DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.023
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
1570 2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)17-1570-03

食管癌微卫星DNA不稳定性及其与临床病理的关系研究

颜 坤[1],王明荣[1],房殿春[2],杨 康[1] (第三军医大学西南医院:[1]胸心外科,[2]全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 检测食管癌中MSI的状况并探讨其与食管癌临床病理特征之间的关系。方法 应用PCR单链构象多态性(PCR-SSCP)技术检测微卫星DNA不稳定性。结果 45例食管癌组织中MSI有10例,检出率22.22%;MSI与临床分期、病理分级、淋巴结转移、浸润深度等无显著性差异。结论 MSI可能是食管癌发生过程中的早期分子事件,在部分食管癌发生过程中起一定的作用。

关键词:食管癌;微卫星不稳定性;单链构象多态性
中图法分类号:R394.2;R735.1 文献标识码:A

Study of the instability of microsatellite DNA and its relationship with clinical pathological parameters in esophageal cancer

YAN Kun[1], WANG Ming-rong[1], FANG Dian-chun[2], YANG Kang[1] ([1]Department of Cardiothoracic Surgery, [2]Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To detect the state of microsatellite instability (MSI) and investigate the relationship between MSI and clinical pathological parameters in esophageal cancer. Methods MSI was analyzed by PCR-SSCP method. Results MSI was detected (22.22%) in 45 cases of esophageal cancer. Effects of MSI on clinical stage, pathological classification, lymph node metastasis, and invasion were not found. Conclusion MSI may be an early molecular pathway and play a certain role in the development of the esophageal cancer.

Key words: esophageal cancer; microsatellite instability; PCR-SSCP

遗传学研究表明,一个正常细胞逐步获得恶性表型需要多个遗传改变的积累。一类是癌基因、抑癌基因和细胞凋亡相关基因等;另一类是近来发现的错配修复基因(mismatch repair gene, MMR),认为它是肿瘤发生的一种新的机制。错配修复基因突变子表型最常见的为微卫星DNA序列的不稳定性(microsatellite instability, MSI)。目前已有研究表明MSI与胃癌[1]、结直肠癌[2]、子宫内膜癌[3]等有明确的关系。与食管癌的关系,国内报道较少。本实验对45例食管癌组织中MSI表达情况进行了研究,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 病例资料

收集本院2002年6—10月手术切除的45例食管鳞状细胞癌患者。男性28例,女性17例,年龄51~72岁,平均年龄(58.45±5.27)岁。分化程度:高-中分化34例,低分化11例。按UICC(1997)TNM分期:T2N0M0 2例(5.3%),T3N0M0 13例(29.0%),T2N1M0 5例(10.5%),T3N1M0 22例(47.4%),T4N-M0 2例(5.3%),T-N-M1 1例(2.6%)。即Ⅰ-Ⅱ期20例;Ⅲ-Ⅳ期25例。

肿瘤组织在原发灶取材,避开坏死、炎症区域;正常组织取自距肿块边缘5.0 cm以上的食管粘膜。标本取出后立即置液氮保存备用。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA样品抽提 组织标本0.1 g,经蛋白酶K消化,酚-氯仿提取,乙醇沉淀后,溶于TE溶液中,紫外线分光光度计定量。

1.2.2 聚合酶链式反应(PCR) 两个微卫星位点是BAT26和D2S123位点,分别为单核苷酸(A)n和二核苷酸(CA)n的重复序列,引物由北京鼎国生物技术公司合成。PCR反应总体积为20 μl,含*Taq*酶1.4 u(北京鼎国公司),10× Buffer 2.0 μl,引物10 μmol/L,dNTP,400 μmol/L,Mg^{2+} 25 mmol/L,模板DNA 100 ng。循环条件:先94 ℃预变性4 min,再30次循环:94 ℃ 60 s,53 ℃ 50 s,72 ℃ 50 s,最后72 ℃延伸7 min。

1.2.3 9%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染 取PCR产物8 μl加入8 μl上样液(95%去离子甲酰胺,20 mmol/L EDTA,0.025%二甲苯晴,0.025%溴芬蓝,pH 8.0),98 ℃变性5 min,立即置于碎冰上保持单链状态,取15 μl于9%变性聚丙烯酰胺凝胶(含尿素8 mmol/L),200 V,电泳1 h。最后凝胶银染。

1.2.4 结果观察 在凝胶成像仪下观察记录。将同一病例癌组织与相应正常组织PCR产物同时上样比较,若癌组织的电泳条带与正常组织相比出现等位基因条带的增多或移位即为MSI。阳性病例经再次PCR扩增证实。

作者简介:颜 坤(1970—),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事食管癌发生的分子机制方面的研究。电话:(023)66781419

收稿日期:2003-06-15;修回日期:2003-09-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

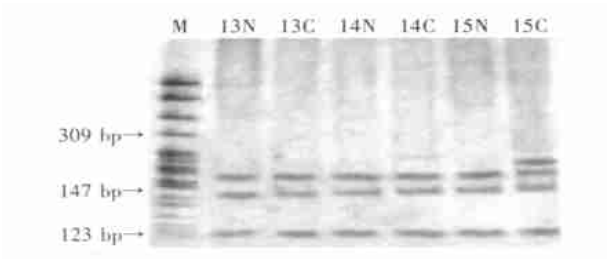
1.3　统计分析

采用 χ^2 检验和 Fisher' s 确切概率法检验。

2　结果

2.1　食管癌 MSI 的检测情况

45 例食管癌中微卫星 D2S123 位点 MSI 阳性有 9 例(20.0%), 微卫星 BAT26 位点 MSI 阳性有 3 例(6.67%)。至少一个位点检出 MSI 者 10 例(22.22%), 两个位点同时检出 MSI 者 1 例(2.22%), 见图 1, 表 1。



M: DNA marker(pBR322DNA/Msp I); N: Normal; C: Cancer

图 1　D2S123 位点 PCR-SSCP 分析, 15C 发生 MSI

Fig 1　PCR-SCCP for loci D2S123, MSI was found at 15C

表 1　食管癌组织中 MSI 的检出情况

Tab 1　MSI detection in esophageal cancer

Microsatellite locus	Locus of chromosome	Information unit	MSI(+)	Positive rate of MSI (%)
D2S123	2P15-16	45	9	20.00
BAT26	2P21-22	45	3	60.67
D2S123+BAT26		45	2	4.44
Total		45	10	22.22

2.2　MSI 与食管癌临床特征之间的关系

根据患者临床分期、病理分级、浸润深度、淋巴结转移等, 将 45 例样本进行分组。统计结果显示, mtMSI 与食管癌的临床分期、病理分级、浸润深度、淋巴结转移之间无显著性差异($P>0.05$), 见表 2。

表 2　MSI 与食管癌临床病理特征之间的关系

Tab 2　Relationship between MSI and clinical pathological parameters in esophageal cancer

Pathological parameter	*n*	MSI(+)	MSI(-)	χ^2	*P*
Clinical stage					
I-II	20	7	13		
III-IV	25	3	22	3.401	0.065
Pathological classification					
Well-Moderate	34	6	28		
Poor	11	4	7	1.680	0.195
Lymph node metastasis					
Absent	15	4	11		
Present	30	6	24	0.257	0.612
Serosal invasion					
Absent	7	3	4		
Present	38	7	31	2.042	0.153

3　讨论

微卫星 DNA 是真核细胞基因组中大量而随机出现的简单串联重复序列, 其通过改变 DNA 结构或通过与特异性蛋白质结合而发挥其基因调控作用, 是一类新的, 多态信息容量高的分子标志。

某些微卫星在特定的肿瘤中更容易发生 MSI, 就是说存在 DNA 不稳定热点区。D2S123 在不同肿瘤的 MSI 阳性率有明显差异, 在 HNPCC 中高达 91%, 在乳腺癌、肝癌中却未发现其有不稳定性。研究表明[4] BAT26 位点检测结直肠肿瘤 MSI 达 99.4%~99.5%; 同时, BAT-26 位于 hMSH2 的第 5 个内含子中, 它的异常致使 hMSH2 功能缺陷, 从而被认为是导致 MSI 极为重要的原因, 故研究结直肠肿瘤 MSI 时, BAT26 位点为首选位点。胃癌的 BAT26 对识别高频率 MSI 十分敏感[5]。有关食道癌 MSI 研究结果不尽一致。Nakashima 等[6] 检测了 D2S119、D2S123 等多个位点, 结果显示食管癌 MSI 阳性率为 18%。Ogasawara 等[7] 在研究食道鳞癌 10 个微卫星位点 MSI 中的检出率为 60%, MSI 与各项病理参数无关。本实验显示, 45 例食管鳞癌 D2S123、BAT26 位点 MSI 总阳性率为 22.22%, 其中 D2S123 位点有 9 例(20.0%), BAT26 位点有 3 例(6.67%), 与文献报道基本相符。BAT26 位点在食管癌的 MSI 并不常见, 提示位点特异的微卫星 DNA 不稳性可能与部分原发食管鳞癌的发生发展有关。BAT26 对识别食管癌 MSI 的敏感性差, 似乎提示与结直肠癌、胃癌不同, 在食管癌的 MSI 发生过程中, 错配修复基因 hMSH2 突变并未发挥重要作用。可能有其它的错配修复基因突变引起相应敏感位点的 MSI 在食管鳞癌的发生中起作用, 或另有其他途径导致食管癌 MSI, 进而促进癌的发生, 有待进一步研究。

近来证实 MSI 是 HPNCC、肺癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌的早期分子标志。由于微卫星改变多发生在肿瘤组织, 而正常组织很少发生改变, 使肿瘤特异的 MSI 用于肿瘤的早期诊断成为可能[8]。本研究根据患者临床分期、病理分级、浸润深度、淋巴结转移等进行分组, 发现 MSI 与食管癌临床特征之间无显著性差异($P>0.05$)。与上述报道类似, 提示食管癌 MSI 在早期肿瘤中即已发生, 而未参与食管癌细胞的分化和侵袭, 它们是食管癌发生过程中的早期分子事件。另外通过检测 MSI 可间接反映错配修复基因异常, 并且检测 MSI 方法简捷, 结果可靠, 价钱低廉, 作为临床用于筛选癌症高危人群的一种新型、有效的分子手段, 具有潜在的、巨大的应用前景。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献：

[1] Habano W, Sugai T, Nakamura S I, *et al*. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma[J]. Gastroenterology, 2000, 118(5): 835－841.

[2] Bianchi N O, Bianchi M S, Richard S M. Mitochondrial genome instability in human cancers[J]. Mutat Ras, 2001, 488(1): 9－23.

[3] Richard S M, Bailliet G, Paez G L, *et al*. Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(15): 4231－4237.

[4] Zhou X P, Hoang J M, Li Y J, *et al*. Determination of thereplication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites[J]. Genes Chromosomes Cancer, 1998, 21(2): 101－107.

[5] 房殿春, 罗元辉, 杨仕明, 等. 胃癌微卫星不稳定性与移码突变的关系[J]. 中华消化杂志, 1999, 19(6): 385－387.

[6] Nakashima H, Mori M, Masaki K, *et al*. Microsatellite instabillityin Japanese esophageal carcinoma[J]. Int J Cancer, 1995, 64(4): 286－289.

[7] Ogasawara S, Maesawa C, Tamura G. Frequent mricrosatellite alterations on chromosome 3P in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 1995, 55(11): 891.

[8] 陈国安, 孙 燕, 李申德, 等. 肺癌组织中微卫星 DNA 的改变[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(3): 166－168.

（编辑 栾 嘉）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)17-1572-02

人 TNFRI cDNA 的克隆及酵母表达载体的构建

Cloning of human TNFRI cDNA and construction of yeast expression vector

代佳平，毛琼国，王 燕，梁 红，刘 昕 （第三军医大学基础医学部分子遗传学教研室，重庆 400038）

本实验利用反转录聚合酶链反应（RT-PCR）以人单核淋巴细胞系 U937 细胞总 RNA 为模板，扩增出人 TNFRI 型受体胞外区约 224 个氨基酸残基的 cDNA 序列，将此片段为模板，采用巢式 PCR 技术扩增出编码 TNFRI 胞外区约 180 个氨基酸的 DNA 序列，将其克隆于载体 PDM18-T 进行序列测定，随后构建于新型酵母表达载体 PGBKT7-DNA-BD，为进一步通过酵母双杂交获得拮抗 TNFRI 的具有生物学活性的多肽奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

U937 由本教研室提供，质粒 PDM18-T 以及连接酶为宝生物公司产品，PGBKT7-BD 购自 Clontech，RPMI 1640 培养基，TripureRNA 抽提试剂，dNTP，DNA 回收试剂盒均为 Roche 公司产品，PCR 引物由上海基康公司合成，AMV、*Taq* 酶、*Sal* Ⅰ、*Eco*RⅠ内切酶购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 U937 细胞的培养 在含 10% 小牛血清的 1640 培养液中，37 ℃，5%CO 条件下培养。

1.2.2 细胞总 RNA 的提取 采用 Tripure 试剂提取总 RNA，操作按说明书进行。

1.2.3 RT-PCR 扩增 编码人 TNFRI 的 cDNA 上游引物：5′GGGGATCCATGGGCCTCTCCACCGTGCCTG，下游：5′GGTCTAGACTAGAGCTTGGACTTCCACCGTTG 逆转录 cDNA 反应遵照如下操作进行，RNA 2 μg、下游引物混合物 2 μl、ddH_2O 12 μl 65 ℃ 10 min，再加入 AMV 2 μl、5× buffer 8 μl、RNA 酶抑制剂 0.5 μl、dNTP 4 μl、ddH_2O 5.5 μl，经 42 ℃ 反应 1 h、99 ℃ 5 min。PCR 反应体系：取 cDNA 10 μl、上下游引物混合物 2 μl、dNTP 2 μl、10× buffer 5 μl、25 mmol/L MgCl 1.5 μl、*Taq* 酶 1 μl/5 U、ddH_2O 12.5 μl，经 94 ℃ 变性 10 min，然后 94 ℃ 40 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 1 mim，30 个循环，最后 72 ℃延伸 10 mim。经琼脂糖电泳证实 PCR 产物为 712 bp 目的片段。

1.2.4 巢式 PCR 扩增 TNFRI 胞外区上游引物：5′AGGATTCACCCATATGCTGGTCCCTCACCTA，下游：5′TGGAGTGCACGAAGTTGTGCAATCGTCGACCTGC 以获得片段（712 bp）为模板进行 PCR 反应：模板 1 μl、引物混合物 4 μl、dNTP 4 μl、10× buffer 5 μl、25 mmol/L MgCl 3 μl、*Taq* 酶 1 μl/5 U、ddH_2O 25 μl 总体积 50 μl，94 ℃变性 10 mim、94 ℃ 40 s、64 ℃ 45 s、72 ℃ 1 mim 30 个循环，最后延伸 72 ℃延伸℃10 mim。

1.2.5 PCR 产物鉴定 取 5 μl 产物与 1.5% 琼脂糖电泳，以 *Eco*RⅠ＋*Hind*Ⅲ双酶切 lamdaDNAMarker 作标准，凝胶扫描仪下观察。

1.2.6 PCR 产物的纯化及序列鉴定 RT-PCR 产物采用 DNA 回收试剂盒纯化目的片断，按操作说明书进行。巢式 PCR 获得片断与 PDM18-T 载体连接并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，蓝白斑筛选阳性克隆，经 *Sal*Ⅰ和 *Eco*RⅠ双酶切鉴定，挑取阳性重组子，由上海基康公司完成序列测定。

1.2.7 TNFRI 酵母双杂交表达载体的构建 将目的片段克隆于酵母表达载体 PGBKT7-DNA-BD 中 *Sal*Ⅰ和 *Eco*RⅠ双酶鉴定筛选重组子。

（下转 1575 页）

作者简介：代佳平（1969－），女，重庆市人，实验师。电话：(023)68753670
通信作者：刘 昕，电话：(023)68753670

收稿日期：2003-08-22；修回日期：2004-01-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net