

· 论 著 ·

白介素-23R 基因多态性与肝癌易感性研究*

覃彦平^{1,2}, 秦 雪^{3△}

(1. 广西壮族自治区柳州市红十字会医院检验科 545001; 2. 广西医科大学, 南宁 530021; 3. 广西医科大学第一附属医院临床实验中心, 南宁 530021)

摘要:目的 探讨白介素-23R(IL-23R)基因 rs10889677 A/C、rs1884444G/T 两个位点单核苷酸多态性(SNP)与肝癌的遗传易感性的关系。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测 84 例肝癌和 94 例健康对照者外周血白细胞 DNA 的 IL-23R 基因 rs1884444、rs10889677 两个位点多态性。结果 IL-23R 基因 rs10889677 位点 AA、AC、CC 基因型及 A、C 等位基因型分布频率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。IL-23R 基因 rs1884444 位点 TT、TG、GG 基因型及 T、G 等位基因型分布频率比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。危险性分析显示含有 T 等位基因型的个体较含有 G 等位基因型者发生肝癌的风险高($OR=1.636, 95\%CI=1.027\sim 2.607$);GA 单倍型与肝癌的患病风险性有相关性($P=0.0209$),携带 GA 单倍型的个体患肝癌的风险增加至 1.72。其他单倍型与肝癌的患病风险无相关性($P>0.05$)。结论 IL-23R 基因 rs1884444T/G 位点多态性与肝癌的遗传易感性有关,而 rs10889677 A/C 位点多态性与肝癌的遗传易感性无明显相关性。

关键词:受体,白细胞介素-23;基因多态性;肝肿瘤;遗传易感性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.30.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)30-3138-03

The study of IL-23R gene polymorphisms on the genetic susceptibility of liver cancer*

Qin Yanping^{1,2}, Qin Xue^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Liuzhou Red Cross Hospital, Liuzhou, Guangxi 545001, China; 2. Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530001, China; 3. The First Department of Clinical Laboratory, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the associations between IL-23R gene polymorphisms and the genetic susceptibility of liver cancer. **Methods** 84 cases of patient with liver cancer and 94 cases cancer-free controls were conducted, and the genotypes of IL-23R rs10889677 and rs1884444 were determined by PCR-RFLP assay. **Results** The IL-23R rs10889677 variant genotypes were not associated with the risk of liver cancer. The IL-23R rs1884444 variant genotypes were associated with the risk of liver cancer. Compared with G allele, The IL-23R rs1884444 T allele were associated with increased risk of liver cancer ($OR=1.636, 95\%CI=1.027-2.607$); We also found the GA haplotype was associated with liver cancer ($P=0.0209$), the GA haplotype were associated with the risk of liver cancer ($OR=1.72$). **Conclusion** Our findings indicated that the IL-23R rs1884444 may contribute to the risk of liver cancer, the IL-23R rs10889677 may no contribute to the risk of liver cancer.

Key words: receptors, interleukin-23; gene polymorphisms; liver neoplasms; genetic susceptibility

肝癌是人类最常见的消化系统恶性肿瘤之一,全世界每年新发肝癌患者约 60 万人,位居恶性肿瘤的第 5 位。中国发病人数约占全球的 50% 以上,全球 55% 肝癌病例发生在中国^[1]。研究证实白介素-23R (IL-23R) 基因的某些多态性位点与胃癌、卵巢癌、食管癌等有关^[2-4]。但 IL-23R 基因多态性与肝癌的遗传易感性的关系尚不清楚。本研究对 IL-23R 基因 rs10889677A/C、rs1884444G/T 两个位点单核苷酸多态性(SNP)进行检测,以探讨这两个位点与肝癌的遗传易感相关性的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 实验分肝癌组和对照组 2 组,肝癌组 84 例,为 2010 年 6~10 月在广西医科大学第一附属医院因肝癌住院,未经化疗、放疗的患者,其中男 73 例,女 11 例,年龄 21~69 岁,中位年龄 47.5 岁,HBsAg 阳性 84 例(100%),AFP 阳性 55 例(65.5%),肝功能 ALT 平均值为 152.1 U/L,全部病例均经临床和病理检查确诊为肝癌。对照组 94 例,为同期健康体检者,其中男 74 例,女 21 例,年龄 21~69 岁,中位年龄 44.5 岁,所有对照组体检结论为健康合格者。所有研究对象

和实验标本的获得均符合伦理学原则。

1.2 DNA 标本 所有未经化疗、放疗的肝癌组患者和健康对照者均抽取外周静脉血 5 mL,EDTA 抗凝,采用苯酚-氯仿法提取外周血白细胞基因组 DNA,置于-20℃冰箱备测。

1.3 引物设计 IL-23R 基因的 rs10889677、rs1884444 两个基因序列 PCR 扩增引物参照文献设计^[5-6]。引物由上海生工生物有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

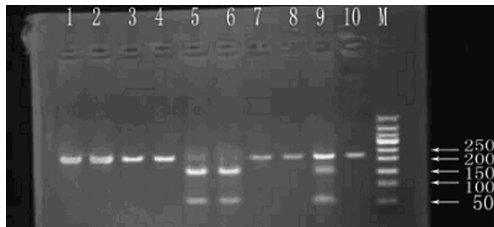
多态性位点	引物序列(5'~3')
rs10889677	5'-AGG GGA TTG CTG GGC CAT AT-3'
	5'-TGT GCC TGT ATG TGG ACC A-3'
rs1884444	5'-TCT TAG GGA AAA ATG TTA TGC TTT TT-3'
	5'-GCA TCC CAT TGA ATA GTG GC-3'

1.4 聚合酶链反应 采用 DA-7300PCR 反应仪,试剂购自

Fermentas 公司。PCR 反应体系为 25 μ L, 包括基因组 DNA 2.0 μ L, 上下游引物(1 μ mol/L)各 1 μ L, Dream TaqTM Green PCR Master Mix(2x)12.5 μ L, 不足体积用灭菌去离子水补充至 25 μ L。IL-23R 基因 rs10889677 位点的 PCR 反应循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62.8 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 36 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。IL-23R 基因 rs1884444 位点的 PCR 反应循环参数除退火温度为 56 $^{\circ}$ C 外, 其他反应条件同 rs10889677。取产物 5 μ L 经含有 EB 的 2% 琼脂糖凝胶电泳, 观察 PCR 扩增是否成功。

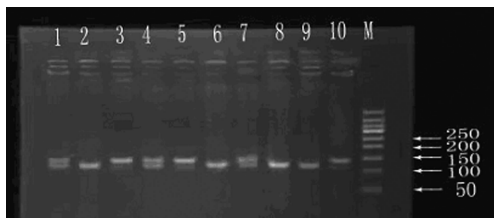
1.5 扩增产物的限制性酶切 酶切反应体系均为 20 μ L, 包括 PCR 产物 10 μ L, 限制性内切酶(10 U/ μ L)1 μ L, 反应缓冲液 2 μ L, 灭菌去离子水补充至 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜。其中 rs10889677 位点的限制性内切酶为 MnlI, rs1884444 位点则为 HaeIII(限制性内切酶均购自 Fermentas 公司)。酶切产物与标准 DNA marker 同步电泳(含 EB 的 3% 琼脂糖凝胶电泳), 观察基因型。

1.6 基因型判断 (1) IL-23R 基因 rs10889677 位点。CC 基因型:完全切开, 酶切产物有 154 bp 和 62 bp 两条带;CA 基因型:未完全切开, 酶切产物有 216, 154 和 62 bp 3 条带;AA 基因型:不能切开, 酶切产物只有 216 bp 1 条带。(2) IL-23R 基因 rs1884444 位点。GG 基因型:完全切开, 酶切产物有 117 bp 和 19 bp 两条带;GT 基因型:未完全切开, 酶切产物有 136, 117 和 19 bp(片段太小, 电泳不可见)3 条带;TT 基因型:不能切开, 酶切产物只有 136 bp 1 条带。



M:对照组;9:CA 基因型;5,6:CC 基因型;1,2,4,7,8,10:AA 基因型。

图 1 IL-23R 基因 rs10889677 位点 PCR 产物酶切电泳图



M:对照组;1,4,7: TG 基因型;2,6,8,9:GG 基因型;3,5,10:TT 基因型)。

图 2 IL-23R 基因 rs1884444 位点 PCR 产物酶切电泳图

1.7 测序鉴定 随机抽取 10% 的样本送至上海生工生物有限公司进行测序。测序仪器为 ABI-PRISM3730。

1.8 统计学处理 对照组和肝癌组经 Hardy-Weinberg 平衡检验分析后, 采用直接计数计算基因型和等位基因频率; 各组间等位基因频率和基因型分布频率差异采用 χ^2 检验和危险性分析, 计算比值比(OR)和 95% 可信区间(95% CI)。采用 PLINK 软件构建 IL-23R 基因 rs1884444 和 rs10889677 两个位点的单倍型并进行分析。

2 结 果

2.1 IL-23R 基因 rs10889677、rs1884444 位点酶切结果和测

序结果 限制性内切酶产物经电泳分析后发现 IL-23R 基因 rs10889677、rs1884444 酶切后均可产生 3 种基因型, 见图 1、图 2。测序结果和酶切结果均吻合。

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验 经 Hardy-Weinberg 平衡检验 IL-23R 基因 rs10889677、rs1884444 位点对照组和肝癌组基因型实际值与预测值比较结果 P 值分别为 0.775、0.387, P > 0.05, 均符合 Hardy-Weinberg 平衡, 显示本研究所检测样品具有代表性和可比性。

2.3 IL-23R 基因 rs10889677、rs1884444 位点肝癌组和对照组基因型及等位基因型分布比较 见表 2。

表 2 IL-23R 基因 rs10889677、rs1884444 位点基因型、等位基因型在肝癌组和对照组中的分布[n(%)]

基因型/等位基因型	对照组	肝癌组	χ^2	P	OR(95%CI)
rs10889677					
AA	55(58.5)	55(65.5)	1.008	0.604	
AC	34(36.2)	26(31.0)			
CC	5(5.3)	3(3.6)			
A	144(76.1)	136(81.0)	1.003	0.317	0.770(0.461~1.285)
C	44(23.9)	32(19.0)			
rs1884444					
TT	60(63.8)	38(45.2)	6.798	0.033	
TG	24(25.5)	36(42.9)			
GG	10(10.6)	10(11.9)			
T	144(76.6)	112(66.7)	4.33	0.037	1.636(1.027~2.607)
G	44(23.3)	56(33.3)			

由表 2 可见肝癌组与对照组比较, IL-23R 基因 rs10889677 位点 AA、AC、CC 基因型及 A、C 等位基因型分布比较差异无统计学意义(P > 0.05)。IL-23R 基因 rs1884444 位点 TT、TG、GG 基因型及 T、G 等位基因型分布比较差异有统计学意义(P < 0.05)。显示 IL-23R 基因 rs1884444 基因多态性与肝癌的遗传易感性有关。危险分析显示 T 等位基因型与 G 等位基因型相比其 OR 值为 1.636, 95% CI 为 1.027~2.607, 提示携带 T 等位基因型的个体较携带 G 等位基因型者发生肝癌的风险增加 1.636 倍。

2.4 IL-23R 基因 rs10889677、rs1884444 位点单倍型分析 采用 PLINK 软件对 rs1884444 和 rs10889677 两个位点进行单倍型构建, 共构建出 4 种单倍型。由表 4 可见 GA 单倍型与肝癌的患病风险性有相关性(P = 0.020 9), 携带 GA 单倍型的个体患肝癌的风险增加至 1.72。其他单倍型与肝癌的患病风险性无相关性(P > 0.05)。

表 3 IL-23R 基因 rs10889677、rs1884444 位点单倍型在肝癌组和对照组中的分布

单倍型	对照组	肝癌组	OR	P
GC	0.078	0.065	0.763	0.504
TC	0.156	0.117	0.705	0.184
GA	0.156	0.245	1.720	0.020
TA	0.610	0.573	0.871	0.420

3 讨 论

经研究发现已有多炎症细胞因子介导的信号通路参与肝癌的发生、发展^[5]。IL-23 是一种与肿瘤有关的炎症性细胞因子^[6]。IL-23R 是 IL-23 受体复合物的 2 个亚基之一,主要的生物学作用是介导 IL-23 在细胞内的信号传导。IL-23 需通过与其相应的 IL-23 受体复合物结合才能发挥其生物学功能。当 IL-23 与 IL-23R 结合后,可引发下游信号通路 Jak2、Tyk2 分子的激活,磷酸化受体胞内区的 Stats 结合位点,使 Stats 分子以二聚体方式聚集,磷酸化的 Stats 二聚体入核后,激活靶基因的转录。IL-23 与 IL-23R 还能诱导记忆性 CD4⁺T 细胞向 TH17 细胞分化^[7]。TH17 细胞可高表达 IL-17,并分泌大量促炎因子如:IL-6 和 TNF- α 等^[8]。TH17 细胞可介导炎症反应、自身免疫性疾病、肿瘤等疾病的发生、发展^[9]。而致炎细胞因子 IL-17 可以促进多种细胞亚群及巨噬细胞产生 TNF、IL-8 等促炎细胞因子,引起细胞浸润和组织破坏^[10]。上述炎症因子构成了 IL-23/IL-23R/TH17/IL-17 通路,该通路是引起机体炎症及免疫紊乱的重要组成部分。由于肿瘤可源自慢性炎症^[11],Kuang 等^[12]揭示肿瘤可激活单核细胞分泌 IL-23 等细胞因子,触发 TH17 细胞分化和增殖;TH17 细胞分泌的 IL-17 累积在肝癌中通过引起血管生成而促进疾病的进展。而作为 IL-23/IL-23R/TH17/IL-17 通路信号传递因子的 IL-23R 也极有可能与肝细胞癌变有关。本研究首次探讨了 IL-23R rs10889677A/C 及 IL-23 R rs1884444G/T 两个位点多态性与肝癌的关系。本研究结果显示 IL-23R 基因 rs1884444 位点基因型、等位基因型分布频率差异有统计学意义($P < 0.05$)。危险分析显示携带 T 等位基因型的个体较携带 G 等位基因型者发生肝癌的风险高。各单倍型中只有 GA 单倍型与肝癌的患病风险性有相关性($P = 0.0209$)。说明了 IL-23R 基因 rs1884444 位点基因多态性可能与肝癌遗传易感性有关。而 IL-23R 基因 rs10889677 位点基因型、等位基因型分布频率差异无统计学意义($P > 0.05$)。该位点与肝癌的遗传易感性无明显相关性。

本研究的 IL-23R rs10889677A/C 及 IL-23R rs1884444G/T 两个位点均为 Haploview 上的标签 SNP,分别位于外显子 11 和外显子 2,二者都是由于碱基的取代而出现 SNP(rs1884444 是 T \rightarrow G,rs10889677 是 A \rightarrow C)。基因序列中单个核苷酸的替代、插入或缺失,都会引起编码氨基酸的改变或导致转录的 mRNA 剪接的改变,影响基因表达与蛋白质的功能,从而导致疾病的发生。IL-23R 基因多态性与食管癌、胃癌等的研究已证实 IL-23R 可能与某些炎症相关的肿瘤易感性有关。Zhang 等^[13]研究发现,IL-23R 可通过交替剪接产生剪接异构体,并优先在肺癌中表达,进而推测该表达可能有助于细胞逃避机体的免疫监视或攻击,使 IL-23R 可能在某些癌症的发生、发展过程中发挥作用。Chen 和 Hsich^[14]证实,IL-23R 信号通路中的 Stats3 调控多种与细胞增殖及凋亡有关的功能蛋白的表达,Stats3 的异常活化是引起子宫内膜癌的原因之一。本研究显示,与肝癌遗传易感性相关的 IL-23R rs1884444 基因位于外显子 2,后者负责编码 IL-23R 的信号肽^[15],信号肽的功能是决定新生肽链在细胞中的定位或决定某些氨基酸残基修饰。虽然 rs1884444 已被报道与胃癌及食管癌等的遗传易感性相关,但 rs1884444 的功能目前还不明确,有待于进一

步的功能学研究。

参考文献:

- [1] 陈再英,钟南山.内科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2008:457-462.
- [2] Chen J,Lu Y,Zhang H,et al. A nonsynonymous polymorphism in IL-23R gene is associated with risk of gastric cancer in a Chinese population[J]. Mol Carcinog,2010,49(10):862-868.
- [3] Zhang Z,Zhou B,Zhang J,et al. Association of interleukin-23 receptor gene polymorphisms with risk of ovarian cancer[J]. Cancer Genet Cytogenet,2010,196(2):146-152.
- [4] 肖勇,陈维,曹维克,等. IL-23R 基因多态与食管癌遗传易感性的关联研究[J]. 南京医科大学学报,2011,31(4):513-516.
- [5] 姚登福. 炎症细胞因子介导的信号通路与肝癌[J]. 南通大学学报:医学版,2010,30(1):1-5.
- [6] Zamarron BF,Chen W. Dual roles of cells and their factors in cancer development and progression[J]. Biol Sci,2011,7(5):651-658.
- [7] Wendling D,Cedoz JP,Racadot E. Serum and synovial fluid levels of P40IL12/23 in spondyloarthritis patients[J]. Clin Rheumatol,2009,28(2):187-190.
- [8] Park H,Li Z,Yang XO,et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J]. Nat Immunol,2005,6(8):1133-1141.
- [9] Tesmer LA,Lundy SK,Sarkar S,et al. Th17 cells in human disease[J]. Immunol Rev,2008,223(1):87-113.
- [10] Kullberg MC,Jankovic D,Feng CG,et al. IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis[J]. J Exp Med,2006,203(17):2485-2494.
- [11] Marx J. Inflammation and cancer;the link grows stronger[J]. Science,2004,306(8):966-968.
- [12] Kuang DM,Peng C,Zhao Q,et al. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology,2010,51(1):154-164.
- [13] Zhang XY,Zhang HJ,Zhang Y,et al. Identification and expression analysis of alternatively spliced isoforms of human interleukin-23 receptor gene in normal lymphoid cells and selected tumor cells[J]. Immunogenetics,2006,57(12):934-943.
- [14] Chen CL,Hsich JC. Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers[J]. Br J Cancer,2007,96(4):591-595.
- [15] Kertesz M,Iovino N,Unnerstall U,et al. The role of site accessibility in microRNA target recognition[J]. Nat Genet,2007,39(10):1278-1284.

(收稿日期:2012-04-04 修回日期:2012-05-23)