

文章编号:1005-6947(2007)04-0338-03

· 基础研究 ·

结直肠癌患者 IL-6 基因启动子 -174G→C 多态性研究

陈江辉¹, 李登清², 陈子华¹

(中南大学湘雅医院 1. 麻醉科 3. 胃肠外科, 湖南长沙 410008; 2. 中南大学湘雅医学院检验系, 湖南长沙 410013)

摘要:目的 观察结直肠癌患者是否存在 IL-6 基因启动子 -174G→C 位点的多态性。方法 采用 PCR 扩增、限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)分析判断 46 例结直肠癌患者 IL-6 启动子 -174G→C 多态性。结果 全组结直肠癌患者 IL-6 基因启动子 -174 位点均为 GG 型。结论 本组结直肠癌患者中未发现 IL-6 基因启动子 -174 位点的多态性。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(4): 338-340]

关键词: 结直肠肿瘤; 白细胞介素 6; 基因多态性; 基因, 结构

中图分类号: R735.3 文献标识码: A

Investigation of -174G→C polymorphism of the IL-6 gene promoter in patients with colorectal cancer

CHEN Jiang-hui¹, LI Deng-qing², CHEN Zi-hua³

(1, Department of Anesthesia 3 General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China. 2, Department of Medical Laboratory, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: Objective To detect -174G→C polymorphism of IL-6 gene promoter in patients with colorectal cancer. **Methods** -174G→C polymorphism of IL-6 gene promoter was detected by PCR-RFLP in 49 patients with colorectal cancer. **Results** -174G→C polymorphism of IL-6 gene promoter in all the 46 patients with colorectal cancer was -174G/G genotype. **Conclusions** -174G→C polymorphism of IL-6 gene promoter was not found in 49 patients with colorectal cancer.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(4): 338-340]

Key words: Colorectal Neoplasms; Interleukin-6; Gene Polymorphism; Gene, Structural

CLC number: R735.3 **Document code:** A

近年来白介素 6(IL-6)启动子区基因多态性与疾病易感性的关系成为研究热点之一。该基因的多态性主要为存在启动子区的 -597G/A, -572C/G, -174G/C, -373AnTn^[1]。

IL-6 启动子区多态性中研究较多的是 -174G→C 多态性, 正常人携带有 C 等位基因时血清 IL-6 水平较低^[2]。研究^[1-6]认为, IL-6 的基因调控区 -174G→C 的变异与动脉粥样硬化、慢性

关节炎、风湿性关节炎、高血压脑血管性疾病以及肿瘤密切相关。通过对乳腺癌^[7]等肿瘤的研究, 发现存在 -174G→C 多态性的个体的肿瘤恶性程度更高, 预后更差。本研究对结直肠癌患者的 IL-6 启动子区基因进行了检测, 报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象分组

1.1.1 研究组 为湘雅医院 2004 年 6 月—2004 年 7 月期间 49 例经手术和病理检查确诊的结直肠癌患者, 男 23 例, 女 26 例; 年龄 22~82 岁, 平均年龄 52 岁。

收稿日期: 2006-11-28; 修订日期: 2007-03-28。

作者简介: 陈江辉, 女, 湖南湘潭人, 中南大学湘雅医院副主任医师, 主要从事临床麻醉和危重病医学的临床、教学和科研方面的研究。

通讯作者: 李登清 E-mail: cscjh@163.com

1.1.2 对照组 为2004年6月在湘雅医院行体检的正常人15例,男10例,女5例;年龄28~58岁,平均45岁。结直肠癌患者于术前,体检者于体检当日清晨空腹抽取静脉抗凝血及非抗凝血各3mL。

1.2 试剂

外周血淋巴细胞分离液,基因组DNA提取试剂盒均为北京鼎国生物工程公司,PCR反应试剂及酶切试剂购自大连宝生物工程公司,ELISA试剂盒购自上海森雄试剂公司。IL-6 PCR引物正义链:5'-TTGTCA AGACATGCCAAAGTG-3',反义链:5'-TCAGACATCTCCAGTCCTATA-3'由大连宝生物工程公司合成。

1.3 DNA制备

外周血淋巴细胞的分离及基因组DNA提取均按试剂盒说明书进行,用紫外分光光度计测定DNA含量,吸光度A₂₆₀/A₂₈₀ > 1.8,提取后于-20℃保存。

1.4 PCR反应体系

PCR反应体系中分别加入DNA模板3μL,10×PCR buffer 5.0μL,dNTP(2.5 mmol/L) 4.0μL,上游引物3μL,下游引物3μL,耐热DNA聚合酶(5U/μL)0.4μL,并加双蒸水至50μL。循环参数:94℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸30s,35个循环,72℃延伸5min。取PCR产物10μL在2%琼脂糖凝胶进行电泳,电压80V,1h后终止电

泳,取出凝胶直接在紫外透射仪上观察并照相。

1.5 酶切反应体系

NlaIII 0.4μL,PCR产物10μL,10×NE缓冲液42μL,100×BSA 0.2μL,ddH₂O至20μL;37℃作用1h,加入4μL 6×加样缓冲液终止反应。取酶切产物15μL于12%聚丙烯酰胺凝胶电泳,电压80V,3h后终止电泳。取出凝胶,EB染色后在紫外透射仪上观察结果并照相。

2 结果

2.1 HT-6基因PCR产物电泳结果

特异性引物扩增IL-6基因-305bp~-6bp片段,PCR产物长400bp(图1)。

2.2 PCR产物限制性片段长度多态性分析(RFLP)

NlaIII在IL-6基因-305~-6扩增片段上正常有2个酶切位点(CATG↓),如-174位点由G变为C,则有3个酶切位点,即对于正常纯合子-174G/G,PCR产物切为3段:13bp,233bp,54bp,突变纯合子-174C/C切为4段:13bp,122bp,111bp,54bp,而突变杂合子-174G/C切为5段:13bp,122bp,111bp,54bp,233bp。-174位不同基因型酶切片段。49例患者及正常对照均为正常纯合子-174G/G,酶切片段为13bp,54bp,233bp(图2),未发现174位点的多态性。

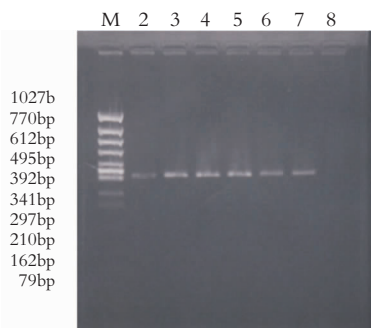


图1 IL-6基因-305→-6片段PCR产物电泳图

1:φX174-Hinc II digest DNA Marker; 2~7:结直肠癌患者; 8:空白对照。

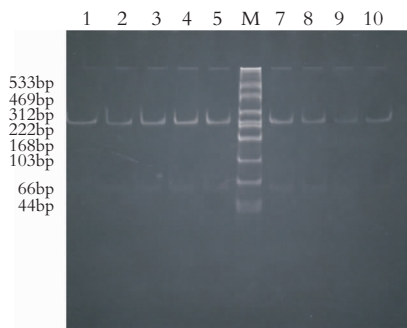


图2 IL-6基因-305→-6片段限制性酶切片段长度多态性分析 6:SSR DNA Marker II; 1~5,7~10:结直肠癌患者

3 讨论

基因多态性是近年来的研究热点,所谓多态性(polymorphism)是指处于随机婚配的群体中,同

一基因位点可存在2种以上的基因型。人类基因多态性在阐明人体对疾病、毒物的易感性与耐受性,疾病临床表现的多样性,以及对药物治疗的反应性上都起着重要的作用。

细胞因子的合成及水平个体差异很大。差异的主要原因在于细胞因子基因调节区或启动区的多态性等因素。通过对 IL-6 编码区及上、下游序列的研究,发现该基因的多态性主要为存在启动子区的 -597G/A, -572C/G, -174G/C, -373A/Tn^[8]。理论上 IL-6 启动子区的任何多态性都有可能改变基因的结合序列,增强或减弱基因的表达调控。IL-6 启动子区多态性中研究较多的是 174G→C 多态性,这可能是因为 -174 位由 G 转换为 C 后,产生了一个转录因子 NF-1 的结合位点。NF-1 包括一系列结构类似的转录因子,在某些细胞中表现出抑制基因表达的活性。在一些肿瘤病人中,IL-6 的基因调控区 -174G→C 多态性意味着肿瘤的恶性程度更高,预后更差^[6]。

Belleuo^[9]对 62 例结直肠癌患者的研究表明 C/C, G/C, G/G 3 种基因型均存在,其中 4 例为 C/C, 28 例为 G/C, 30 例为 G/G。且 IL-6 基因多态性与 IL-6 血清水平密切相关: C⁺ (C/C 和 G/C) 基因型患者血清 IL-6 平均水平为 0.14pg/mL 而 C⁻ (G/G) 基因型为 0.32pg/mL ($P=0.034$)。而在肝转移病人中, C⁻ 基因型 IL-6 水平为 0.96pg/mL, C⁺ 基因型为 0.23pg/mL ($P=0.004$)。存在 -174G→C 多态性的结直肠癌患者血清 IL-6 水平更高。这些实验结果有一定临床意义,因为在包括结直肠癌在内的多种肿瘤中,高的血清 IL-6 水平是一种负性预后因子。这种基因的多态性能否成为一种预后的分子标志物,值得进一步研究。以上研究均是针对西方人而言,中国结直肠癌患者中 IL-6 基因启动子区是否也存在 -174G→C 的多态性,并影响 IL-6 的表达,国内尚未有相关报道。本文观察的病人中,无 1 例 IL-6 基因启动子区 -174 位点出现 G→C 的突变,均为正

常 G/G 型。是否中国的结直肠癌患者中不存在 IL-6 启动子 -174 位点的变异,还有待进一步扩大标本进行研究。

参考文献:

- [1] Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin-6 transcriptional regulation [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (24): 18138 - 18144.
- [2] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, *et al.* The effect of novel polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102 (7): 1369 - 1376.
- [3] Basso F, Love GD, Rumley A, *et al.* Interleukin-6 174G > C polymorphism and risk of coronary heart disease in west of Scotland coronary prevention study [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22 (4): 599 - 604.
- [4] 吴军,王琦林,张海鸥. 蛛网膜下腔出血患者血浆 TNF α , IL-6 含量研究 [J]. *脑与神经疾病杂志*, 2001, 9 (4): 234 - 235.
- [5] Bagli M, Papassotiropoulos A, Knapp M, *et al.* Association between an interleukin-6 promoter and 3' flanking region haplotype and reduced Alzheimer's disease risk in German population [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 283 (2): 109 - 112.
- [6] Iacopetta B, Grieco F, Joseph D. The -174 G/C gene polymorphism in interleukin-6 is associated with an aggressive breast cancer phenotype [J]. *Br J Cancer*, 2004, 90 (2): 419 - 422.
- [7] Hirano T, Matsuda T, Nakajima K. Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the IL-6 related cytokine subfamily [J]. *Stem Cell*, 1994, 12 (3): 262 - 227.
- [8] 陈昱,汤斌,许庆文,等. 胃癌病人血清 3 种细胞因子测定及其临床意义探讨 [J]. *实用癌症杂志*, 2000, 15 (1): 37 - 39.
- [9] Belluco C, Dlivieri F, Borlaffe M, *et al.* -174G > C polymorphism of interleukin-6 gene promoter affects serum level in patients with colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (6): 2173 - 2176.