DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.04.022
第26卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 4
338 2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)04-0338-03

原发性肝癌染色体17P微卫星不稳定性及突变型P53蛋白的表达

吴 凯,房殿春,罗元辉,刘为纹 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)及突变型P53蛋白在原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生中的作用。方法 采用PCR为基础的方法及免疫组织化学技术检测了48例手术切除肝癌标本染色体17P的MSI及突变型P53蛋白的表达。结果 肝癌MSI总阳性率为8.3%(4/48),突变型P53蛋白表达阳性率为39.6%(19/48),MSI在肝癌的不同发病年龄、性别,是否伴有肝硬化、血清HBsAg和AFP是否阳性及是否存在突变型P53蛋白的表达组无显著差异($P>0.05$),但AFP阳性肝癌突变型P53蛋白的表达阳性率明显高于AFP阴性肝癌($P<0.01$)。结论 MSI与大多数HCC发生无关,HCC中p53基因突变的致癌机制不是通过MSI病理途径。

关键词:原发性肝癌;微卫星不稳定性;突变型P53蛋白表达
中图法分类号:R394.3;R730.23;R735.7 文献标识码:A

Microsatellite instability of chromosome 17p and mutant P53 protein expression in hepatocellular carcinoma

WU Kai, FANG Dian-chun, LUO Yuan-hui, LIU Wei-wen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of microsatellite instability (MSI) and mutant P53 protein expression on the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma (HCC). Methods MSI and mutant P53 protein expression in 48 surgical specimens of HCC were detected by using PCR-based method and immunohistochemical method. Results MSI was detected in 4 (8.3%) specimens of HCC. Of the 48 specimens of HCC, 19 (39.6%) were positive for mutant P53. MSI was not associated with sex, age, liver cirrhosis, HBsAg, AFP of HCC, and mutant P53 protein expression ($P>0.05$). However, P53 positive rate in AFP-positive HCC was significantly higher than that in AFP-negative HCC ($P<0.01$). Conclusion MSI may not be involved in the genesis of HCC, and the carcinogenic mechanism of p53 gene mutation in most of the HCCs may not be realized through the pathological pathway of MSI.

Key words: hepatocellular carcinoma; microsatellite instability; P53 expression

基因不稳在胃肠道肿瘤的发生中起重要作用。这种基因不稳可分为两种不同的形式,即染色体不稳(chromosome instability),亦称肿瘤抑制途径(suppressor pathway)和微卫星不稳(microsatillite instability, MSI),也称MSI途径(MSI pathway)[1,2]。我们过去对胃癌的研究表明,多数胃癌的发生系通过肿瘤抑制途径,涉及APC/MCC、DCC和p53基因等抑癌基因的杂合缺失(loss of heterozygosity, LOH);而少数胃癌系通过MSI途径,由于错配修复基因异常,导致了TGFβRⅡ、BAX、hMSH6等基因单核苷酸水平突变率的增加[3,4]。现有研究表明,多数原发性细胞肝癌(HCC)的发生是通过肿瘤抑制途径,涉及到多条染色体片段的丢失[5,6],而MSI途径是否参与了HCC的发生尚无定论[7,8]。p53基因突变在HCC的发生中起重要作用[9],已有研究表明,HCC组织MSI与p53突变似无相关性[10],但与p53表达的关系尚缺乏深入研究。为了研究MSI及突变型P53蛋白的表达在HCC发生中的作用及两者的关系,本研究采用PCR为基础的方法及免疫组织化学技术检测了肝癌组织的MSI及突变型P53蛋白的表达。

1 资料与方法

1.1 组织标本

48例肝癌及正常肝组织均为我院1992年11月至1997年3月手术切除标本,手术切下肿瘤后立即收集癌及切缘处正常组织,剔除出血坏死组织后,立即置-80 ℃冰箱保存备用。

作者简介:吴 凯(1960-),女,山东省泰安市人,主治医师,主要从事消化系疾病诊疗方面的研究,现在解放军309医院工作。电话:(023)68765189

收稿日期:2002-10-17;修回日期:2003-02-17

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

1.2　DNA 提取

将正常及癌组织连续冷冻切片 20 张(5 μm), 取其中一张做 HE 染色, 在显微镜下区分癌及正常组织, 对照该片从未染色切片上刮取正常及肝癌标本, 确保肝癌标本中癌细胞至少占 70%, 正常组织中无癌细胞, 采用蛋白酶 K 消化, 酚/氯仿抽提法提取基因组 DNA。

1.3　MSI 分析

选用 D17S799 和 D17S261 两个微卫星位点分析胃癌 MSI。引物由上海细胞生物研究所合成, 序列见表 1。采用 PCR 仪(480)型扩增微卫星 DNA。PCR 反应体积为 10 μl, 含 1× Buffer ($MgCl_2$ 15 mmol/L) 1 μl, 引物各 0.5 μmol/L, 4× dNTP 各 0.2 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1U, 基因组 DNA 100 ng, α-[^{32}P] dCTP 5 μl (37× 10^4 Bq)。循环参数为 93 ℃ 40 s、56 ℃ 40 s、72 ℃ 60 s, 35 个循环后置 72 ℃继续反应 10 min, 取扩增产物 5 μl 加等量上样缓冲液(98%去离子甲酰胺, 0.025% 二甲苯蓝, 0.025%溴酚蓝, 10 mmol/L EDTA)在 95 ℃条件下变性 5 min 后快速冷却, 在 9%变性聚丙烯酰胺凝胶(含 7 mmol/L 尿素)上电泳 30 W 3 h 后采用柯达 X 线片于－80 ℃进行放射自显影 24～72 h(凝胶用干胶机干燥), 观察结果。

表 **1**　引物序列

Tab 1　Primer sequence used in this study

MSI locus	Primer sequence
D17S261	5′-CAGGTTCTGTCATAGGACTA-3′
	5′-TTCTGGAAACCTACTCCTGA-3′
D17S799	5′-ATTGCCAGCCGTCAGTT-3′
	5′-GACCAGCATATCATTATAGACAA-3′

1.4　免疫组织化学染色

p53 抗体及 SABC 试剂盒均购自中山生物制品公司, 以 PBS 作为空白对照, 正常血清作为替代对照, 正常肝组织作为正常对照。

1.5　结果分析

与正常组织比较, 肝癌组织有额外的 DNA 片段或出现电泳带的移位即可判断为 MSI。细胞核及核周出现棕黄色颗粒为阳性。

1.6　统计学分析

以 χ^2 检验和四格表确切概率法对相关数据进行统计处理。

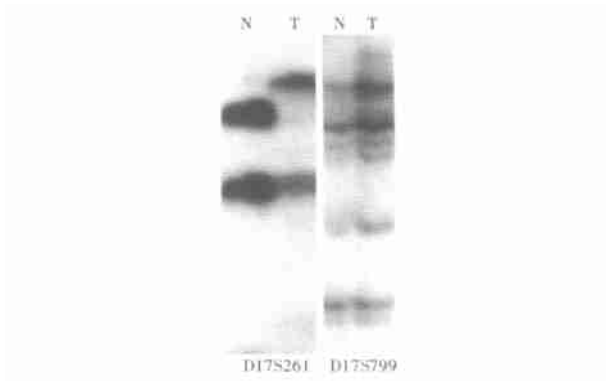
2　结果

2.1　肝癌 MSI 检出率及突变型 P53 蛋白的表达

2 个微卫星位点经 PCR 扩增, MSI 电泳变化见图 1。2 个微卫星位点 MSI 检出率分别为: D17S261 4.2%(2/48)、D17S799 4.2%(2/48)。将 2 个位点综合分析, 共检出 MSI 4 例, 阳性率为 8.3%(4/48)。48 例肝癌突变型 P53 蛋白阳性率为 39.6%(19/48), 见图 2。

2.2　MSI 及突变型 P53 蛋白表达与临床参数的关系

将 48 例肝癌按年龄、性别、肝硬化情况、HBsAg 阳性、AFP 阳性情况进行分组, 由表 2 可见, MSI 与肝癌的发病年龄、性别、有无肝硬化、HBsAg 及 AFP 阳性情况无显著性差异($P>0.05$)。突变型 P53 蛋白表达在不同发病年龄、性别、是否伴有肝硬化及 HbsAg 是否阳性组无显著性差异($P>0.05$), 但 AFP 阳性肝癌突变型 P53 蛋白的表达阳性率明显高于 AFP 阴性肝癌($P<0.01$)。



N: Normal tissue; T: Tumor tissue

图 **1**　肝癌微卫星 **DNA** 不稳

Fig 1　Microsatellite instability in hepatocellular carcinoma

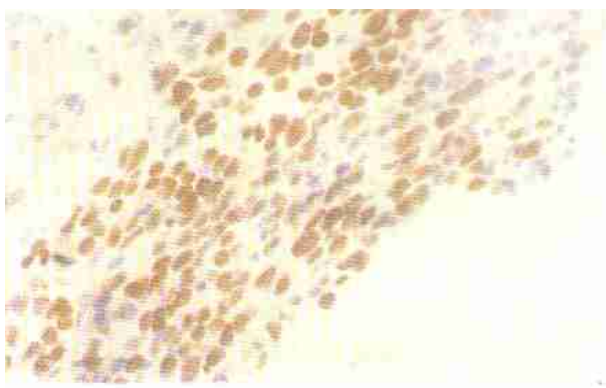


图 **2**　肝癌组织突变型 **P53** 蛋白表达　(SABC× 200)

Fig 2　Mutant P53 protein expression in hepatocellular carcinoma (SABC× 200)

表 **2**　肝癌组织 **MSI** 和突变型 **P53** 蛋白表达与临床参数关系

Tab 2　Relationship of MSI and P53 protein expression with clinicopathological parameters

Parameter		*n*	MSI+	Mutant P53 expression
Age	＞40	36	2	15
	＜40	12	2	4
Sex	Male	39	4	15
	Female	9	0	4
Cirrhosis	Positive	36	3	16
	Negative	12	1	3
HBsAg	Positive	35	3	14
	Negative	13	1	4
AFP	Positive	24	2	15 *
	Negative	24	2	4

*: $P<0.01$, *vs* AFP-negative HCC

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

2.3 MSI 与突变型 P53 蛋白表达的关系

将 48 例肝癌分为 MSI 阳性及阴性两组，由表 3 可以看出，MSI 阳性肝癌组织突变型 P53 蛋白阳性率为 25% 与 MSI 阴性肝癌组(40.9%)相比，差异无显著性意义($P>0.05$)。

表 3 MSI 与突变型 P53 蛋白表达的关系

Tab 3 Relationship between MSI and mutant P53 expression

	n	Mutant P53 expression (%)
MSI positive	4	1(25.0)
MSI negative	44	18(40.9)

3 讨论

微卫星是由 1～6 核苷酸组成的散布于整个基因组中的短小串联重复的 DNA 序列。MSI 是指由于复制错误引起的简单重复序列的增加或丢失。肿瘤遗传学表明，细胞恶性转化与基因组的不稳定性有关，而基因组不稳定性是由错配修复基因缺陷引起的 MSI 所致。关于 MSI 与肝癌发病之间的关系，国外[4～6]文献报道 MSI 的检出率为 6%～40%。本研究 MSI 检出率为 8.3%，且 MSI 与肝癌的发病年龄、性别、是否伴肝硬化、是否携带 HBsAg 及 AFP 是否阳性无关。MSI 在 HCC 中检测结果相差较大，结合文献及作者的工作，考虑有以下几个原因：①可能与种族差异有关；②与选择的检测位点及数目不同有关；③与病例选择标准，如是否有肝硬化及是否有肝炎病毒感染有关；④与各家采用判断 MSI 的标准不尽一致有关。总之，本研究结果说明，MSI 在大多数 HCC 的发生中并不起重要作用。

p53 基因突变与 HCC 的发生有密切的关系，是 HCC 发生发展过程中的重要基因改变[6]。p53 在正常组织表达量低，半衰期短，很难被检测到，故免疫组化检测出的均为突变型 P53 蛋白。突变型 P53 蛋白不但丧失了抑癌活性，反而具有了恶性转化能力。文献[11]报道 HCC 突变型 P53 蛋白表达的阳性率为 48.9%，本组的阳性率为 39.6%。此外，我们还发现突变型 P53 蛋白与肝癌患者的发病年龄、性别、是否伴有肝硬化及 HBsAg 是否阳性无显著相关性，但 AFP 阳性肝癌突变型 P53 蛋白的表达阳性率明显高于 AFP 阴性肝癌，与文献[12]报道的检测结果相一致。

不同 HCC 中突变 p53 基因的表达也有明显不同，这种不同可能与致癌因素密切相关。本研究结果并未发现突变型 P53 蛋白表达与 HBsAg 有相关关系，提示突变型 P53 蛋白表达与 HBV 感染可能无关。晚近有研究报道指出，HCC 发生 p53 突变与黄曲霉毒素 B_1 致癌因素有关，但本组突变型 P53 蛋白表达是否与黄曲霉毒素 B_1 有关[13,14]，尚需进一步研究。

p53 基因位于染色体 17p13.1，Kazachkov 等[10]研究 HCC 组织 p53 基因突变与 MSI 的关系，结果提示在多数 HCC 中 p53 基因突变与 MSI 并无相关性。本研究检测了 48 例手术切除肝癌标本染色体 17P 的 MSI 并分析了其与突变型 P53 蛋白表达的关系，MSI 阳性组肝癌突变型 P53 蛋白的阳性率为 25%，MSI 阴性组阳性率为 40.9%，差异无显著性。由此推断，p53 基因突变不是由 17P 微卫星位点 MSI 所致。

参考文献：

[1] Modrich P. Mismatch repair, genetic stability, and cancer[J]. Science, 1994, 266(5193): 1959—1960.

[2] Aaltonen L A, Peltomaki P, Leach F S, *et al*. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer[J]. Science, 1993, 260(5109): 812—816.

[3] Fang D C, Jass J R, Wang D X, *et al*. Infrequent loss of heterozygosity of APC/MCC and DCC genes in gastric cancer showing DNA microsatellite instability[J]. J Clin Pathol, 1999, 52(7): 504—508.

[4] Fang D C, Yang S M, Zhou X D, *et al*. Telomere erosion is independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2001, 7(4): 522—526.

[5] Nakau M, Miyoshi H, Seldin M F, *et al*. Hepatocellular carcinoma caused by loss of heterozygosity in Lkb1 gene knockout mice[J]. Cancer Res, 2002, 62(16): 4549—4553.

[6] Feitelson M A, Sun B, Satiroglu Tufan N L, *et al*. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis[J]. Oncogene, 2002, 21(16): 2593—604.

[7] Wang L, Bani-Hani A, Montoya D P, *et al*. hMLH1 and hMSH2 expression in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Oncol, 2001, 19(3): 567—570

[8] Piao Z, Kim H, Malkhosyan S, *et al*. Frequent chromosomal instability but no microsatellite instability in hepatocellular carcinomas[J]. Int J Oncol, 2000, 17(3): 507—512.

[9] Ming L, Thorgeirsson S S, Gail M H, *et al*. Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China [J]. Hepatology, 2002, 36(5): 1214—1220.

[10] Kazachkov Y, Yoffe B, Khaonstov V I, *et al*. Microsatellite instability in human hepatocellular carcinoma. Relationship to p53 abnormalities[J]. Liver, 1998, 18(2): 156—161.

[11] 赵爱志，窦科峰，李开宗，等. 肝细胞肝癌中 p53、ras 基因与血管内皮生长因子表达的关系[J]. 中华实验外科杂志，2000，17(5)：424—425.

[12] Caruso M L, Valentini A M. Overexpression of p53 in a large series of patients with hepatocellular carcinoma: a clinicopathological correlation[J]. Anticancer Res, 1999, 19(5B): 3853—3856.

[13] Zhang Y J, Chen Y, Ahsan H, *et al*. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relationship to aflatoxin B1-DNA adducts and p53 mutation in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2003, 103(4): 440—444.

[14] Smela M E, Hamm M L, Henderson P T, *et al*. The aflatoxin B(1) formamidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(10): 6655—6660.

(编辑 刘洪娥)

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