

IGF1和IGFBP3基因变异与中国人群肾癌易感性的相关性

陈建春¹, 蒋民军¹, 周永强¹, 王 玥², 杨韬越², 王 阳², 俞兆儿², 徐铎杰², 徐映文², 常 磊², 杨 京², 蔡金原², 赵 虎^{3,4*}, 曹 强⁴

(¹ 吴江区第一人民医院泌尿外科, 江苏 苏州 215200; ² 南京医科大学第一临床医学院, 江苏 南京 210029; ³ 江阴市人民医院泌尿外科, 江苏 江阴 214400; ⁴ 南京医科大学第一附属医院泌尿外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor 1, IGF1)和胰岛素样生长因子结合蛋白-3 (IGF binding protein 3, IGFBP3)在肾细胞癌的发生发展中起重要作用。本研究旨在探索位于IGF1和IGFBP3基因功能区具有潜在功能学的基因遗传多态性与中国人群肾癌易感性的关系。方法: 采用病例-对照研究方法, 对 1 027例肾癌患者和 1 094例健康对照, 应用 TaqMan 探针分型法对位于IGF1和IGFBP3基因功能区9个基因遗传多态性位点进行分型。控制混杂因素, 应用非条件逻辑回归, 评价基因多态性与肾癌易感性之间的关系。结果: 在9个基因多态性位点中, 通过校正后的多因素分析发现位于IGF1 3'-UTR区域的rs5742714多态性和中国人群肾癌发病风险明显相关。与携带IGF1 rs5742714 GG基因型的个体相比, IGF1 rs5742714 GC/CC基因型携带者的肾癌发病风险明显增高(OR=0.82; 95% CI=0.68~0.98, P=0.002)。此外, IGF1 rs5742714 GC/CC基因型癌旁组织中IGF1 mRNA含量明显降低。结论: 位于IGF1 3'-UTR区域的rs5742714多态性可能通过调控IGF1基因的表达而影响中国人群肾癌发病易感性。

[关键词] IGF1; IGFBP3; 肾细胞癌; 遗传多态性

[中图分类号] R737.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)11-1537-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20171141

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是肾脏恶性肿瘤的主要类型之一, 占有肾脏肿瘤的 80%以上。约 25%的患者在诊断时已出现肿瘤转移灶, 早期患者即使接受手术治疗, 也有 30%的患者可能在手术后依旧产生转移灶, 一旦出现转移灶, 患者的预后效果往往不佳。目前, 对 RCC 预后的预测很大程度上依赖于传统预后因素, 如肿瘤病理分期、分级。近几年, 一些大范围基因组相关研究结果显示不同的基因遗传变异与 RCC 的发展和预后相关^[1-3]。例如, 在 RCC 发病机制中占重要地位的血管生成相关基因, 其多态性被证实与 RCC 易感率和预后相关。我们的近期研究显示, VHL 和 HIF1A 基因的多态性可共同影响 RCC 的发病进程和存活率。但是在不同人群中的调查研究结果并不完全相符, 这说明了不同种族基因构造存在差异, 因此中国人群 RCC 基因遗传变异需要继续研究。

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor 1, IGF)家族在细胞增生、分化、凋亡中起到重要作用。该家族包括了 IGF1、IGF2, 同时也包括了它们的细胞表面受体(IGF1R 和 IGF2R)和 6 种 IGF 结合蛋白(IGF binding protein, IGFBP)。胰岛素样生长因子结合蛋白-3 (IGF binding protein 3, IGFBP3)作为一种主要的 IGFBP, 与大部分处于循环状态 IGF1 结合来共同发挥其生物活性。IGF1、IGFBP3 的异常表达或异常激活被证实能促进癌变, 并对癌症预后造成影响。Chuang 等^[4]利用 cDNA 微序列, 结合 Western blot 和免疫组织化学手段, 发现 IGFBP3 是肾透明细胞癌的标志物, IGFBP3 异常表达增高与肾癌 Fuhrman 评分呈正相关。另外有报道称血清 IGF1 是监测 RCC 患者预后的独立指标。

其他一些实验结果相继证明了 IGF1 或 IGFBP3 基因多态性与结肠癌、肺癌、前列腺癌和乳腺癌等患病危险或预后有关, 但有关 RCC 的 IGF1 或 IGFBP3 基因多态性的研究较少。IGFBP rs2854744 多态性位点是 RCC 的易感因素之一, 然而这项研究样本较小, 只包括 158 例患者和 316 例对照^[5]。根据 IGF1 和 IGFBP3 在 RCC 中共同发挥的重要作用, 这 2 个基因多态性可能影响 RCC 患病危险和预后。因此本

[基金项目] 苏州市吴江区卫生局 2014 年度“科教兴卫”卫生科技项目(WWK201409); 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划(201610312024Z, 201410312017Z)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: medzhao1980@163.com

研究选择了 9 个潜在功能性 IGF1 基因多态性位点,并通过病例-对照研究评估了它们与 RCC 患病风险和预后的关系。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究共招募了从 2004 年 5 月—2011 年 9 月在南京医科大学第一附属医院就诊或体检的 1 027 例 RCC 病例与 1 094 例健康个体。病例和对照的入组条件参照先前的研究^[2,6]。所有新诊断为 RCC 的病例均得到了组织病理学确认。两组排除标准:既往患肿瘤病史、放化疗病史。无年龄与性别限制,符合条件者即招募入组。对照人群来自门诊体检正常人群,与病例组人群之间无血缘关系,并且没有肿瘤病史。在招募入组前,由经过专业培训的调查人员进行面对面的标准问卷调查来收集人口特征和相关因素资料。征得书面知情同意后,抽取每位研究对象 5 mL 外周血。

1.2 方法

1.2.1 SNP 采集和基因分型

IGF1 和 IGFBP3 基因多态性是利用基因型数据,从 HapMap database 数据库 (HapMap Data Rel 24/phaseII Nov08, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126)采集的来自北京的无血缘关系的汉族个体。基因多态性位点被设定在 IGF1 和 IGFBP3 基因组上下两端各 2 kb 长度。根据以下标准鉴定可能的功能基因多态性:①位于 5'端的调控区,5'端的非翻译区(UTR),3'端的 UTR,或导致氨基酸序列改变的编码区;②在中国人口中,多于 5%少部分等位基因频率(MAF)。挑选了 5 种 IGF1 的基因多态性位点(rs6214、rs6218、rs35767、rs5742612、rs5742714)和 4 种 IGFBP3 的基因多态性位点(rs2132572、rs2854744、rs2854746、rs282734)。如前所述利用 TaqMan SNP 基因分型方法进行基因分型^[7]。

1.2.2 IGF1 mRNA 表达分析

采用 46 例手术切除的肾脏肿瘤样本,在组织内检测 IGF1 mRNA 水平。所有组织样本在收集后立即被储存在液氮中。RNA 提取物和 cDNA 制备参考文献^[8]。IGF1 mRNA 利用(RT)-PCR ABI Prism 7900 序列检测系统进行实时定量逆转录。ACTB 基因作为内参。其中 IGF1 的引物:上游 5'-GCTCTTCAGTTCGTGTGTGGA-3',下游 5'-GCCTCCTTAGATCACAGCTCC-3'。放大率参考文献^[8]。

1.3 统计学方法

病例和对照的人口学特征、选定变量和基因型

频率分布差别都利用 *t* 检验(连续变量)或卡方检验(分类变量)进行评估的。在进行 Hardy - Weinberg 平衡定律分析之前,运用拟合优度卡方检验,检测研究对象的单核苷酸多态性等位基因的频率。校正可能的混杂因素后,运用非条件逻辑回归分析,计算比值比(odds ratio,OR)和 95%CI,评估多态性与 RCC 风险性之间的关系。所有分析均使用 SAS 9.1.3 软件,所有的统计均为双侧检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RCC 患者和对照个体特征

1 027 例病例与 1 094 例健康对照的人口学指标及吸烟、饮酒等危险因素的差异见表 1。在年龄、性别和饮酒状况方面,两组没有明显差别(P 均 > 0.05)。但病例组中吸烟、高血压和糖尿病患者所占比例显著高于对照组(P 值分别为 0.017、 <0.001 、 <0.001)。在 1 027 例肾癌患者中,肾癌分期为 I、II、III 及 IV 期的患者分别占 65.3%、19.5%、7.1%和 8.1%。肿瘤 I、II、III 及 IV 分级的比例分别是 21.6%、51.1%、20.7%及 6.5%。

表 1 病例组与对照组的各项人口学特征分布情况

观察指标	病例组	对照组	<i>P</i> 值
年龄(岁)	56.7 ± 12.1	57.1 ± 12.1	0.522
性别[n(%)]			
男	652 (63.5)	704 (64.4)	0.678
女	375 (36.3)	390 (35.6)	
吸烟状态[n(%)]			
不吸烟	647 (63.0)	743 (67.9)	0.017
吸烟	380 (37.0)	351 (32.1)	
饮酒状态[n(%)]			
不饮酒	750 (73.0)	807 (73.8)	0.701
曾饮酒	277 (27.0)	287 (26.2)	
高血压史[n(%)]			
无	626 (70.0)	810 (74.0)	<0.001
有	401 (30.0)	284 (26.0)	
糖尿病史[n(%)]			
无	895 (87.2)	1027 (93.9)	<0.001
有	132 (12.8)	67 (6.1)	

连续变量以 *t* 检验比较,分类变量以卡方检验比较。

2.2 IGF1 和 IGFBP3 基因多态性与 RCC 患病风险的关联性分析

IGF1 以及 IGFBP3 基因各多态性位点和 RCC 患病风险的联系见表 2。其中 IGF1 rs6218 位点在对照人群中的分布频率不符合 Hardy-Weinberg 平衡

表 2 IGF1、IGFBP3 多态性和肾癌发病风险的关联性分析

基因型	病例组 (例)	对照组 (例)	P 值	OR(95%CI)*
IGF1 rs5742714				
GG	713	691		1.00
GC	279	355	0.005	0.82(0.67 ~ 0.99)
CC	35	48	0.127	0.79(0.50 ~ 1.27)
GC/CC	314	403	0.002	0.82(0.68 ~ 0.98)
IGF1 rs35767				
CC	466	476		1.00
CT	435	502	0.187	0.92(0.76 ~ 1.11)
TT	126	116	0.471	1.06(0.80 ~ 1.43)
CT/TT	561	618	0.388	0.95(0.80 ~ 1.40)
IGF1 rs5742612				
TT	552	596		1.00
TC	389	417	0.938	1.02(0.85 ~ 1.24)
CC	86	81	0.410	1.04(0.75 ~ 1.47)
TC/CC	475	498	0.736	1.03(0.86 ~ 1.23)
IGF1 rs6214				
GG	283	301		1.00
GA	494	550	0.658	0.93(0.75 ~ 1.15)
AA	250	243	0.462	1.08(0.84 ~ 1.40)
GA/AA	744	793	0.983	0.98(0.80 ~ 1.20)
IGFBP3 rs9282734				
AA	927	992		1.00
AC	93	100	0.975	1.00(0.73 ~ 1.36)
CC	7	2	0.078	3.71(0.76 ~ 18.10)
AC/CC	100	102	0.746	1.06(0.78 ~ 1.43)
IGFBP3 rs2132572				
GG	653	689		1.00
GA	333	366	0.662	0.93(0.76 ~ 1.12)
AA	41	39	0.652	1.11(0.68 ~ 1.80)
GA/AA	374	405	0.773	0.94(0.78 ~ 1.13)
IGFBP3 rs2854746				
CC	606	669		1.00
CG	356	361	0.363	1.07(0.89 ~ 1.30)
GG	65	64	0.536	1.02(0.70 ~ 1.49)
CG/GG	421	425	0.313	1.07(0.89 ~ 1.28)
IGFBP3 rs2854744				
AA	600	626		1.00
AC	359	409	0.340	0.93(0.77 ~ 1.12)
CC	68	59	0.323	1.24(0.85 ~ 1.82)
AC/CC	427	468	0.576	0.97(0.81 ~ 1.16)

* 调整年龄、性别、吸烟、饮酒、糖尿病、高血压后的回归模型。

定律($P=0.032$), 在后续分析中被剔除。通过校正后的多因素分析发现位于 IGF1 3'-UTR 区域的

rs5742714 多态性和中国人肾癌发病风险明显相关。与携带 IGF1 rs5742714 GG 基因型的个体相比, IGF1 rs5742714 GC/CC 基因型携带者的肾癌发病风险明显降低($OR=0.82, 95\%CI=0.68\sim 0.98, P=0.002$)。

2.3 IGF1 rs5742714 多态性与癌旁组织中 IGF1 表达的关系

为进一步探索 rs5742714 的潜在功能, 用实时定量 PCR 分析了携带不同基因型组织中 IGF1 mRNA 表达水平的差异。如图 1 所示, 携带 CC 或 GC 基因型的组织中 IGF1 mRNA 的表达水平比携带 GG 基因型的组织明显低(P 分别为 0.013 和 0.017)。

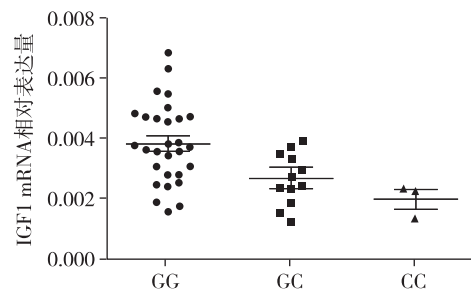


图 1 IGF1 rs5742714 多态性对于 IGF1 表达的影响

3 讨论

本研究中调查了中国人人群中 IGF1 和 IGFBP3 基因多态性是否与 RCC 演变和存活率有关。发现在 IGF1 基因中的 3'-UTR 端 rs5742714 的多态性与 RCC 发病风险降低有关。在多元分析中, 和临床分级和病理分级一样, IGF1 rs5742714 的多态性是 RCC 存活率的预测指标。rs5742714 的功能还在 IGF1 mRNA 水平上得以体现。

复习文献发现 IGF1 和 IGFBP3 与包括 RCC 在内的多种癌症演变和发展有关。Zhang 等^[9]认为 IGF1 rs5742714 是非小细胞肺癌预后的修饰基因位点, 特别是在接受过手术的患者当中。

考虑到 IGF1 基因 3'-UTR 中 rs5742714 多态性的位置, 人们预测 rs5742714 的变异可能会通过改变 IGF1 mRNA 的稳定性和它对 miRNA(microRNA) 的结合能力, 从而对 IGF1 的表达产生影响。有趣的是, 正如使用生物信息学的模型^[10]所预测的那样, C 等位基因对 rs5742714 G 等位基因的替代可能会为 hsa-mir-580 创造 1 个 microRNA 结合位点, 由于其对 TWIST1 表达的抑制作用^[11], 被证明是乳腺癌的 1 种肿瘤抑制剂。推测 rs5742714 C 的等位基因变异会导致 microRNA 与该区域的结合, 随后通过 mRNA 的裂解或平动抑制来降低 IGF1 的表达。鉴于 IGF1 在恶性肿瘤发展和进展中的作用, IGF1 水

平降低可能会降低癌症易感性并抑制肿瘤进展,然而 rs5742714 基因型多态性对 IGF1 表达功能影响的确切机制需要进一步研究。

研究报道 IGF1 rs5742714 的多态性与许多肿瘤易感性相关,如食管鳞状细胞癌^[12]、乳腺癌^[13]、结直肠癌^[14]、膀胱癌^[15]等,多态性位于基因启动子中,可能影响转录因子对启动子的约束力,这将导致基因表达的改变。有几项研究表明,IGFBP3 rs2854744 等位基因多态性可能会增强启动子活性,并可能增强 IGFBP3 的表达^[16-17]。然而本研究并没有发现这种多态性与 RCC 风险之间关联的证据。值得注意的是,以前发现这种多态性与伊朗人口中 RCC 的发展有关^[5],然而该研究的样本规模相对较小。此外,其他因素如不同的遗传背景也可能导致研究之间的差异。

总之,本研究首次证明了在中国人群中,IGF1 rs5742714 多态性在 RCC 易感性中的作用。此外研究结果也强调了该变异对 IGF1 表达的影响作用,本研究庞大的病例对照组研究提供了统计能力,以识别与 RCC 风险相关的多态性。为了更好地理解 IGF1 在 RCC 中所扮演的角色,需要在更大人群和功能研究中进一步验证。

[参考文献]

- [1] Kawai Y, Sakano S, Korenaga Y, et al. Associations of single nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene with the characteristics and prognosis of renal cell carcinomas [J]. *Eur Urol*, 2007, 52(4): 1147-1155
- [2] Qin C, Cao Q, Ju X, et al. The polymorphisms in the VHL and HIF1A genes are associated with the prognosis but not the development of renal cell carcinoma [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(4): 981-989
- [3] Qin C, Chen J, Li J, et al. Variants in angiogenesis-related genes and the risk of clear cell renal cell carcinoma [J]. *Mutagenesis*, 2014, 29(6): 419-425
- [4] Chuang ST, Patton KT, Schafermak KT, et al. Over expression of insulin-like growth factor binding protein 3 in clear cell renal cell carcinoma [J]. *J Urol*, 2008, 179(2): 445-449
- [5] Safarinejad MR. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) gene variants are associated with renal cell carcinoma [J]. *BJU Int*, 2011, 108(5): 762-770
- [6] Cao Q, Wang J, Zhang M, et al. Genetic variants in RKIP are associated with clear cell renal cell carcinoma risk in a Chinese population [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109285
- [7] Qian J, Zhou H, Chen J, et al. Genetic polymorphisms in IGF-I and IGFBP-3 are associated with prostate cancer in the Chinese population [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e85609
- [8] Cao Q, Ju X, Li P, et al. A functional variant in the MTOR promoter modulates its expression and is associated with renal cell cancer risk [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50302
- [9] Zhang M, Hu Z, Huang J, et al. A 3'-untranslated region polymorphism in IGF1 predicts survival of non-small cell lung cancer in a Chinese population [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(4): 1236-1244
- [10] Gong J, Tong Y, Zhang HM, et al. Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis [J]. *Hum Mutat*, 2012, 33(1): 254-263
- [11] Nairismägi ML, Vislovukh A, Meng Q, et al. Translational control of TWIST1 expression in MCF-10A cell lines recapitulating breast cancer progression [J]. *Oncogene*, 2012, 31(47): 4960-4966
- [12] Zhao L, Chi F, Xi M, et al. Polymorphisms of insulin-like growth factor binding protein-3 as a predictor for risk and patient survival in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 74(2015): 148-152
- [13] Ma X, Kang H, Dai Z, et al. Impact of the IGFBP3 A-202C polymorphism on susceptibility and clinicopathologic features of breast cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 71(2015): 108-111
- [14] Ge W, Li Y, Xiang H, et al. Lack of association of IGFBP-3 gene polymorphisms with colorectal cancer: evidence from 17 380 subjects [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(4): 2609-2615
- [15] Selinski S, Lehmann ML, Blaszkewicz M, et al. Urinary bladder cancer risk in relation to a single nucleotide polymorphism (rs2854744) in the insulin-like growth factor-binding protein-3(IGFBP3) gene [J]. *Arch Toxicol*, 2012, 86(2): 195-203
- [16] Deal C, Ma J, Wilkin F, et al. Novel promoter polymorphism in insulin-like growth factor-binding protein-3: correlation with serum levels and interaction with known regulators [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(3): 1274-1280
- [17] Jernström H, Deal C, Wilkin F, et al. Genetic and non-genetic factors associated with variation of plasma levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 in healthy premenopausal women [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2001, 10(4): 377-384

[收稿日期] 2017-07-09