

MBL 在结肠直肠癌中的基因分型

陈远崇¹ 陈竹雨² 侯建华¹ 闫山英¹ 席锋祥¹

(1 河北省张家口市第五医院 河北 张家口 075000 2 河北省张家口市第一医院 河北 张家口 075000)

摘要 目的 MBL 是补体激活凝集素途径的关键因素。MBL 基因多态性影响 MBL 血清水平。结肠直肠癌患者血清 MBL 水平升高,低水平的 MBL 则预示着术后肺炎的发生,目前还不清楚此相关性是否与遗传相关。本实验分析调查了结肠直肠癌患者和健康对照者的 MBL 基因分型,评估基因分析和复发率、生存率之间潜在的相关性。方法 使用 TaqMan 基因分型分析法和实时定量 PCR 分析 MBL 基因的 4 个 SNP、启动子区 2 个 SNP、非编码区 1 个 SNP ELISA 测定标本血清 MBL 含量。结果 所有标本中发现了 8 种不同的 MBL 单体型,它们在患者和健康者中出现频率几乎是完全一样的,YA/YA 基因型与高水平的 MBL 相关,YO/YO 与低水平的 MBL 水平相关,6 种不同基因型 CRC 患者的 MBL 水平存在着明显不同。结论 MBL 基因型与血清 MBL 浓度显著相关 ($P<0.0001$) 突变型 B,C,D 和启动子单体型 Y,X 对 MBL 含量的影响起主要作用,MBL 基因型和术后感染并发症没有明显相关性 ($P=0.33$),与复发癌和存活时间也没有明显相关性 ($P=0.74$)。因此,从基因水平还不能解释为何结肠直肠癌患者血清 MBL 水平增加。对比已经检测出的血清 MBL 水平,其基因型还不能预测结肠直肠癌患者的疾病进程。

关键词 结肠直肠癌;甘露糖结合凝集素;基因型;单核苷酸多态性

中图分类号 R735.3 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 17-3306-05

MBL Genotypes in Colorectal Cancer

CHEN Yuan-chong¹, CHEN Zhu-yu², HOU Jian-hua¹, YAN Shan-ying¹, XI Feng-xiang¹

(1 The Fifth Hospital of Zhangjiakou, 075000, Zhangjiakou, China; 2 The First Hospital of Zhangjiakou, 075000, Zhangjiakou, China)

ABSTRACT Objective: Mannan-binding lectin (MBL) is key factors of the lectin pathway of complement activation. Polymorphisms of the MBL-2 genes affect serum levels of MBL. In patients with colorectal cancer (CRC), the MBL serum levels are increased and low MBL levels predict post-operative pneumonia. It is not known whether these associations are genetically based. In this study, the MBL genotypes are investigated in patients with CRC and healthy controls. The potential association between genetic profile and recurrence and survival is evaluated. **Methods:** Four single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of MBL, two SNPs of promoter region and one SNP of untranslated region were analysed using TaqMan assays. The concentration of MBL in the sera were detected by ELISA. **Results:** Eight different MBL haplotypes were found among the CRC patients and healthy individuals, The frequency of each haplotype in the patients was not different from that in healthy controls, YA/YA genotype was associated with the highest MBL levels, and YO/YO and XA/YO with the lowest levels. a significant difference between the serum levels of MBL in the six genotypes. **Conclusion:** MBL genotype significantly associated with MBL concentration in serum ($P<0.0001$). Variants B, C and D and the promoter haplotypes Y and X have dominant effects on the concentration of MBL. No significant association between MBL genotype and post-operative infectious complications ($P=0.33$), recurrent cancer or survival ($P=0.74$) was found. Thus, the increased serum levels of MBL found in patients with CRC are not explained for by genetic profiles. In contrast to what has been demonstrated for serum levels of MBL, the genotypes do not predict disease course of the CRC patients.

Key words: Colorectal cancer; Mannan-binding lectin(MBL); Gene type; Single-nucleotide polymorphisms (SNPs)

Chinese Library Classification(CLC): R735.3 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)17-3306-05

甘露糖结合凝集素(Mannan-binding lectin, MBL)是固有免疫系统重要的模式识别分子,它与 MBL 相关丝氨酸蛋白酶(MASP)形成复合物。血液中 MBL-MASP 复合物识别病原微生物相关分子模式从而激活补体系统。血清 MBL 水平在很大程度上由 MBL2 基因型决定,并且在健康个体中处于稳定水平^[1-3]。MBL2 基因(MBL1 是一个假基因)定位于 10 号染色体 q11.2-q21,由四个外显子组成。在外显子 1 上已经发现了 3 个单核苷酸多态性位点(single-nucleotide polymorphisms, SNP)。

这些 SNP 的存在破坏了 MBL 肽段的铰链结构而导致血清 MBL 浓度的降低^[4,5]。MBL2 基因的野生型被定义为 A 型,密码子 52,54,57 的基因多态性分别定义为突变型 D,B,C,后三项合称为 "0" 型。另外,位于 MBL 启动子区的两个 SNP 也已经发现,其突变标记为 X/Y 和 H/L,位于非翻译区的一个 SNP 标记为 P/Q_[6]。这些基因多态性存在连锁不平衡,仅确定了七种单体型 HYPA,LYPA,LYQA,LXPA,HYPD,LYPB,LYQC,还有一个很少报道的型别 LYPD^[7]。MBL2 基因型和血清 MBL 水平存在明显相关性,但在具有相同基因型的个体中 MBL 水平仍存在很多变异。MBL 可能由于疾病类型而发生改变,或者可能影响疾病的进程。结肠直肠癌(colorectal cancer, CRC)患者

作者简介 陈远崇(1965),男,副主任医师。电话:13513132588,

E-mail:cyc_20688@126.com

(收稿日期 2011-05-11 接受日期 2011-06-04)

MBL 普遍升高^[8],可能在癌症进展中具有潜在作用。此外,有研究表明 MBL 通过结合结肠、直肠腺管上皮细胞而激活补体系统并趋化白细胞^[9]。

在本研究中,我们探讨了 (1) CRC 患者的 MBL2 基因型, (2) 探讨了患者 MBL2 基因型与其相对应的蛋白血清水平的关系, (3) CRC 患者与健康对照者的基因分布的不同是否能解释结肠直肠癌患者的 MBL2 水平增加 (4) 和基因特性与疾病预后 (包括术后感染并发症,癌症复发率和生存率) 之间的潜在相关性。

表 1 患者基本特征 (n=572)

Table 1 Basic patient characteristics

Age in years; median(range)		69(33-88)
Gender; n(%)		
	Male	343(60%)
	Female	229(40%)
Dukes stage; n(%)		
	A	46(8%)
	B	235(41%)
	C	188(33%)
	D*	103(18%)
Cancer localization; n(%)		
	Colon	326(57%)
	Rectum	246(43%)

Note: *Dukes' stage: colorectal cancer disseminated to the liver

收集 348 名 (132 女 216 男) 健康血液捐献者的血液标本,其平均年龄为 47 岁 (范围 18-64 岁)。

1.2 主要试剂

QIAamp DNA 微量提取试剂盒, 购于德国 Qiagen ;dNTP (2.5μ mol/L),Taq DNA 聚合酶(5U/μ L)等 PCR 试剂主要购于大连 TaKaRa 公司,血清 MBL 含量 ELISA 检测试剂盒购于江苏希望生物技术公司。

1.3 基因组 DNA 提取

应用 QIAamp DNA 微量提取试剂盒从收集的标本外周血细胞中提取出基因组 DNA。

1.4 TaqMan 探针和引物设计

采用 7500 实时荧光定量 PCR 仪随机软件 Primer Express 3.0 进行引物和探针的设计。针对每个 SNP 位点所设计的两条探针分别采用 VIC 和 FAM 进行荧光标记,引物合成由大连 TaKaRa 公司完成,SNP 位点的探针和引物混合之后的贮存备用。

1.6 基因分型

用 TaqMan 基因分型分析法分析 MBL2 的启动子区 4 个 SNP^[12]。用 PCR 对 DNA 进行扩增,扩增体系为 25μ L,包括 20ngDNA,0.9μ M 引物和 0.2μ M 探针 (终浓度)。反应程序为: 95℃10min 95℃ 15s、60℃ 60s,40 个循环。实验过程主要包括读取扩增前信号,生成扩增数据以及读取扩增后信号,检测基因分型。对于确切个体的基因分型,用实时定量 PCR 技术检测 MBL2 基因,具体方法参考文献^[13]。

1.6 MBL 含量检测

1 材料与方法

1.1 标本

本实验共收集 572 名结肠直肠癌病例血液标本,检测其 MBL 血清水平,并分析其 MBL2 基因型。从术前原发性 CRC 癌患者收集样本,并预先描述了疾病进程和病人的细节^[10,11]。术后这些病人每 3 个月复查一次,以记录是否有复发或转移,对整体存活率进行了调查。表 1 显示了病人的基本特征。

应用 ELISA 试剂盒测定所有标本血清中 MBL 含量,具体方法严格按照说明书进行。

1.7 统计分析

用 Kruskal-Wallis 检验或一般线性模型分析 MBL 水平 通过卡方检验或 Fisher's 确切概率法分析样本独立性;用 Cox 比例危险率模型对全部手术者和没有复发的手术者的基因相关性进行分析,P<0.05 具有统计学意义。

2 结果

2.1 MBL 基因型

CRC 患者 MBL 基因分型分布与健康对照组相比并无显著差异(P=0.49)。在 572 名 CRC 患者和 348 名健康个体中发现了 8 种不同的 MBL2 单体型,包括稀少的 LYPD 单体型。除了 LYPD 单体型,其他每种单体型在 CRC 患者和健康者中的出现的频率没有区别。LYPD 单体型只出现于健康对照组中,在癌症患者中未出现 (Tab.2)。

对血清 MBL 水平有主要影响的等位基因,如 Y/X 等位基因,野生型基因 A 和与其相对应的 "0" 突变型基因 (B,C 和 D),它们在患者和健康者中出现频率几乎是完全一样的 (P=0.95)。两组中等位基因 A 出现的频率是 77%。CRC 患者中 Y 和 X 出现的频率分别是 81%和 19%,在健康对照组中出现的频率与其相似,分别为 80%和 20%。表 3 显示了 CRC 患者和健康者中 XY 和 A0 等位基因的分布频率,表中所列数据依据先前研究分析出的 MBL 血清高,中,低水平而进行的分组。表 4 分别列出了患者和健康者突变型等位基因 B,C,D 和 X/Y,H/L,P/Q

出现的频率。不同性别 CRC 患者基因型分布相同 (P=0.18) , 58 无关。
CRC 患者的基因型与年龄 (P= 0.97) 或 Dukes' 疾病分期 (P=0.

表 2 CRC 患者(n=572)和健康对照者(n=348)MBL-2 单体型
Table 2 MBL-2 haplotypes in patients with CRC(n = 572) and in healthy controls (n = 348)

Haplotype	Patients with CRC	Healthy individuals	P-value
	n(%)	n(%)	
HYPA	339(29.6)	223(31.9)	0.49
LYPA	86(7.5)	38(5.43)	
LYQA	238(20.8)	139(19.9)	
LXPA	219(19.1)	139(19.9)	
LYPB	161(14.1)	100(14.3)	
LYQC	22(1.9)	9(1.29)	
HYPD	79(6.9)	51(7.29)	
LYPD	0	1(0.14)	

表 3 CRC 患者(n=572)和健康对照者(n=348)MBL-2 等位基因分布
Table 3 The distribution of MBL-2 alleles in patients with CRC (n = 572) and in healthy controls (n = 348)

Main MBL group	Genotype	Patients with CRC	Healthy controls
		n(%)	n(%)
High serum level	YA/YA	182(31.8)	119(34.1)
	YA/XA	129(22.6)	77(22.1)
	Subtotal	311(54.4)	196(56.2)
Intermediate serum level	XA/XA	30(5.2)	15(4.3)
	YA/YO	139(24.3)	83(23.8)
	Subtotal	169(29.5)	98(28.1)
Low serum level	XA/YO	61(10.7)	34(9.7)
	YO/YO	31(5.4)	22(6.3)
	Subtotal	92(16.1)	56(16.0)

表 4 CRC 患者(n=572)和健康对照者(n=348)MBL-2 外显子 I 等位基因 B,C,D 突变位点与频率,MBL-2 启动子单元型 X/Y,H/L,P/Q 频率
Table 4 The frequency and positions of the MBL-2 exon 1-alleles B, C and D, and the frequency of MBL-2 promotor haplotypes X/Y, H/L and P/Q in 348 healthy controls and 572 patients with CRC

Position of SNP on MBL gene	Allele	Patients with CRC n(%)	Healthy controls n(%)
Exon I			
+223 (codon 52)	D	79(6.9)	52(7.4)
+230 (codon 54)	B	161(14.0)	100(14.3)
+239 (codon 57)	C	22(1.9)	9(1.3)
Promotor region			
-550	H/L	418/726(36.5/63.5)	274/426(39.1/60.9)
-221	X/Y	219/925(19.1/80.9)	139/561(19.9/80.1)
+4	P/Q	260/884(77.3/22.7)	552/148(78.0/22.0)

Note: SNP, single-nucleotide polymorphism; MBL, mannan-binding lectin.

2.2 基因型对血清 MBL 水平的影响

健康对照组中 MBL 单体型与 MBL 血清水平相关性的研究证实, 突变型 B,C,D 和启动子单体型 Y,X 对 MBL 含量的影响起主要作用。YA/YA 基因型与高水平的 MBL 相关, YO/YO 与低水平的 MBL 水平相关 (Tab.5)。对比等位基因 H, L,X,Y 和与其相对应的 MBL 浓度表明两者之间存在一定相关性 (P<0.0001)。因此 HY 单体型与 MBL 高水平浓度相关,而

LY 单体型和 LX 单体型分别与中水平浓度和低水平浓度相关。相对于 H/L 和 P/Q 等位基因,X/Y 等位基因对血清 MBL 基因突变型的影响是较为重要的。表 6 显示了等位基因对的每个等位基因对 MBL 水平的影响。6 种不同基因型 (YA/YA, YA/XA,YA/YO,YA/XA,YO/YO,YO/XO) CRC 患者的 MBL 水平存在着明显不同 (P<0.0001)。

表 5 CRC 患者(n=572)和健康对照者(n=348)MBL-2 基因型与相应的 MBL 水平

Table 5 MBL-2 genotypes and corresponding serum levels of MBL in 348 healthy individuals and in 572 patients with CRC

Genotype	MBL(ng/mL)	Median(range)
	Healthy controls	Patients with CRC
YA/YA	2790(202-9223)	2419(218-11103)
YA/XA	1515(503-4996)	1323(340-2928)
YA/YO	491(10-1818)	468(0-4285)*
XA/XA	298(63-1284)	826(202-4506)
XA/XO	10(10-190)	53(0-3104)*
YO/YO	10(10-25)	0(0-6170)*

Note: *The high values are due to single outliers and most values were in the low-concentration area

表 6 等位基因位点对 MBL 血清含量水平的影响

Table 6 The relative influence of the allelic composition on the MBL serum level

Allen	MBL ratio	95% confidence interval
HH	1.39	0.83-2.32
HL	1.71	1.27-2.32
LL	1.00*	
XX	0.33	0.17-0.65
XY	0.34	0.25-0.48
YY	1.00*	
PP	0.81	0.42-1.58
PQ	0.74	0.42-1.31
QQ	1.00*	
00	0.001	0.0006-0.002
A0	0.10	0.08-0.14
AA	1.00	

Note:* Homozygosity of one of the alleles is arbitrarily considered as representing baseline value and is compared with the MBL levels found associated with the two other possible allele combinations.

2.3 基因型和疾病预后

术后跟踪记录研究表明,CRC 患者的 MBL-2 基因型与术后感染及并发症无相关性 (P=0.33) ,对于肺炎也是如此 (P=0.38) ,并预测 MBL-2 基因型与复发癌 (P=0.74 ;只针对切除后有疗效的患者) 或生存率无关 (P=0.61) 。

3 讨论

CRC 患者 MBL-2 基因型的分布与健康对照组相似,其基因型与 MBL 血清水平有一定关联,这与以前的结果相似^[14-16],CRC 患者 MBL 水平和对照组相比比较高。因此野生型 A/A 可导致最高水平的 MBL, 等位基因突变型与 X 突变型相比导致较高水平的功能性 MBL。当野生型 A 与启动子突变型 X 共同表达,即发现 XA/XA 基因型时,MBL 循环水平低,为 298ng/mL,而 YA/XA 的 MBL 水平为 1515 ng/mL,YA/YA 的 MBL 水平为 2790 ng/mL。另外,我们发现多态性等位基因 H/L 和 P/Q 对 MBL 血清水平有不同的影响。研究了所有的等位基因发现 P/Q 等位基因对 MBL 循环水平的影响无意义。

这些研究结果主要表明了两点,第一 :带有确定 MBL2 基因型的不同个体,其 MBL 循环浓度可有大幅度的变化。因此检测实时 MBL 水平比检测其基因型能对机体的功能状态能提供

更多的信息。这可以部分解释在比较多种自身免疫性疾病、心血管疾病和代谢性疾病时,MBL 浓度和 MBL2 基因型表现出不一致性。第二 :目前的研究结果表明 CRC 患者的 MBL 水平升高不是基因型决定的^[8,11],可能与基因的上调表达或逆转录机制有关。MBL 主要由肝细胞合成^[17,18]。CRC 患者 MBL 水平较高的一个潜在机制可能是颗粒性储存和 / 或癌症患者 MBL 的释放增加。另一种机制可能是癌症患者 MBL 的新陈代谢减缓,从而导致循环中 MBL 的浓度升高。多种器官特异性机制也可能参与 MBL 调节过程,如组织局部 MBL 合成上调。MBL 主要在肝脏合成,有文献证明在小肠发现小部分 mRNA^[19]。结肠直肠癌可能通过旁分泌上调 MBL2 mRNA 的肠转录。

本研究未发现 MBL2 基因型对生存率、复发率或术后感染率有影响。这与以前的研究并不一致,以前的研究表明 MBL 血清水平与感染并发症,预后和复发具有一定相关性。这可能与标本来源及判断标准存在区别有关系。

本研究表明 CRC 患者和健康对照组的 MBL 基因型没有区别,且 CRC 患者的 MBL2 基因型与 MBL 血清水平相关,相关性与健康对照组相似。MBL 血清水平与结肠直肠癌相关,除基因以外的其他因子可能在 MBL 水平增加和对疾病后果的影响方面起一定的作用。

参考文献 (References)

- [1] Garred P, Thiel S, Madsen HO, et al. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic variant of mannan binding protein associated with low serum concentrations [J]. Clin Exp Immunol, 1992,90:517-521
- [2] Steffensen R, Thiel S, Varming K, Jersild C, Jensenius JC. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers[J]. J Immunol Methods, 2000,241:33-42
- [3] Sorensen GL, Petersen I, Thiel S et al. Genetic influences on mannan-binding lectin (MBL) and mannan-binding lectin associated serine protease-2 (MASP-2) activity[J]. Genet Epidemiol, 2007,31:31-41
- [4] Wallis R, Shaw JM, Uitdehaag J, Chen CB, Torgersen D, Drickamer K. Localization of the serine protease-binding sites in the collagen-like domain of mannose-binding protein - indirect effects of naturally occurring mutations on protease binding and activation [J]. J Biol Chem, 2004,279:14065-14073
- [5] Larsen F, Madsen HO, Sim RB, Koch C, Garred P. Disease-associated mutations in human mannose-binding lectin compromise oligomerization and activity of the final protein [J]. J Biol Chem, 2004,279:21302-21311
- [6] Madsen HO, Garred P, Thiel S et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannanbinding protein[J]. J Immunol, 1995,155:3013-3020
- [7] Boldt AB, Petzl-Erler ML. A new strategy for mannose-binding lectin gene haplotyping[J]. Hum Mutat, 2002,19:296-306
- [8] Ytting H, Jensenius JC, Christensen IJ, Thiel S, Nielsen HJ. Increased activity of the mannan-binding lectin complement activation pathway in patients with colorectal cancer [J]. Scand J Gastroenterol, 2004,39:674-679
- [9] Muto S, Takada T, Matsumoto K. Biological activities of human mannose-binding lectin bound to two different ligand sugar structures, Lewis A and Lewis B antigens and high-mannose type oligosaccharides[J]. Biochim Biophys Acta, 2001,1527:39-46
- [10] Ytting H, Christensen IJ, Thiel S, Jensenius JC, Nielsen HJ. Serum mannan-binding lectin-associated serine protease 2 levels in colorectal cancer: relation to recurrence and mortality [J]. Clin Cancer Res, 2005,11:1441-1446
- [11] Ytting H, Christensen IJ, Jensenius JC, Thiel S, Nielsen HJ. Preoperative mannan-binding lectin pathway and prognosis in colorectal cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2005,54: 265-272
- [12] Molle I, Steffensen R, Thiel S, Peterslund NA. Chemotherapy-related infections in patients with multiple myeloma: associations with mannan-binding lectin genotypes[J]. Eur J Haematol, 2006, 77:19-26
- [13] Steffensen R, Hoffmann K, Varming K. Rapid genotyping of MBL2 gene mutations using real-time PCR with fluorescent hybridisation probes[J]. J Immunol Methods, 2003,278:191-199
- [14] Gordon AC, Waheed U, Hansen TK et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in severe sepsis: relationship to levels, incidence, and outcome[J]. Shock, 2006,25:88-93
- [15] Lee SG, Yum JS, Moon HM et al. Analysis of mannose-binding lectin 2 (MBL2) genotype and the serum protein levels in the Korean population[J]. Mol Immunol, 2005,42:969-977
- [16] Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heatley S, Mullighan CG. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population[J]. Scand J Immunol, 2002,56:630-641
- [17] Summerfield JA, Taylor ME. Mannose-binding proteins in human serum: identification of mannose-specific immunoglobulins and a calcium-dependent lectin, of broader carbohydrate specificity, secreted by hepatocytes[J]. Biochim Biophys Acta, 1986,883:197-206
- [18] Wild J, Robinson D, Winchester B. Isolation of mannose-binding proteins from human and rat liver[J]. Biochem J, 1983,210:167-174
- [19] Seyfarth J, Garred P, Madsen HO. Extra-hepatic transcription of the human mannose-binding lectin gene (mbl2) and the MBL-associated serine protease 1-3 genes[J]. Mol Immunol, 2006, 43:962-971