

• 论 著 •

细胞程序性死亡-配体 1 基因启动子区 rs10815225 多态性与结直肠癌的关联研究

马晓磊¹, 张 麒², 潘定国³

(云南省肿瘤医院:1. 生物治疗中心;2. 腹部外科;3. 结直肠外科, 云南昆明 650118)

摘 要:目的 探讨位于细胞程序性死亡-配体 1(PD-L1)基因启动子区的 rs10815225 多态性与结直肠癌的相关性。方法 直接测序法分析 215 例结直肠癌患者和 236 例体检健康者 rs10815225 多态性,定量 PCR 检测 65 例结直肠癌组织中 PD-L1 mRNA 的表达变化。结果 与 GG 基因型相比,CG 基因型显著降低了结直肠癌的发病风险($OR=0.48, 95\%CI\ 0.28\sim0.83, P=0.01$)。双荧光素酶报告基因结果显示,与 rs10815225G 等位基因相比,rs10815225C 对应的荧光素酶活性显著降低($P<0.05$)。基因型-表型结果显示,携带 rs10815225CG 基因型结直肠癌患者中 PD-L1 mRNA 表达明显低于 GG 基因型携带者($P<0.05$)。结论 PD-L1 基因启动子区 rs10815225CG 基因型可能通过降低基因转录活性和 PD-L1 mRNA 表达,从而降低中国汉族人群结直肠癌的发病风险。

关键词:细胞程序性死亡-配体 1; 启动子; 单核苷酸多态性; 转录活性; 结直肠癌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.03.020

中图法分类号:R735.3+5

文章编号:1673-4130(2020)03-0335-04

文献标识码:A

Association of rs10815225 polymorphism in the promoter region of programmed cell death ligand 1 gene with colorectal cancer

MA Xiaobiao¹, ZHANG Qi², PAN Dingguo³

(1. Department of Biotherapy Center; 2. Department of Abdominal Surgery;

3. Department of Colorectal Surgery, Yunnan Cancer Hospital, Kunming, Yunnan 650118, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between rs10815225 polymorphism in the promoter region of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) gene and colorectal cancer. **Methods** The rs10815225 polymorphism was analyzed in 215 colorectal cancer patients and 236 healthy people by direct sequencing, and the expression of PD-L1 mRNA in 65 colorectal cancer tissues was detected by quantitative PCR. **Results** Compared with GG genotype, CG genotype significantly reduced the risk of colorectal cancer ($OR=0.48, 95\%CI\ 0.28-0.83, P=0.01$). The results of double luciferase reporter gene showed that the luciferase activity of rs10815225c was significantly lower than that of rs10815225g ($P<0.05$). The results of genotype phenotype showed that the expression of PD-L1 mRNA in colorectal cancer patients with rs10815225cg genotype was significantly lower than that in patients with GG genotype ($P<0.05$). **Conclusion** The rs10815225CG genotype in the promoter region of PD-L1 gene may reduce the risk of colorectal cancer in Chinese Han population by reducing gene transcription activity and PD-L1 mRNA expression.

Key words: programmed cell death ligand 1; promoter; single nucleotide polymorphism; transcriptional activity; colorectal cancer

免疫疗法是当前最具前景的肿瘤治疗方法之一。细胞程序性死亡-受体 1(PD-1)/细胞程序性死亡-配体 1(PD-L1)是肿瘤免疫治疗的一个重要靶点,两者结合可抑制抗肿瘤免疫应答^[1-2]。PD-L1 在人类多种肿瘤,包括结直肠癌中呈高表达,与淋巴结转移和预后等临床特征密切相关,影响细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移^[3-10]。有研究显示,PD-L1 基因启动子区

rs10815225 不同等位基因与转录因子 SP1 的结合不同,导致不同个体对胃癌的易感性不同^[11]。鉴于 rs10815225 是一个功能性多态位点,推测该位点多态性可能与结直肠癌的风险有关。本研究运用病例-对照研究调查 rs10815225 多态性与中国汉族人群结直肠癌的关联,并分析其对转录活性和 PD-L1 mRNA 的影响。

作者简介:马晓磊,主治医师,主要从事消化道肿瘤方面的研究。

本文引用格式:马晓磊,张麒,潘定国. 细胞程序性死亡-配体 1 基因启动子区 rs10815225 多态性与结直肠癌的关联研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(3): 335-338.

1 资料与方法

1.1 一般资料 血液样本:收集 2012 年 3 月至 2017 年 5 月在本院住院的结直肠癌患者 215 例作为病例组,同期收集本院体检健康者 236 例作为对照组。两组研究对象均来自云南地区,均为汉族个体,相互间无亲缘关系,性别和年龄差异无统计学意义($P>0.05$);病例组中饮酒和吸烟个体均高于对照($P\leq 0.05$)。结直肠癌纳入标准:(1)经医院病理科确诊;(2)未经放、化疗治疗者。结直肠癌排除标准:(1)结直肠癌术后复发者;(2)非原发性结直肠癌者;(3)有家族史者。215 例病例中,高、中分化 158 例,低分化 57 例;临床Ⅰ~Ⅱ期 108 例,临床Ⅲ~Ⅳ期 107 例。采集外周静脉血 2~3 mL,乙二胺四乙酸抗凝,-20℃冰箱保存备用。组织样本:手术切除结直肠癌组织样本 65 例,离体样本经液氮速冻,-80℃冰箱保存备用,所有样本均经医院病理科确诊。本研究经医院伦理委员会批准。见表 1。

表 1 病例组和对照组临床资料

临床资料	病例组($n=215$)	对照组($n=236$)	t/χ^2	P
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	59.0 $\pm$ 12.3	58.4 $\pm$ 9.7	-0.50	0.61
性别[$n(\%)$]				
男	125(58.1)	148(62.7)	0.99	0.32
女	90(41.9)	88(37.3)		
饮酒史[$n(\%)$]				
有	80(37.2)	65(27.5)	4.82	0.03
无	135(62.8)	171(72.5)		
吸烟史[$n(\%)$]				
有	32(14.9)	21(8.9)	3.89	0.05
无	183(85.1)	215(91.1)		

1.2 试剂与仪器 引物由中国擎科生物科技有限公司合成;基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 分子量标准、聚合酶链反应混合物、Trizol 试剂、TIANScript II 反转录试剂盒和 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒均购自中国北京天根生化科技有限公司;限制性内切酶 Kpn I 和 Xho I 购自美国 NEB 公司;pGL3 载体和定点突变试剂盒购自美国 Promega 公司;荧光定量 PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 抽提及 rs10815225 多态性分析 基因组 DNA 通过试剂盒法抽提。直接测序法分型 rs10815225。测序引物序列如下:上游 5'-CGA AGG TCA GGA AAG TCC AA-3',下游 5'-AGG AAC AAC GCT CCC TAC CT-3'。PCR 总反应体系 50 μ L,其中 2 $\times$ PCR 缓冲液 25 μ L,上、下游引物各 2 μ L,基因组 DNA 2.5 μ L 和去离子水 18.5 μ L。反应条件为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s;60℃

退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 35 个循环;72℃充分延伸 10 min,4℃保存。PCR 反应产物送中国擎科生物科技有限公司测序。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测 PD-L1 mRNA 表达 Trizol 法提取结直肠癌组织总 RNA,按照反转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒说明书操作进行 PD-L1 mRNA 相对水平分析。PD-L1 引物:上游 5'-GGT GGT GCC GAC TAC AA-3',下游 5'-TAG CCC TCA GCC TGA CAT-3'。内参基因选用甘油醛-3-磷酸脱氢酶,上游引物:5'-ATG GGG AAG GTG AAG GTC G-3',下游引物:5'-GGG GTC ATT GAT GGC AAC AAT A-3'。PCR 反应总体积 10 μ L,含 2 $\times$ SYBR Green 5 μ L,上、下游引物各 1 μ L,cDNA 1 μ L 和去离子水 2 μ L。反应条件:94℃5 min;94℃30 s,60℃35 s,40 个循环。记录目的基因和内参基因的循环阈值(Ct),采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法计算不同 rs10815225 基因型结直肠癌患者中 PD-L1 mRNA 的相对表达量。

1.3.3 双荧光素酶活性检测 参考文献[11]构建 pGL3-rs10815225G 和 pGL3-rs10815225C 重组载体。以 rs10815225GG 纯合子 DNA 为模板扩增 PD-L1 启动子区,上游引物:5'-GGC TAG GGT ACC CGT TCA GAT GTT GGC TTG TTG-3',下游引物:5'-GGC TAG CTC GAG GGA AGC TGC GCA GAA CTG GGG-3'。经 Kpn I 和 Xho I 双酶切,连接 pGL3 载体,构建 pGL3-rs10815225G 重组载体。运用定点突变试剂盒将 G 突变为 C,突变引物:5'-GAC CCC GCC TCC CGG CCT GGC GCA AC-3'。提取质粒,获得 pGL3-rs10815225C 重组载体。高糖 DMEM 培养基培养结直肠癌细胞 HCT116,接种于 24 孔板,Lipo2000 转染 pGL3、pGL3-rs10815225G 和 pGL3-rs10815225C 载体,pRL 共转染,48 h 后检测荧光素酶活性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件统计分析数据。正态分布定量和定性资料分别采用 $\bar{x}\pm s$ 和百分率(%)表示;非正态分布资料采用中位数(四分位数)[$M(P_{25}\sim P_{75})$]表示。正态分布数据两组比较采用 t 检验,两组以上比较采用方差分析和两两比较的 q 检验。非正态分布数据比较采用秩和检验。 χ^2 检验分析 rs10815225 基因型分布是否符合哈迪-温伯格(HWE)平衡。Logistic 回归计算调整性别、年龄、饮酒和吸烟后的比值比(OR)和 95%置信区间(95%CI)。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

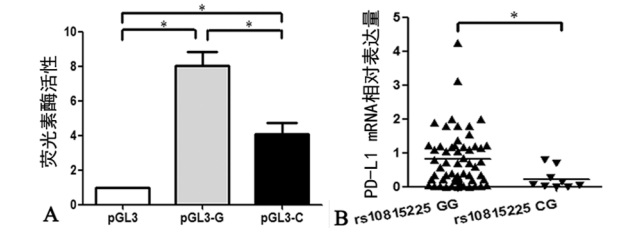
2.1 HWE 检验 入选病例组和对照组研究个体 PD-L1 基因启动子区 rs10815225 基因型分布符合 HWE 定律, $P>0.05$ 。

2.2 PD-L1 基因启动子区 rs10815225 多态性与结直肠癌的相关性 对照组中,PD-L1 基因启动子区

rs10815225GG 和 CG 基因型频率分别为 80.5% 和 19.5%; 疾病组中, 频率分别为 89.3% 和 10.7%。Logistic 回归结果显示, 调整性别、年龄、饮酒和吸烟因素后, 与 GG 基因型相比, CG 基因型降低结直肠癌患病风险 ($OR = 0.48, 95\% CI\ 0.28 \sim 0.83, P = 0.01$)。对 rs10815225 基因型频率按照分化程度和 TNM 分期进行分层分析, Logistic 回归结果显示, rs10815225 多态性与以上临床特征无相关性 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 PD-L1 基因启动子区 rs10815225 多态性与结直肠癌的相关性				
多态性	GG [n(%)]	CG [n(%)]	OR(95%CI) [M($P_{25} \sim P_{75}$)]	P
对照组	190(80.5)	46(19.5)	参照	
病例组	192(89.3)	23(10.7)	0.48(0.28~0.83)	0.01
分化程度				
高、中分化	138(87.3)	20(12.7)	参照	
低分化	54(94.7)	3(5.3)	0.36(0.10~1.29)	0.08
TNM 分期				
I~II	94(87.0)	14(13.0)	参照	
III~IV	98(91.6)	9(8.4)	0.52(0.20~1.33)	0.17

2.3 rs10815225 多态性对荧光素酶活性和 PD-L1 mRNA 的影响 结直肠癌 HCT-116 细胞转染空质粒 pGL3、pGL3-rs10815225G 和 pGL3-rs10815225C, 48h 后检测双荧光素酶活性。与空质粒 pGL-3 相比, 转染 pGL3-rs10815225G 和 pGL3-rs10815225C 后荧光素酶活性均明显增加。与 pGL3-rs10815225G 相比, 转染 pGL3-rs10815225C 后荧光素酶活性明显降低 ($P < 0.05$)。PD-L1 mRNA 在 rs10815225GG 基因型结直肠癌患者中的相对表达量为 0.64, 在 rs10815225CG 基因型患者中的相对表达量为 0.06。两组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1B。



注: A 表示结直肠癌 HCT-116 细胞转染空质粒 pGL3、pGL3-rs10815225G 和 pGL3-rs10815225C48 h 后, 荧光素酶活性, * $P < 0.05$; B 表示 rs10815225GG 和 CG 基因型结直肠癌患者中 PD-L1 mRNA 的表达差异, * $P < 0.05$ 。

图 1 rs10815225 多态性对荧光素酶活性和 PD-L1 mRNA 的影响

3 讨 论

PD1/PD-L1, 作为重要的免疫检查点, 在肿瘤免疫治疗中的作用备受瞩目^[12-16]。PD1 表达于多种免

疫细胞, 例如细胞毒性 T 淋巴细胞、B 细胞和单核细胞等。PD-L1 作为 PD1 的配体, 传递细胞信号抑制 T 细胞活化和增殖, 介导自身免疫耐受。多种肿瘤细胞表面表达 PD-L1, 与 PD1 结合, 抑制细胞毒性 T 淋巴细胞的杀伤作用及细胞因子的释放, 从而导致肿瘤细胞发生免疫逃逸^[3-7]。基于 PD-L1 在肿瘤免疫中的重要作用, 该基因上的遗传变异可能成为肿瘤发生和预后的一个生物学标记物。

最近, TAO 等^[11]报道了位于 PD-L1 基因转录起始位点上游 62 bp 的一个功能性多态位点 rs10815225C/G, G 等位基因可与转录因子 SP1 结合, 而 C 等位基因则不能, 造成携带 CG 基因型胃癌患者中 PD-L1 mRNA 表达明显降低, 进而降低胃癌的发病风险。随后, 有研究报道该多态性与 PD-L1 蛋白表达和胃癌的预后无关^[17]。由于遗传多态性与结直肠癌的发病有关, 例如脂联素基因 rs2241766 位点、环氧化酶-2 基因-765G/C 位点、HIPPO 通路 RASSF1A 基因 rs2236947 位点、白细胞介素 17Ars10484879 位点、髓过氧化物酶基因启动子区 rs2333227 位点和 miR-17-92 启动子区 rs9588884 和 rs982873 位点等^[18]。因此, 推测 PD-L1 基因多态性可能影响结直肠癌的易感性个体差异。本研究回顾性调查了 rs10815225 在 215 例结直肠癌和 236 例对照组中的分布, 发现 CG 基因型携带者结直肠癌的发病风险降低 50%, 提示可能是结直肠癌的保护因素之一。以往全基因组关联研究证实, 9p24 是结直肠癌的 1 个易感位点^[19], PD-L1 基因恰好位于该易感区域(9p24.1), 由此认为本研究结果具有一定的理论研究支持, 合理可靠。

为了探讨 rs10815225CG 基因型降低结直肠癌风险的可能机制, 本研究运用双荧光素酶报告基因检测系统和实时荧光定量分析了 rs10815225 对基因转录活性和 PD-L1 mRNA 的影响, 发现与 rs10815225G 等位基因相比, rs10815225C 等位基因对应的细胞转录活性显著降低, 导致 PD-L1 mRNA 表达下调, 结直肠癌的发病风险降低。该研究结果与 TAO 等^[11]在胃癌中观察到的结果一致, 证实了由于 rs10815225C 等位基因不能与转录因子 SP1 结合, 致使转录活性下降, 具有促癌作用的 PD-L1 mRNA 水平降低, 最终导致结直肠癌的罹患风险减小。

本研究亦存在一定的局限性, 临床样本采集时未考虑一些混杂因素, 比如体质指数、饮食习惯(油炸烟熏及腌制食品)、吸烟是否被动等, 因此无法校正更多的混杂因素, 基因-环境相互作用值得进一步深入研究。

4 结 论

PD-L1 基因启动子区 rs10815225CG 基因型通过降低基因转录活性和 PD-L1 mRNA 表达, 进而降低中国汉族人群结直肠癌的发病风险, 提示 rs10815225

可能作为结直肠癌新的免疫治疗靶点。

参考文献

[1] 全诗翠,胡佳,刘畅,等. 免疫靶点 PD-1/PD-L1 的研究现状与应用进展[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(14): 2283-2286.

[2] 吴晶晶,刘红利. PD-1/PD-L1 信号通路在结直肠癌中的研究进展[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2018, 47(1): 121-125.

[3] ZHAO L W, LI C, ZHANG R L, et al. B7-H1 and B7-H4 expression in colorectal carcinoma; correlation with tumor FOXP3(+) regulatory T-cell infiltration[J]. Acta Histochem, 2014, 116(7): 1163-1168.

[4] ENKHBAT T, NISHI M, TAKASU C, et al. Programmed cell death ligand 1 expression is an independent prognostic factor in colorectal cancer[J]. Anticancer Res, 2018, 38(6): 3367-3373.

[5] 朱明,孙静,王辉,等. 负性共刺激分子 B7-H1 和 B7-H4 在结直肠癌中的表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(5): 528-532.

[6] 李晓凤,巴彩霞,袁海清,等. B7-H1 和 Bcl-2 在人结直肠癌中表达及其临床意义[J]. 肿瘤, 2012, 32(7): 555-558.

[7] 雷星,陈硕,单涛,等. 结肠癌中 PD-L1 的表达及其与临床病理和预后的关系[J]. 现代肿瘤医学, 2018(16): 2548-2552.

[8] 汤国军,胡丛岗,童毅,等. 程序性死亡配体 1 在结直肠癌中的表达及作用[J]. 中国普通外科杂志, 2018, 27(6): 792-795.

[9] 熊振芳,熊秋迎,万红萍,等. PD-L1 调节结直肠癌细胞生物学行为的作用研究[J]. 江西医药, 2018, 53(9): 931-934.

[10] NI X, SUN X, WANG D, et al. The clinicopathological and prognostic value of programmed death-ligand 1 in colorectal cancer; a meta-analysis[J]. Clin Transl Oncol, 2019, 21(5): 674-686.

[11] TAO L H, ZHOU X R, LI F C, et al. A polymorphism in the promoter region of PD-L1 serves as a binding-site for

SP1 and is associated with PD-L1 overexpression and increased occurrence of gastric cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2017, 66(3): 309-318.

[12] TSUKAMOTO H, FUJIEDA K, MIYASHITA A, et al. Combined blockade of IL6 and PD-1/PD-L1 signaling abrogates mutual regulation of their immunosuppressive effects in the tumor microenvironment[J]. Cancer Res, 2018, 78(17): 5011-5022.

[13] SHAABANI S, HUIZINGA H P S, BUTERA R, et al. A patent review on PD-1/PD-L1 antagonists: small molecules, peptides, and macrocycles (2015-2018)[J]. Expert Opin Ther Pat, 2018, 28(9): 665-678.

[14] LE B S, CHAMPIAT S, ROUTIER E, et al. Onset of connective tissue disease following anti-PD1/PD-L1 cancer immunotherapy[J]. Ann Rheum Dis, 2018, 77(3): 468-470.

[15] SU Q, ZHANG X, SHEN X, et al. Risk of immune-related colitis with PD-1/PD-L1 inhibitors vs chemotherapy in solid tumors: systems assessment[J]. J Cancer, 2018, 9(9): 1614-1622.

[16] 阿茹娜. 胰腺癌和结直肠癌的免疫治疗及其生物标志物的反应[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2015, 22(7): 798.

[17] WANG W, LIAO P, HE Y. A gene polymorphism in PD-L1 promoter region is not associated with PD-L1 expression and patients' survival in gastric cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2017, 66(10): 1379-1381.

[18] 李政,周天义,贺小会,等. 脂联素基因 rs2241766 位点多态性与结直肠癌风险相关性的 meta 分析[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2018, 25(5): 592-601.

[19] KOCARNIK J D, HUTTER C M, SLATTERY M L, et al. Characterization of 9p24 risk locus and colorectal adenoma and cancer: gene-environment interaction and meta-analysis[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19(12): 3131-3139.

(收稿日期: 2019-06-12 修回日期: 2019-10-19)

(上接第 334 页)

suburban middle-class children with asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 112: 87-92.

[13] 苗青,刘永革,王燕,等. 3160 例住院儿童敏筛过敏原检测结果分析及其临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(13): 1632-1637.

[14] ZHANG Y W, LAI X X, ZHAO D Y, et al. Indoor allergen levels and household distributions in nine cities across

china[J]. Biomed Environ Sci, 2015, 28(10): 709-717.

[15] 武其文,蔡鹏程,陈治中,等. 武汉地区支气管哮喘患儿过敏原特异性 IgE 分析[J]. 临床血液学杂志, 2009, 22(2): 65-67.

[16] 闭雄杰,覃正学,玉兰清,等. 118 例过敏性疾病过敏原检测分析[J]. 检测医学, 2011, 26(8): 555-557.

(收稿日期: 2019-07-21 修回日期: 2019-10-28)