

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.05.007

CTLA-4+49A>G 基因多态性与结直肠癌的相关性研究*

李晓冬 赵 磊 钟 海 方太石 刘文生[△]

(哈尔滨医科大学附属第四医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4(CTLA-4)+49 A>G 位点多态性与结直肠癌发生的相关性,为早期预测结直肠癌的发生提供临床参考依据。**方法:**选取结直肠癌病例 231 例未实验组和正常健康体检者 325 例为对照组,取其空腹外周静脉血提取 DNA 后,采用聚合酶链式反应(PCR)技术对 CTLA-4 基因第 1 外显子区 +49 位点 DNA 进行扩增,产物用限制性片段长度多态性(RFLP)方法检测 CTLA-4 第 1 外显子区 +49A>G 位点的多态性,比较两组杂合子 AG 和纯合子 AA、GG 基因型发生的频率、A 等位基因与 G 等位基因的分布,分析 CTLA-4 +49 A>G 位点多态性与结直肠癌发生的相关性。**结果:**两组间 CTLA-4 基因外显子 1 区 +49A>G 位点杂合子 AG 和纯合子 AA、GG 基因型发生的频率以及 A 等位基因与 G 等位基因的分布比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**CTLA-4 基因外显子 1 区 +49 A>G 基因多态性与我省汉族人群结直肠癌的发病无显著相关性。

关键词:细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4;结直肠癌;限制性片段长度多态性;相关性

中图分类号:R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)05-822-03

Correlative Study on CTLA-4+49A>G Polymorphism Gene Polymorphism and Colorectal Cancer*

LI Xiao-dong, ZHAO Lei, ZHONG Hai, FANG Tai-shi, LIU Wen-sheng[△]

(Department of general surgery, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To study the relation of CTLA-4 +49 A>G polymorphism on the susceptibility of colorectal cancer, and provide clinical help for the early prediction and monitoring of colorectal cancer. **Methods:** Selection of colorectal cancer in 231 cases; 325 cases of normal control group, according to kit instructions after extracting DNA, using polymerase chain reaction CTLA-4 gene first exon region amplification of the +49 locus DNA, products with restriction fragment length polymorphism (restriction fragment length polymorphism, RFLP) exon region of +49A>G polymorphism detection of CTLA-4 first, a comparative analysis of node and control groups in rectal cancer, to analyze the correlation between CTLA-4 +49 A>G polymorphism and the risk of colorectal cancer for further. **Results:** Two groups of CTLA-4 gene exon 1 +49A>G locus, heterozygous and homozygous AG AA, GG genotype frequency showed not statistically significant difference between two groups ($P>0.05$); A alleles and G alleles between the two groups were not significantly different ($P>0.05$). **Conclusion:** There was no association between the prevalence of CTLA-4 gene exon 1 region of +49 A>G gene polymorphism and people of our province of colorectal cancer.

Key words: Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4(CTLA-4); Colorectal Cancer; Restriction fragment length polymorphism; Correlation

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

Article ID: 1673-6273(2015)05-822-03

前言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是胃肠道中最常见的恶性肿瘤,近年来我国结直肠癌的发病率明显上升^[1]。随着分子生物学技术的不断发展,人们逐渐认识到结直肠癌的发生发展是一个多步骤、多阶段及多基因参与的细胞遗传性疾病^[2]。CTLA-4 基因编码一种与抗原提呈细胞表面的 B7 分子相结合的膜蛋白(cytotoxic T-lymphocyte antigen-4, CTLA-4),通过与配体相互作用可使 T 淋巴细胞的活化、增殖受到抑制,从而引起外周免疫耐受^[3]。本研究旨在探讨 CTLA-4 基因外显子 1 区 +49

A>G 的基因多态性与结直肠癌发生的相关性,以期为早期预测结直肠癌的发生提供临床帮助。

1 材料和方法

1.1 标本及试剂来源

选取 2012 年 3 月~2013 年 9 月由哈尔滨医科大学附属第四医院经内镜下取病理确诊为结直肠癌患者 231 例为实验组,所有患者均未行放疗或化疗治疗,其中男 137 例,女 94 例,平均年龄为(53.4±1.7)岁。同时选取 2012 年 10 月~2013 年 9 月体检健康的 325 例为对照组,其中男 195 例,女 130 例,平均

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12521320)

作者简介:李晓冬,男,硕士研究生,副主任医师,副教授,主要研究方向:胃肠道肿瘤,电话:13804609542, E-mail: gongjinwei321@163.com

△ 通讯作者:刘文生,电话:0451-82576686, E-mail: 865636368@qq.com

(收稿日期:2014-08-23 接受日期:2014-09-18)

年龄为(51.2±1.3)岁。两组均在患者及家属之情同意的情况下,抽取空腹外周静脉血。所研究对象均为黑龙江省无血缘关系的汉族人,既往无冠心病、糖尿病、甲状腺疾病、系统性红斑狼疮、关节炎等病史,亦无肿瘤及免疫相关疾病家族史。基因组 DNA 提取试剂盒购买于天为时代公司;基因组扩增采用 ABI9600 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, USA) 进行 PCR 扩增;Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;引物的合成及测序由上哈尔滨医科大学基础实验室完成。

1.2 方法

1.2.1 两组 DNA 的提取 抽取两组受试外周静脉血 5 mL,采用 EDTA 抗凝,蛋白酶 K 消化^[4],利用 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,在 -20℃ 的冰箱中保存备用。

1.2.2 CTLA-4 +49 A>G 位点扩增 采用聚合酶链反应一限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法对 CTLA-4 +49 A>G 位点扩增。引物序列^[5],上游为:5'-CCA CGG CTTCTT CCG-3';下游为:5'-GCA GAA GACAGG GAT GAA-3';PCR 扩增片段为 311bp。

1.2.3 CTLA-4 +49 基因多态性检测 PCR 扩增产物应用限制性内切酶 BstEII 进行酶切,然后使用 3%琼脂糖凝胶对酶切产物进行电泳,EB 染色进行基因型鉴定。

1.3 统计学处理

应用 SPSS19.0 统计学软件,应用 χ^2 检验检验 Hardy-Weinberg 平衡吻合度;应用标准 χ^2 检验比较两组基因型和等位基因频率的差异;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CTLA-4 +49 A>G 位点多态性酶切的结果

CTLA-4 基因外显子 1 区 +49 A>G 位点 PCR 扩增片段为 311 bp,扩增产物应用限制性内切酶 BstEII 进行酶切,然后使用 3%琼脂糖凝胶对酶切产物进行电泳分离后获得基因型:GG 纯合子 255 bp 片段;AA 纯合子 311 bp 片段;AG 杂合子 255 bp 和 311 bp 片段。

2.2 两组 CTLA-4 +49 A>G 位点多态性分布的比较

经 χ^2 检验,两组 CTLA-4 +49 A>G 位点基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡,具有群体代表性。两组 CTLA-4 第 1 外显子区 +49A>G 位点基因型及等位基因频率见表 1,两组间杂合子 AG 和纯合子 AA、GG 基因型发生的频率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$),A 等位基因与 G 等位基因的分布比较差异亦无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 两组 CTLA-4 基因第 1 外显子 +49 位点基因型及等位基因频率的比较

Table 1 Comparison of the frequencies of CTLA-4 gene exon first +49 locus genotype and allele between two groups

观察项目	结直肠癌组	正常对照组	χ^2 值	P 值
Observation items	Colorectal cancer group	Normal control group	χ^2 value	P value
n	231	325		
基因型[例(%)]				
Genotype cases[n(%)]				
GG	18(7.79)	46(14.15)	21.083	<0.05
AG	138(59.74)	131(40.31)	21.083	<0.05
AA	75(32.47)	148(45.54)	21.083	<0.05
等位基因[例(%)]				
Allele cases[n(%)]				
G	73(31.60)	78(24.00)	3.944	<0.05
A	158(68.40)	247(76.00)	3.944	<0.05

3 讨论

恶性肿瘤的发生可能与免疫监督缺失有关^[14-16],参与肿瘤细胞的免疫应答包括 T 细胞、NK 细胞、巨噬细胞激活以及抗体产生等,免疫耐受或免疫无反应性可使肿瘤细胞逃避这种免疫应答,而 CTLA-4 的表达在对 T 细胞的活化起负性调节作用^[17]。CTLA-4 基因导致自身免疫遗传倾向改变是通过调控引起 CTLA-4 蛋白的表达或者功能改变而实现的^[6-8],而其对前导序列翻译后修饰作用的影响是因为前导序列的蛋白质糖基化效率是由 CTLA-4 基因第一外显子 49 位点 A>G 的多态性决定的^[9]。CTLA-4 基因第一外显子 49A>G 位点的多态性可导致 17 位密码子上苏氨酸 / 丙氨酸交换,进而使得前导肽链功能发生改变,减弱了 CTLA-4 蛋白携带丙氨酸从胞内向细胞表面迁移能力,使得细胞表面 CTLA-4 蛋白减少^[10]。近年来,有实验研究^[11-13]表明 CTLA-4 +49 A>G 基因可以导致疾病易感,如 Graves 病、胰腺癌、胃癌等,其位点基因已经成为研究焦点之一。然而,

CTLA-4 +49 A>G 位点基因及等位基因频率与结直肠癌的关系目前尚未确实。

过去,伴随着 CTLA-4 基因多态性被不断发现,研究主要集中于个体遗传背景与不同类型癌症发生发展的相关性^[18-20]。有研究观察了爱尔兰、意大利和土耳其三个人群中 CTLA-4 +49 A>G 多态性与结直肠癌易感性的相关性,但这些研究都得出了阴性结果^[18-20];爱尔兰人群中,Hadinia 等^[18]选择 109 例结直肠癌患者和 190 例健康者为研究对象,探讨 CTLA-4 (-1772T>C、-1661A>G、-318C>T 和 +49A>G) 与结直肠癌易感性的相关性,结果两组间基因型分布和等位基因频率差异均无统计学意义,但他们也发现结直肠癌中 TACG 单体型在 CTLA-4(-1722T、-1661A、-318C、+49G)四个位点中出现的频率很低;意大利人群中,Solerio 等^[19]对 132 例结直肠癌、186 例结直肠腺瘤患者和 238 例健康者的对照研究显示各组间 CTLA-4 +49A>G 多态性比较差异无统计学意义,表明意大利人群 CTLA-4 +49A>G 多态性与其结直肠癌的发生无显著相关性;土耳

其人中,Dilmec 等^[20]对 56 例结直肠癌患者和 162 例健康者的对照研究显示两组间 CTLA-4 +49A>G 和 -318C>T 多态性比较差异亦无统计学意义。而本研究探讨了我国汉族人群 CTLA-4 +49A>G 位点基因多态性与结直肠癌发生的相关性,结果显示 CTLA-4 第 1 外显子区 +49A>G 位点杂合子 AG 和纯合子 AA、GG 基因型发生的频率、A 等位基因与 G 等位基因的分布与正常健康人群比较差异均无统计学意义,这与上述国家的相关研究结果相似。

综上所述,本次研究的结果表明我国汉族人群 CTLA-4 +49 A>G 位点多态性与结直肠癌的发生并无相关性。但本研究的结果尚存在一定的局限性可能对结果造成影响:(1)样本含量小;(2)所选取的基因位点少;(3)地域性和种族的差异。因此,未来尚需要大样本的研究进一步分析证实 CTLA-4 +49A>G 基因多态性与结直肠癌发生的关系。

参考文献(References)

- [1] Jass JR. Colorectal cancer: a multipathway disease[J]. Critical Reviews in Oncology, 2006, 12 (3-4): 273-287
- [2] 吴在德,吴肇汉.外科学[M].第 7 版.北京:人民卫生出版社,2009: 487-492
- [3] Wu Zai-de, Wu Zhao-han. Surgery[M]. The Seventh Edition. Beijing: People's Medical Publishing house, 2009: 487-492
- [3] Van Wijk F, Nierkens S, de Jong W, et al. The CD28/CTLA-4-B7 signaling pathway is involved in both allergic sensitization and tolerance induction orally administered peanut proteins [J]. J Immunol, 2007, 178(11): 6894-6900
- [4] 李睿,夏冰,肖晖,等. CTLA-4 基因启动子区 -1661 和 -318 位点多态性与胃癌的关系[J]. 胃肠病学杂志, 2009, 14(6): 332-336
- [4] Li Rui, Xia Bing, Xiao Hui, et al. Association between Gene Promoter Region Polymorphisms CTLA-4 at Positions-1661 and -318 and Gastric Cancer[J]. Journal of Gastroenterology, 2009, 14(6): 332-336
- [5] 范志广,付佳,陈婷,等. 细胞毒性 T 细胞相关抗原 4 基因 +49 位点多态性与大肠癌相关性研究 [J]. 黑龙江医学杂志, 2012, 36(11): 810-811
- [5] Fan Zhi-guang, Fu Jia, Chen Ting, et al. Cytotoxic T cells associated antigen-4 gene +49 loci polymorphisms and colorectal cancer association study[J]. Heilongjiang Medical Journal, 2012, 36(11): 810-811
- [6] 王淑琼,高继东,张惠莉. CTLA-4 基因多态性与弥漫性毒性甲状腺肿的相关性[J]. 青海医学院学报, 2010, 31(4): 225-227
- [6] Wang Shu-qiong, Gao Ji-dong, Zhang Hui-li. Association of CTLA-4 gene exon 1 polymorphism with graves disease in han population[J]. Journal of Qinghai Medical College, 2010, 31(4): 225-227
- [7] Scalapino KJ, Daikh DI. CTLA-4: a key regulatory point in the Control of autoimmune disease[J]. Immunol Rev, 2008, 223: 143-155
- [8] 蒋益,夏冰,郑君杰,等. 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 基因微卫星多态性与炎症性肠病的关系 [J]. 中华消化杂志, 2005, 25(7): 387-390
- [8] Jiang Yi, Xia Bing, Zheng Jun-jie, et al. The study of relationship between the microsatellite polymorphism of cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 gene and inflammatory bowel disease [J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2005, 25(7): 387-390
- [9] 陈晓雯,李玲. 中国人群 CTLA-4 基因外显子 1 及启动子 -318 的多态性与 Graves 病相关性的 Meta 分析 [J]. 中国循证医学杂志, 2012, 12(11): 1302-1308
- [9] Chen Xiao-wen, Li Ling. Correlation between Chinese Population Cytotoxic T Lymphocytes Associated Antigen-4 Gene Exon-1 & Promoter Polymorphisms and Graves' Disease: A Meta-Analysis[J]. Chin J Evid-based Med, 2012, 12(11): 1302-1308
- [10] 郭中秋,陈晓铭,吴平,等. CTLA-4 基因多态性与粤西汉族人 Graves 病发病的先关性研究[J]. 广东医学院学报, 2010, 28(1): 1-3
- [10] Guo Zhong-qiu, Chen Xiao-ming, Wu Ping, et al. Relationships between CTLA-4 gene polymorphism and Graves' disease in Han population in western region of Guangdong Province [J]. Journal of Guangdong Medical College, 2010, 28(1): 1-3
- [11] 张耀东,谭利娜,卫海燕,等. CTLA-4 基因 49 位点多态性与中国人 Graves 病相关性的 Meta 分析[J]. 中华内分泌外科杂志, 2013, 7(1): 64-68
- [11] Zhang Yao-dong, Tan Li-na, Wen Hai-yan, et al. Meta-analysis of CTLA-4 promoter-49 A / G polymorphism and Graves' disease in China [J]. Chin J Endocr Surg, 2013, 7(1): 64-68
- [12] Cuicui Lang, Lei Chen, Senlin Li. Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 + 49G/A Polymorphism and Susceptibility to Pancreatic Cancer [J]. DNA Cell Biol, 2012, 31(5): 683-687
- [13] 司君利,吕梅,元玉琴,等. 胃癌患者 CTLA-4 启动子及外显子区域基因多态性的研究 [J]. 中国现代普通外科进展杂志, 2012, 15(6): 435-486
- [13] Si Jun-li, Lv Mei, Yuan Yu-qin, et al. Polymorphism of CTLA-4 and Helicobacter pylori infection On gastric cancer Genes [J]. Chin J Curr Adv Gen Surg, 2012, 15(6): 435-486
- [14] Wilczyński JR, Duechler M. How do tumors actively escape from host immunosurveillance? [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2010, 58(6): 435-448
- [15] 李儒佑,李清泉. 检测 CTLA-4 在鉴别结核性和恶性胸腔积液中的临床意义[J]. 武汉大学学报, 2009, 30(3): 409-411
- [15] Li Ru-you, Li Qing-quan. Evaluation of CTLA-4 Determination in Differential Diagnosis Between Tuberculous and Malignant Pleural Effusions[J]. Journal of Wuhan University, 2009, 30(3): 409-411
- [16] 张勤英,朱凡,王毓明. 结直肠癌患者外周血 CD4 + CD25high 调节性 T 细胞的作用[J]. 肿瘤基础与临床杂志, 2012, 25(1): 14-17
- [16] Zhang Qin-ying, Zhu Fan, Wang Yu-ming. The Action of CD4 + CD25high Treg Cell in Peripheral Blood of Patients with Colon Cancer[J]. Journal of basic and clinical oncology, 2012, 25(1): 14-17
- [17] 赵玉芹,刘晓青,刘玮. 欧亚人群中 TLA-4+49 基因多态性与 Graves 病遗传易感性关系的 Meta 分析 [J]. 实用医学杂志, 2013, 29(19): 3241-3244
- [17] Zhao Yu-qin, Liu Xiao-qing, Liu Wei. A meta-analysis about the relation of polymorphism at the sites +49 of cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene with the susceptibility of Graves disease in Asian population [J]. Journal of Practical Medicine, 2013, 29 (19): 3241-3244
- [18] Hadinia A, Hossieni SV, Erfani N, et al. CTLA-4 gene promoter and exon 1 polymorphisms in Iranian patients with gastric and colorectal cancers[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(12): 2283-2287
- [19] Solerio E, Tappero G, Iannace L, et al. CTLA-4 gene polymorphism in Italian patients with colorectal adenoma and cancer [J]. Dig Liver Dis, 2005, 37(3): 170-175
- [20] Dilmec F, Ozgonul A, Uzunkoy A, et al. Investigation of CTLA-4 and CD28 gene polymorphisms in a group of Turkish patients with colorectal cancer[J]. Int J Immunogenet, 2008, 35(4-5): 317-321