

## 临床细胞生物学

中国汉族人群 *NLRP3* 基因多态性与  
结肠癌的相关性研究

任晓军\* 赵铭 段峰 王晓峰 张燕 宋哲伟

(上海市闵行区吴泾医院外科, 上海 200241)

**摘要** 该实验研究 *NLRP3* 基因多态性与中国汉族人群结肠癌之间的相关性。采用 TaqMan 检测法对中国汉族人群 208 例结肠癌患者和 203 名正常对照 *NLRP3* 的 3 个位点(rs4925648、rs10754558、rs10925019)进行关联分析, 并使用 SPSS 软件进行单核苷酸多态性分析, 比较病例组和对照组等位基因频率、基因型频率及单倍型的差异。结果发现, *NLRP3* 上三个位点基因频率、基因型频率两组间差异不明显( $P>0.05$ )。rs4925648 与 rs10925019 的 LD 分析其  $D'$  值较大( $D'=0.798$ )。但进一步对两位点的单倍型分析发现其各种组合均无统计学差异。该研究结果提示, *NLRP3* 基因的三个位点与中国汉族人群结肠癌的发生相关性无统计学意义。

**关键词** 结肠癌; *NLRP3* 基因; 单核苷酸多态性; 关联分析

Association between *NLRP3* Gene Polymorphism and Colorectal  
Cancer from Chinese Han Population

Ren Xiaojun\*, Zhao Ming, Duan Feng, Wang Xiaofeng, Zhang Yan, Song Zhewei

(Department of Surgery, Wujing Hospital of Minhang District of Shanghai, Shanghai 200241, China)

**Abstract** The aim was to evaluate the relationship between *NLRP3* gene and colorectal cancer (CRC). The sample set consists of 208 CRC patients and 203 controls. 3 SNPs (rs4925648, rs10754558, rs10925019) of *NLRP3* gene were tested using Taqman technology. The allele frequency, genotypic frequency and haplotype were analyzed between case group and control group. There were no significant difference of allele frequency and genotypic frequency between these two groups ( $P>0.05$ ). The  $D'$  value of rs4925648 and rs10925019 was large ( $D'=0.798$ ). The haplotype of these two SNPs was negative. In conclusion, there was no significant association between rs4925648, rs10754558, rs10925019 and CRC from Chinese Han population.

**Key words** CRC; *NLRP3* gene; SNP; haplotype analysis

## 前言

结肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化道恶性肿瘤之一, 多发于40~50岁年龄组, 好发部位

为直肠及直肠与乙状结肠交界处。流行病学调查发现该病在欧美人群中发病率较高, 居内脏肿瘤前二位<sup>[1]</sup>。随着生活水平的提高和饮食等生活方式的转变, 结肠癌在我国的发病率呈不断上升趋势, 其发病率紧随在肺、肝脏、胃、食道肿瘤之后, 居于第五位<sup>[2]</sup>。虽然结肠癌发生的分子机制目前尚未完全明确, 但众多的研究证实结肠癌的发生发展是多因素、多基因变异累计的癌变过程<sup>[3]</sup>。因此, 深入探讨结

收稿日期: 2013-06-23

接受日期: 2013-10-28

\*通讯作者。Tel: 021-64502371, E-mail: renxiaojun12@126.com

Received: April 4, 2013 Accepted: August 28, 2013

\*Corresponding author. Tel: +86-21-64502371, E-mail: renxiaojun12@126.com

网络出版时间: 2013-12-11 15:23

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0126.html>

肠癌的致病机制,寻找其分子诊治的新靶点,对于临床预防、诊断和治疗结肠癌具有重要意义。*NLRP3*基因定位于染色体1q44,其编码的蛋白产物为NOD样受体家族成员,在炎症和凋亡信号转导通路中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。最近,Ungerbäck等<sup>[5]</sup>研究证实瑞典人群中,*NLRP3*基因与结肠癌有相关性,但目前有关该基因与中国人群中结肠癌的关联研究还未见报道。本研究以中国汉族人群为研究对象,从*NLRP3*基因上选取了3个重要的单核苷酸多态性(SNP)位点(rs4925648、rs10754558、rs10925019),选取依据是该3个位点近年来成为*NLRP3*基因与疾病相关研究的热点区域。并进一步采用TaqMan探针检测法对这3个位点进行检测,以期证明中国汉族人群中*NLRP3*基因与结肠癌疾病的易感关联提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

(1)病例组:208例结肠癌患者血样来自上海市闵行区吴泾医院普通外科住院手术患者,就诊时间为2011年1月至2012年12月,术前均未接受放疗及化疗,术后均经病理学证实为结肠癌。该项研究中总共选择了208例CRC患者,其中男144例,女64例,年龄(57.32±9.20)岁。(2)对照组:该组入选对象均为性别、年龄匹配的健康志愿者203例,其中男147例,女56例,年龄(53.27±11.22)岁,经门诊肠镜检查无异常。两组研究对象均为上海地区汉族人群,实验前均签署知情同意书。

### 1.2 主要仪器及试剂

实时荧光定量PCR仪、TaqMan Universal PCR master Mix试剂盒(包含dNTP、PCR缓冲液和AmpliTaq Gold DNA聚合酶等)、SNP Genotyping Product试剂盒(包含引物以及探针等)均购自ABI公司。

### 1.3 方法

1.3.1 外周血收集及基因组DNA提取 病例组及对照组均采集外周静脉血5 mL(EDTA抗凝),-80 °C冰箱冻存储存。用全血基因组DNA提取试剂盒在全血中提取基因组DNA,并用0.8%琼脂糖电泳检测DNA质量。采用紫外可见分光光度计检测DNA的浓度,进一步稀释DNA样本,保证各DNA样本浓度一致后,4 °C保存以备下一步检测使用。

1.3.2 SNP位点选择 结合相关文献,利用SNP browser软件(www.allsnps.com/snpbrowser)从

*NLRP3*基因上选取3个重要的SNP位点:rs4925648、rs10754558、rs10925019。进一步用TaqMan探针法进行基因型检测,简述如下:在实时荧光定量PCR仪上先进行96孔板的绝对定量PCR扩增,反应的条件为:95 °C预变性10 min;95 °C 15 s,60 °C 1 min,40个循环。PCR反应结束以后,继续在同一96孔板上做等位基因分布检测,反应条件为:60 °C 10 min,保存并记录结果。利用SDS 2.0软件收集反应后的信号,划分基因型。结果显示,只有1个荧光信号增强的样本,其SNP位点分型对应为纯合子,2个荧光信号同时增强,则对应为杂合子。对于荧光信号增强不明显的样本均进行重复检测。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 10.0软件进行单体型分析和连锁不平衡(LD)分析,并应用PLink软件进行验证分析。 $\chi^2$ 检验用于检测等位基因的频率是否符合Hardy-Weinberg平衡定律,比较病例组和对照组基因型分布的差异,进一步计算OR值和95% CI。所有统计检验均为双侧检验,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 Hardy-Weinberg平衡法则的吻合度检验

病例组与对照组多态性位点的基因型观察值与期望值检测均符合Hardy-Weinberg平衡定律,吻合良好。表明本研究对象来自大的群体,个体间为随机婚配,无明显的自然选择、迁移等因素对遗传平衡的影响,资料安全可靠,见表1。

### 2.2 三组等位基因和基因型的频率分布

研究选定的3个SNP位点的基因频率和基因型频率比较 $P$ 值 $> 0.05$ ,OR值及95%可信度区间均包含1(rs4925648:  $P_{\text{allele}}=0.776\ 208$ , OR: 0.950 035, 95% CI: [0.667 183~1.352 801],  $P_{\text{genotype}}=0.807\ 021$ ; rs10754558:  $P_{\text{allele}}=0.395\ 979$ , OR: 0.886 883, 95% CI: [0.672 150~1.170 216],  $P_{\text{genotype}}=0.455\ 21$ ; rs10925019:  $P_{\text{allele}}=0.830\ 072$ , OR: 1.036 317, 95% CI: [0.748 149~1.435 480],  $P_{\text{genotype}}=0.938\ 207$ )(表1),提示*NLRP3*基因,尤其是这3个位点与结肠癌的发生无统计学相关性。

### 2.3 三组SNP位点的连锁不平衡分析(Linkage Disequilibrium) $D'$ 值

表2中可见,rs4925648与rs10925019所组成的block中,两位点的 $D'=0.798$ ,此结果表明这两个位点强连锁。

表1 三个位点的等位基因及单倍型频率分析结果  
Table 1 Allele and genotype frequency of the three loci

SNP 位点 SNP	分组 Groups	位置 Position	等位基因 Alleles	OR值[95%可信度区间] OR [95% CI]	P值 P-value	基因型 Genotypes	Hwe值 Hwe	P值 P-value
rs4925648		247580568	C(freq) T(freq)			C/C(freq) C/T(freq) T/T(freq)		
	Case		336(0.812) 78(0.188)	0.950 035 [0.667 183~ 1.352 801]	0.776 208	138(0.667) 60(0.290) 9(0.043)	0.807 021	
	Control		331(0.819) 73(0.181)			139(0.688) 53(0.262) 10(0.050)	0.105 63	
rs10754558		247612036	C(freq) G(freq)			C/C(freq) C/G(freq) G/G(freq)		
	Case		232(0.558) 184(0.442)	0.886 883 [0.672 150~ 1.170 216]	0.395 979	67(0.322) 98(0.471) 43(0.207)	0.455 21	
	Control		236(0.587) 166(0.413)			67(0.333) 102(0.507) 32(0.159)	0.508 285	
rs10925019		247595850	C(freq) T(freq)			C/C(freq) C/T(freq) T/T(freq)		
	Case		297(0.762) 93(0.238)	1.036 317 [0.748 149~ 1.435 480]	0.830 072	117(0.600) 63(0.323) 15(0.077)	0.938 207	
	Control		302(0.755) 98(0.245)			117(0.585) 68(0.340) 15(0.075)	0.252 229	

表2 三位点相互之间D'值结果  
Table 2 D' values between the sites

	rs10754558	rs10925019
rs4925648	0.507	0.798
rs10754558	/	0.645

表3 两位点间单倍型分析结果  
Table 3 Haplotype between rs4925648 and rs10925019

单倍体 Haplotype	病例频率(%) Case freq (%)	对照频率(%) Control freq (%)	卡方 $\chi^2$	P值 P-value	关联比值比 OR [95% CI]
C C*	282.03 (0.727)	293.28 (0.733)	0.040	0.841 690	0.968 [0.707~1.326]
C T*	34.97 (0.090)	35.72 (0.089)	0.002	0.967 547	1.010 [0.620~1.647]
T C*	12.97 (0.033)	8.72 (0.022)	0.995	0.318 623	1.552 [0.650~3.703]
T T*	58.03 (0.150)	62.28 (0.156)	0.057	0.810 717	1.552 [0.650~3.703]

#### 2.4 rs4925648-rs10925019位点间的单倍型分析结果

表3结果显示, 这两个位点所组成的四种单倍型组合中, C-C组合的卡方 $\chi^2=0.040$ ,  $P=0.841 690$ , 关联比值比OR [95% CI]=0.968 [0.707~1.326]; C-T组合的卡方 $\chi^2=0.002$ ,  $P=0.967 547$ , 关联比值比OR [95% CI]=1.010 [0.620~1.647]; T-C组合的卡方 $\chi^2=0.995$ ,  $P=0.318 623$ , 关联比值比OR [95% CI]=1.552 [0.650~3.703]; 以上结果表明, rs4925648-rs10925019位点

的单倍型分析无显著统计学意义。

### 3 讨论

NLRP3(也称Nalp3、CIAS1或Cryopyrin)是NLRPs蛋白家族中的典型代表, 由N-端PYD结构域、C-端亮氨酸重复序列(LRR)和中间的NACHT结构域组成。NLRP3可通过LRR识别其配体胞壁酰二肽(MDP)、尿酸、三磷酸腺苷(ATP)、内毒素和细胞裂解产物等导致其被活化而发生构象变化, 通过其效应结构

域PYD募集ASC和带有CARD结构域的caspase-1,形成复杂的复合物——NLRP3炎性体<sup>[6-7]</sup>。随后,活化的Caspase-1催化IL-1 $\beta$ 、IL-18、IL-33等形成活性形式并分泌,引起各种免疫炎症反应<sup>[6-7]</sup>。目前,NLRP3炎性体在自身免疫性疾病、无菌性炎症和慢性炎症反应等病理过程中的作用及意义备受关注。多种感染性疾病(如HIV感染<sup>[8]</sup>、沙眼衣原体感染<sup>[9]</sup>)及自身免疫性疾病(如I型糖尿病<sup>[10]</sup>、Cryoprin相关周期综合征<sup>[11]</sup>、炎症性肠病(IBD)<sup>[12]</sup>)均涉及NLRP3炎性体-caspase-1-IL-1 $\beta$ /IL-18轴的激活。

虽然结肠癌发生的分子机制目前尚未完全明确,但可以肯定该病的发生是一个多因素、多步骤的过程,与遗传因素、环境因素、慢性肠道炎症等密切相关。有研究表明,IBD患者发生结肠癌的风险率明显高于常人,而其发病率还在逐年递增,据预测8~10年后以每年0.5%~1%递增,30年后高达18%的IBD患者可能发展为CRC<sup>[13]</sup>。近年来,多项研究证实NLRP3基因多态性可影响IBD的易感性<sup>[14]</sup>,NLRP3炎性小体在IBD的发生、发展及治疗过程中的作用亦得到进一步阐释<sup>[15]</sup>。NLRP3基因缺陷小鼠对口服DSS和TNBS灌肠所诱导的结肠炎的易感性均明显增加,且并发结肠癌的风险明显增加,由此提示NLRP3炎性小体在结肠癌的发病过程中发挥重要功能<sup>[16-19]</sup>。Ungerback等<sup>[5]</sup>的研究也提示NLRP3基因多态性与瑞典人群中结肠癌患者的存活率密切相关。

为进一步探讨NLRP3基因多态性结肠癌的关系,本研究对3个中国汉族人群的重要SNPs位点:rs4925648、rs10754558及rs10925019进行了208例对203例的病例-对照分析研究。其中,rs4925648和rs10925019在Cummings等<sup>[20]</sup>的研究中被证实与IBD相关。rs10754558则被证实与HIV易感性相关联<sup>[21]</sup>。病例-对照分析研究中,以上3个位点遗传多态性的数据均未显示出统计学意义上的阳性结果。另外,我们同时对这三个位点之间的D'值进行分析,结果显示rs4925648-rs10925019间的D'值较大(D'=0.798)。在此基础上,我们进一步对这两个位点之间进行了单倍型分析,结果显示,在它们所形成的四种单倍型组合中,C-C,C-T,T-C以及T-T组合最终统计显示均无统计学差异(P>0.05)。此结果进一步证实我们选取的3个SNP位点与结肠癌的关联分析为阴性结果。造成这一现象的原因分析有以下几

种情况:首先是遗传异质性的影响<sup>[22]</sup>,NLRP3基因的SNP位点在不同人群中的分布频率不完全一样,并且其杂合程度也不尽相同。如在Ungerback等<sup>[5]</sup>的研究中证实与结肠癌相关的Q705K/rs35829419位点在中国人群中不存在,而我们所选取的三个位点的等位基因和基因型频率在中国汉族人群和欧洲人群中均有较大差异;其次,受本研究所选位点和样本量的局限性影响,所能提供的有效信息量有限;此外,结肠癌作为一种复杂疾病,是基因-基因、基因-环境交互作用的结果<sup>[22]</sup>,因此离开环境因素来找基因缺陷也有一定片面性,对其病因的探寻需进一步综合考量NLRP3基因与其他基因及环境因素的相互作用;考虑到NLRP3炎性小体在慢性炎症及肿瘤中的重要作用<sup>[23-26]</sup>,对该基因在结肠癌组织中的表达检测也有助于进一步确认NLRP3在结肠癌发生发展中的作用。

综上所述,尽管我们未能在中国汉族人群中检测出NLRP3与结肠癌之间的相关性,但此项工作也给后续研究工作提供了一定的参考。关于NLRP3与结肠癌之间的关系还有待于在其他人群以及更大规模的样本中得到进一步的论证。

### 参考文献 (References)

- Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* 2009; 59(6): 366-78.
- 万德森. 我国结直肠癌的流行趋势及对策. *中华肿瘤杂志*(Wan Desen. The popular trend of colorectal cancer in our country and the countermeasures. *Chinese Journal of Oncology*) 2011; 33(7): 481-3.
- Win AK, Macinnis RJ, Hopper JL, Jenkins MA. Risk prediction models for colorectal cancer: A review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21(3): 398-410.
- Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 2001; 29(3): 301-5.
- Ungerback J, Belenki D, Jawad ul-Hassan A, Fredrikson M, Fransén K, Elander N, *et al.* Genetic variation and alterations of genes involved in NF- $\kappa$ B/TNFAIP3- and NLRP3-inflammasome signaling affect susceptibility and outcome of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2012; 33(11): 2126-34.
- Yang CS, Shin DM, Jo EK. The role of NLR-related protein 3 inflammasome in host defense and inflammatory diseases. *Int Neurourol J* 2012; 16(1): 2.
- Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature* 2012; 481(7381): 278-86.
- Pontillo A, Silva LT, Oshiro TM, Finazzo C, Crovella S, Duarte AJ. HIV-1 induces NALP3-inflammasome expression and interleukin-1 $\beta$  secretion in dendritic cells from healthy individu-

- als but not from HIV-positive patients. *AIDS* 2012; 26(1): 11-8.
- 9 Wang W, Stassen FR, Surcel HM, Ohman H, Tiitinen A, Paavonen J, *et al.* Analyses of polymorphisms in the inflammasome-associated NLRP3 and miRNA-146A genes in the susceptibility to and tubal pathology of Chlamydia trachomatis infection. *Drugs Today (Barc)* 2009; 45 Suppl B: 95-103.
- 10 Grishman EK, White PC, Savani RC. Toll-like receptors, the NLRP3 inflammasome, and interleukin-1 $\beta$  in the development and progression of type 1 diabetes. *Pediatr Res* 2012; 71(6): 626-32.
- 11 Feldmann J, Prieur AM, Quartier P, Berquin P, Certain S, Cortis E, *et al.* Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIASI, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. *Am J Hum Genet* 2002; 71(1): 198-203.
- 12 Zaki MH, Lamkanfi M, Kanneganti TD. The Nlrp3 inflammasome: Contributions to intestinal homeostasis. *Trends Immunol* 2011; 32(4): 171-9.
- 13 Herszenyi L, Miheller P, Tulassay Z. Carcinogenesis in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2007; 25(3): 267-9.
- 14 Villani AC, Lemire M, Fortin G, Louis E, Silverberg MS, Collette C, *et al.* Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 2009; 41(1): 71-6.
- 15 Bauer C, Duewell P, Lehr HA, Endres S, Schnurr M. Protective and aggravating effects of Nlrp3 inflammasome activation in IBD models: Influence of genetic and environmental factors. *Dig Dis* 2012; 30 Suppl 1: 82-90.
- 16 Zaki MH, Boyd KL, Vogel P, Kastan MB, Lamkanfi M, Kanneganti TD. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* 2010; 32(3): 379-91.
- 17 Hirota SA, Ng J, Lueng A, Khajah M, Parhar K, Li Y, *et al.* NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17(6): 1359-72.
- 18 Bauer C, Duewell P, Mayer C, Lehr HA, Fitzgerald KA, Dauer M, *et al.* Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium(DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut* 2010; 59(9): 1192-9.
- 19 Allen IC, TeKippe EM, Woodford RM, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, *et al.* The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med* 2010; 207(5): 1045-56.
- 20 Cummings JR, Cooney RM, Clarke G, Beckly J, Geremia A, Pathan S, *et al.* The genetics of NOD-like receptors in Crohn's disease. *Tissue Antigens* 2010; 76(1): 48-56.
- 21 Pontillo A, Brandão LA, Guimarães RL, Segat L, Athanasakis E, Crovella S. A 3' UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; 54(3): 236-40.
- 22 McClellan J, King MC. Genetic heterogeneity in human disease. *Cell* 2010; 141(2): 210-7.
- 23 Ahmed FE. Gene-gene, gene-environment & multiple interactions in colorectal cancer. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2006; 24(1): 1-101.
- 24 Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, Lau DT, Doehle B, Papis N, *et al.* IL-1 $\beta$  production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathog* 2013; 9(4): e1003330.
- 25 Chow MT, Sceneay J, Paget C, Wong CS, Duret H, Tschopp J, *et al.* NLRP3 suppresses NK cell-mediated responses to carcinogen-induced tumors and metastases. *Cancer Res* 2012; 72(22): 5721-32.
- 26 Chow MT, Tschopp J, Möller A, Smyth MJ. NLRP3 promotes inflammation-induced skin cancer but is dispensable for asbestos-induced mesothelioma. *Immunol Cell Biol* 2012; 90(10): 983-6.