文章编号:0253 - 3626(2003)01 - 0001 - 03

# 肝癌细胞表达差异 cDNA 克隆的研究

沈 薇, 吴显才

(重庆医科大学第二临床学院消化内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:筛选肝细胞癌(HCC)相关基因,探讨其在 HCC 发病中的临床意义。方法:用差异显示技术对比研究正常肝组织,胎肝组织,HCC 组织及癌旁肝组织之间 mRNA 的表达差异,以肝癌 cDNA 片段 MRG98.2 为探针,对 10 例 HCC 及癌旁肝组织进行斑点印渍分析,并通过逆转录 - 聚合酶链反应(RT - PCR)方法检测这些标本血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 的表达水平。结果:获得 55 个 HCC 差示 cDNA 片段,其中 24 个 cDNA 片段同时表达于 HCC 和胎肝组织。HCC 差示片段 MRG98.2 在 7 例 HCC 标本中表达阳性(7/10),癌旁肝组织弱表达(2/10)或无表达。VEGFmRNA 在 7 例 MRG98.2 阳性表达的 HCC 标本中 6 例表达上调。结论:胚胎期某些基因的激活与 HCC 发生有关,差示片段 MRG98.2 可能是 HCC 相关的基因片段,其表达与 VEGFmRNA 一致,并可能与肿瘤浸润转移及预后不良有关。

【关键词】mRNA 差异显示;肝细胞癌;差示片段 MRG98.2

【中国图书分类法分类号】R735.702.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2002 - 04 - 21

## Study of differentially expressed cDNA on hepatocellular carcinoma

*SHEN Wei, et al*

(*Department of Gastroenterology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To search for gene related to hepatocellular carcinoma(HCC), and study its potential significance in liver oncogenesis. *Methods*: The difference in mRNA expression among HCC, nontumorous liver tissue, fetal liver tissue and normal liver tissue was investigated by differential display technique. Ten hepatic tissues of HCC versus surrounding noncancerous liver tissues were examined with MRG98.2 as a probe in Dot blot analysis. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)mRNA in above mentioned samples was examined with reverse transcription - polymerase chain reaction(RT - PCR). *Results*: Fifty five differentially expressed cDNA fragments were isolated from HCC samples, 24 of them were present in HCC and fetal liver tissues simultaneously. Dot blot analysis showed that differential display fragment MRG98.2 expressed in 7 cases of HCC samples (7/10)but only slightly in 2 of the surrounding noncancerous hepatic tissues (2/10). The expression of VEGFmRNA was upregulation in 6/7 of HCC samples expressed MRG98.2. *Conclusion*: The activation of some genes expressed in fetal period may have an important role in the genesis of HCC. MRG98.2 may be a gene related to HCC. Its expression in HCC correlates with VEGFmRNA. MRG98.2 expression is helpful in predicting a tendency toward invasion and metastasis of HCC.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; mRNA differential display; Differential display fragment MRG98.2

HCC 是当今世界上最常见的恶性肿瘤之一,其发生发展是多种癌基因激活或抑癌基因失活所产生的后果。寻找 HCC 与癌旁肝组织之间基因的表达差异,将有助于从分子水平上阐明肿瘤的发生机理和转归。基于该目的,我们以正常肝组织、胎肝组织、HCC 组织和癌旁肝组织为对比材料,应用 mRNA 差异显示技术,研究肝癌细胞表达差异的 cDNA 克隆。

作者介绍:沈 薇(1956 - ),女,硕士,教授,主任医师,主要研究方向:慢性肝脏疾病.

基金项目:国家自然科学基金(39670810)。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本

1997 年 12 月至 1998 年 5 月收集 HCC 手术标本 10 例(重庆医科大学临床学院,第二临床学院,第三军医大学西南医院),HBV 标志物阳性者 80%(8/10 例),AFP≥400μg/L 为 40%(4/10 例),其中 9 例伴有不同程度的转移倾向(门静脉癌栓形成 3/10 例、肝内转移 2/10 例、包膜不完整 4/10 例),仅 1 例无浸润转移,肿瘤直径<5cm。全部标本病检均证实为肝细胞癌。2 例正常肝组织来自于非肝病手术患者,2 例胎肝取自 16 孕周水囊引产。

1.2 差示片段的筛选

按 Display Systems 公司试剂盒提供的操作方法进行。

1.3 阳性重组子的鉴定

分别以 3 份 HCC 和癌旁肝组织 RNA 混合物以及 2 份正常肝组织 RNA 混合物为模板，反转录时参入$^{32}$P－dCTP 进行 cDNA 单链标记作为探针，获得的 cDNA 克隆点样于尼龙膜(Hybond$^{TM}$－N$^{+}$，Amersham)上一式三张，80℃ 干燥 2h，预杂交 42℃ 2h. 然后，相同点样的三张膜分别与正常肝$^{32}$P－cDNA、HCC$^{32}$P－cDNA 及癌旁肝组织$^{32}$P－cDNA 探针杂交 48h，洗膜后－20℃ 放射自显影 3～6 天。

1.4 DNA 测序及同源性比较

用 ABI377 自动测序仪对纯化后的克隆片段进行序列分析，上网与 Genbank 核酸数据库中已知的序列进行同源性比较。

1.5 差示片段 MRG98.2 在 HCC 组织表达的研究

以差示片段 MRG98.2 为模板，扩增时参入$^{32}$P－dCTP，通过 PCR 标记 cDNA 探针。分别以 10 份 HCC 组织和癌旁肝组织 RNA 为模板进行 RT－PCR，然后将每份样品点样于尼龙膜上，杂交条件同上。

1.6 VEGFmRNA 在 HCC 组织的表达研究

方法参照文献[1]以 10 份 HCC 和癌旁肝组织的 RNA 为模板，β－actin 为内照，经 RT－PCR，1.2% 琼脂糖电泳显示 VEGFmRNA 的表达情况。

## 2 结　果

2.1 mRNA 差异显示

从正常肝、胎肝、HCC 和癌旁肝组织中共获得 84 个差示片段，其中单独出现于正常肝组织 2 个，癌旁肝组织 17 个，HCC 组织 31 个，同时表达于 HCC 和胎肝组织的有 24 个，同时表达于正常肝和癌旁肝组织的有 10 个。

选择 24 条 HCC 差示片段回收，23 条获得特异性扩增，分子量为 130～350bp，通过 T－A 克隆得到 16 个重组子。

2.2 阳性重组子的鉴定

斑点杂交结果显示，7 个重组子与肝癌探针有很强的杂交信号，其余 9 个杂交信号不明显或与正常肝、癌旁肝和 HCC 探针存在重叠反应。

2.3 DNA 序列分析和同源性比较

7 个有杂交信号的 HCC 差示片段，经自动核酸测序分析，cDNA 片段为 147～374bp，上网与 Genbank 已知序列作同源性比较，仅 1 个片段与 β－蛋白有 98% 的同源性，其余 6 个均为未知序列。

2.4 差示片段 MRG98.2 在 HCC 组织的表达研究

从上述 7 个有杂交信号的 HCC 差示片段中随机选择 MRG98.2 进行斑点杂交，初步分析显示，MRG98.2 在 7 例 HCC 组织表达阳性(7/10)例，癌旁肝组织仅 2 例可见较弱的杂交信号(2/10 例)，与差示结果基本一致。

2.5 VEGFmRNA 在 HCC 组织的检测结果

在 HCC 组织中 VEGFmRNA 的表率 80%(8/10 例)，癌旁肝组织的表达率是 30%(3/10 例)。在 MRG98.2 阳性表达的 7 例 HCC 标本中，6 例 VEGFmRNA 表达上。

## 3 讨　论

mRNA 差异显示技术[2]可快速灵敏地筛选和克隆差异表达基因，已成为寻找新基因的有效手段。但是其①假阳性率高，②得到的 cDNA 片段通常仅 300bp，并且多位于 mRNA3′端非翻译区，使得该方法在实际应用中受到极大的限制，需要在实践中不断完善和发展[3]。在研究中采用 RT－PCR 标记单链 cDNA 探针，斑点杂交鉴定已获得的 cDNA 克隆，可避免大量无意义片段的测序分析，此方法简便有效，值得推广。由于分离筛选得到的 cDNA 片段短，对应 mRNA 表达丰度低，是造成 Northern blot 失败的主要原因之一。以待检标本的 RNA 为模板，RT－PCR 放大引物介导扩增的特异 mRNA，再与 PCR 标记的 cRNA 探针进行杂交验证，获得 MRG98.2 在 HCC 表达的阳性结果。然而，全长片段的得到仍有赖于 Northern blot，cDNA 文库筛选，RACE 法[4](rapid amplification of cDNA ends)或 mRNA5′逐渐步移法[5]。

肿瘤标志物的研究在经历了 70 年代的癌胚抗原，80 年代的糖链抗原，现已进入到基因标志的研究。在筛选肝癌相关基因时增加了胎肝组织，结果与预期的相符合，在 55 个 HCC 差示 cDNA 片段中，有 24 个同时表达于 HCC 和胎肝组织，而在正常肝、癌旁肝组织均无表达。揭示这些胎肝基因在成熟后不再表达，但是在肝细胞癌变时重新激活，说明基因选择性表达是许多生理和病理现象的基本调控方式，为肿瘤标志物的研究深入到基因水平提供了实验依据。

在收集的 10 例 HCC 病例中，9 例均伴有不同程度的肝内或肝外浸润转移，其中 3 例患者在术后半年内相继死亡，2 例分别于术后 3 个月和 5 个月

复发，这些病例均属中晚期 HCC。差示片段 MRG98.2 在该组标本中表达阳性(7/10 例)，提示 MRG98.2 与 HCC 相关，并可能与 HCC 浸润转移有关。为进一步证实这一推测，选择与肿瘤浸润转移有关的 VEGF[1,6]进行检测。在 MRG98.2 阳性表达的 7 例 HCC 组织中，6 例 VEGFmRNA 表达上调，而本组标本中仅 1 例无转移倾向，肿瘤直径＜5cm 的 HCC，MRG98.2 和 VEGFmRNA 表达均呈阴性，显示 MRG98.2 与 VEGFmRNA 的表达具有良好的相关性。本组小样本实验结果初步说明，差示片段 MRG98.2 与 HCC 相关，并可能与 HCC 的浸润转移以及 HCC 患者的预后有关。MRG98.2 在无转移倾向 HCC 的表达情况，与 VEGF 的关系，在 HCC 发生发展过程中的作用，以及 MRG98.2 全长片段的获得均有待于进一步研究和证实。

## 参 考 文 献

[1] 李小明，汤钊猷，周 铬，等. 血管内皮细胞生长因子的表达与肝细胞癌侵袭和转移的关系[J]. 中华肿瘤杂志，1998;20(1):12－14.

[2] Ling P, Averboukh L, Keyomarsi K, et al. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells [J]. Cancer Res, 1992;52(24):6966－6968.

[3] Sun Y, Hegamyer G, Colburn NH. Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells: one is homologous to human tissue inhibitor metalloproteinase－3 [J]. Cancer Res, 1994;54(5):1139－1144.

[4] Rompf R, Kahl G. mRNA differential display in agarose gel [J]. Bio Techniques, 1997;23(3):28－32.

[5] Sompayrac L, Jane S, Burn TC, et al. Overcoming limitation of the mRNA differential display technique [J]. Nucleic Acid Res, 1995;23(22):4738－4739.

[6] Mise M, Arii S, Higashituji H, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor [J]. Hepatology, 1996;23(3):455－464.

# 消 息

本刊经上级主管部门批准自 2003 年由季刊改为双月刊，逢双月 20 日出版。每期定价 8 元，全年 48 元。邮发代号 78－132，欢迎广大读者到当地邮局订阅，或请直接汇款到本刊编辑部。地址：重庆市渝中区医学院路 1 号，重庆医科大学 384 号信箱，邮编：400016。

我刊为《中国科学引文数据库》、《中国学术期刊综合评价数据库》、《中文科技期刊数据库》三大数据库期刊源，并被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。如有不愿加入上述数据库者，请作者提前申明。

凡国家自然科学基金及各种政府基金课题论文，本刊将予以优先发表，稿费从优。

本刊编辑部已搬迁至图书馆大楼八楼，电话：(023)68485032。