

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.25.012

脂联素基因多态性与结直肠癌发病风险关联性研究*

向德森,张敬[△],肖杰,冉文华,黄自铎,周涛

(重庆市黔江中心医院普外科 409000)

[摘要] **目的** 调查脂联素基因多态性位点与结直肠癌发病风险的关联性。**方法** 采用 1:1 病例对照研究,对 250 例病例(病例组)及匹配对照(对照组, $n=250$)抽取静脉血,提取基因组 DNA 后,运用 Taqman 荧光定量 PCR 方法,对研究对象 3 个基因多态性位点(rs266729,rs2241766 及 rs1501299)进行检测。Logistic 回归分析用于检测基因型别、基因-基因、基因-环境交互作用。**结果** 对 rs266729,病例组携带 GG 及 CG+GG 基因型别均可引起结直肠癌发病风险增高[OR(95%CI):1.87(1.01~3.47)、1.63(1.14~2.32)]。对 rs2241766,病例组携带 TG+GG 基因型别可引起结直肠癌发病风险增高[OR(95%CI):1.45(1.02~2.06)]。对 rs1501299,病例组携带 GT+GG 基因型别的发病风险是对照组的 0.61 倍(95%CI:0.43~0.88)。Logistic 回归分析表明,rs266729 基因多态性与体质指数(BMI)存在交互作用,两者使得病例组发生结直肠癌的风险是对照组的 1.16 倍(95%CI:1.03~1.30)。**结论** 脂联素基因多态性可引起结直肠癌的发病风险增高,rs266729 基因多态性与 BMI 共同影响结直肠癌发病风险。

[关键词] 结直肠肿瘤;病例对照研究;脂联素基因;基因多态性

[中图分类号] R735.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)25-3493-04

The adiponectin gene polymorphisms and the association with colorectal cancer*

Xiang Desen, Zhang Jing[△], Xiao Jie, Ran Wenhua, Huang Ziduo, Zhou Tao

(Department of General Surgery, Qianjiang Central Hospital, Chongqing 409000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the adiponectin(ADIPOQ) gene polymorphisms and which association with colorectal cancer(CRC). **Methods** Genotyping of blood samples were performed for 250 case-control pairs. Taqman real-time PCR was used to test the three single nucleotide polymorphisms(SNPs), namely rs266729, rs2241766, rs1501299. Logistic regression was applied to assess the effects of three SNPs, the gene-gene, and gene-environment interactions on CRC risk. **Results** The ADIPOQ rs266729 GG and CG+GG genotype had a higher CRC risk than those carrying the CC genotype[OR(95%CI):1.87(1.01-3.47), 1.63(1.14-2.32), respectively]. The same results was observed in cases who carried TG+GG genotype vs. TT genotype in rs2241766 [OR(95%CI):1.45(1.02-2.06)]. The rs1501299 GT+TT genotype had a lower CRC risk than those carrying the GG genotype [OR(95%CI):0.61(0.43-0.88)]. Furthermore, in two-factor gene-environment interaction analyses, rs266729 presented significant interactions with Body mass index (BMI), with OR of 1.16 (95%CI:1.03-1.30). **Conclusion** The results suggest that variants in ADIPOQ may contribute to increased colorectal cancer risk and this contribution may be modified by BMI.

[Key words] colorectal neoplasms; case-control study; adiponectin gene; single nucleotide polymorphism

已有前瞻性研究显示,循环脂联素水平与结直肠癌(colorectal cancer, CRC)发病风险存在负相关关系。美国的护士健康研究(NHS)和卫生专业人员随访研究(HPFS)等两个大型的前瞻性队列研究结果表明,仅在男性人群中观察到低水平脂联素与 CRC 的发病风险存在联系^[1]。然而,观察性研究存在固有的局限性,如无法很好地控制混杂因素,难以建立暴露因素与疾病发生之间的因果关系。而利用个体遗传变异可能会影响循环中的脂联素水平,从而可为脂联素与 CRC 发病风险提供因果证据。在配子形成过程中,等位基因的分配是独立的,即类似于干预试验的随机化。此等位基因的分配可确保遗传变异与疾病结局之间的关联无法被其他常见混杂因素打破。

此前的全基因组关联研究(GWAS)已鉴定出几个可影响血循环脂联素水平的单核苷酸多态性位点^[2-3]。已有研究表明,脂联素及其受体基因的多态性会影响血循环脂联素水平,但国内鲜少有关于脂联素基因多态性与 CRC 发病风险的研究

报道。本研究对本院 CRC 患者行脂联素 3 个基因多态性位点进行的研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究采用病例对照研究,研究对象来源于 2010 年 1 月至 2014 年 1 月在本院诊治或健康查体者。病例组纳入标准:病理组织学确诊为原发 CRC、无合并其他肿瘤,在行放射化学治疗前,以同意抽取 10 mL 血液进行遗传学检查者纳入;排除标准:合并 2 项或以上肿瘤、CRC 为转移癌、有糖尿病病史或已接受放射化学治疗者。对照组纳入标准:无恶性肿瘤病史、无糖尿病病史,来本院行健康体检,且同意抽取 10 mL 血液进行遗传学检查者。对照组的性别及年龄(± 5 岁)与病例组匹配。纳入病例、对照各 250 例,其中病例组患者 43~68 岁,平均(55.8 ± 8.0)岁;对照组患者 46~69 岁,平均(55.5 ± 7.8)岁。

1.2 方法

* 基金项目:重庆市卫生计生委 2014 年医学科研计划项目(20142143)。 作者简介:向德森(1981-),本科,主治医师,主要从事普通外科胃肠、肝胆胰研究及工作。 [△] 通讯作者, E-mail:xiangdesen1@126.com。

表 1 基因多态位点引物设计

基因多态位点	上游引物	下游引物
rs266729	5'-ATT CTG TTT TGG ATG TCT TGT TG-3'	5'-CTT GGA CTT TCT TGG CAC G-3'
rs2241766	5'-CCA TGG CTG ACA GTG CAC AT-3'	5'-GCC CGC CAT CCA ACC T-3'
rs1501299	5'-TTT CAT CAC AGA CCT CCT ACA CTG A-3'	5'-AGA TGC AGC AAA GCC AAA GTC-3'

表 2 基因多态位点探针设计

基因多态位点	探针 1	探针 2
rs266729	FAM-ATC CTG CCC TTC AA	VIC-TCC TGC GCT TCA A
rs2241766	FAM-TCT GCC CGG TCA TGA CCA GGA	VIC-TCT GCC CGG GCA TGA CCA G
rs1501299	FAM-TAT ATG AAG GCA TTC ATT A	VIC-TAT ATG AAG TCA TTC ATT ATT

1.2.1 试剂与设备 Taqman 荧光定量 PCR 仪 ABI7900;脂联素基因的 3 个基因多态性位点:脂联素 5'端侧翼区-11377C/G 位点:rs266729,外显子 2 区+45T/G 位点:rs2241766,以及内含子 2 区+276G/T 位点:rs1501299。使用 VIC 及 FAM 标记探针。此 3 个位点的引物由美国 ABI 公司合成,PCR 试剂及引物均购自美国 ABI 公司,DNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司。反应所用的基因多态位点引物信息见表 1,探针信息见表 2。

1.2.2 样本 DNA 提取及脂联素基因分型 抽取研究对象外周血,利用柱式抽提试剂盒抽提样本 DNA。采用荧光定量 PCR 技术,检测 rs266729,rs2241766 和 rs1501299 的基因多态性。每个反应体系总体积 5.0 μ L,包含 DNA 模板(浓度为 30~100 ng/ μ L)1.0 μ L,2 \times Taqman 通用 MasterMix 2.5 μ L,每条引物浓度为 225 nmol/L,每条探针浓度为 50 nmol/L。反应条件为 55 $^{\circ}$ C 2 min,95 $^{\circ}$ C 10 min,随后进行 35 个循环的扩增(90 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 1 min)。在测量等位基因特异性荧光后,用 SDS 软件分析基因型别。为确保基因分型的准确性,随机重复 10.0% 的样品,结果一致性符合率为 100.0%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行统计分析,基因计数法统计基因型频率和等位基因频率。基因型别、基因-基因、基因-环境交互作用采用 Logistic 回归分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般人口学特征 两组对象性别相匹配,病例组、对照组各纳入女 48 例,男 202 例。两组间在年龄方面差异无统计学意义($t = 0.37, P = 0.714$)。病例组的体质指数(BMI)较对照组高,差异有统计学意义($t = 4.68, P = 0.000$),见表 3。病例组有肿瘤家族史 25 例,对照组有肿瘤家族史 8 例,两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 9.38, P = 0.002$)。

表 3 研究对象人口学特征($\bar{x} \pm s$)

变量	病例组	对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄(岁)				
≥60	64.35 \pm 2.78	64.23 \pm 2.66	0.31	0.401
<60	49.37 \pm 3.30	49.44 \pm 3.11	0.18	0.524
BMI(kg/m ²)	24.24 \pm 2.57	23.61 \pm 2.42	4.68	0.000

2.2 脂联素 3 个基因多态性位点与 CRC 发病风险 脂联素-

11377C/G 位点(rs266729)病例组突变型(GG)及 G 等位基因携带者(CG、CG+GG)均高于对照组($P = 0.047, 0.016, 0.007$)。对于脂联素+45T/G 位点(rs2241766),病例组的 G 等位基因携带者(TG、TG+GG)高于对照组($P = 0.046, 0.040$)。对于脂联素+276G/T 位点(rs1501299),病例组 T 等位基因携带者(TG、TG+TT)低于对照组($P = 0.011, 0.007$),见表 4。

表 4 脂联素基因多态性与 CRC 发病风险

基因型别	病例组 [<i>n</i> (%)]	对照组 [<i>n</i> (%)]	OR(95%CI)	<i>P</i>
rs266729				
CC	97(38.8)	127(50.8)	1.00	—
CG	123(49.2)	102(40.8)	1.58(1.09~2.29)	0.016
GG	30(12.0)	21(8.4)	1.87(1.01~3.47)	0.047
CG/GG	153(61.2)	123(49.2)	1.63(1.14~2.32)	0.007
rs2241766				
TT	108(43.2)	131(52.4)	1.00	—
TG	122(48.8)	102(40.8)	1.45(1.01~2.09)	0.046
GG	20(8.0)	17(6.8)	1.43(0.71~2.86)	0.316
TG/GG	142(56.8)	118(47.6)	1.45(1.02~2.06)	0.040
rs1501299				
GG	127(50.8)	97(38.8)	1.00	—
GT	108(43.2)	133(53.2)	0.62(0.43~0.90)	0.011
TT	15(6.0)	20(8.0)	0.57(0.28~1.18)	0.129
GT/TT	123(49.2)	153(61.2)	0.61(0.43~0.88)	0.007

—:此项无数据。

2.3 脂联素基因-基因交互作用与 CRC 发病风险的关系 条件 Logistic 回归分析显示,脂联素的 3 个基因多态性位点间不存在基因-基因交互作用,见表 5。

2.4 脂联素基因-环境交互作用与 CRC 发病风险的关系 恶性肿瘤家族史与 BMI 之间的交互作用并未影响 CRC 的发生($OR = 0.96, P = 0.793$)。进一步利用 Logistic 回归分析脂联素的 3 个基因多态性位点分别与 BMI、肿瘤家族史之间进行交互作用,结果显示,仅有脂联素 5'端侧翼区-11377C/G 位点 rs266729 与 BMI 之间存在交互作用,表明两者相互作用促使 CRC 发病风险增高($OR = 1.16, P = 0.012$),见表 6。

表 5 Logistic 回归分析脂联素基因-基因交互作用与 CRC 发病风险

基因-基因交互作用	B	SE	Wald	P	OR	95%CI
rs266729-rs2441766	-0.330	0.210	2.469	0.116	0.72	0.48~1.09
rs2441766-rs1501299	-0.383	0.285	1.803	0.179	0.68	0.39~1.19
rs266729-rs1501299	0.246	0.244	1.014	0.314	1.28	0.79~2.06

表 6 Logistic 回归分析脂联素基因-环境交互作用与 CRC 发病风险

基因-环境交互作用	B	SE	Wald	P	OR	95%CI
rs266729-BMI	0.146	0.058	6.270	0.012	1.16	1.03~1.30
rs2441766-BMI	-0.902	1.454	0.385	0.535	0.41	0.02~7.01
rs266729-BMI	0.041	0.060	0.474	0.491	1.04	0.93~1.17
rs266729-家族史	-0.016	0.693	0.001	0.982	0.98	0.25~3.83
rs2441766-家族史	-0.203	0.688	0.087	0.768	0.82	0.21~3.14
rs266729-家族史	0.253	0.684	0.137	0.712	1.29	0.34~4.92

3 讨 论

CRC 是癌症发病和死亡顺位中位居前列的恶性肿瘤,据世界卫生组织统计,全世界每年大概有 133.0 万 CRC 新发病例,60.8 万死亡病例^[4]。我国是 CRC 高发的国家之一。CRC 占我国恶性肿瘤发病的第 3 位,是恶性肿瘤死亡顺位第 5 位,给国家和人民带来沉重的经济和精神负担^[5]。

肥胖、中心型肥胖及能量摄入增加,均可使 CRC 的发病率增高^[6]。他们通过作用于胰岛素水平、胰岛素抵抗及炎症反应引起致癌效应。脂联素是脂肪细胞分泌的因子,它是胰岛素的增敏剂,并与已知 CRC 风险因素即肥胖、2 型糖尿病及炎症相关联^[7-9]。对血浆脂联素水平与 CRC 关联的研究得到了相矛盾的结果。Wei 等^[10]观察到低脂联素水平与男性 CRC 风险增加有关,而另外一项研究则发现两者并无关联^[11]。有研究认为,脂联素基因的遗传变异有可能是导致这些矛盾结果的原因之一。研究人员已找到几个影响脂联素水平的基因变异位点,这些位点与胰岛素抵抗、肥胖及 2 型糖尿病相关^[12]。

本病例对照研究中,选择了与胰岛素抵抗相关的脂联素的 3 个基因多态性位点,分别是位于 5' 端侧翼区-11377C/G 位点:rs266729、外显子 2 区+45T/G 位点:rs2241766,以及内含子 2 区+276G/T 位点:rs1501299。本研究结果表明,个体携带 rs266729 的突变纯合子 GG 及 G 等位基因(GT+GG)均可增加 CRC 的发病风险[OR(95%CI):1.87(1.01~3.47)、1.63(1.14~2.32)]。同样现象在 rs2241766 位点亦被观察到。个体携带 G 等位基因(TG+GG)者发生 CRC 的风险是健康人群的 1.45 倍(95%CI:1.02~2.06)。

脂联素基因位于染色体 3q27 处,由 3 个外显子和 2 个内含子组成,大概跨越了 17 kb 区域。已鉴定出该基因是代谢综合征及 2 型糖尿病的敏感位点,其中包括了 rs266729 及 rs2241766。已有几个研究证实,脂联素上述 2 个位点变异可引起循环脂联素水平下降,胰岛素抵抗上升,并与 CRC 的致病因素之一即 2 型糖尿病有关^[13]。脂联素是脂肪来源的蛋白质,在血清中大量存在。与其他脂肪因子不同,脂联素与肥胖、糖尿病、胰岛素抵抗呈反向相关关系。脂联素亦是一种已知的胰岛素增敏激素,它能在葡萄糖代谢中起放大胰岛素的作用。因而,对于 rs266729 的野生型 GG 位点,其 G 等位基因(CG+

GG)及 rs2241766 野生型 TT 位点,携带 TG+GG 基因型别均可能与低脂联素水平、高的胰岛素抵抗及 CRC 的发病风险有关。本研究与脂联素的生物学效应较吻合。最新研究表明,脂联素及其受体基因在癌症形成,尤其是导致与肥胖相关的癌症中起着关键的作用。有研究表明,脂联素基因通过调节癌变重要通路:AMPK 或 β -连接素-Wnt 信号通路来执行其功能^[14]。

肥胖导致癌症的不同致病机制是目前研究的热点。Wei 等^[10]认为,肥胖诱导胰岛素抵抗即高胰岛素血症,从而致使血循环胰岛素水平增高。此过程正向导致 CRC 的发生。最近有研究表明,肥胖者的 BMI 升高与 CRC 发病风险呈正相关关系,且与性别、肿瘤发生部位有关^[15-16]。本研究表明,病例组较对照组有着更高的 BMI($t=4.68, P=0.000$)。肥胖诱导的炎症反应是脂肪组织功能受损的重要特征,它被认为在肥胖致癌过程中起着关键的作用。

尽管 CRC 的发病机制尚未完全阐明,许多研究表明,CRC 的发生、发展是环境-基因共同作用的结果。研究发现饮食习惯西化,如大量摄入红肉、长时间静坐以及不运动等在 CRC 的发病过程中起着重要的作用。与健康人群不同,有肥胖、2 型糖尿病的人群 CRC 的发病率及病死率更高,是由于糖尿病及肥胖均可导致胰岛素抵抗有关^[17-18]。本研究结果表明,rs266729 与 BMI 之间存在交互作用,表明两者相互作用促使 CRC 发病风险增高[OR 95%CI:1.16(1.03~1.30)]。

本研究仅分析了脂联素的 3 个基因多态性位点,及其与 BMI、肿瘤家族史之间的交互作用对 CRC 发病的影响,尚未能分析与胰岛素抵抗、糖尿病发病的血清学因子,这些有待课题组今后的研究进一步证实。

参考文献

[1] Song M, Zhang X, Wu K, et al. Plasma adiponectin and soluble leptin receptor and risk of colorectal cancer: a prospective study[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2013, 6(9):875-885.

[2] Dastani Z, Hivert MF, Timpson N, et al. Novel loci for adiponectin levels and their influence on type 2 diabetes and metabolic traits: a multi-ethnic meta-analysis of 45 891 in-

- dividuals[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(3): e1002607.
- [3] Wu Y, Li Y, Lange EM, et al. Genome-wide association study for adiponectin levels in Filipino women identifies CDH13 and a novel uncommon haplotype at KNG1-ADIPOQ[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(24): 4955-4964.
- [4] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; Globocan 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [5] 陈万青, 张思维, 郑荣寿, 等. 中国肿瘤登记地区 2007 年肿瘤发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2011, 20(3): 162-169.
- [6] Macinnis RJ, English DR, Hopper JL, et al. Body size and composition and colon cancer risk in men[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13(4): 553-559.
- [7] Filippi E, Sentinelli F, Trischitta V, et al. Association of the human adiponectin gene and insulin resistance[J]. *Eur J Hum Genet*, 2004, 12(3): 199-205.
- [8] Kaklamani VG, Wisinski KB, Sadim M, et al. Variants of the adiponectin (ADIPOQ) and adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) genes and colorectal cancer risk[J]. *JAMA*, 2008, 300(13): 1523-1531.
- [9] Joshi RK, Kim WJ, Lee SA. Association between obesity-related adipokines and colorectal cancer; a case-control study and meta-analysis[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(24): 7941-7949.
- [10] Wei EK, Giovannucci E, Fuchs CS, et al. Low plasma adiponectin levels and risk of colorectal cancer in men; a prospective study[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(22): 1688-1694.
- [11] Lukanova A, Soderberg S, Kaaks R, et al. Serum adipone-
- ctin is not associated with risk of colorectal cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 15(2): 401-402.
- [12] Beltcheva O, Boyadzhieva M, Angelova O, et al. The rs266729 single-nucleotide polymorphism in the adiponectin gene shows association with gestational diabetes[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2014, 289(4): 743-748.
- [13] Chu HY, Wang ML, Zhong DY, et al. AdipoQ polymorphisms are associated with type 2 diabetes mellitus; a meta-analysis study[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2013, 29(7): 532-545.
- [14] Dieudonne MN, Bussiere M, Dos Santos E, et al. Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(1): 271-279.
- [15] Ashktorab H, Paydar M, Yazdi S, et al. BMI and the risk of colorectal adenoma in African-Americans[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2014, 22(5): 1387-1391.
- [16] Rickles AS, Iannuzzi JC, Mironov O, et al. Visceral obesity and colorectal cancer; are we missing the boat with BMI? [J]. *J Gastrointest Surg*, 2013, 17(1): 133-143.
- [17] Basen-Engquist K, Chang M. Obesity and cancer risk; recent review and evidence[J]. *Curr Oncol Rep*, 2011, 13(1): 71-76.
- [18] Noto H, Tsujimoto T, Sasazuki T, et al. Significantly increased risk of cancer in patients with diabetes mellitus; a systematic review and meta-analysis[J]. *Endocr Pract*, 2011, 17(4): 616-628.
- (收稿日期: 2015-03-08 修回日期: 2015-05-20)
-
- (上接第 3492 页)
- 2013, 64(3): 421-430.
- [3] Jawa RS, Quist E, Boyer CW, et al. Mesenteric ischemia-reperfusion injury up-regulates certain CC, CXC, and XC chemokines and results in multi-organ injury in a time-dependent manner[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2014, 24(4): 148-156.
- [4] Bernat V, Heinrich MR, Baumeister P, et al. Synthesis and application of the first radioligand targeting the allosteric binding pocket of chemokine receptor CXCR3 [J]. *ChemMedChem*, 2012, 7(8): 1481-1489.
- [5] Singh AK, Arya RK, Trivedi AK, et al. Chemokine receptor trio; CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12 [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013, 24(1): 41-49.
- [6] Murakami T, Kawada K, Iwamoto M, et al. The role of CXCR3 and CXCR4 in colorectal cancer metastasis[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(2): 276-287.
- [7] Bedognetti D, Spivey TL, Zhao Y, et al. CXCR3/CCR5 pathways in metastatic melanoma patients treated with adoptive therapy and interleukin-2 [J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(9): 2412-2423.
- [8] Hilborn E, Sivik T, Fornander T, et al. C-X-C ligand 10 and C-X-C receptor 3 status can predict tamoxifen treatment response in breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 145(1): 73-82.
- [9] Chaturvedi P, Gilkes DM, Wong CC, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent breast cancer-mesenchymal stem cell bidirectional signaling promotes metastasis[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1): 189-205.
- [10] Kawada K, Taketo MM. Significance and mechanism of lymph node metastasis in cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1214-1218.
- (收稿日期: 2015-03-10 修回日期: 2015-05-20)