DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.23.016
第25卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 23
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)23-2101-02

论著

食管癌BAT-26位点微卫星不稳的分析

颜 坤[1],王明荣[1],房殿春[2],杨 康[1] (第三军医大学附属西南医院:[1]胸心外科;[2]全军消化专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨食管粘膜BAT-26位点微卫星不稳定性(Microsatellite Instability,MSI)及其单态性的情况。方法 组织DNA提取后PCR扩增,扩增产物行9%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,最后银染等方法,分析45例食管癌及正常切缘组织BAT-26位点微卫星不稳的情况。结果 所有正常组织在BAT-26位点DNA电泳条带长度无明显改变,45例食管癌中有3例MSI改变。结论 食管粘膜BAT-26具有较好的单态性,食管癌细胞BAT-26位点对识别高频率MSI不十分敏感。

关键词:微卫星;微卫星不稳定性;BAT-26;单态性
中图法分类号:R394.2;R735.1 文献标识码:A

Analysis of microsatellite instability at BAT-26 locus in esophageal cancer

YAN Kun, WANG Ming-rong, FANG Dian-chun, YANG Kang (Department of Cardiothoracic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the microsatellite instability (MSI) and monomorphism at microsatellite DNA BAT-26 locus in esophageal mucosa. Methods Genomic DNA extracted from tissues was amplified by PCR. PCR products were run on 9% denaturing polyacrylamidegel and stained with silver. Then MSI and monomorphism of microsatellite at BAT-26 locus in normal tissues at the incised edge and esophageal cancer tissues in 45 cases of esophageal caner were analyzed. Results All normal specimens showed no change in the length of MS DNA at BAT-26 locus. MSI was detected in 3 out of 45 (6.7%) cases of esophageal cancer. Conclusion BAT-26 has complete monomorphism in genome of normal esophageal tissues, but is not sensitive to the identification of MSI.

Key words: microsatellite; microsatellite instability; BAT-26; monomorphism

微卫星不稳定性(Microsatellite Instability,MSI)主要表现为高度多态性,在许多肿瘤如胃癌[1]、结直肠癌[2]、子宫内膜癌[3]等的发生中具有重要的作用。有报道表明消化系统微卫星(Microsatellite,MS)BAT-26位点对识别高频率MSI十分敏感,其单态性也很好,但食管癌中BAT-26位点还少有报道。本研究通过检测食管癌组织及其正常切缘粘膜的BAT-26位点的变化,以便了解BAT-26位点MSI及单态性情况。

1 材料与方法

1.1 标本

来源于西南医院胸心外科经手术切除的新鲜病理组织、正常切缘食管组织,标本取出后立即置液氮保存备用。

1.2 DNA提取

组织标本0.1 g,经蛋白酶K消化,酚-氯仿提出,乙醇沉淀后,溶于TE溶液中,紫外线分光光度计测定浓度和纯度。

1.3 聚合酶链式反应(PCR)

BAT-26位点引物序列参照文献[4]报道:上游:5′-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3′;下游:5′-AACCATTCAACATTTTTAACCC-3′;(上海Sangon公司合成)。PCR反应体积为20 μl,含*Taq*酶1.4 U,10× Buffer 2.0 μl(北京鼎国公司),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。

1.4 9%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

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。凝胶银染,在凝胶成像仪下观察记录。

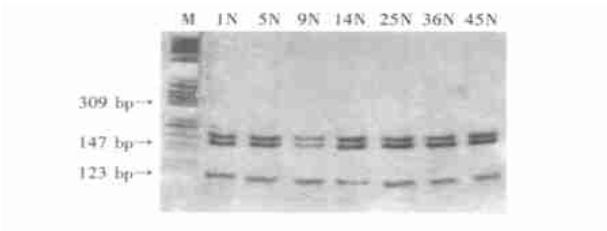
2 结果

45例正常切缘食管粘膜BAT-26微卫星DNA长度基本一致,电泳条带无明显变化,均显示出较好的单态性,见图1。食管癌组织中有3例出现异常电泳条带,即MSI阳性,检出率为6.67%,见图2。

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)65392937

收稿日期:2003-04-05;修回日期:2003-09-19

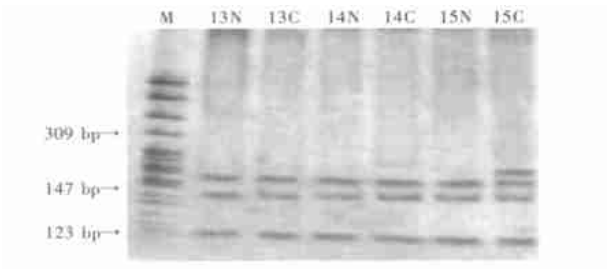
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



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

图 1 正常粘膜组织 BAT26 位点 PCR-SSCP 分析，无异常电泳条带

Fig 1 PCR-SCCP analysis of BAT26 locus in normal mucous tissues. No abnormal electrophoretic band is found



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

图 2 BAT26 位点 PCR-SSCP 分析发生 MSI

Fig 2 MSI is detected by PCR-SCCP analysis of BAT26 locus

3 讨论

微卫星是位于基因组中的简单重复的核苷酸序列，具有高度多态性，表现为相同微卫星位点 DNA 长度在不同的个体不同。目前认为 MSI 产生是由于 DNA 多聚酶的滑动导致重复序列中 1 个或多个碱基的错配，同时配对错误修复基因的功能缺陷不能正常地发挥修复所致。还有学者提出，广泛、重度的 DNA 损伤超过 DNA 修复功能时，也可能出现 MSI，这就是所谓的过饱和机制，在这种机制下，DNA 的错配修复功能是完善的。MSI 首次在 HNPCC 中发现，并认为是肿瘤发生的一个新的机制。

有研究认为，某些微卫星位点在特定的肿瘤中更容易发生 MSI，就是说存在微卫星 DNA 不稳定热点区[5]。BAT-26 位于错配修复基因 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，BAT-26 位点为首选位点。文献报道 27 种 MSI 表型的结肠癌细胞株和 160 例 MSI 阳性的结肠癌几乎均显示 BAT26 突变[6]。对胃癌的研究也显示，BAT26 对识别高频率 MSI 十分敏感[7]。有关食道癌 BAT-26 位点的研究未见报道。本实验中 45 例食道鳞癌样本有 3 例在 BAT26 位点表现 MSI 阳性，阳性率为 6.7%。证实 BAT-26 位点对识别食管癌 nMSI 的敏感性差，似乎提示与结直肠癌、胃癌不同，在食管癌的 nMSI 发生过程中，错配修复基因 hMSH2 突变并未发挥重要作用。说明有其它的错配修复基因变化引起的 MSI 在食管癌的发生中起作用。另一可能就是过饱和机制。能否用该学说解释食管癌 nMSI 的发生，或另有其他途径导致食管癌 nMSI，进而促进癌的发生，有待进一步研究。

此外，人体基因组中存在成百上千个 MS 位点，选择特异性位点来研究显得很重要。体内大多数微卫星位点 DNA 长度在人群中不一致，即多态性显著，因此在选这些位点检测 MSI 时，每例肿瘤标本必须均设立邻近正常组织作为自身对照，否则会出现较多的假阳性。本组 45 例食管粘膜正常组织 BAT-26 位点长度无明显差异，条带基本一致，说明 BAT-26 位点在正常人群基因组中单态性较好。与狄金明等[8]研究的结果一致。因而在选取这一位点研究 MSI 时可以不必每例肿瘤标本均设立自身正常对照。通过这样的步骤，可以节省大量的物力、财力、时间，对于更方便地推向临床应用无疑具有一定的现实意义。

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] 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.

[5] Arzimanogou I I, Gibert F, Barber H R K. Microsatellite instability in human lolidtumors[J]. Cancer Res, 1998, 82(12): 1808.

[6] Zhou X P, Hoang J M, Li Y J, *et al*. Determination of the replication 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.

[7] 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(16): 385—387.

[8] 狄金明, 张一楚, 顾琴龙, 等. 微卫星 BAT-26 位点单态性的分析[J]. 肿瘤防治研究, 2001, 28(2): 124—125.

（编辑 汪勤俭）

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