

HRM 探讨 IL-23R/IL-17 基因多态性与大肠肿瘤关联性研究

李丙生 许岸高 甘爱华 张晓慧 黄文峰 余中贵 陈晓龙

【摘要】 目的 运用高分辨率熔解曲线分析技术 (HRM) 探讨 IL-23/IL-17 炎症轴中 IL-23R、IL-17 基因多态性 (GP) 与大肠肿瘤的相关性。方法 采用病例对照研究, 选择大肠癌组 (CRC 组)、大肠腺瘤组 (AA 组) 和健康对照组 (HC 组) 各 50 例患者, 用 HRM 方法检测组织 IL-23R (rs6682925、rs1884444、rs10889677)、IL-17 rs763780 的 GP, 比较其在各组的分布差异。结果 3 组的 IL-23R rs10889677 基因型频率分布存在差异 ($P=0.028$)。CRC 组和 HC 组间, 在不喝酒亚组中, IL-23R rs6682925 位点 CC 基因型患 CRC 风险比 TT 增加 9.73 倍 (校正 $OR=10.73$, 95% CI 1.02 ~ 112.50); 在吸烟亚组中, rs1884444 位点 TT 基因型比 TG 患 CRC 风险增加 4.47 倍 (校正 $OR=5.47$, 95% CI 1.08 ~ 27.6); 在男性患者中, rs10889677 位点 AA 基因型患 CRC 风险比 AC 基因型增加 3.15 倍 (校正 $OR=4.15$, 95% CI 1.02 ~ 16.91), 另外病变部位在结肠亚组中, 携带 rs10889677 位点 AA 基因型的患者比携带 AC 基因型的患者患大肠癌的风险增加了 2.18 倍 (校正 $OR=3.18$, 95% CI 1.04 ~ 9.71); AA 组和 HC 组间, IL-23R rs10889677 位点携带 AA 基因型比携带 AC 基因型患者患 AA 的风险增加 2.40 倍 (校正 $OR=3.40$, 95% CI 1.38 ~ 8.37); 在 RCR 组和 AA 组中, 以上多态性基因位点基因频率分布及分层分析结果差异均无统计学意义。IL-17 rs763780 的 GP 在 3 组的分布差异无统计学意义。结论 IL-23R 基因多态性与大肠癌、大肠腺瘤的发病相关, 而 IL-17 基因多态性与大肠癌、大肠腺瘤均无关。

【关键词】 白介素-23R; 白介素-17; 基因多态性; 大肠肿瘤

Application of high resolution melting assay to explore the correlation between the single nucleotide polymorphisms of IL-23/IL-17 gene and colorectal cancer Li Bingsheng, Xu Angao, Gan Aihua, Zhang Xiaohui, Huang Wenfeng, Yu Zhonggui, Chen Xiaolong. Huizhou First Hospital, Huizhou 516003, China
Corresponding author, Xu Angao, E-mail: angao62@21cn.com

【Abstract】 **Objective** To explore the correlation between the gene polymorphisms (GP) of IL-23R/IL-17 gene, which is located in the IL-23/IL-17 axis, and the risk of colorectal cancer by using the high resolution melting (HRM) assay. **Methods** In this case-control study, 50 patients with colorectal cancer (CRC group), 50 with colorectal adenoma (AA group) and 50 healthy controls (HC group) were recruited. The GP and distribution of IL-23R (rs6682925, rs1884444 and rs10889677) and IL-17 rs763780 were detected and statistically compared among three groups using HRM assay. **Results** Among three groups, the genotype frequency of IL-23R rs10889677 significantly differed ($P=0.028$). In the non-drinking subgroup between the CRC and HC groups, the risk of CRC in subjects with IL-23R rs6682925 CC genotype was 10.73 times higher than that of their counterparts with TT genotype (adjusted $OR=10.73$, 95% CI 1.02-112.50). In the smoking subgroup, the risk of CRC in patients with rs1884444 TT genotype was 5.47 times higher compared with that of their counterparts with TG genotype (adjusted $OR=5.47$, 95% CI 1.08-27.6). For male subjects, the risk of CRC with rs10889677 AA genotype was 4.145 times higher than that of their counterparts with AC genotype (adjusted $OR=4.15$, 95% CI 1.02-16.91). In the colon cancer subgroup, the risk of CRC with rs10889677 AA genotype was 3.175 times higher than that of AC genotype counterparts (adjusted $OR=3.18$, 95% CI 1.04-9.71). Comparing between the AA and HC groups, the risk of AA in subjects with rs10889677 AA geno-

type was 3.40 times higher compared with that in those with AC genotype (adjusted $OR = 3.40$, 95% CI 1.38-8.37). No significant difference was documented in the gene frequency and distribution between the CRC and AA groups. There was no significant difference in the distribution of IL-17 rs763780 GP among the three groups. **Conclusion** IL-23R GP is correlated with the incidence of CRC and AA, but IL-17 GP is not a relevant factor.

【Key words】 Interleukin-23R; Interleukin-17; Gene polymorphism; Colorectal cancer

我国大肠癌的发病率及病死率呈逐年上升的趋势。近年来,炎症与大肠癌的关系越来越受到重视。发现许多炎症因子的基因多态性(GP)参与大肠癌的发病进程^[1-8]。因此寻找出更多同大肠癌相关的细胞因子的GP位点,将可为大肠癌防治提供新的思路。已有不少研究发现IL-23/IL-17炎症轴的相关细胞因子与腺瘤、大肠癌密切相关^[9-12],但目前国内尚未见系统探讨IL-23/IL-17炎症轴中的关键细胞因子GP与大肠癌、腺瘤的易感性关联性研究报道。高分辨率熔解曲线分析(HRM)是新近开发的一种医学分子诊断技术,具有高通量、经济、快捷、简单等优势^[13]。因此,本研究将采用HRM法探讨IL-23/IL-17炎症轴中关键的细胞因子IL-23R、IL-17F位点的GP与大肠癌、大肠腺瘤的关联性。

对象与方法

一、研究对象

连续收集2013年10月至2014年6月惠州市第一人民医院消化内科和胃肠外科就诊的大肠癌组(CRC组)、大肠腺瘤组(AA组)、健康对照组(HC组)各50例的组织标本并抽提基因组DNA,同时收集患者的相关临床资料。纳入标准:病理组织学检查(均由同一位经验丰富的胃肠道病理学专家阅片判定)确诊为大肠癌与大肠腺瘤患者。排除标准:①家族性或遗传性结直肠腺瘤或肿瘤;②其他系统或器官肿瘤;③大肠癌或大肠腺瘤患者同时患有炎症性肠病;④术前有放射治疗或化学治疗史;⑤妊娠或有严重肝肾不全者;⑥非原发癌灶者及不能确诊等其他情况。病例组患者均经内镜及活检病理或手术活检病理确诊为大肠癌或大肠腺瘤性息肉。其中CRC组男23例、女27例,年龄(58.5 ± 15.6)岁;AA组男33例、女17例,年龄(55.7 ± 14.3)岁。HC组为健康体检人群,其中男24名、女26名,年龄(57.2 ± 13.9)岁,3组的性别、年龄比较差异均无统计学意义。纳入研究人员均签订知情同意书,本研究通过伦理委员会审查。

二、PCR-HRM检测

根据NCBI的IL-23R、IL-17的参考基因序列,使用Primer 5.0软件设计引物(IL-23Rrs6682925, F: GCCCAAACATGGAAATAACATT, R: CCTTCCTTTTATGGCTGCAT; IL-23Rrs1884444, F: GTCTTTTCCTGCTTCCAGACAT, R: ACACCATACCTCCATGACACCA; IL-23Rrs10889677, F: GCTCCATGCC-TTTTTAATTTTAG, R: CCTTCGGGACCTTAATTC-TCTA; IL-17rs763780, F: AGCTGAGTGGATATGCACCTCT, R: TGGAGAAGGTGCTGGTACT),引物由上海生工生物科技有限公司合成。PCR扩增与HRM检测均在LightCycler480 PCR仪上操作。反应条件:预变性95℃ 10 min;95℃变性10 s,60/61℃退火/延伸30 s共40个循环;HRM分析95℃ 5 min,40℃ 1 min,65℃ 1 s,95℃。每秒检测荧光25次;冷却40℃ 30 s进行反应。

三、DNA测序

为了验证PCR方法的准确性,我们按照每个位点不同的熔解曲线所分出的基因型,挑选不同熔解曲线所对应的样本各2~3个的PCR产物送至广州英潍捷基公司测序,根据测序结果确定各组曲线的基因型。

四、统计学处理

应用SPSS 20.0统计软件进行统计分析。运用 χ^2 检验比较人口学特征和Hardy-Weinberg平衡定律;使用 χ^2 检验分析病例组与对照组的基因频率及等位基因频率分布差异,两两比较采用Bonferroni法校正检验水准;SNP与疾病发生风险之间的关系采用Logistic回归分析,用校正性别、年龄、发病部位、吸烟和喝酒状况后的OR和95%CI表示。 $P < 0.05$ 或校正后 $P < 0.017$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、CRC组、AA组和HC组一般资料比较

CRC组、AA组及HC组的性别、年龄、发病部位、吸烟、饮酒比例比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表1。IL-23R(rs6682925、rs1884444、rs10889677)、IL-17 rs763780的GP在正常对照组

基因型分布频率符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$), 具有群体代表性。

表 1 CRC 组、AA 组和 HC 组的一般情况比较

项 目	CRC 组 (50 例)	AA 组 (50 例)	HC 组 (50 名)	<i>P</i> 值	
年龄(岁)	<50	12	12	13	0.965
	≥50	38	38	37	
性别	男	23	33	24	0.649
	女	27	17	26	
吸烟 ^a	吸烟	21	21	20	0.923
	不吸	29	29	30	
饮酒 ^b	喝酒	19	22	18	0.695
	不喝	31	28	32	
部位	直肠	29	36	28	0.199
	结肠	21	14	22	

注:^a吸烟史阳性的定义为每天至少吸烟 1 支, 连续吸烟 1 年以上, 长期吸烟或者戒烟少于半年;^b饮酒史阳性定义为平均每日酒精摄入量 > 25 g, 长期饮酒持续时间 > 1 年或者戒酒时间 < 3 个月

表 2 CRC 组、AA 组和 HC 组 IL-23R、IL-17 的 4 个位点基因型频率分布比较 例 (%)

位 点	组 别	例数	基因型分布			等位基因	
IL-23R rs10889677			AA	AC	CC	A	C
	CRC 组	50	26 (52)	24 (48)	0 (0)	76 (76)	24 (24)
	AA 组	50	22 (44)	28 (56)	0 (0)	72 (72)	28 (28)
	HC 组	50	35 (70)	15 (30)	0 (0)	85 (85)	15 (15)
IL-23R rs1884444			TT	TG	GG	T	G
	CRC 组	50	21 (42)	29 (58)	0 (0)	71 (71)	29 (29)
	AA 组	50	26 (52)	24 (48)	0 (0)	76 (76)	24 (24)
	HC 组	50	29 (58)	21 (42)	0 (0)	79 (79)	21 (21)
IL-23R rs6682925			TT	TC	CC	T	C
	CRC 组	50	21 (42)	26 (52)	3 (6)	68 (68)	32 (32)
	AA 组	50	15 (30)	28 (56)	7 (14)	58 (58)	42 (42)
	HC 组	50	15 (30)	28 (56)	7 (14)	58 (58)	42 (42)
IL-17 rs763780			TT	TG	GG	T	G
	CRC 组	50	37 (74)	13 (26)	0 (0)	87 (87)	13 (13)
	AA 组	50	40 (80)	10 (20)	0 (0)	90 (90)	10 (10)
	HC 组	50	40 (80)	10 (20)	0 (0)	90 (90)	10 (10)

讨 论

大量研究证据表明, 促炎细胞因子对维持慢性炎症, 促进肿瘤细胞生成, 肿瘤微环境扩张以及抑

二、CRC 组、AA 组和 HC 组 IL-23R、IL-17 的 4 个位点基因型频率分布比较

3 组的 IL-23R rs6682925、rs1884444、IL-17F rs763780 的基因型频率分布比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), IL-23R rs10889677 基因型频率分布存在差异 ($\chi^2 = 7.18$, $P = 0.028$), 经过两两比较, 仅 AA 组与 HC 组比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.90$, $P = 0.009$)。A/C 等位基因分布, 在 AA 组与 HC 组间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.01$, $P = 0.025$, $OR = 2.20$, $95\% CI 1.04 \sim 4.44$), 见表 2。

三、IL-23R 位点 GP 与 CRC、AA 患病易感关联性分析

通过调整年龄、性别、吸烟、饮酒、病变部位因素的进一步分层分析结果发现, 在男性患者与在病变位于结肠亚组中, 与 AC 基因型相比, AA 基因型是大肠癌危险因素; IL-23R rs1884444 位点 GP 在吸烟人群中, 与 TG 基因型相比, TT 基因型是大肠癌危险因素, 见表 3。

制肿瘤免疫监视具有重要作用^[14]。其中, IL-23/IL-17 炎症轴中的关键细胞因子与肿瘤关系备受关注。已有研究发现 IL-23、IL-17 促炎症细胞因子 GP 与消化道肿瘤密切相关, 但与大肠肿瘤的相关

表 3 IL-23R 位点 SNP 与 CRC、AA 患病易感关联性分析

位 点	分层因素	基因型	CRC 组	AA 组	HC 组	P 值	校正 OR (95% CI)
IL-23R rs10889677	男	AC	12		7		
		AA	11	-	17	0.048	4.15 (1.02 ~ 16.91)
	病变位于结肠	AC	10		4		
		AA	11	-	18	0.043	3.18 (1.04 ~ 9.71)
	-	AC	-	28	15		
		AA		22	35	0.008	3.40 (1.38 ~ 8.37)
IL-23R rs1884444	吸烟	TG	12		7		
		TT	9	-	13	0.040	5.47 (1.08 ~ 27.60)

性研究报道少见^[15]。因此,深入全面探讨 IL-23/IL-17 炎症轴中关键的细胞因子 GP 与大肠肿瘤的关系非常重要。

目前,Chen^[16]等在一项包含了 1 043 例胃癌患者和 1 089 例健康对照的病例对照研究中发现 IL-23R rs6682925 位点 GP 与胃癌的发病风险无相关性,但 rs1884444 的 G 等位基因可以降低肠型胃癌的患病风险 ($OR = 0.75$, 95% CI 0.65 ~ 0.87); Chu 等^[12]研究表明 IL-23R rs6682925 的 TC/CC 基因型和 rs1884444 位点 TG/GG 基因型和食管癌的患病风险显著相关。但目前国内外尚无探讨 IL-23R rs6682925 GP 与大肠肿瘤相关性研究报道,本研究我们首次发现,在不喝酒人群中,与 HC 组比,携带 rs6682925 CC 基因型患者患大肠癌风险增加 9.73 倍,这与 Chu 等^[12]的研究结果相类似,但我们的研究并未显示该位点 GP 在 AA 发病的相关性,也没有在大肠癌与 AA 组间发现他们间的相关性;在吸烟人群中 rs1884444 TT 基因型患大肠癌风险增加 4.47 倍。但未发现该位点 GP 在 AA 的发病及在“腺瘤-大肠癌”的过程中的作用。鉴于目前国内外尚无相关研究数据,因此,我们的研究结果率先提供非常有意义的理论依据,但由于地域的局限性及样本量的不足,尚需更强论证强度的大样本量研究深入探讨。

Nemati 等^[15]研究发现,IL-23R rs10889677 位点的 GP 与大肠癌发病风险无相关性,但 IL-17A rs2275913 携带 AG 基因型可以增加患大肠癌风险,相反,rs763780 携带 TT 基因型或 T 等位基因可以显著降低患大肠癌的风险。我们的研究发现,在男性患者中,CRC 组比 HC 组携带 IL-23R rs10889677 AA 基因型患大肠癌风险增加 3.15 倍,在发病部位位于结肠患者中,携带该基因型比携带

AC 基因型大肠癌发病风险增加 2.18 倍,但 A/C 等位基因间未能表现相关性;AA 组比 HC 组携带该基因型患 AA 的风险增加 2.40 倍,这提示 rs10889677 位点 GP 与 AA 的发病存在相关性,进一步对该位点的等位基因进行分析结果提示,与携带 C 等位基因相比,携带 A 等位基因可以增加大肠腺瘤性息肉的风险。未发现 IL-23R rs10889677 位点 GP 在其他组间相关性。这与 Nemati 等^[15]的研究结果不同,其可能的原因是不同地域的人群大肠癌易感基因型不同,另外还可能的原因是样本量不足。然而,在我们的实验检测结果中,IL-23R rs10889677 AA 即是大肠癌的易感基因,又是大肠腺瘤的易感基因,根据前面提到的大肠癌发展的模式“早期腺瘤-晚期腺瘤-癌”来看,我们推测 IL-23R rs10889677 AA 可能在大肠腺瘤性息肉发展为大肠癌的过程中起到作用,但我们的数据却未提供这方面的证据,而是得出该基因型与该进程无关的结果,这可能需要更大的样本量的数据来寻找并证明该基因型与上述肿瘤进程的关系。

对于 IL-17F 基因外显子区域的 rs763780 位点,本研究结果并未发现该位点与大肠癌或大肠腺瘤的患病风险存在相关性,这与 Nemati 等^[15]的研究结果不同。出现上述两个位点的检测结果与类似研究人员研究结果不同的可能原因是:①基因分型检测方法结果不准确,出现假阳性,而本研究采用 HRM 基因分析技术,准确率较高,假阳性率较低,并经过测序验证部分样本,结果更可信;②不同种族人群的遗传差异也可能导致研究结果不一致;③样本量偏小导致结果的偏倚。

综上所述,本研究探讨 IL-23R rs6682925 GP 与大肠肿瘤相关性研究,发现 IL-23R rs6682925、rs1884444、rs10889677 位点与大肠肿瘤遗传易感

相关, 而 IL-17 基因多态性与大肠癌、大肠腺瘤均无关。

参 考 文 献

- [1] Landi S, Bottari F, Gemignani F, Gioia-Patricola L, Guino E, Osorio A, de Oca J, Capella G, Canzian F, Moreno V; Bellvitge Colorectal Cancer Study Group. Interleukin-4 and interleukin-4 receptor polymorphisms and colorectal cancer risk. *Eur J Cancer*, 2007, 43 (4): 762-768.
- [2] Azimzadeh P, Romani S, Mohebbi SR, Kazemian S, Vahedi M, Almasi S, Fatemi SR, Zali MR. Interleukin-16 (IL-16) gene polymorphisms in Iranian patients with colorectal cancer. *J Gastrointest Liver Dis*, 2011, 20 (4): 371-376.
- [3] Castro FA, Försti A, Buch S, Kalthoff H, Krauss C, Bauer M, Egberts J, Schniewind B, Broering DC, Schreiber S, Schmitt M, Hampe J, Hemminki K, Schafmayer C. TLR-3 polymorphism is an independent prognostic marker for stage II colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 2011, 47 (8): 1203-1210.
- [4] Kapitanović, Čačev, Catela Ivković T, Lončar B, Aralica G. TNF α gene/protein in tumorigenesis of sporadic colon adenocarcinoma. *Exp Mol Pathol*, 2014, 97 (2): 285-291.
- [5] Yannopoulos A, Nikiteas N, Chatzitheofylaktou A, Tsigris C. The (-590 C/T) polymorphism in the interleukin-4 gene is associated with increased risk for early stages of colorectal adenocarcinoma. *In Vivo*, 2007, 21 (6): 1031-1035.
- [6] Wu X, Zeng Z, Chen B, Yu J, Xue L, Hao Y, Chen M, Sung JJ, Hu P. Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. *Int J Cancer*, 2010, 127 (1): 86-92.
- [7] Poole EM, Curtin K, Hsu L, Duggan DJ, Makar KW, Xiao L, Carlson CS, Caan BJ, Potter JD, Slattery ML, Ulrich CM. Genetic variability in IL23R and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer. *Cancer Epidemiol*, 2012, 36 (2): e104-e110.
- [8] 肖勇, 陈维, 曹维克, 褚红军, 郭伟, 潘善东, 姜洁, 董静, 胡志斌, 沈洪兵. IL23R 基因多态与食管癌遗传易感性的关联研究. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2011, 31 (4): 513-516, 521.
- [9] Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, Huso DL, Brancati FL, Wick E, McAllister F, Housseau F, Pardoll DM, Sears CL. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med*, 2009, 15 (9): 1016-1022.
- [10] 王建升, 张立志, 帖彦清, 吕元鹏, 宋津晓. 结直肠息肉、结直肠腺瘤和结直肠癌患者外周血中 Th17 和 Tc17 细胞的变化. *天津医药*, 2014, 42 (4): 312-314.
- [11] Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas JM, Karp DD, Loprinzi CL, Steinbach G, Schilsky R. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2003, 348 (10): 883-890.
- [12] Chu H, Cao W, Chen W, Pan S, Xiao Y, Liu Y, Gu H, Guo W, Xu L, Hu Z, Shen H. Potentially functional polymorphisms in IL-23 receptor and risk of esophageal cancer in a Chinese population. *Int J Cancer*, 2012, 130 (5): 1093-1097.
- [13] Krypuy M, Ahmed AA, Etemadmoghadam D, Hyland SJ, DeFazio A, Fox SB, Brenton JD, Bowtell DD, Dobrovic A. High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5-8. *BMC Cancer*, 2007, 7: 168.
- [14] 曾庆理, 李少丽, 周燕斌. 白细胞介素-32 在炎症与肿瘤中的研究进展. *新医学*, 2013, 44 (11): 733-738.
- [15] Nemati K, Golmoghaddam H, Hosseini SV, Ghaderi A, Doroudchi M. Interleukin-17F17488 allele is associated with a decreased risk of colorectal cancer and tumor progression. *Gene*, 2015, 561 (1): 88-94.
- [16] Chen J, Lu Y, Zhang H, Ding Y, Ren C, Hua Z, Zhou Y, Deng B, Jin G, Hu Z, Xu Y, Shen H. A nonsynonymous polymorphism in IL23R gene is associated with risk of gastric cancer in a Chinese population. *Mol Carcinog*, 2010, 49 (10): 862-868.

(收稿日期: 2016-06-06)

(本文编辑: 杨江瑜)