

大肠癌IFN- γ 基因+874位点的单核苷酸多态性

费保莹, 吕火祥, 陈永伟, 杨建民

■背景资料

大肠癌发病机制仍不清楚, 是一多因素疾病, 其中个体遗传易感性与其相关。细胞因子IFN- γ 在大肠癌的发病中起着重要的作用。研究发现IFN- γ 基因多态性影响IFN- γ 的分泌, 目前IFN- γ 基因多态性是否在大肠癌的发病中起作用尚未见报道。

费保莹, 杨建民, 浙江省人民医院消化内科 浙江省杭州市 310014
吕火祥, 浙江省人民医院检验科 浙江省杭州市 310014
陈永伟, 浙江省人民医院肛肠科 浙江省杭州市 310014
浙江省卫生厅科研基金项目, No.97420
通讯作者: 费保莹, 310014, 浙江省杭州市朝晖四区158号, 浙江省人民医院消化内科。 feibaoying6924@tom.com
电话: 0571-85893430
收稿日期: 2006-04-20 接受日期: 2006-06-05

Single nucleotide polymorphism of interferon-gamma gene +874 T/A in colorectal cancer

Bao-Ying Fei, Huo-Xiang Lv, Yong-Wei Chen, Jian-Min Yang

Bao-Ying fei, Jian-Min Yang, Department of Gastroenterology, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China
Huo-Xiang Lv, Department of Clinical Laboratory, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China
Yong-Wei Chen, Department of Coloproctology, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China
Supported By the Fund from Health Department of Zhejiang Province, No. 97420
Correspondence to: Dr. Bao-Ying Fei, Department of Gastroenterology, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China. feibaoying6924@tom.com
Received: 2006-04-20 Accepted: 2006-06-05

Abstract

AIM: To investigate whether the single nucleotide polymorphism (SNP) of interferon-gamma (IFN- γ) +874 T/A correlates with colorectal cancer in Han Chinese of Zhejiang province, China.

METHODS: The alleles of IFN- γ gene were detected in 132 healthy subjects and 92 patients with colorectal cancer using amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR. Meanwhile, the PCR products were cloned and sequenced.

RESULTS: The frequency of IFN- γ +874 AA genotype was significantly higher in patients with colorectal cancer than that in the healthy

individuals (70.6% vs 57.6%, $P < 0.05$), but it had no significant correlation with the age, gender, tumor location or Dukes grading in patients with colorectal cancer ($P > 0.05$).

CONCLUSION: IFN- γ +874 AA genotype may be associated with the susceptibility to colorectal cancer in Han Chinese of Zhejiang province.

Key Words: Interferon-gamma; Colorectal neoplasm; Single nucleotide polymorphism

Fei BY, Lv HX, Chen YW, Yang JM. Single nucleotide polymorphism of interferon-gamma gene +874 T/A in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(20):2022-2025

摘要

目的: 探讨中国浙江地区汉族人群中IFN- γ 基因+874位点多态性分布, 分析其与大肠癌的相关性。

方法: 应用突变特异性扩增系统(ARMS)-PCR对健康者132例和大肠癌患者92例IFN- γ 基因+874位点多态性进行分析, 并将PCR产物克隆及测序鉴定。

结果: 大肠癌患者IFN- γ +874位点AA基因型频率为70.6%, 显著高于正常人中的57.6% ($P < 0.05$)。进一步分析显示IFN- γ +874位点AA基因型与患者的年龄、性别、肿瘤部位、Dukes分期无关。

结论: IFN- γ +874位点AA基因型可能与大肠癌的发生相关。

关键词: 干扰素; 大肠肿瘤; 多态性

费保莹, 吕火祥, 陈永伟, 杨建民. 大肠癌IFN- γ 基因+874位点的单核苷酸多态性. *世界华人消化杂志* 2006;14(20):2022-2025
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2022.asp>

0 引言

大肠癌是常见的消化性恶性肿瘤之一, 其发病

■研发前沿

免疫遗传素质在大肠癌的关系越来越受到重视, 特别是一些重要的细胞因子如TNF、IL-1、IFN等, 其中某些易感基因可能在大肠癌的发病中起一定作用。细胞因子基因治疗大肠等肿瘤也在临床实验阶段。

机制仍不清楚. 目前免疫遗传素质与大肠癌的关系越来越受到学者们的重视^[1-3]. 干扰素- γ (IFN- γ)是体内具有多种生物活性的重要细胞因子, 有抗肿瘤、抗病毒感染及免疫调节作用. IFN- γ 基因第一内含子区+874位点T/A单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)可以通过改变转录因子的结合位点, 影响IFN- γ 的表达量^[4]. 迄今为止, 国内外尚未见有关IFN- γ 基因多态性与大肠癌关系的报道. 因此, 我们采用突变特异性扩增系统(amplification refractory mutation system, ARMS)-PCR对浙江地区汉族人群IFN- γ 基因+874位点多态性分布进行研究, 并分析其与大肠癌的相关性, 阐明IFN- γ 基因多态性在大肠癌发病中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 健康体检者132例, 男89例, 女43例, 平均年龄 51.4 ± 11.2 岁. 病理确诊大肠癌92例, 其中结肠癌48例, 直肠癌44例. 男67例, 女25例, 平均年龄 54.2 ± 11.8 岁. Dukes A期18例、B期28例、C期34例、D期12例. 以上个体均为无血缘关系的浙江汉族人. 各个体抽取静脉抗凝血2 mL.

1.2 方法 用改良的盐析法提取基因组DNA. 扩增IFN- γ 基因第一内含子+874位点的PCR引物如下述, 其中特异正向引物1为5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3', 特异正向引物2为5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3', 通用反向引物为5'-CATCTACTGTGCCTTCCTGT-3', 内参照正向引物为5'-TGCCAAGTGGAGCACCCAA-3', 内参照反向引物为5'-GCATCTTGCTCTGTGCA GAT-3'. PCR扩增条件: 94℃ 5 min, 94℃ 50 s; 60℃ 50 s; 72℃ 50 s; 72℃ 5 min, 总共33个循环. 扩增总体积为50 μ L, 内含通用反向引物和特异性正向引物1(或2)各1.0 μ mol/L, 内参照正向引物和反向引物各0.2 μ mol/L, 200 μ mol/L dNTP, 2.0 mmol/L MgCl₂, 2U Taq聚合酶, 50 ng模板DNA, 1 \times PCR缓冲液. 同一标本分成两管分别扩增. PCR产生相对应的特异性扩增条带长度为116 bp; 而内参照扩增片段长度为798 bp. PCR扩增片段在1%琼脂糖凝胶上电泳分离, 溴化乙锭染色观察结果. 将IFN- γ 待测等位基因的PCR产物(116 bp)经低熔点琼脂糖回收纯化, 然后严格按照Promega公司生产的pGEM-T质粒试剂盒说明书中的步骤操作, 与pGEM-T连接, 转化至JM109感受态细菌, 蓝白斑筛选, 培养, 提取纯

表1 大肠癌患者和正常对照组IFN- γ +874基因型频率和基因频率分布

分组	n	基因型			基因频率	
		TT	TA	AA	T	A
正常组	132	17(0.129)	39(0.295)	76(0.576)	73(0.276)	191(0.724)
大肠癌组	92	10(0.109)	17(0.185)	65(0.706) ^a	37(0.201)	147(0.799)

^a $P < 0.05$ vs 正常组.

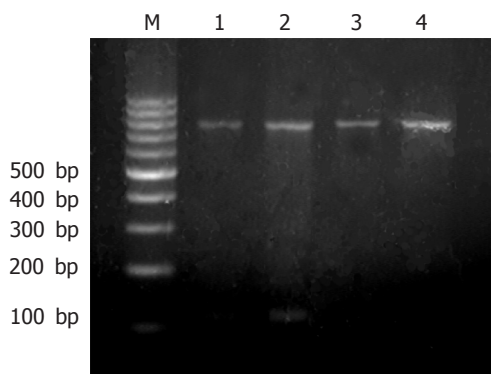


图1 IFN- γ 基因+874位点ARMS扩增电泳结果. M: 100 bp梯度DNA分子质量标准; 1, 2: 含阳性116 bp片段和内参照条带798 bp片段; 3, 4: 仅含内参照条带798 bp片段.

化鉴定质粒后测序.

统计学处理 采用 χ^2 检验进行组间各等位基因和基因型分布比较, 年龄差别比较采用 t 检验. 数据处理用SPSS10.0统计软件.

2 结果

IFN- γ 基因+874位点ARMS扩增产物有TT、TA和AA3种基因型(图1), 同一标本的2次PCR扩增产物中均有116 bp片段为杂合子TA基因型; 只有1次PCR扩增产物中有116 bp片段为纯合子TT或AA基因型. 所有的扩增产物中均有内参照条带798 bp片段. IFN- γ +874位点基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡定律. 大肠癌患者IFN- γ +874位点AA基因型频率为70.6%, 显著高于正常人中的57.6%($\chi^2 = 3.98$, $P < 0.05$, $OR = 1.77$, 95% CI: 1.01-3.12), 差异有统计学意义(表1). IFN- γ +874位点等位基因频率在大肠癌患者和正常人群中差异无统计学意义($P > 0.05$). 统计分析发现IFN- γ +874位点AA基因型与大肠癌的年龄、性别、肿瘤部位、Dukes分期无显著性相关. IFN- γ +874位点等位基因A克隆后测序图中所示35→150为IFN- γ +874位点PCR扩增片段, 35→53与特异正向引物2序列一致, 131→150与通用反向引物序列完全互补(图2).

■创新盘点

本文从免疫遗传学的角度分析了IFN- γ 基因多态性在大肠癌的发病中的作用, 找出大肠癌的易感基因. 目前国内外尚未见相关类似报道.

应用要点

本文发现IFN- γ +874位点AA基因型为大肠癌的易感基因,为大肠癌的发病机制的阐明和基因治疗提供一个新的方向.可以进一步通过加强大肠癌易感人群的早期一级预防和提高细胞因子基因治疗疗效,来降低大肠癌的发病率和致死率.

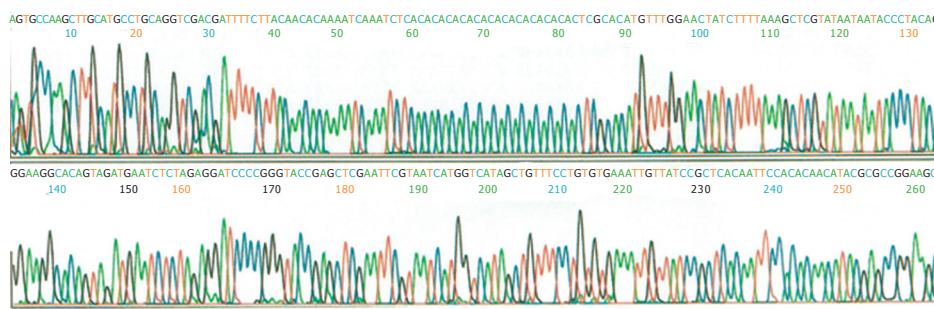


图2 IFN- γ +874位点等位基因A克隆后测序图. 35→150为PCR扩增片段.

3 讨论

IFN- γ 是Th1细胞分泌的主要细胞因子,主要来源于活化的T细胞和NK细胞,其通过直接抑制肿瘤细胞增殖;增加表面MHC抗原和肿瘤坏死因子的表达;抗肿瘤血管生成;诱发肿瘤细胞的凋亡等发挥抗肿瘤作用^[5-7]. Csiszar *et al*^[8]发现在结直肠癌组织中的IFN- γ 等细胞因子mRNA阳性检出率显著高于正常结肠组织,而且在更多的结直肠癌患者的外周血单核细胞检测到IFN- γ 转录物,这说明IFN- γ 等细胞因子调控结肠肿瘤的生长和肿瘤浸润淋巴细胞的功能性活动.研究表明,IFN- γ 基因第一内含子5'末端的(CA)₁₂重复序列其外周血单个核细胞IFN- γ 表达量最高.在CA重复序列5'末端+874位点T/A多态性与(CA)_n相邻,存在着极强的连锁不平衡.由于+874位点正好位于转录因子NF-kappaB的结合位点,其多态性影响与转录因子的结合能力,从而直接影响IFN- γ 的转录^[9].最近Biolo *et al*^[10]也发现IFN- γ 低表达型基因AA与IFN- γ mRNA水平的降低相关.

IFN- γ 基因第一内含子+874位点多态性与某些自身免疫性疾病、肿瘤等疾病的发生相关^[11-14]. Tsiavou *et al*^[11]发现+874位点的低IFN- γ 表达等位基因A在2型糖尿病患者中的频率显著高于对照组,结果表明IFN- γ 基因多态性与2型糖尿病的发病相关. Kamali-Sarvestani *et al*^[12]在一伊朗妇女人群中发现乳腺癌患者中的IFN- γ +874位点T/T基因型频率显著高于正常人群,说明携带T/T基因型的妇女患乳腺癌的风险增大.本研究结果显示大肠癌患者中的IFN- γ +874位点AA基因型频率显著高于正常人,提示AA基因型为其易感基因,在大肠癌的发病中起一定作用.研究已显示TT为高表达基因型,AA为低表达型基因,IFN- γ +874位点基因多态性可能通过影响IFN- γ 的分泌而参与大肠癌的发病.进一步分析未发现IFN- γ +874

位点基因型与大肠癌的临床特征相关.

由于IFN- γ 基因还存在其他位点的单核苷酸多态性,且这些多态性与IFN- γ 表达和分泌的关系还不明确,而且IFN- γ +874位点可能会与某些大肠癌的致病基因存在连锁不平衡.因此本文中IFN- γ +874基因型究竟是与其他易感基因连锁,还是协同其他基因发挥作用或其本身单独发挥作用均有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Viet HT, Wagsater D, Hugander A, Dimberg J. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in human colorectal cancer. *Oncol Rep* 2005; 14: 915-918
- 2 Macarthur M, Sharp L, Hold GL, Little J, El-Omar EM. The role of cytokine gene polymorphisms in colorectal cancer and their interaction with aspirin use in the northeast of Scotland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1613-1618
- 3 Zhang W, Stoeckelmacher J, Park DJ, Yang D, Borchard E, Gil J, Tsao-Wei DD, Yun J, Gordon M, Press OA, Rhodes K, Groshen S, Lenz HJ. Gene polymorphisms of epidermal growth factor receptor and its downstream effector, interleukin-8, predict oxaliplatin efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2005; 5: 124-131
- 4 Lopez-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, Gonzalez A, Codoceo R, Madero R, Vazquez JJ, Montiel C. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 970-975
- 5 Matsushita K, Takenouchi T, Shimada H, Tomonaga T, Hayashi H, Shioya A, Komatsu A, Matsubara H, Ochiai T. Strong HLA-DR antigen expression on cancer cells relates to better prognosis of colorectal cancer patients: Possible involvement of c-myc suppression by interferon-gamma in situ. *Cancer Sci* 2006; 97: 57-63
- 6 Yang JL, Qu XJ, Russell PJ, Goldstein D. Interferon-alpha promotes the anti-proliferative effect of gefitinib (ZD 1839) on human colon cancer cell lines. *Oncology* 2005; 69: 224-238
- 7 Juang SH, Wei SJ, Hung YM, Hsu CY, Yang DM, Liu KJ, Chen WS, Yang WK. IFN-beta induces caspase-mediated apoptosis by disrupting mitochondria in human advanced stage colon cancer cell lines. *J Interferon Cytokine Res* 2004; 24: 231-243
- 8 Csiszar A, Szentes T, Haraszti B, Balazs A, Petranyi

- GG, Pocsik E. The pattern of cytokine gene expression in human colorectal carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2004; 10: 109-116
- 9 Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000; 61: 863-866
- 10 Biolo G, Amoroso A, Savoldi S, Bosutti A, Martone M, Pirulli D, Bianco F, Ulivi S, Bertok S, Artero M, Barazzoni R, Zanetti M, Grassi G, Guarnieri G, Panzetta G. Association of interferon-gamma +874A polymorphism with reduced long-term inflammatory response in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 1317-1322
- 11 Tsiavou A, Hatziagelaki E, Chaidaroglou A, Koniavitou K, Degiannis D, Raptis SA. Correlation between intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) production by CD4+ and CD8+ lymphocytes and IFN-gamma gene polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes of adults (LADA). *Cytokine* 2005; 31: 135-141
- 12 Kamali-Sarvestani E, Merat A, Talei AR. Polymorphism in the genes of alpha and beta tumor necrosis factors (TNF-alpha and TNF-beta) and gamma interferon (IFN-gamma) among Iranian women with breast cancer. *Cancer Lett* 2005; 223: 113-119
- 13 Dierksheide JE, Baiocchi RA, Ferketich AK, Roychowdhury S, Pelletier RP, Eisenbeis CF, Caligiuri MA, VanBuskirk AM. IFN-gamma gene polymorphisms associate with development of EBV+ lymphoproliferative disease in hu PBL-SCID mice. *Blood* 2005; 105: 1558-1565
- 14 Spriewald BM, Witzke O, Wassmuth R, Wenzel RR, Arnold ML, Philipp T, Kalden JR. Distinct tumour necrosis factor alpha, interferon gamma, interleukin 10, and cytotoxic T cell antigen 4 gene polymorphisms in disease occurrence and end stage renal disease in Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 457-461
- 15 Qi S, Cao B, Jiang M, Xu C, Dai Y, Li K, Wang K, Ke Y, Ning T. Association of the -183 polymorphism in the IFN-gamma gene promoter with hepatitis B virus infection in the Chinese population. *J Clin Lab Anal* 2005; 19: 276-281
- 16 Etokebe GE, Bulat-Kardum L, Johansen MS, Knezevic J, Balen S, Matakovic-Mileusnic N, Matanic D, Flego V, Pavelic J, Beg-Zec Z, Dembic Z. Interferon-gamma gene (T874A and G2109A) polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. *Scand J Immunol* 2006; 63: 136-141
- 17 Arora R, Saha A, Malhotra D, Rath P, Kar P, Bamezai R. Promoter and intron-1 region polymorphisms in the IFNG gene in patients with hepatitis E. *Int J Immunogenet* 2005; 32: 207-212

■同行评价

本文从免疫遗传学的角度分析了IFN- γ 基因多态性在大肠癌发病中的作用,证实IFN- γ +874位点AA基因型频率在大肠癌患者和正常人群中存在显著性差异,发现大肠癌的易感基因,对大肠癌发病机制研究、预防和生物免疫治疗有一定的价值。

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

更正与说明专栏

本刊讯《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道,特设“更正与说明”固定专栏,包括“事实纠错”、“文字更正”、“解释说明”三个子栏目,不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正、就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明,而且针对文章的学术水平等进行讨论。在此,我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》,给更正与说明栏目投稿。投稿者凭文章的编号,可免费注册(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/39.doc>)使用中国生物医学基金论文摘要库3年。中国生物医学基金论文摘要库(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)收录了1994-2005年国内发表在1204种生物医学类期刊总计20万以上的论文摘要。这些论文受国家、军队和省部级自然科学基金、杰出青年基金、重大计划项目基金资助,内容丰富、数据准确,体现了我国生物医学的发展历程、脉络和方向,可为相关领域广大学者和研究人员了解并掌握当前研究动态、开辟新的研究领域提供思路。