最近,国内学者杨丽娟等^[15]将 IL-27 基因转染到小鼠结肠腺癌细胞中,证明 IL-27 能在体内明显抑制肿瘤的生长,延长荷瘤小鼠的生存期,具有一定的抗肿瘤作用。以上研究表明 IL-27 在抗肿瘤和抗血管形成中起着重要的作用。IL-27 基因位于 16 染色体短臂上(16p11),由 5 个外显子和 4 个内含子组成。研究表明,IL-27 基因具有遗传多态性,这种基因多态性影响 IL-27 的基因转录和表达,进而影响到 IL-27 的生物学功能,从而影响到肿瘤的发生、发展。因而,作者推测 IL-27 基因多态性可能与肿瘤的易患性有关。

关于 IL-27 基因多态性与大肠癌的关系,尚未见文献报道。为进一步明确 IL-27 基因多态性是否与大肠癌的发生相关,本研究采用病例-对照的研究方法对 IL-27 基因多态性进行分析,结果发现大肠癌患者 IL-27 基因-964 A/G 多态性分布与健康人比较差异具有统计学意义,其中-964 G 等位基因携带者频率在大肠癌组显著高于对照组 ($P<0.05$)。联合基因型进一步分析发现,IL-27 基因-964 A/G 和 2905 T/G 单核苷酸多态性存在强烈的连锁不平衡 ($|D'| = 0.937$),-964 G/2905 G 单倍型携带者显著增加了大肠癌的发病风险 ($OR=2.100, 95\%CI:1.176\sim 3.749$)。研究结果提示,IL-27 基因-964 A/G 多态性和-964 G/2905 G 单倍型与大肠癌的发病具有相关性,其中-964 G 等位基因可能是大肠癌的遗传易感基因。

参考文献:

[1] Dibra D, Cutrera JJ, Xia X, et al. Expression of WSX1 in tumors sensitizes IL-27 signaling-independent natural kil-

ler cell surveillance[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(3):550-553.

[2] Engel MA, Neurath MF. Anticancer properties of the IL-12 family-focus on colorectal cancer[J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(29):3303-3308.

[3] Jankowski M, Kopsiński P, Goc A. Interleukin-27: biological properties and clinical application[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2010, 58(6):417-425.

[4] Rajaiiah R, Puttabyatappa M, Polumuri SK, et al. Interleukin-27 and interferon-gamma are involved in regulation of autoimmune arthritis[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(14):2817-2825.

[5] Li TT, Zhang T, Chen GM, et al. Low level of serum interleukin 27 in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *J Investig Med*, 2010, 58(5):737-739.

[6] Guzzo C, Hopman WM, Che Mat NF, et al. Impact of HIV infection, highly active antiretroviral therapy, and hepatitis C coinfection on serum interleukin-27[J]. *AIDS*, 2010, 24(9):1371-1374.

[7] Cocco C, Giuliani N, Di Carlo E, et al. Interleukin-27 acts as multifunctional antitumor agent in multiple myeloma[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(16):4188-4197.

[8] Matsui M, Kishida T, Nakano H, et al. Interleukin-27 activates natural killer cells and suppresses NK-resistant head and neck squamous cell carcinoma through inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(6):523-530.

[9] Zhu S, Lee DA, Li S. IL-12 and IL-27 sequential gene therapy via intramuscular electroporation delivery for eliminating distal aggressive tumors[J]. *J Immunol*, 2010, 184(5):2348-2354.

[10] Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, et al. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009, 8(1):40-52.

[11] Nagai H, Oniki S, Fujiwara S, et al. Antitumor activities of interleukin-27 on melanoma[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2010, 10(1):41-46.

[12] Salcedo R, Stauffer JK, Lincoln E, et al. IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors; role for CD8⁺ T cells[J]. *J Immunol*, 2004, 173(12):7170-7182.

[13] Hisada M, Kamiya S, Fujita K, et al. Potent antitumor activity of interleukin-27[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(3):152-156.

[14] Shimizu M, Shimamura M, Owaki T, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of IL-27[J]. *J Immunol*, 2006, 176(5):7317-7324.

[15] 杨丽娟, 胡洁, 白利锐, 等. IL-27 基因转染对小鼠结肠腺癌细胞生物学特性的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(12):1210-1213.