

# 结直肠癌患者β-纤维蛋白原基因多态性和血浆纤维蛋白原水平相关性的研究

王静文, 韩 韬, 陈 玺, 唐 曦

复旦大学附属华东医院肿瘤科, 上海 200040

[摘要] 背景与目的: 结直肠癌患者病程中常伴有血浆纤维蛋白原(fibrinogen, Fg)浓度的升高。该研究探讨结直肠癌人群中*FGB* β 基因-448G/A、-148C/T、-1420G/A、-854G/A的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)频率分布和血浆Fg浓度的关系, 分析其对肿瘤发生、发展的影响。方法: 采集194例结直肠癌患者和74例健康者外周血, 用实时荧光定量多聚酶链反应(real-time fluorescence quantitative PCR, RTFQ-PCR)法分析*FGB* β 基因频率分布, 用Clauss凝固法检测血浆Fg浓度。结果: 结直肠癌转移组和无转移组血浆Fg浓度均较对照组显著升高( $P<0.05$ )。疾病组中*FGB* β -148T等位基因频率和突变型基因频率均显著高于对照组( $P<0.05$ )。各组人群中*FGB* β -148T携带者的血浆Fg浓度均明显高于非携带者( $P<0.05$ )。在IV期患者中*FGB* β -148C/T突变型者中位PFS较野生型者差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论: 结直肠癌患者体内Fg浓度升高, 提示其可能参与恶性肿瘤发生、发展的过程。*FGB* β -148C/T位点的SNP是导致血浆Fg浓度改变的原因之一, 但与IV期患者的预后无关。

[关键词] 纤维蛋白原; 基因多态性; 结直肠癌

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.10.009

中图分类号: R735.3+5; R735.3+7 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)10-0807-05

**The correlation study of beta-fibrinogen gene polymorphisms and plasma fibrinogen concentration in patients with colorectal cancer** WANG Jingwen, HAN Tao, CHEN Xi, TANG Xi (Department of Oncology, Huadong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China)

Correspondence to: TANG Xi E-mail: olivia9tang@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Patients with colorectal cancer are often accompanied by the increase of plasma fibrinogen concentration. This study aimed to investigate the distribution characteristics of beta-fibrinogen gene -448G/A, -148C/T, -1420G/A and -854G/A polymorphism and plasma fibrinogen (Fg) concentration in patients with colorectal cancer. Furthermore, we analyzed their effects on the occurrence and development of cancer. **Methods:** The level of plasma Fg was quantified by using Clauss clotting method. *FGB* β gene polymorphisms were identified by real-time fluorescence quantitative PCR (RTFQ-PCR) in 194 colorectal cancer patients and 74 healthy controls. **Results:** The plasma Fg levels in tumor metastasis group and non-metastasis group were significantly higher than that in control group, respectively ( $P<0.05$ ). Compared with control group, the frequencies of -148T allele and mutation genotype were notably higher in disease group ( $P<0.05$ ). In all the groups, the plasma Fg levels of those with -148T allele were higher than those without -148T allele ( $P<0.05$ ). In stage IV patients, there was no difference in PFS between -148T wild genotype group and mutation genotype group ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** Plasma Fg concentration in patients with colorectal cancer was significantly raised, which suggests that Fg may play a role in the occurrence and development of colorectal cancer. The beta-fibrinogen gene -148C/T polymorphism is one of the reasons that cause plasma Fg elevation, but has no correlation with prognosis of patients with stage IV colorectal cancer.

[Key words] Fibrinogen; Gene polymorphism; Colorectal cancer

在引起血浆纤维蛋白原(fibrinogen, Fg)升高的疾病中, 恶性肿瘤占21.1%, 是导致血浆Fg升高的首要因素<sup>[1]</sup>。Fg是由6条多肽链 [ (A $\alpha$ 、B $\beta$ ,  $\gamma$ )<sub>2</sub> ] 通过二硫键连接成的对称性二聚体。分别由3个独立的基因编码: *FGA*、*FGB*和*FGG*。它们集中分布于染色体4q28~4q31约50 kb的区域内。其中因*FGB*编码的 $\beta$ 链是Fg合成的限速步骤而备受关注<sup>[2]</sup>。目前的研究多集中于*FGB*  $\beta$  基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP), 认为它可以影响血浆Fg的结构、功能和浓度的变化。由于恶性肿瘤患者病程中常伴有血浆Fg浓度的升高, 而Fg本身也可能参与了肿瘤发生、发展及转移的过程。因此本研究采集结直肠癌患者外周血标本, 采用结合实时荧光定量多聚酶链反应(real-time fluorescence quantitative PCR, RTFQ-PCR)法检测*FGB*  $\beta$  基因-448G/A、-148C/T、-1420G/A、-854G/A 4个位点的SNP, 分析其与血浆Fg浓度之间的关系, 并研究其与肿瘤发生、发展的相关性。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

收集复旦大学附属华东医院2011年1月—2012年12月住院治疗的结直肠癌患者资料共194例。其中结肠癌102例, 直肠癌92例。根据TNM分期标准, 将疾病组患者再分为2组。无转移组: I~II期无淋巴结及远处脏器转移且已接受根治性手术切除的患者共36例, 其中男性20例, 女性16例, 年龄26~77岁, 中位年龄58岁。转移组: III~IV期存在淋巴结及远处脏器转移的患者共158例, 其中男性95例, 女性63例, 中位年龄62岁(37~80岁)。所有患者均由手术或活检病理证实为腺癌。肿瘤转移组及无转移组合称为疾病组。另取正常对照组74例, 其中男性46例, 女性28例, 中位年龄58岁(30~82岁)。所有受检者近3个月内均未用过影响纤溶

和凝血的药物, 且无外伤及手术史。3组人群的年龄、性别构成差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 1.2 试剂与主要仪器

Fg检测试剂盒及STA Compact全自动凝血分析仪均为法国Diagnostica Stago公司产品。磁珠法DNA提取试剂盒及SYBR Green I染料购自上海灏勤生物科技有限公司。PCR引物由上海生物工程技术有限公司提供。PCR仪为美国Bio-Rad CFX产品。

### 1.3 标本采集与处理

疾病组(在初次接受抗肿瘤药物治疗前或术前1~3 d)和正常对照组分别抽取其晨起空腹外周血5 mL, 置于含有0.3 mL枸橼酸钠(109 mmol/L)的抗凝试管中, 混匀。采用Clauss凝固法做血浆Fg的定量分析, Fg正常值参考范围为2~4 g/L。用磁珠法提取全血DNA后进行PCR检测。

### 1.4 RTFQ-PCR检测

本实验原理为等位基因特异性PCR(Allele-specific PCR), 即设计引物时选择在基因组的多态性区域, 使等位基因的突变定位或接近在引物的3'端。为了提高实验的精准度, 采用RTFQ-PCR技术检测实时扩增产物(专利号200810039230.3, 上海裕隆生物科技有限公司)。各引物序列见表1。实验中使用Taq聚合酶, 以U6作为内参, 实验重复3次。qRT-PCR反应体系为20  $\mu$ L, 其中含10  $\mu$ L快速荧光定量反应预混液(含SYBR Green I染料), 200 nmol/L的上游引物, 200 nmol/L的下游引物, 200 ng的DNA和超纯水。采用两步法PCR, 反应程序为: 95  $^{\circ}$ C预变性3 min, 95  $^{\circ}$ C变性10 s, 60  $^{\circ}$ C退火10 s, 共40个循环。融解曲线分析为95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 15 s。PCR实验结束后, 分析实验数据, 同一个样本, 同一个位点, 2条基因特异性的前引物各对应1次反应。以 $\Delta Ct(A-G) \leq -5$ 为野生纯合子,  $-5 < \Delta Ct \leq 5$ 为突变杂合子,  $\Delta Ct > 5$ 为突变纯合子(图1)。

表1 RTFQ-PCR反应中*FGB*β基因中4个多态性位点的引物序列

Tab. 1 Primer sequences of *FGB*β gene polymorphisms in RTFQ-PCR

Gene	Primer (5'→3')
C-448G/A	TGGAAGGGGTCATGGTACTCAATGA[G/A] GAAGATGAGTATGAAGATCAGGCC
C-148C/T	AATAGTTCTATGACAAGTAAATAAG[C/T] TTGCTGGGAAGATGTTGCTTAAAT
C-1420G/A	TATTCCTGTATATATTTTAATTAATAGCCACATA[G/A] ATATTTGCTTTTTCT
C-854G/A	GAGAGATAAATTTTGTGGCTTGTGG[G/A] AAATGAAGGAAAATGGCCCTCATTT

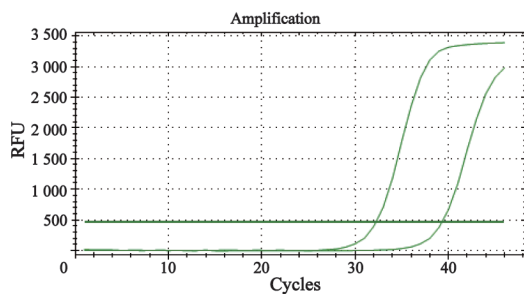


图1 纯合子基因型

Fig. 1 Homozygote genotype

1.5 随访

对92例IV期患者进行随访。随访时间起止日期为2011年1月—2014年12月，随访方式为门诊随访。无进展生存期(progress-free survival, PFS)为患者从接受治疗开始至观察到疾病进展或者发生因为任何原因死亡之间的这段时间。

1.6 统计学处理

采用SPSS 16.0统计软件进行统计分析。用基因计数法计算各组基因型频率及等位基因频率。基因型分布是否符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律及两组间等位基因频率的差异比较采

用 $\chi^2$ 检验。各组间血浆Fg浓度比较采用t检验。用Kaplan-Meier法进行生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组人群血浆Fg浓度比较

肿瘤转移组 [ (3.56 ± 1.14) g/L ] 与无转移组 [ (3.20 ± 0.95) g/L ] 的血浆Fg浓度均较正常对照组 [ (2.67 ± 0.49) g/L ] 显著升高 ( $P < 0.05$ )。但与无转移组相比，转移组血浆Fg浓度的升高并不显著 ( $P > 0.05$ )。

2.2 *FGB*β -448G/A、-148C/T、-1420G/A、-854G/A多态性分布及等位基因频率

疾病组中148T等位基因频率显著高于正常对照组(表2)。此外，疾病组中-148C/T位点突变型基因的频率较对照组明显升高 ( $P < 0.05$ )。正常对照组与疾病组之间，*FGB*β -448G/A、-1420G/A、-854G/A，这3个位点的基因型频率、等位基因频率差异均无统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

2.3 基因多态性与不同组人群血浆Fg浓度的关系

在各组人群中-148C/T突变型者的血浆Fg浓度均明显高于野生型者 ( $P < 0.05$ )。同样为-148C/T突变型，肿瘤转移组与无转移组相比血浆Fg浓度差异无统计学意义 [ (3.83 ± 1.10) g/L vs (3.71 ± 1.25) g/L,  $P > 0.05$  ]。此外*FGB*β -448G/A、-1420G/A及-854G/A的基因野生型和突变型人群之间，血浆Fg浓度差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 表3)。

表2 基因多态性分布及等位基因频率

Tab. 2 Genotype and allele frequencies

Group	n	<i>FGB</i> β-148C/T		Allele frequency		<i>FGB</i> β-448G/A			Allele frequency		Group	n	<i>FGB</i> β-1420G/A			Allele frequency		<i>FGB</i> β-854G/A			Allele frequency		
		CC	CT	TT	C	T	GG	GA	AA	G			A	GG	GA	AA	G	A	GG	GA	AA	G	A
Control	74	50	22	2	0.824	0.176	52	18	4	0.824	0.176	Control	74	54	17	3	0.845	0.155	46	21	7	0.764	0.236
Patient	194	93	82	19	0.691	0.309*	134	53	7	0.827	0.173	Patient	194	156	34	4	0.892	0.108	127	57	10	0.802	0.198

\*: Compared with control group,  $P < 0.05$

表 3 基因多态性与不同组人群血浆Fg浓度(g/L)的关系

Tab. 3 The relationship between polymorphism and Fg level

Group	( $\bar{x} \pm s$ )		
	Control(n=74)	Non-metastasis(n=36)	Metastasis(n=158)
-148C/T			
Wild genotype(n)	2.52 $\pm$ 0.49(50)	2.87 $\pm$ 0.51(22)	3.22 $\pm$ 1.05(71)
Mutant genotype(n)	2.99 $\pm$ 0.29(24)*	3.71 $\pm$ 1.25(14)*	3.83 $\pm$ 1.10(87)*
-448G/A			
Wild genotype(n)	2.68 $\pm$ 0.49(52)	3.12 $\pm$ 0.76(24)	3.53 $\pm$ 1.19(110)
Mutant genotype(n)	2.64 $\pm$ 0.49(22)	3.34 $\pm$ 1.28(12)	3.63 $\pm$ 0.93(48)
-1420G/A			
Wild genotype(n)	2.57 $\pm$ 0.49(54)	3.18 $\pm$ 1.03(30)	3.57 $\pm$ 1.15(126)
Mutant genotype(n)	2.94 $\pm$ 0.36(20)	3.30 $\pm$ 0.35(6)	3.52 $\pm$ 0.96(32)
-854G/A			
Wild genotype(n)	2.66 $\pm$ 0.47(46)	3.32 $\pm$ 1.18(21)	3.45 $\pm$ 1.13(106)
Mutant genotype(n)	2.69 $\pm$ 0.52(28)	3.03 $\pm$ 0.48(16)	3.78 $\pm$ 1.06(52)

\*:  $P < 0.05$ , compared with wild genotype

## 2.4 结直肠癌IV期患者-148C/T多态性与生存情况的关系

92例IV期患者中-148C/T野生型患者44例,-148C/T杂和、纯和突变型患者共48例。突变型患者的血浆Fg浓度较野生型患者明显升高[(4.08  $\pm$  1.25) g/L vs (3.54  $\pm$  1.17) g/L,  $P < 0.05$ ]。所有患者均接受姑息性化疗,其中野生型组的1年PFS率为25.0%,突变型组为22.9%,两组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。用Kaplan-Meier法分析两组PFS,结果显示突变型组较野生型组中位PFS虽有缩短,但差异无统计学意义(5.1个月 vs 7.6个月,  $P > 0.05$ , 图2)。

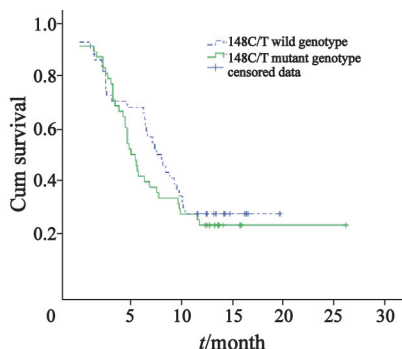


图 2 148C/T野生型和突变型两组患者PFS的比较

Fig. 2 The difference of PFS between 148C/T wild-type and mutant groups

## 3 讨 论

Fg是一种肝细胞合成和分泌的血浆糖蛋白,其在促进恶性肿瘤发生、发展方面的作用已经得到普遍的认可。临床已观察到肺癌、结肠癌、子宫内膜癌等恶性肿瘤患者术前血浆Fg浓度的升高与不良预后有相关性<sup>[3-5]</sup>。而且治疗前血浆Fg浓度也可以提示放疗或靶向药物的疗效<sup>[6-8]</sup>。对于癌症患者血浆Fg浓度普遍升高这一现象,目前认为是因为癌细胞对正常组织的破坏导致某些炎症因子和组织因子的释放,进而激活凝血过程<sup>[9]</sup>。作为一种正向反馈,Fg会进一步刺激癌细胞的生长及转移,其可能机制包括:①作为一种重要的桥连蛋白介导了肿瘤细胞与血小板之间的黏附<sup>[10-11]</sup>,有助于瘤栓的形成;②与血小板形成凝集物后阻挡NK细胞对肿瘤细胞的杀伤,参与其免疫逃逸的过程<sup>[12]</sup>;③与某些血管生长因子如成纤维细胞生长因子-2结合,阻止其被降解,进而促进肿瘤组织内血管的形成<sup>[13]</sup>。

本研究利用RTFQ-PCR法检测FGB  $\beta$  基因

-448G/A、-148C/T、-1420G/A、-854G/A位点的SNP。结果发现与健康人群相比,结直肠癌患者中-148T等位基因频率及突变基因型频率均明显升高( $P<0.05$ )。携带-148T基因的突变型者,在各组人群中其血浆Fg浓度均高于非携带者( $P<0.05$ )。提示-148C/T的SNP可能是调节血浆Fg浓度升高的原因之一,这一结果与以往报道相一致<sup>[14-15]</sup>。关于其机制,目前研究结果认为,Fg的合成受白介素6(interleukin-6, IL-6)的正向调节,而FGB $\beta$ -148C/T位点靠近IL-6调控FGB $\beta$ 基因表达的受体作用元件。因此FGB $\beta$ -148C $\rightarrow$ T的多态性改变可能增加了IL-6与受体元件的结合能力,进而提高了FGB $\beta$ 基因的转录水平<sup>[15]</sup>。

本研究未发现血浆Fg浓度与肿瘤转移的关联。此外,虽然FGB $\beta$ -148C/T突变型者的血浆Fg浓度明显高于野生型者,然而同样是IV期结直肠癌,突变型者较野生型者的中位PFS差异无统计学意义。考虑可能与样本量少以及分组时未排除其他影响因素(治疗方案、并发症等)有关。

综上所述,本研究结果显示结直肠癌患者较正常人群血浆Fg浓度明显升高,且FGB $\beta$ -148T等位基因及突变基因型频率也均显著升高,因此该位点的多态性可能是导致体内Fg浓度改变的原因之一。虽未能证实FGB $\beta$ -148C/T与IV期患者预后的相关性,但突变型组的中位PFS有缩短趋势。因此未来需要扩大样本量并严格分组来证实FGB $\beta$ -148C/T多态性是否有提示结直肠癌患者预后的作用。

#### [参 考 文 献]

- [1] 黄先国,卢义柱,李涛,等.纤维蛋白原升高原因初步分析[J].检验医学与临床.2010,7(2):111-112.
- [2] ROY S N, MUKHOPADHYAY G, REDRNAN C M. Regulation of fibrinogen assembly. Transfection of Hep G2 cells with B beta cDNA specifically enhances synthesis of the three component chains of fibrinogen [J]. J Biol Chem, 1990, 265(11): 6389-6393.
- [3] ZHAO J, ZHAO M, JIN B, et al. Tumor response and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer:

the predictive value of chemotherapy induced changes in fibrinogen [J]. BMC Cancer, 2012, 12: 330.

- [4] SON H J, PARK J W, CHANG H J, et al. Preoperative plasma hyperfibrinogenemia is predictive of poor prognosis in patients with nonmetastatic colon cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2013, 20(9): 2908-2913.
- [5] GHEZZI F, CROMI A, SIESTO G, et al. Prognostic significance of preoperative plasma fibrinogen in endometrial cancer [J]. Gynecol Oncol, 2010, 119(2): 309-313.
- [6] SILVESTRIS N, SCARTOZZI M, GRAZIANO G, et al. Basal and bevacizumab-based therapy-induced changes of lactate dehydrogenases and fibrinogen levels and clinical outcome of previously untreated metastatic colorectal cancer patients: a multicentric retrospective analysis [J]. Expert Opin Biol Ther, 2015, 15(2): 155-162.
- [7] LEE J H, HYUN J H, KIM D Y, et al. The role of fibrinogen as a predictor in preoperative chemoradiation for rectal cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2015, 22(1): 209-215.
- [8] LIU Y L, LU Q, LIANG J W, et al. High plasma fibrinogen is correlated with poor response to trastuzumab treatment in her2 positive breast cancer [J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(5): e481.
- [9] DVORAK H F. Tumors: wounds that do not heal—redux [J]. Cancer Immunol Res, 2015, 3(1): 1-11.
- [10] LONSDOR A S, KRAMER B F, FAHRLREITNER M, et al. Engagement of  $\alpha$  II b  $\beta$  3 (GP II b/III a) with  $\alpha$  v  $\beta$  3 integrin mediates interaction of melanoma cells with platelets: a connection to hematogenous metastasis [J]. J Biol Chem, 2012, 287(3): 2168-2178.
- [11] ALVESL C S, BURDICK M M, THOMAS S N, et al. The dual role of CD44 as a functional P-selectin ligand and fibrin receptor in colon carcinoma cell adhesion [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294(4): C907-C916.
- [12] PALUMBO J S, TALMAGE K E, MASSARI J V, et al. Platelets and fibrin (ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells [J]. Blood, 2005, 105(1): 178-185.
- [13] SAHNI A, BAKER C A, SPORN L A, et al. Fibrinogen and fibrin protect fibroblast growth factor-2 from proteolytic degradation [J]. Thromb Haemost, 2000, 83(5): 736-741.
- [14] VAN' T HOOFT F M, VON BAHR S J, SILVEIRA A, et al. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19(12): 3063-3070.
- [15] VERSCHUR M, DE JONG M, FELIDA L, et al. A hepatocyte nuclear factor-3 site in the fibrinogen beta promoter is important for interleukin 6-induced expression, and its activity is influenced by the adjacent -148C/T polymorphism [J]. J Biol Chem, 2005, 280(17): 16763-16771.

(收稿日期: 2015-06-25 修回日期: 2015-08-25)