DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.04.026
第26卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 4
346 2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)04-0346-03

原发性肝癌细胞核和线粒体DNA微卫星不稳定性研究

方 丽,房殿春 (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 探讨细胞核和线粒体DNA微卫星不稳在原发肝癌发生中的作用及两者的关系。方法 采用限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction, single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP)方法检测原发性肝癌线粒体DNA微卫星不稳(mitochondrial microsatellite instability, mtMSI);采用PCR方法检测细胞核BAT26微卫星位点不稳定性(nuclear microsatellite instability, nMSI)。结果 52份肝癌组织检出mtMSI 11例(21.2%),其中仅1个微卫星位点mtMSI阳性者7份(13.5%),有2个微卫星位点mtMSI阳性者4例(7.7%)。有4份于BAT26位点检出nMSI,阳性率为7.7%。肝癌mtMSI发生率在患者同性别、年龄、是否合并乙型肝炎病毒感染和肝硬化、AFP是否阳性组无显著性差异($P>0.05$),亦未发现mtMSI与nMSI有显著相关。结论 mtMSI在部分原发性肝癌的发生中起重要作用,肝癌mtMSI与nMSI无关。

关键词:肝癌;线粒体微卫星不稳;BAT26
中图法分类号:R394.2;R730.23;R735.7 文献标识码:A

Nuclear and mitochondrial microsatellite instability in primary hepatocellular carcinoma

FANG Li, FANG Dian-chun (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the roles of nuclear microsatellite instability (nMSI) at BAT26 and mitochondrial microsatellite instability (mtMSI) in the genesis and development of primary hepatocellular carcinoma. Methods mtMSI was detected using polymerase chain reaction, single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis, and nMSI by PCR method. Results Fifty-two cases of primary hepatocellular carcinoma were studied for mtMSI and nMSI. The mtMSI in at least one locus was detected in 11 out of 52 (21.2%) cases. Out of the 11 cases with mtSMI, 7 showed mtMSI at one locus (13.5%) and 4 at two loci (7.7%), but none at more than three loci. The nMSI at BAT26 was detected in only 4 out of 52 (7.7%) cases. mtMSI was found not to be associated with sex, age, HBsAg, cirrhosis of liver, AFP level, and nMSI ($P>0.05$). Conclusion mtMSI may be involved in the carcinogenesis of some hepatocellular carcinomas, but mtMSI is not associated with nMSI.

Key words: hepatocellular carcinoma; mitochondrial microsatellite instability; BAT26

线粒体是细胞独特而重要的细胞器,过去认为其只是人体的"能量供应站",实际上线粒体的功能远比人们了解的更为复杂[1]。线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)独立于细胞核DNA之外,能独立进行复制、转录和翻译,具有非常活跃的自我复制能力。由于真核细胞线粒体DNA几乎均是小于20 kb的闭环分子,与核基因组相比,其分子量小,缺乏组蛋白保护,易受致癌物攻击,且其缺乏损伤修复系统,因此是致癌物的重要靶点。研究发现黄曲霉素B1与肝细胞mtDNA结合量高于核DNA 3~4倍,且这些结合物不易被清除,可在线粒体内较长时间存在[2]。此外,人体内90%以上的氧直接与线粒体的电子传递体系一呼吸链相联系,大量的自由基在有氧代谢过程中不断地产生,由于线粒体内氧浓度很高,易产生自由基及过氧化氢等物质,它本身又不能合成谷胱甘肽而将这些过氧化物有效地清除,因此线粒体及mtDNA易受氧化性损伤。线粒体受损以后可通过改变细胞能量产生,提高线粒体氧化压力,引起线粒体酶表达异常和/或调控凋亡等途径,影响细胞的生物学行为[3~5]。关于线粒体DNA微卫星不稳(mitochondrial microsatellite instability, mtMSI)在原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生中的作用,以及它与核DNA微卫星不稳(nuclear microsatellite instability, nMSI)的关系,尚缺乏深入研究。本研究采用PCR为基础的方法,检测了原发肝癌组织mtMSI和nMSI,以期阐明其在HCC发生中的作用,从另一角度揭示原发肝癌的发病机制。

1 材料和方法

1.1 病例资料

收集本院1992—1998年手术切除的52例肝癌组织,其中

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070043)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070043)
作者简介:方 丽(1977—),女,湖北省咸宁县人,硕士,医师,主要从事肝癌发病机制方面的研究 电话:(028)83016948
收稿日期:2003-03-01;修回日期:2003-04-20

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

男性42 例, 女性 10 例, 年龄 22～71 岁, 平均48. 8 岁。手术前均未接受放疗或化疗。取材后部分标本用 10% 甲醛固定, 其余立即放置于－80 ℃超低温冰箱保存备用。每例病人抽血 5 ml, 分离淋巴细胞。将固定的肝癌及正常肝组织连续冰冻切片 20 张(5 μm), HE 染色, 显微镜下观察, 证实肝癌组织中肿瘤细胞占 70%以上。肝癌和淋巴细胞基因组 DNA 的提取采取酚/氯仿异戊醇提取法。

1. 2　mtMSI 的检测

采用 PCR 为基础的方法扩增 mtDNA 微卫星序列, 见表 1。参照 Habano 等[6]的资料, 引物包括 2 个控制区(D-loop)区和 5 个编码区的 mtDNA 微卫星序列, 由上海生工生物工程公司合成。引物序列见表 1。PCR 反应条件及步骤见文献[6]。取扩增产物 5 μl 与等体积的加样缓冲液混合, 90 ℃变性 5 min 后, 迅速置于碎冰中。病变样本与正常淋巴细胞样本配对加样, 在 7. 5%非变性聚丙烯酰胺上低温电泳, 电压 50 V。电泳 3 h 后, 凝胶银染, 在凝胶成像仪上扫描, 记录结果。

表 1　mtMSI PCR 分析所用的引物序列

Tab 1　Sequences of primer used in PCR analysis

Repeated sequence	mtDNA region	Position	Annealing (℃)	Primer
(C)n	270-425	D-loop	58	5′-TCCACACAGACATCAATAACA-3′
				5′-AAAGTGCATACCGCCAAAAG-3′
(A)n	467-556	D-loop	55	5′-CCCATACTACTAATCTCATCAA-3′
				5′-TTTGGTTGGTTCGGGGTATG-3′
(C)6	3529-3617	ND1	55	5′-CCGACCTTAGCTCTCACCAT-3′
				5′-AATAGGAGGCCTAGGTTGAG-3′
(A)7	4555-4644	ND2	55	5′-CCTGAGTAGGCCTAGAAATAAA-3′
				5′-ACTTGATGGCAGCTTCTGTG-3′
(T)7	9431-9526	COIII	55	5′-CCAAAAAGGCCTTCGATACG-3′
				5′-GCTAGGCTGGAGTGGTAAAA-3′
(C)6 and (A)8	270-425	ND5	55	5′-CACCCTAACCCTGACTTCC-3′
				5′-GGTGGATGCGACAATGGAAT-3′
(CCT)3 and (AGC)3	12940-13032	ND5	55	5′-GCCCTTCTAAACGCTAATCC-3′
				5′-TCAGGGGTGGAGACCTAATT-3′

1. 3　nMSI 的检测

选择微卫星位点 BAT26, 重复序列(A)n, 引物序列参照 Hoang 等[7], 由上海生工生物工程公司合成。上游引物: 5′-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3′, 下游引物: 5′-AACCATTCAACATTTTT-AACCC-3′, 产物长度 120 bp。PCR 反应体积 20 μl, 包括 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8. 3), 50 mmol/L KCl, 1. 5 mmol/L $MgCl_2$, 200 μmol/L dNTP, 上下游引物各 0. 5 μmol/L, 0. 75 U Taq DNA 多聚酶(Perkin-Elmer, USA)和 100 ng 基因组 DNA。PCR 反应条件为 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 35 个循环, 最后 72 ℃延伸 10 min。有聚丙烯酰胺电泳带的移位判定为该位点 nMSI 阳性。

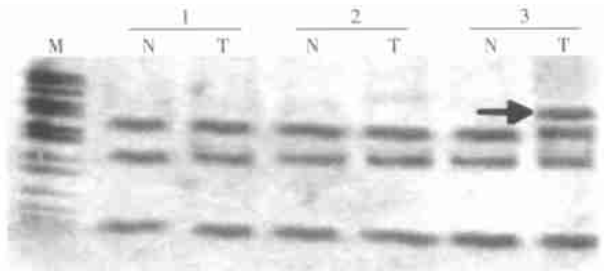
1. 4　统计学分析

采用 χ^2 检验。

2　结果

2. 1　mtMSI 检测结果

mtMSI 检测结果见图 1。将 7 个位点综合分析, 52 例样本中有 11 例(21. 2%)表现为 mtMSI。其中仅 1 个位点 mtMSI 阳性者 7 例(13. 5%), 有 2 个位点 mtMSI 阳性者 4 例(7. 7%)。分别统计 D-loop 区和编码区, 发现 D-loop 区有 10 例(19. 2%)表现 mtMSI, 其中 8 例发生在(C)n 区, 占 D-loop 区 80%, 而(CA)n 区仅 2 例, 占 D-loop 区 20%。编码区有 5 例(9. 6%)表现 mtMSI, 其中 4 例同时合并 D-loop 区 mtMSI, 占编码区 80%。



1－3: Typical cases; M: Marker; N: Normal tissue; T: Tumor tissue; Arrow: mtMSI

图 1　肝癌组织 mtDNA 微卫星不稳(mtMSI)

Fig 1　mtMSI in mtDNA of tumor tissue

根据患者性别、年龄、是否合并乙型肝炎病毒感染(HBsAg 阳性)、是否合并肝硬化、AFP 是否阳性, 我们将 52 例样本进行分组。统计结果显示, 肝癌 mtMSI 发生率在上述各组间无显著性差异($P > 0.05$), 见表 2。

表 2　mtMSI 与临床指标的关系

Tab 2　Relationship between mtMSI and clinical parameters

		n	mtMSI Positive	mtMSI Negative
Sex	Male	42	10	32
	Female	10	1	9
Age (year)	≤30	1	1	0
	30-60	41	8	33
	≥ 60	10	2	8
HBsAg	Positive	38	8	30
	Negative	14	3	11
Cirrhosis	Positive	37	9	28
	Negative	15	2	13
AFP	Positive	26	6	20
	Negative	26	5	21

2. 2　nMSI 检测结果

通过 PCR 扩增 BAT26 位点、电泳和银染, 52 例原发肝癌中有 4 例出现额外新的电泳条带或电泳条带的移位, 阳性率为 7. 7%, 其中 1 例同时合并 mtMSI。而在 48 例 nMSI 阴性样本中, 有 10 例表现 mtMSI。

3　讨论

线粒体是迄今发现的人类细胞核外唯一具有自己基因组, 且能不依赖 nDNA 进行复制、转录和翻译的细胞器, 被称为"人类第 25 号染色体"。业已发现, 很多疾病的发生均与线粒体结构和功能缺陷有关, 因此有人将这些疾病统称为线粒体疾病。对胃癌、结直肠癌、乳腺癌等研究表明 mtMSI 是一种非常常见的现象, 可能在这些肿瘤的发生过程中起重要作用[8～10]。本研究检测了 52 例原发性肝癌 7 个 mtDNA 微卫星位点的 mtMSI, 11 例检出 mtMSI, 阳性率为 21. 2%。其中仅 1 个位点 mtMSI 阳性者 7 例, 2 个位点 mtMSI 阳性者 4

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

例,未检测到3个或更多位点mtMSI阳性者。以上结果提示,mtMSI不但存在于胃肠道等肿瘤,在肝癌也比较常见,可能在部分原发肝癌的发生中起重要作用。

肝癌常常发生于HBV病毒感染引起的慢性炎症之后。通过研究肝癌发生过程中mtDNA突变与病毒感染的关系发现,与对照肝组织相比,HCC个体癌及癌旁肝标本mtDNA突变频率均显著增加,肝癌mtDNA突变的积聚可反映恶性程度。HBV病毒感染相关HCC mtDNA突变频率明显高于其他类型肿瘤,提示与慢性病毒性肝炎引起肝组织反复的破坏和再生导致mtDNA突变的积聚有关[11]。本实验对肝癌mtMSI进行分析,并未发现mtMSI检出室在合并HBV感染肝癌和未合并HBV感染肝癌组有显著差异。以上差异可能与下列原因有关:①种族差异;②选择微卫星位点不同;③判断MSI的标准不统一;④判断HBV病毒感染的标准不同,如有人选择HBV-DNA阳性为准,有人选择HBsAg阳性为准;⑤病例筛选时,对是否合并肝硬化未做明确规定。因此,制定统一的标准对实验结果的比较十分重要。

D-loop区是mtDNA重链、轻链的复制起点,为人类mtDNA的主要非编码区,对mtDNA的转录和复制起调控作用。肿瘤细胞mtDNA结构改变主要发生在D-loop区。文献报道,在部分胃癌和结肠癌组织中,mtDNA的D-loop区发生突变,结果具有统计学意义。本研究52例肝癌中有11例表现为mtMSI,其中D-loop区有10例,编码区有5例,且4例同时合并D-loop区mtMSI。以上结果提示,与编码区相比,D-loop区是mtMSI发生的靶位。在D-loop区mtMSI阳性样本中,8例发生在(C)n区,而(CA)n仅2例,可见(C)n区检测敏感性又优于(CA)n区,与文献[6]报道的检测结果相一致。

错配修复基因hMSH2突变在遗传性非息肉性大肠癌和部分散发性肿瘤的发生中起重要作用。BAT-26位于错配修复基因hMSH2的第5个内含子中,它的异常可干扰hMSH2第5内含子的剪切、缝接效率。在胃肠道肿瘤,高频率微卫星不稳肿瘤几乎均表现为BAT-26改变[9],故BAT-26为研究结直肠癌MSI的首选位点。对肝癌的nMSI的检出率各家报道的结果不尽相同,多数文献报道肝癌的nMSI属于低频率,BAT-26位点的MSI发生率极低[12]。本研究52例原发肝癌有4例在BAT-26位点检出nMSI,阳性率为7.7%,提示原发肝癌BAT-26位点nMSI并不常见。也提示原发肝癌的发生与胃肠道肿瘤不同,可能涉及到一条与MSI不同的分子途径。

mtDNA突变可致肿瘤发生,已为人们普遍接受,但机制尚不完全清楚。近年来,人们把目光逐渐转向mtDNA与nDNA的相互作用方面,试图找到其中的关联。有学者发现,在胃癌中mtMSI与nMSI有相关性[8]。但也有人得出相反的研究结果[13]。本研究在54例原发肝癌中检测出nMSI 4例,其中1例同时合并mtMSI。未能证实肝癌mtMSI与nMSI有相关关系。

目前已在多种肿瘤发现有mtDNA突变,突变mtDNA容易在各种癌的体液中被检测到,这有可能为癌的非侵入性检测提供一种有效的分子标记。检测胰腺癌细胞mtDNA突变发现,mtDNA体细胞突变几乎发生于所有的检测标本之中[14],有希望在临床诊断上应用。全世界肝癌每年发病约26万人,其中42.5%发生在我国,如能从线粒体基因不稳、突变和表达方面进行深入研究,可能不仅有助于揭示原发肝癌的发病机制,而且可能为其临床诊断、治疗和预防提供新的思路。

参考文献:

[1] Martinou J C. Apoptosis. Key to the mitochondrial gate[J]. Nature, 1999, 399(6735): 411-412.

[2] Niranjan B G, Bhat N K, Avadhani N G. Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B1 during hepatocarcinogenesis[J]. Science, 1982, 215(4528): 73-75.

[3] Green D R, Reed J C. Mitochrondria and apoptosis[J]. Science, 1998, 281(5381): 1309-1312.

[4] Susin S A, Lorenzo H K, Zamzami N, *et al*. Molecular characterization of mitochrondrial apoptosis-inducing factor[J]. Nature, 1999, 397(6718): 441-443.

[5] Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the releases of apoptogenic cytochrome C by the mitochondrial channel VDAC[J]. Nature, 1999, 399(6735): 483-487.

[6] Habano W, Nakamura S I, Sugai T. Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: Evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome[J]. Oncogene, 1998, 17(15): 1931-1937.

[7] Hoang J M, Cottu P H, Thuille B, *et al*. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines[J]. Cancer Res, 1997, 57(2): 300-303.

[8] 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.

[9] Habano W, Sugai T, Yoshida T, *et al*. Mitochondrial gene mutation, but not large-scale deletion, is a feature of colorectal carcinomas with mitochondrial microsatellite instability[J]. Int J Cancer, 1999, 83(5): 625-629.

[10] 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.

[11] Nishikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S, *et al*. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2001, 61(5): 1843-1845.

[12] Yamamoto H, Itoh F, Fukushima H, *et al*. Infrequent widespread microsatellite instability in hepatocellular carcinomas[J]. Int J Oncol, 2000, 16(3): 543-547.

[13] Maximo V, Soares P, Machado J C, *et al*. Mitochondrial DNA alteration in gastric cancer[J]. Gastroenterology, 2000, 119(6): 1808-1809.

[14] Jones J B, Song J J, Hempen P M, *et al*. Detection of mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer offers a "massive" advantage over detection of nuclear DNA mutations[J]. Cancer Res, 2001, 61(4): 1299-1304.

(编辑 陈聪连)

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