DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.020
第25卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 9
792 2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)09-0792-03

非小细胞肺癌E-钙粘蛋白基因异常的研究

张国桥[1],王志新[1],刘 昕[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院全军肿瘤治疗中心,重庆 400037;[2]基础医学部分子遗传学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察非小细胞肺癌组织中E-钙粘蛋白(E-cadherin)的基因异常。方法 采用PCR-SSCP及序列分析,研究了24例非小细胞患者肺癌组织中E-cadherin基因外显子6、7、8、9的基因突变。结果 24例非小细胞肺癌中发现2例存在E-cadherin exon9的基因插入、缺失及突变。结论 E-cadherin在非小细胞肺癌中存在基因异常改变,尤其集中在E-cadherin的细胞外区域,主要表现为插入及缺失,细胞外区域的基因异常改变可能是造成上皮细胞粘附力下降的主要原因。

关键词:非小细胞肺癌;E-cadherin基因;多聚酶链式反应-单链构象多肽性
中图法分类号:R394.3;R730.23;R734.2 文献标识码:A

The study of E-cadherin gene abnormality in non-small cell lung cancer

ZHANG Guo-qiao, WANG Zhi-xin, LIU Xin (Department of Oncology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To observe the E-cadherin gene abnormality in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** E-cadherin gene mutations in exons 6, 7, 8 and 9 in 24 cases of non-small cell lung cancer were studied by PCR-SSCP and DNA sequence analysis. **Results** Abnormality of the E-cadherin gene was found in exon 9 by means of insertion, deletion and mutation in 2 cases. **Conclusion** Abnormality of E-cadherin gene is present in NSCLC by means of insertion and deletion in extracelluar matrix. The main cause of the decrease in epithelial adhesion may be resulted from the abnormality gene change of the E-cadherin.

Key words: non-small cell lung cancer; E-cadherin gene; PCR-SSCP

细胞的癌变是一个多因子、多步骤的复杂过程,基因的点突变、缺失、重排等改变都可能导致有关原癌基因的激活或抑癌基因的失活。

国外研究表明:肿瘤细胞间的粘附下降是导致肿瘤发生、发展的重要原因之一[1]。E-cadherin是一类介导细胞与细胞间互相粘附的钙依赖性跨膜糖蛋白,存在于上皮细胞中,在维持上皮细胞的极性,形态,组织发生中起着重要作用[2],而E-钙依赖粘附蛋白表达异常是导致细胞间粘附下降的重要原因。Berx等[3]在小叶乳腺癌中对钙粘蛋白的16个外显子作了详尽的分析,发现突变大多存在于外显子6~10,而这正是钙粘蛋白编码的胞外区,这个区域内的编码发生错误,可以导致E-cadherin的功能异常,上皮细胞粘附下降。本研究从基因水平上对非小细胞肺癌E-cadherin基因的外显子6~9进行了研究,目前国内外尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 标本

经病理确诊的24例非小细胞肺癌(Non-small cell lung carcinoma, NSCLC)及其正常组织手术标本均取自本院胸外科,其中鳞癌10例、腺癌10例、腺鳞癌1例、大细胞癌3例,男性17例,女性7例,年龄26~77岁,2例正常肺组织取自相应的正常肺,手术切除组织迅速置于液氮中冷冻后-70 ℃保存备用。

1.2 组织DNA制备

按照《细胞和组织DNA提取试剂盒》(Roche氏公司)说明,提取组织DNA,紫外分光光度计测定A_{260}、A_{280}(BIO RAD公司),确定DNA的纯度及含量,其余样品放-20 ℃贮存备用。

1.3 引物设计及合成

根据Kanenori研究资料,分别扩增E-cadherin基因外显子6、7、8、9,引物由上海生工生物工程公司合成,引物序列及各自片段长度见下[9]。

Exon 6(234 bp)
GGGTCCAAACCTAAGAG TCCTCATCAGAGCTCAAGTC
Exon 7(263 bp)
TGCCCAGTCCCAAAGTGCAG TCCACACCCTCTGGATCCTC
Exon 8(182 bp)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870350)
作者简介:张国桥(1970-),男,四川省广元市人,硕士,主治医师,现在成都军区昆明总医院肿瘤科,主要从事肺癌发机制方面的研究。电话:(0871)5414384
收稿日期:2002-11-21;修回日期:2003-02-17

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

AGGTGGCTAGTGTTCCTGG　　CCTTTCTTTGGAAACCCTCTA

Exon 9(253 bp)

GACACATCTCTTTGCTCTGC　　GGACAAGGGTATGAACAGCT

1.4　E-cadherin 基因的 PCR 扩增

在 0.5 ml 离心管中, 加入 1~25 号样品 DNA 各 250 ng, 10×PCR 缓冲液 2.5 μl, 4 种 dNTP 各 200 μmol/L, 扩增区域一对引物各 50 pmol/L, 25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μl, TaqDNA 聚合酶 0.5 U, 加灭菌双蒸水至总体积 25 μl, 混匀后离心, 置于 PTC-100(美国生产)热循环仪中, 按照下列参数进行循环 95 ℃预变性 5 min, 95 ℃变性 30 s, 58 ℃退火 45 s, 72 ℃ 延伸 60 s, 35 个循环, 72 ℃延伸 10 min。取 PCR 产物 5 μl 经 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 其余放—20 ℃保存。

1.5　PCR 产物 SSCP 分析

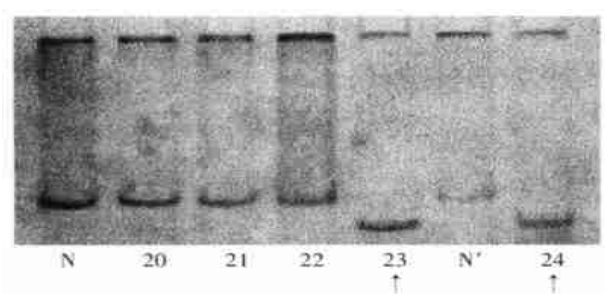
取 PCR 产物 5 μl, 加等体积变性液(95%甲酰胺、20 mmol/L EDTA, 0.025%溴酚蓝), 混匀后煮沸 5 min, 冰上骤冷 2 min, 上样于非变性 8%PAGE 凝胶, 1× TBE 缓冲液体系下, 80 V, 40 W 电泳 12 h, 电泳结束后按下列方法进行银染① 固定: 10%冰醋酸 45 min, ② 冲洗: 10% 无水乙醇 5 min, ③ 预处理: $K_2Cr_2O_7$ (1 g/L), 0.2 ml HNO_3(10 mmin), ④漂洗: 双蒸水 2 min× 3 次, ⑤银染: $AgNO_3$(2 g/L), 30 min, ⑥漂洗: 双蒸水 2 min× 3 次, ⑦显影: Na_2CO_3(30 g/L), 0.5 ml 37%HCOH 5~10 min, ⑧终止: 10%冰醋酸 50 ml, ⑨保存: 10%冰醋酸 4 ℃保存。

1.6　序列分析

将 PCR-SSCP 观察到的移动条带的 PCR 产物取 50 μl, 相对应的上、下引物(终浓度 10 pmol/μl)各取 30 μl, 纯化并测序。(上海基康生物技术有限公司, 3700 型 DNA 测序仪)。

2　结果

应用 PCR-SSCP 技术以正常肺组织 DNA 为对照, 24 例非小细胞肺癌组织中 2 例存在异常, 均发生在 Exon 9 上, 见图 1。



PCR-SSCP: N; N': Normal lung tissue; Cases 20—24: NSCLC tissue

图 1　尖头所示为 23, 24 号标本 E-cadherin Exon 9 银染移动条带

Fig 1　Arrowheads show E-cadherin Exon 9 in cases 23 and 24

序列分析发现, 在 30 号标本 Exon 9 编码 50 位点处插入 T 碱基(50+T), 见图 2; 82, 89 位点处插入 C 碱基(82+C、89+C), 见图 3; 31 号标本 Exon 9 编码 94 位点处发生 T→C 的置换, 即由谷氨酸→天冬氨酸, 171, 190 位点处出现 G 碱基的缺失(171-G、190-G), 见图 4、5。

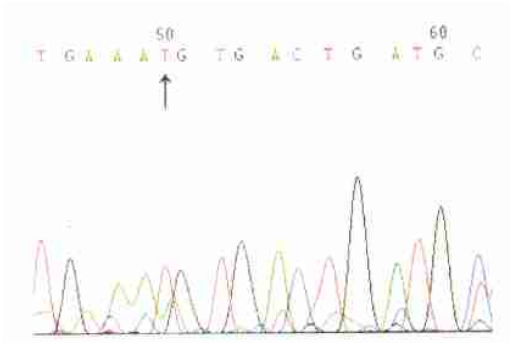


图 2　E-cadherin Exon 9 30 号标本在编码 50 位点处插入 T 碱基

Fig 2　In case 30, T inserted at codon 50 of E-cadherin Exon 9

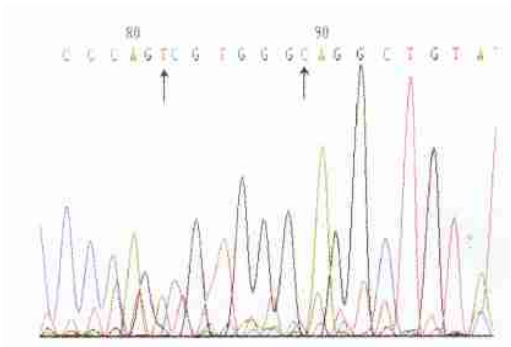


图 3　E-cadherin Exon 9 30 号标本在编码 82 位点处插入 T 碱基 89 位点处插入 C 碱基

Fig 3　In case 30, T and C inserted at codons 82 and 89 of E-cadherin Exon 9 respectively

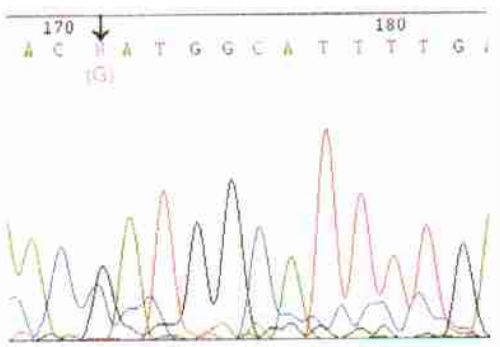


图 4　E-cadherin Exon 9 31 号标本在编码 171 位点处缺失 G

Fig 4　In case 31, G deleted at codon 171 of E-cadherin Exon 9

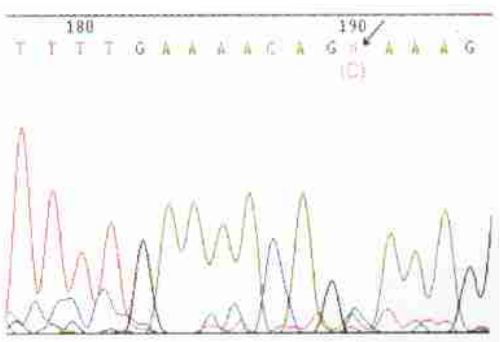


图 5　E-cadherin exon 9 31 号标本在编码 190 位点处缺失 G

Fig 5　In case 31, G deleted at codon 190 of E-cadherin Exon 9

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

3 讨论

PCR-SSCP 是一种简便有效的筛选靶 DNA 是否存在突变的技术，单链 DNA 在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移率与其序列及所形成的空间结构密切相关[4]。少至一个碱基的改变即可引起单链构象改变，从而影响电泳迁移率，通过与野生型靶序列对照比较单链带的位置及数量来检测突变。由于各单链可能有几种稳定的构象体，因此 SSCP 分析经常并非两条带，它是一种高效、简便的突变筛选方法。为了提高准确率，我们对 SSCP 异常条带进行了序列分析以进一步明确突变的位置及碱基位点的改变。

钙粘蛋白基因定位于染色体 16q21.1，由 16 个外显子和 15 个内含子组成，E-cadherin 分子由 N 末端的胞外区，跨膜区及 C 末端的胞内区组成。钙粘蛋白的胞外区是由 5 个重复串联的结构单元组成，它通过 HAV 序列识别和介导细胞间粘附[5]。如果外显子 8、9 在 mRNA 的加工修饰过程中被剪切掉，可能导致 E-cadherin 的表达下调以及功能丧失。Fukudome 等[6]对胃癌研究发现，钙粘蛋白基因突变以外显子 8，9 为主，并认为是外显子 8，9 的突变造成了钙粘蛋白失去结合 Ca^{2+} 的能力，从而造成细胞-细胞连接疏松。外显子 8，9 包括一些氨基酸残基都位于钙离子结合口袋内，研究表明 N 末端的钙离子结合口袋的点突变足以破坏细胞之间的粘附，而 N 末端的钙离子结合口袋具有重要的侵袭抑制活性，这些位点的突变均可导致 E-cadherin 基因的 Ca^{2+} 结合区域的改变，从而影响 E-cadherin 的功能。

体外细胞培养显示 E-cadherin 是一种肿瘤侵袭抑制因子，当上皮性肿瘤细胞 E-cadherin 表达下调或功能障碍时，可导致肿瘤细胞具侵袭性生长的特点，并容易脱离原发部位向局部淋巴结或远处转移。本研究结果显示，E-cadherin 基因在 Exon 9 处存在插入及缺失。由于插入、缺失形成了移码突变，使整个氨基酸的编码发生错误，导致产生无活性或无功能的蛋白质。由于这些插入，缺失均发生在钙粘蛋白编码区内，可能导致钙粘蛋白的结构或功能发生改变，进而影响上皮细胞之间的粘附，造成细胞间粘附下降，聚集疏散，从而导致细胞极性的丢失及组织结构的破坏，为肿瘤的侵袭和转移提供了必要的条件。本实验显示两例基因异常(2/24，8.3%)，与文献在其它癌症如肝癌(17%)、胃癌(34%)报道的高突变率有差别，可能存在以下几个方面的原因：①本实验仅对 E-cadherin 外显子 6、7、8、9 进行了检测，对其它外显子未作进一步的分析。②E-cadherin 在肺癌中可能以 mRNA 及蛋白的异常表达为主[7]。③在 E-cadherin 基因启动子附近可能存在甲基化。④标本数量少可能也是其原因之一。

国外 Kanenori 等[8]对 34 例肝内胆管癌的外显子 7、8、9 进行了研究，发现外显子 8、9 以错义突变为主，突变均发生在胞外区，与之相吻合。

由于 E-cadherin 与 α、β、γ-Catenin 组成 E-cadherin/Catenin 复合物，因而它的失活包括多种机制，这其中可能涉及到 E-cadherin/catenin 复合体及相连的细胞蛋白结构明显改变以及 α、β-Catenin 表达下调及功能丧失[9]。

虽然对 E-cadherin 系统已有较多研究，但许多作用环节仍不是很清楚，E-cadherin 在肿瘤转移中的作用机制以及 E-cadherin 调控的确切机制，以及 CpG 的甲基化[10]尚有待于深入研究。

参考文献：

[1] Setsuo H. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers[J]. Am J Pathol, 1998, 153(2): 333－339.

[2] Fumihiro H, Keiji F, Koichi Y. Increased expression of β-catenin predicts better prognosis in nonsmall cell lung carcinomas[J]. Cancer, 2002, 94(3): 752－758.

[3] Berx G, Cleton-Jansen A M, Nollet F, *et al*. E-cadherin is a tumor/invasion suppressor gene mutated in lobular breast cancers[J]. Embo J, 1995, 14(24): 6107－6115.

[4] C.W. 迪芬巴赫. PCR 技术实验指南[M]. 北京：科学出版社，1999. 1730.

[5] Cheng C W, Wu P E, Yu J C. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene[J]. Oncogene, 2001, 20(29): 3814－3823.

[6] Fukudome Y, Yanagihara K, Takeichi M, *et al*. Characterization of a mutant E-cadherin protein encoded by a mutant gene frequently seen in diffuse-type human gastric carcinoma[J]. Int J Cancer, 2000, 88(4): 579－583.

[7] 张庆玲，王志新. 免疫组化法检测非小细胞肺癌患者 alpha-catenin 表达[J]. 第三军医大学学报，1999, 21(10): 750－752.

[8] Kanenori E, Ashida K, Miyake N, *et al*. E-cadherin gene mutations in human intrahepatic cholangiocarcinoma[J], J Pathol, 2001, 193(2): 310－317.

[9] Tsuyoshi S, Oda Y, Sakamoto A, *et al*. Prognostic value of the preserved expression of the E-cadherin and catenin families of adhesion molecules and of β-catenin mutations in synovial sarcoma[J]. J Pathol, 2000, 192(3): 342－350.

[10] Yshiura K, Yae K, Atsushi O, *et al*. Silencing of the E-cadherin in invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas[J]. Proc Natl A Calk Sci USA, 2000, 123(4): 4246－4250.

（编辑 王 红）

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