

# Duffy 抗原基因多态性与结直肠癌 易感性的关联分析

周世航<sup>1</sup> 梁晓华<sup>1</sup> 杨悦<sup>2</sup> 刘铭<sup>3</sup>

**[摘要]** **目的:**探讨 Duffy 抗原基因 rs863002 和 rs3027012 位点的单核苷酸多态性(SNP)与结直肠癌易感性的关系。**方法:**收集 100 例结直肠癌患者和 100 例健康对照者的外周血样本,提取全血 DNA;选择 Duffy 抗原基因 2 个具有代表性的标签 SNP 位点(rs863002 和 rs3027012),使用 TaqMan-MGB 探针 Real-time PCR 技术对样本进行基因分型。**结果:**rs863002 位点的 CC 基因型频率在结直肠癌组和对照组分别为 90.0%和 88.0%,CT 基因型频率分别为 10.0%和 12.0%,两组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。rs863002 位点的 C 等位基因频率在结直肠癌组和对照组中分别为 95.0%和 94.0%,T 等位基因频率分别为 5.0%和 6.0%,两组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。rs3027012 位点的 CC 基因型频率在结直肠癌组和对照组分别为 97.0%和 98.0%,CT 基因型频率分别为 3.0%和 2.0%,两组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。rs3027012 位点 C 等位基因频率在结直肠癌组和对照组中分别为 98.5%和 99.0%,T 等位基因频率分别为 1.5%和 1.0%,两组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论:**未发现 Duffy 抗原基因 rs863002 和 rs3027012 位点 SNP 与结直肠癌易感性存在关联。

**[关键词]** Duffy 抗原;结直肠癌;单核苷酸多态性;易感性

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2016.02.006

**[中图分类号]** R735.3 **[文献标志码]** A

## Association of Duffy antigen gene polymorphisms with the susceptibility of colorectal carcinoma

ZHOU Shihang<sup>1</sup> LIANG Xiaohua<sup>1</sup> YANG Yue<sup>2</sup> LIU Ming<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Dalian Blood Center, Dalian, 116001, China; <sup>2</sup>College of Medical Laboratory, Dalian Medical University; <sup>3</sup>Department of Cell Biology, Dalian Medical University)

Corresponding author: LIU Ming, E-mail: 240702974@qq.com

**Abstract Objective:** To examine the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs863002 and rs3027012) at Duffy antigen gene with the susceptibility of colorectal carcinoma. **Method:** Whole blood samples were collected from 100 individuals with colorectal carcinoma and 100 normal controls. The DNA of the whole blood samples was extracted and then the selected SNPs (rs863002 and rs3027012) at Duffy antigen gene were genotyped by real-time PCR technique with TaqMan-MGB probe. **Result:** In colorectal carcinoma group and control group, the frequencies of CC at rs863002 were 90.0% and 88.0% respectively and the frequencies of CT were 10.0% and 12.0% respectively. There were no statistically significant difference between the two groups ( $P>0.05$ ). The frequencies of C were 95.0% and 94.0% respectively and the frequencies of T were 5.0% and 6.0% respectively. There were no statistically significant difference between the two groups ( $P>0.05$ ). The frequencies of CC at the rs3027012 were 97.0% and 98.0% respectively and the frequencies of CT were respectively 3.0% and 2.0%. There were no statistically significant difference between the two groups ( $P>0.05$ ). The frequencies of C were respectively 98.5% and 99.0%; the frequencies of T were respectively 1.5% and 1.0%. There were no statistically significant difference between the two groups ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** No association was found between the selected SNPs of Duffy antigen gene and the susceptibility of colorectal carcinoma.

**Key words** Duffy antigen; colorectal carcinoma; SNP; susceptibility

结直肠癌是一种严重影响人类健康的恶性肿瘤,其发生和发展受到外界的因素以及遗传背景的影响。结直肠癌遗传易感性因素包括染色体和微卫星不稳定性以及一些原癌基因和抑癌基因的分

子突变以及单核苷酸多态性(SNP)等<sup>[1]</sup>。趋化因子受体在调节结直肠癌的生长、血管生成以及转移中发挥重大作用<sup>[2]</sup>。因趋化因子受体的 SNP 而导致的趋化因子受体结构或表达差异可能会影响其与趋化因子的结合,进而影响结直肠癌的发生和发展。Duffy 抗原是位于红细胞以及内皮细胞等表面的一种糖蛋白,是红细胞上的一种血型抗原<sup>[3]</sup>。Duffy 抗原本质上是一种杂合性趋化因子受体,其

<sup>1</sup>大连市血液中心(辽宁大连,116001)

<sup>2</sup>大连医科大学检验医学院

<sup>3</sup>大连医科大学细胞生物学教研室

通信作者:刘铭,E-mail: 240702974@qq.com

结合的趋化因子在结直肠癌的生长、血管生成、转移以及预后中发挥重要的作用<sup>[4]</sup>。Duffy 抗原基因上存在多个 SNP 位点,这些 SNP 位点有可能改变 Duffy 抗原的结构或表达,影响其与相应趋化因子的结合,进而影响结直肠癌的发生或发展。在这个研究中,我们选择 Duffy 抗原基因的 2 个具有代表性的标签 SNP 位点,分析了 Duffy 抗原基因多态性与结直肠癌易感性的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

选择我地区结直肠癌患者 100 例纳入结直肠癌组,其中男 58 例,女 42 例;年龄 36~87 岁,中位年龄 50.2 岁。同时选择健康献血者 100 例为对照组,男 62 例,女 38 例;年龄 18~55 岁,中位年龄 43.7 岁。每个研究对象抽取 3~5 ml 外周静脉血。

### 1.2 试剂与仪器

全血 DNA 提取试剂盒(离心柱型)(Invitrogen 公司);TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems 公司);ABI Prism 7300 实时荧光 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 全血 DNA 提取和定量** 使用 DNA isolation 试剂盒(盐析法),进行血液基因组 DNA 的提取。继而测定每个样本的 DNA 浓度,并将终浓度统一调至 10 ng/ $\mu$ l,于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

**1.3.2 SNPs 位点选择及引物和探针序列** 在 HapMap 网站搜索 Duffy 抗原基因数据库,利用 Haploview 软件选取 2 个具有代表性的标签 SNPs 位点:rs863002 和 rs3027012。应用 Primer Express v2.0 软件设计 2 对 PCR 引物和探针。引物和探针均由 Life Technologies 公司合成。其序列见表 1。

**1.3.3 基因分型** ①每个反应孔的 TaqMan-MGB 探针实时 PCR 反应体系为均 25  $\mu$ l,包括:2 $\times$ TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix II, no UNG 12.5  $\mu$ l,DNA 2  $\mu$ l(10 ng/ $\mu$ l),正向引物和反向引物各 1.125  $\mu$ l(20  $\mu$ mol/L),FAM 探针和 VIC 探针 0.25  $\mu$ l(20  $\mu$ mol/L),H<sub>2</sub>O 7.75  $\mu$ l;②PCR 反应条件:预变性,95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 15 s;60 $^{\circ}$ C 1 min,共 40 个循环;③扩增结束后,读取扩增后荧光信号,

软件自动得出基因分型结果。

### 1.4 统计学分析

使用直接计数法分别计算出 2 个 SNP 位点在结直肠癌组和对照组中的基因型及等位基因分布频率,并采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验对样本进行群体代表性检验;再运用软件 SPSS 19.0 分别对结直肠癌组和对照组的基因型及等位基因频率分布的差异进行  $\chi^2$  检验;并利用二元 logistic 回归分析方法计算 OR 值。

## 2 结果

### 2.1 结直肠癌组和对照组样本 Duffy 抗原的基因分型及 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验结果

结直肠癌组和对照组 Duffy 抗原基因的 rs863002 和 rs3027012 SNP 位点的基因分型结果见表 2。在结直肠癌组中,rs863002 位点基因型 CC 为 90 例,CT 为 10 例,rs3027012 位点基因型 CC 为 97 例,CT 为 3 例。在对照组中,rs863002 位点基因型 CC 为 88 例,CT 为 12 例,rs3027012 位点基因型 CC 为 98 例,CT 为 2 例。在结直肠癌组和对照组人群中,均未检出 rs863002 位点和 rs3027012 位点的基因型 TT。经 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验分析,结直肠癌组和对照组 rs863002 和 rs3027012 SNP 位点基因型分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律( $P>0.05$ ),表明本研究选取的人群具有代表性。

### 2.2 结直肠癌组与对照组 rs863002 和 rs3027012 位点的基因型和等位基因频率分布比较

结直肠癌组与对照组 rs863002 和 rs3027012 位点各个基因型和等位基因的频率分布比较见表 2。经统计学分析,结直肠癌组和对照组中 rs863002 和 rs3027012 这 2 个 SNP 位点的基因型和等位基因频率分布差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

Duffy 抗原作为红细胞膜上的血型抗原,同时也作为杂合性趋化因子受体,与多种疾病包括新生儿溶血病、溶血性输血反应、疟疾、HIV、炎症,甚至恶性肿瘤等均有关联<sup>[5-8]</sup>。Duffy 抗原作为受体可以通过调节血液循环中趋化因子的数量参与肿瘤的免疫过程。现已发现乳腺癌、喉鳞状细胞癌、胃

表 1 rs863002 及 rs3027012 位点的引物与探针序列

	rs863002	rs3027012
正向引物	5'-CATTTCCCGTGCTGTTTGC-3'	5'-CCCAGACCTAGAGATAGCTAGACACA-3'
反向引物	5'-ACAAGAGGGAGCTAGGAGGCTAG-3'	5'-CGTGGGCGTGAGCTCTTT-3'
FAM 探针	5'-FAM-CCTTCTCTCCTTCC-MGB-3'	5'-FAM-ATACACAGCAAACGTACA-MGB-3'
VIC 探针	5'-VIC-TTCTTTTCTCCTTCC-MGB-3'	5'-VIC-ACACAGCAAATGTACA-MGB-3'

表 2 结直肠癌组及对照组两个位点的基因型及等位基因频率分布的比较

例 (%)

SNP 位点	基因型/等位基因	结直肠癌组	对照组	OR	95% CI
rs863002	CC	90(90.0)	88(88.0)		1.00
	CT	10(10.0)	12(12.0)	1.227 (0.504~2.986)	
	TT	0	0		/
rs3027012	C	190(95.0)	94(94.0)		1.00
	T	10(5.0)	6(6.0)	1.213 (0.512~2.875)	
	CC	97(97.0)	98(98.0)		1.00
rs3027012	CT	3(3.0)	2(2.0)	0.660 (0.108~4.036)	
	TT	0	0		/
	C	197(98.5)	99(99.0)		1.00
	T	3(1.5)	1(1.0)	0.663(0.110~4.013)	

癌、宫颈癌以及非小细胞肺癌 Duffy 抗原的高表达能够降低肿瘤微环境中的 CC 与 CXC 家族趋化因子的浓度,进而达到抑制癌组织中的血管新生及抑制肿瘤的生长转移<sup>[9-13]</sup>。Duffy 抗原在多数肿瘤的发生发展过程中发挥着负性调节因子的作用。

Duffy 抗原基因定位于 1 号染色体的长臂(1q22-q23),其基因序列中存在着 300 多个 SNP 位点。为了探讨结直肠癌的易感性是否受到 Duffy 抗原基因多态性的影响,本研究中检测了 Duffy 抗原基因的 2 个具有代表性的标签 SNPs 位点(rs863002 和 rs3027012),进行了 Duffy 抗原基因多态性与结直肠癌易感性的关联分析。我们的研究表明,结直肠癌组和健康对照组的 rs863002 位点等位基因均以 C 为主,两组间的 rs863002 位点基因型及等位基因频率的分布差异无统计学意义。结直肠癌组和健康对照组的 rs3027012 位点等位基因均以 C 为主。该位点在两组的基因型及等位基因的频率分布差异也无统计学意义。因此,笔者认为 Duffy 抗原的 rs863002 和 rs3027012 这 2 个 SNP 位点的基因多态性与结直肠癌的易感性无关。Yang 等<sup>[14]</sup>研究了 Duffy 抗原基因 rs3027012 位点的多态性与乳腺癌的淋巴结转移相关性,也没有发现 Duffy 抗原 rs3027012 位点的基因的多态性与乳腺癌淋巴结转移有关。

SNP 既可位于基因编码区又可位于基因的非编码区。SNP 位于非编码区的数目远远大于编码区,非编码区的 SNP 有可能改变外显子-内含子的剪接,影响蛋白的修饰或改变 mRNA 的表达水平及稳定性,进而影响蛋白的表达。标签 SNPs 位点是指基因组中具有高度连锁不平衡区域中具有代表性的 SNP 位点。一个基因座位上有许多相互关联的 SNP 位点,通常可用一个标签 SNP 来反映这个区域的情况,方便人们继续做关联分析。本研究中,我们选取了 2 个具有代表性的标签 SNP 位点

(位于非编码区)用于 Duffy 抗原基因多态性与结直肠癌易感性的分析。我们发现这 2 个 SNP 位点与结直肠癌的易感性无关,可能和这 2 个位于非编码区的 SNP 并不引起 Duffy 抗原的结构和表达变化有关。

总之,本研究首次研究了 Duffy 抗原基因多态性和结直肠癌易感性的关系。我们的研究表明,结直肠癌患者 Duffy 抗原的 SNP 位点 rs863002 和 rs3027012 与结直肠癌的易感性无关。

参考文献

- [1] Sameer AS. Colorectal cancer: molecular mutations and polymorphisms[J]. *Front Oncol*, 2013, 3: 114.
- [2] Balkwill F. Cancer and the chemokine network[J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 540-550.
- [3] Latini FR, Bastos AU, Arnoni CP, et al. DARC (Duffy) and BCAM (Lutheran) reduced expression in thyroid cancer[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2013, 50: 161-165.
- [4] Baier PK, Eggstein S, Wolff-Vorbeck G, et al. Chemokines in human colorectal carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2005, 25:3581-3584.
- [5] Sippert EÂ, de Oliveira e Silva C, Visentainer JE, et al. Association of duffy blood group gene polymorphisms with IL8 gene in chronic periodontitis[J]. *PLoS One*, 2013, 8:e83286.
- [6] Meny GM. The Duffy blood group system: a review [J]. *Immunohematology*, 2010, 26: 51-56.
- [7] Horne K, Woolley IJ. Shedding light on DARC: the role of the Duffy antigen/ receptor for chemokines in inflammation, infection and malignancy[J]. *Inflamm Res*, 2009, 58: 431-435.
- [8] Rundle CH, Mohan S, Edderkaoui B. Duffy antigen receptor for chemokines regulates post-fracture inflammation[J]. *PLoS One*, 2013, 8:e77362.
- [9] Wang J, Ou ZL, Hou YF, et al. Enhanced expression of Duffy antigen receptor for chemokines by breast cancer cells attenuates growth and metastasis potential[J]. *Oncogene*, 2006, 25: 7201-7211.

# TIM4 在湿疹和 RA 患者外周血单核细胞的表达水平研究

魏燕<sup>1</sup> 蔡鹏程<sup>1</sup> 胡丽华<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:**研究 TIM4 在湿疹和类风湿性关节炎(RA)患者外周血单核细胞的表达水平。**方法:**采用流式细胞技术分别检测 30 例健康体检者、30 例湿疹患者、30 例 RA 患者及 30 例 IgE 升高患者 TIM4 阳性细胞占外周血单核细胞的比例,检测各组嗜酸性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞占白细胞的比例并与其与 TIM4 水平的相关性进行分析。**结果:**与对照组相比,湿疹患者组,RA 患者组的 TIM4 阳性细胞占外周血单核细胞比例均显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而 IgE 升高组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与对照组相比,湿疹患者组的嗜酸性粒细胞比例显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而 RA 患者组、IgE 升高患者组差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ )。各组 TIM4 比例与嗜酸性粒细胞比例相关性分析中,只有对照组差异有统计学意义( $P<0.05$ ),其他各组差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ )。各组 TIM4 与单核细胞、TIM4 与淋巴细胞差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ )。另 RA 组的 TIM4 比例与患者年龄相关( $P<0.05$ ),其他各组均无相关性。**结论:**TIM4 在湿疹、RA 患者外周血单核细胞表达水平较正常升高,提示 TIM4 与这类疾病存在相关性。

**[关键词]** TIM4;湿疹;类风湿性关节炎;IgE;嗜酸性粒细胞

**doi:**10.13201/j.issn.1004-2806-b.2016.02.007

**[中图分类号]** R593.22 **[文献标志码]** A

## Study on TIM4 expression levels of peripheral blood mononuclear cells in patients with eczema and rheumatoid arthritis

WEI Yan CAI Pengcheng HU Lihua

(Department of Clinical Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China)

Corresponding author: HU Lihua, E-mail: xhhulh@126.com

**Abstract Objective:** Study on the TIM4 expression levels of peripheral blood mononuclear cells in patients with eczema and rheumatoid arthritis. **Method:** The TIM4 positive cells proportion of the peripheral blood mononuclear were detected using the flow cytometry technique to in thirty healthy people, thirty patients with eczema, thirty patients with rheumatoid arthritis and thirty patients with elevated IgE. Eosinophils, monocytes, and lymphocytes accounted for the proportion of white blood cells were tested, and their correlation with TIM4 level were

<sup>1</sup>华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科(武汉,430022)  
通信作者:胡丽华,E-mail:xhhulh@126.com

- [10] Sun G, Wang Y, Zhu Y, et al. Duffy antigen receptor for chemokines in laryngeal squamous cell carcinoma as a negative regulator[J]. Acta Otolaryngol, 2011, 131: 197-203.
- [11] Addison CL, Belperio JA, Burdick MD, et al. Overexpression of the duffy antigen receptor for chemokines (DARC) by NSCLC tumor cells results in increased tumor necrosis[J]. BMC Cancer, 2004, 4: 28.
- [12] Zhu Z, Sun Z, Wang Z, et al. Prognostic impact of atypical chemokine receptor expression in patients with gastric cancer[J]. J Surg Res, 2013, 183: 177-183.
- [13] Hou T, Liang D, Xu L, et al. Atypical chemokine receptors predict lymph node metastasis and prognosis in patients with cervical squamous cell cancer[J]. Gynecol Oncol, 2013, 130: 181-187.
- [14] Yang C, Yu KD, Xu WH, et al. Effect of genetic variants in two chemokine decoy receptor genes, DARC and CCR2, on metastatic potential of breast cancer[J]. PLoS One, 2013, 8: e78901.

(收稿日期:2015-07-16)