

Duffy 血型基因多态性和结直肠癌的相关性研究*

周世航¹ 王霓¹ 邵林楠¹ 于卫建¹ 张开立² 刘铭²

[摘要] 目的:探讨 Duffy 血型基因多态性和结直肠癌的关系。方法:收集 325 例结直肠癌患者和 306 例健康对照人群血样,应用 TaqMan-MGB 探针实时 PCR 方法进行 Duffy 血型的基因分型。结果:在对照人群中,基因型 $FY * A / FY * A$ 为 266 例(86.9%), $FY * A / FY * B$ 为 39 例(12.7%), $FY * B / FY * B$ 为 1 例(0.3%)。在结直肠癌患者中,基因型 $FY * A / FY * A$ 为 286 例(88.0%), $FY * A / FY * B$ 为 38 例(11.7%), $FY * B / FY * B$ 为 1 例(0.3%)。结直肠癌组和对照组比较,Duffy 血型基因型频率分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。在淋巴结转移阴性的结直肠癌患者组 $FY * A / FY * B$ 和 $FY * B / FY * B$ 组合的基因型频率(16.7%)高于淋巴结转移阳性组的基因型频率(8.6%),而 $FY * A / FY * A$ 的基因型频率(83.3%)要低于淋巴结转移阳性组的基因型频率(91.4%)($P < 0.05$)。基因型 $FY * A / FY * A$ 的结直肠癌患者要比非 $FY * A / FY * A$ 基因型的患者发生淋巴结转移的风险高 2.137 倍。结论:Duffy 血型基因多态性与结直肠癌发生无关,与结直肠癌的淋巴结转移有关。

[关键词] Duffy 血型;结直肠癌;单核苷酸多态性

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2020.06.003

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Association of Duffy blood group gene polymorphism with colorectal cancer

ZHOU Shihang¹ WANG Ni¹ SHAO Linnan¹ YU Weijian¹
ZHANG Kaili² LIU Ming²

(¹Dalian Blood Center,Dalian,116001,China;²Department of Cell Biology,Dalian Medical University)

Corresponding author:LIU Ming,E-mail:liuminglinxi@163.com

Abstract Objective: To investigate the association of Duffy blood group gene polymorphism with colorectal cancer(CRC). **Method:** Blood samples from patients with CRC and control group were collected and genotyped using real-time PCR with TaqMan-MGB probes. **Result:** The numbers of $FY * A / FY * A$, $FY * A / FY * B$ and $FY * B / FY * B$ genotype were 266 (86.9%), 39 (12.7%) and 1 (0.3%) respectively in control group and 286 (88.0%), 38 (11.7%) and 1 (0.3%) respectively in CRC. There were no significant differences ($P > 0.05$) in the genotype frequency distribution for Duffy blood gene between the patients and the control groups. Combination of $FY * A / FY * B$ and $FY * B / FY * B$ genotype frequencies (16.7%) in lymph node negative patients was higher than that in lymph node positive patients (8.6%). However, $FY * A / FY * A$ genotype frequency (83.3%) in lymph node negative patients was lower than that in lymph node positive patients (91.4%) ($P < 0.05$). CRC patients with $FY * A / FY * A$ genotype had higher lymph node metastasis risk (2.137-fold) than patients without $FY * A / FY * A$ genotype. **Conclusion:** Duffy blood group gene polymorphism is not associated with CRC tumorigenesis but is correlated with lymph node metastasis.

Key words Duffy blood group; colorectal cancer; single nucleotide polymorphism

结直肠癌是一种严重影响人类健康的恶性肿瘤。在全球范围内,男性人群结直肠癌排在恶性肿瘤的第 3 位,女性人群排在第 2 位^[1]。结直肠癌的发生和发展受到外界的因素以及遗传背景的影响,从而形成了某些易感人群或高发人群。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^[2]。SNP 是人类基因组中最

常见的一种遗传变异,平均 1 000 bp 就会存在一个 SNP 位点。目前,已证实多种基因的 SNP 和结直肠癌易感性有关。

Duffy 血型抗原又称 Duffy 抗原趋化因子受体(Duffy antigen receptor for chemokines,DARC),是位于红细胞以及内皮细胞等表面的一种糖蛋白,属于红细胞血型系统之一^[3]。Duffy 血型基因序列的 3 个位点的 SNP 形成了 4 个等位基因,分别为 $FY * A$ 、 $FY * B$ 、 $FY * X$ 和 $FY * Fy$ ^[4]。Duffy 血型抗原在多种肿瘤的发生及发展中发挥重要作用。在这个研究中,我们使用 TaqMan-MGB 探针实时 PCR 方法检测了结直肠癌病例组和对照组 Duffy

*基金项目:辽宁省自然科学基金指导计划(No:20180550393)

¹大连市血液中心(辽宁大连,116001)

²大连医科大学细胞生物学教研室

通信作者:刘铭,E-mail:liuminglinxi@163.com

血型基因 *FY * A* 和 *FY * B* 的基因多态性,探讨其与结直肠癌发生以及转移的关系。

1 资料与方法

1.1 资料

本研究收集 325 例在我院住院的结直肠癌患者血样,其中男 189 例,女 136 例;年龄 29~87 岁。所有患者均经手术外科治疗,并经病理学诊断为结直肠癌,基本特征见表 1。健康对照组为同期进行健康体检并未患肿瘤者 306 例,其中男 197 例,女 109 例;年龄 22~73 岁。抽取研究对象静脉全血 5 mL,置于 5 mL 的 EDTA-K₂ 抗凝真空采血管中用于 DNA 提取。

1.2 仪器及试剂

实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司, ABI Prism[®] 7300 型);全自动核酸提取仪 (RBCBioscience 公司, MagCore[®] HF-16 型); MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit (RBCBioscience 公司); 2× TaqMan[®] Universal Master Mix II (Thermo Scientific 公司)。

1.3 结直肠癌的浸润深度、转移及分期

按照美国癌症联合会 (AJCC) 的结直肠癌 TNM 分期标准确定。

1.4 血液基因组 DNA 的提取

使用全自动核酸提取仪 (磁珠法) 提取全血 DNA。

1.5 引物和探针的设计与合成

应用 Primer Express v2.0 软件,设计 TaqMan-MGB 探针实时 PCR 引物和探针序列 (表 2)。用于 *FY * A* 和 *FY * B* 基因分型的 2 条探针 5' 端分别用荧光基团 FAM 和 VIC 标记,3' 端用非荧光淬灭基团和 MGB 标记。

1.6 TaqMan-MGB 探针实时 PCR

25 μL 反应体系包含 2× TaqMan[®] Universal Master Mix II 12.5 μL;正、反向引物 (20 μmol/L) 各 1.125 μL; *FY * A*、*FY * B* 探针 (20 μmol/L) 各 0.25 μL;模板 DNA 10 ng。PCR 反应条件:95℃ 预变性,10 min;95℃ 变性 15 s,60℃ 退火/延伸 60 s,共 40 个循环。

1.7 统计学分析

使用 SPSS 11.5 软件进行数据的统计分析。使用 χ^2 拟合优度检验人群 Duffy 血型基因型的

Hardy-Weinberg 平衡状态,确定样本的群体代表性。使用 χ^2 检验方法检验病例组和对照组 Duffy 血型基因型的分布差异。使用非条件多因素 Logistic 回归统计方法调整年龄和性别因素的影响,计算 OR 值及其 95% CI。使用 χ^2 检验分析 Duffy 血型基因型和结直肠癌病理特征的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 结直肠癌患者基本特征

	例数	百分比/%
年龄/岁		
≤40	20	6.2
41~60	135	41.5
61~80	168	51.7
≥81	2	0.6
性别		
男	189	58.2
女	136	41.8
部位		
结肠	138	42.5
直肠	187	57.5
肿瘤大小		
<5 cm	168	51.7
≥5 cm	157	48.3
分化程度		
低分化	42	12.9
中分化	235	72.3
高分化	48	14.8
浸润深度		
T ₁	6	1.8
T ₂	18	5.5
T ₃	165	50.8
T ₄	136	41.8
淋巴结转移情况		
N ₀	138	42.5
N ₁	115	35.4
N ₂	72	22.2
远处转移		
M ₀	262	80.6
M ₁	63	19.4
TNM 分期		
I	14	4.3
II	112	34.5
III	136	41.8
IV	63	19.4

表 2 TaqMan-MGB 探针实时 PCR 引物和探针序列

引物和探针	序列 (5'~3')	长度/mer	T _m /℃	终浓度/(μmol·L ⁻¹)
正向引物	TGTGAATGATTCCCTTCCCAGATG	23	59.8	0.9
反向引物	CACTGGTGAGGATGAAGAAGGG	22	59.6	0.9
<i>FY * A</i> 探针	FAM-AGACTATG <u>G</u> TGCCAAC-MGB	16	65.0	0.2
<i>FY * B</i> 探针	VIC-AGACTATG <u>A</u> TGCCAAC-MGB	17	66.0	0.2

注:加粗和下划线的碱基是多态性位点。

2 结果

2.1 结直肠癌病例组和对照组 Duffy 血型基因分型结果的 Hardy-Weinberg 平衡检验

对获得的结直肠癌病例组和对照组人群 Duffy 血型基因型数据,进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。结果表明,结直肠癌病例组和对照组 Duffy 血型基因型分布处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$),表明 2 组的人群数据具有群体代表性。

2.2 结直肠癌病例组和对照组 Duffy 血型基因型分布的比较

在 306 例对照组人群中,基因型 $FY * A / FY * A$ 为 266 例, $FY * A / FY * B$ 为 39 例, $FY * B / FY * B$ 为 1 例。在 325 例结直肠癌患者中,基因型 $FY * A / FY * A$ 为 286 例, $FY * A / FY * B$ 为 38 例, $FY * B / FY * B$ 为 1 例。基因型 $FY * A / FY * A$ 个体患有结直肠癌的风险比非 $FY * A / FY * A$ 基因型个体高 1.103 倍 ($OR = 1.103, 95\%$

$CI = 0.688 \sim 1.767$),经 χ^2 检验分析差异有无统计学意义,见表 3。为避免年龄和性别因素对结果的影响,使用多因素 Logistic 回归分析将年龄和性别因素进行调整后进行分析。如表 4 所示,虽然 OR 值增加到 1.709,但仍差异无统计学意义。尚未发现 Duffy 血型基因型与结直肠癌的发生有关。

2.3 Duffy 血型基因型和结直肠癌患者的病理特征的关系

Duffy 血型基因型与结直肠病理特征的相关性见表 5。Duffy 血型的基因型与淋巴结转移 ($P = 0.026$)、TNM 分期 ($P = 0.039$) 有显著性关联,但是与年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位、分化程度、浸润深度以及远处转移等没有显著性关联 ($P > 0.05$)。基因型 $FY * A / FY * A$ 的结直肠癌患者要比非 $FY * A / FY * A$ 基因型的患者发生淋巴结转移的风险高 2.137 倍 ($OR = 2.137, 95\% CI 1.082 \sim 4.221, P < 0.05$)。

表 3 2 组 Duffy 血型基因型分布的比较

基因型	例 (%)					
	结直肠癌组	对照组	OR	95%CI	χ^2	P
$FY * A / FY * A$	286(88.0)	266(86.9)	1.103	0.688~1.767	0.165	0.684
$FY * A / FY * B + FY * B / FY * B$	39(12.0)	40(13.1)	1.000			

表 4 2 组 Duffy 血型基因型的多因素 Logistic 回归分析

基因型	OR	95%CI	P
$FY * A / FY * A$	1.709	0.993~2.942	0.053
$FY * A / FY * B + FY * B / FY * B$	1.000		

3 讨论

结直肠癌的发生、发展受多种因素影响。目前已明确的结直肠癌的风险因子包括年龄、性别、种族、克隆氏病、炎症性肠病、肠息肉或结直肠癌家族史、低纤维及高脂饮食、吸烟、酒精、缺乏运动、肥胖、糖尿病、遗传综合症以及放疗等^[2]。结直肠癌患者中大约 75% 患者是散发病例,没有明显的证据表明和遗传有关,但其余的 25% 患者具有结直肠癌的家族史,这部分患者或者因为共同暴露于某种致癌因素或是由于与遗传有关^[2]。小于 5% 的结直肠癌患者归咎于家族性癌症综合征,如家族性腺瘤性息肉病及遗传性非息肉病性结直肠癌。结直肠癌的发生是一个多基因参与、多阶段的过程,包括原癌基因的突变活化、抑癌基因的失活等。结直肠癌遗传易感性因素除了染色体和微卫星不稳定性,还包括一些原癌基因和抑癌基因的分子突变和 SNP。基因的分子突变包括 P53、KRAS、BRAF、APC、b-Catenin、SMAD4 和 AXIN 等基因^[2]。SNP 包括 TP53、MTHFR NQO1 CYP2E

等与结直肠癌有关^[2]。

Duffy 血型基因序列中存在着多个 SNP,比较重要的 SNP 位点包括 rs2814778 和 rs12075。SNP 位点 rs2814778 产生的等位基因 $FY * Fy$ 使 GATA-1 红细胞转录因子无法结合到该启动子上,导致红细胞无法表达 Fyb 抗原蛋白,但不影响其他组织如内皮组织 Duffy 抗原的表达^[4]。 $FY * Fy$ 等位基因在非洲黑种人中比较常见,但是在高加索人和其他人种中很少携带该等位基因^[5]。SNP 位点 rs12075 形成的 $FY * A$ 、 $FY * B$ 等位基因可引起氨基酸的改变 (Gly42Asp),其与血型抗原 Fya 和 Fyb 有关^[4]。

本研究中,我们使用 TaqMan-MGB 探针实时 PCR 对结直肠癌病例组和对照组的人群进行 Duffy 血型基因分型。我们首先对 Duffy 血型基因分型结果进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。结果表明,病例组和对照组均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,因此,本研究的人群具有代表性。对照组和病例组比较结果表明,虽然在结直肠癌病例组中 $FY * A / FY * A$ 基因型频率高于对照组,非 $FY * A / FY * A$ 基因型频率要低于对照组,但是经统计学分析,未发现统计学意义。为了避免年龄和性别对结果的影响,我们使用了多因素 Logistic 回归分析调整年龄和性别影响因素,但仍然未发现统计学意义。因此,认为 Duffy 血型的 rs12075 位点

的基因多态性与结直肠癌发生无关。

表 5 Duffy 血型基因型和结直肠癌患者病理特征
例(%)

	基因型		χ^2	P
	FY * A/ FY * A / FY * A	FY * B + FY * B / FY * B		
年龄/岁				
≤60	124(91.2)	12(8.8)	2.235	0.135
>60	162(85.7)	27(14.3)		
性别				
男	168(88.9)	21(11.1)	0.338	0.561
女	118(86.8)	18(13.2)		
部位				
结肠	125(90.6)	13(9.4)	1.511	0.219
直肠	161(86.1)	26(13.9)		
肿瘤大小				
<5 cm	148(88.1)	20(11.9)	0.003	0.956
≥5 cm	138(87.9)	19(12.1)		
分化程度				
低分化	36(85.7)	6(14.3)	1.160	0.447
中分化	210(89.4)	25(10.6)		
高分化	40(83.3)	8(16.7)		
浸润深度				
T ₁ +T ₂ +T ₃	164(86.8)	25(13.2)	0.664	0.422
T ₄	122(89.7)	14(10.3)		
淋巴结转移状态				
N ₀	115(83.3)	23(16.7)	4.946	0.026
N ₁ +N ₂	171(91.4)	16(8.6)		
远处转移				
M ₀	230(87.8)	32(12.2)	0.058	0.809
M ₁	56(88.9)	7(11.1)		
TNM 分期				
I + II	105(83.3)	21(16.7)	4.244	0.039
III + IV	181(91.0)	18(9.0)		

进一步分析了 Duffy 血型 FY * A、FY * B 基因多态性与病理特征的关联。结果表明, Duffy 血型的 FY * A、FY * B 的基因多态性与患者年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位、分化程度、浸润深度以及远处转移等均无关, 而与淋巴结转移、TNM 分期有显著性关联。这提示 Duffy 血型 FY * A、FY * B 的基因多态性能影响结直肠癌的淋巴结转移, 其中基因型 FY * A/FY * A 患者相对于非 FY * A/FY * A 患者更易发生淋巴结转移。Yang 等^[6]的研究发现 Duffy 血型基因多态性与乳腺癌淋巴结转移有关与笔者研究结果相似。那么 Duffy 血型 FY * A、FY * B 的基因多态性是如何影响结直肠

癌的淋巴结转移呢? 目前, 在乳腺癌、非小细胞肺癌、喉鳞状细胞癌、胃癌、宫颈鳞状细胞癌以及前列腺癌的一系列研究表明, Duffy 血型抑制肿瘤的机制是 Duffy 血型抗原发挥趋化因子受体作用清除微环境中促进肿瘤生长与转移的趋化因子, 降低肿瘤微血管密度, 进而抑制肿瘤生长与转移^[3,6-13]。最近, Schnabel 等^[14]对来自 3 个人群的样本进行全基因组关联分析。研究结果表明, Duffy 血型的基因多态性和其配体趋化因子 CCL2 的血清浓度高度相关。基于上述研究, 可以推测 Duffy 血型基因多态性影响结直肠癌的淋巴结转移是和其影响其编码蛋白的清除趋化因子的能力有关。Mangal-murti 等^[15]研究了红细胞在储存期间趋化因子清除功能的变化, 发现红细胞在储存期间趋化因子清除功能是随着储存时间的延长而降低。他们认为在储存过程中红细胞 Duffy 血型抗原结构受损是引起红细胞趋化因子清除功能下降的主要原因。因此, 不同 Duffy 血型基因型的红细胞的趋化因子清除功能的不同可能与 FY * A、FY * B 等位基因所引起 Duffy 抗原的趋化因子结合区域的结构改变有关。

Duffy 血型抗原除了表达在红细胞表面, 还表达在内皮细胞等。最近的研究发现, 血管内皮 Duffy 血型抗原通过和肿瘤细胞上的 KAI1 分子相互作用, 将肿瘤细胞吸附到内皮细胞上, 而 KAI1 和 Duffy 血型抗原的交互作用能抑制肿瘤的增殖和转移, 并且通过 TBX2 的下调和 p21 的上调而诱导肿瘤的衰老^[16]。King 等^[17]研究发现, Duffy 血型基因多态性影响其与疟原虫 Duffy 结合蛋白的结合能力。内皮细胞上 Duffy 血型的基因多态性或许也能影响其与肿瘤细胞上的 KAI1 蛋白的结合能力。最近的研究还发现, Duffy 血型抗原通过抑制人胰腺导管腺癌中的 CXCR2 信号传导来抑制肿瘤进展^[18]。因此, Duffy 血型基因多态性也许通过多种机制影响结直肠癌的转移。

综上所述, 本研究表明, Duffy 血型基因多态性与结直肠癌的发生无关, 而与结直肠癌的淋巴结转移有关。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61: 69-90.
- [2] Sameer AS. Colorectal cancer: molecular mutations and polymorphisms[J]. Front Oncol, 2013, 3: 114.
- [3] Latini FRM, 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] Gai PP, van Loon W, Siegert K et al. Duffy antigen receptor for chemokines gene polymorphisms and malaria in Mangaluru, India[J]. Malar J, 2019, 18: 328.

- [5] Howes RE, Patil AP, Piel FB, et al. The global distribution of the Duffy blood group[J]. *Nat Commun*, 2011, 2:266.
- [6] Yang C, Yu K-D, Xu W-H, et al. Effect of Genetic Variants in Two Chemokine Decoy Receptor Genes, DARC and CCBP2, on Metastatic Potential of Breast Cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8:e78901.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Wang J, Ou Z, Hou Y, 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.
- [10] Zeng X-H, Ou Z-L, Yu K-D, et al. Coexpression of atypical chemokine binders (ACBs) in breast cancer predicts better outcomes[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 125:715—727.
- [11] 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.
- [12] Li DD, Yang C, Shao ZM, et al. Effect of functional genetic variants in chemokine decoy receptors on the recurrence risk of breast cancer[J]. *Cancer Med*, 2018, 7:5497—5504.
- [13] Zhu Q, Jiang L, Wang X. The expression of Duffy antigen receptor for chemokines by epithelial ovarian cancer decreases growth potential[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13:4302—4306.
- [14] Schnabel RB, Baumert J, Barbalic M, et al. Duffy antigen receptor for chemokines(Darc) polymorphism regulates circulating concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and other inflammatory mediators[J]. *Blood*, 2010, 115:5289—5299.
- [15] Mangalmurti NS, Xiong Z, Hulver M, et al. Loss of red cell chemokine scavenging promotes transfusion-related lung inflammation [J]. *Blood*, 2009, 113:1158—1166.
- [16] Iizumi M, Bandyopadhyay S, Watabe K. Interaction of Duffy antigen receptor for chemokines and KAI1: a critical step in metastasis suppression [J]. *Cancer Res*, 2007, 67:1411—1414.
- [17] King CL, Adams JH, Xianli J, et al. Fya/Fyb antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108:20113—20118.
- [18] Maeda S, Kuboki S, Nojima H et al. Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) expressing in cancer cells inhibits tumor progression by suppressing CXCR2 signaling in human pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cytokine*, 2017, 95:12—21.

(收稿日期:2019-10-17)