DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.010
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1024 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1024-03

胃粘膜幽门螺杆菌感染与线粒体DNA微卫星不稳的关系

凌贤龙,房殿春,周晓东,罗元辉,鲁 荣 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨胃粘膜幽门螺杆菌(Hp)感染与线粒体DNA微卫星不稳(mtMSI)的关系。方法 采用改良Giemsa染色、免疫组化染色和PCR方法检测Hp,并对Hp进行分型;采用限制性片段多态性(PCR-SSCP)方法检测胃粘膜细胞mtMSI。结果 30例胃癌检出mtMSI 11例(36.7%),15例肠化中有4例(26.7%)检出mtMSI,10例异型增生胃粘膜有3例(30%)检出mtMSI。mtMSI主要发生于D-loop闭环区。Hp感染胃粘膜mtMSI发生率显著高于非Hp感染组($P<0.01$)。mtMSI发生与$cagA^+$ Hp似乎没有密切关系($P>0.05$)。结论 Hp感染可能与胃粘膜细胞mtMSI发生有关,而mtMSI的发生可能参与了胃癌的发生过程。

关键词:胃癌;线粒体微卫星不稳定;Hp感染;单链构象多态性
中图法分类号:R322.4;R377;R394 文献标识码:A

The relationship between *Helicobacter pylori* infection and mitochondrial DNA microsatellite instability in gastric mucosa

LING Xian-long, FANG Dian-chun, ZHOU Xiao-dong, LUO Yuan-hui, LU Rong (Department of Gastroenterology, Southwest Hosital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the relationship between *Helicobacter pylori* infection and mitochondrial microsatellite instability (mtMSI) in gastric mucosa. Methods Hp was detected by modified Giemsa stain and immunohistochemical technique and Hp cagA classification was identified by PCR method; mtMSI was detected by PCR-SSCP. Results The mtMSI was detected in 11 of 30(36.7%) in gastric cancers, 4 of 15(26.7%) in intestinal metaplasia, and 3 of 10 (30.0%) in dysplasia. mtMSI was mainly detected in mitochondrial DNA D-loop. The mtMSI phenotype was associated with Hp infection($P<0.0$), however, it was not associated with Hp cagA status ($P>0.05$). Conclusion Hp infection seems to be an important factor in inducing mtMSI in gastric mucosa, and mtMSI might play a role in the carcinogenesis of gastric cancer.

Key words: gastric cancer; mitochondrial microsatellite instability; Hp infection; PCR-SSCP

流行病学研究表明,胃粘膜长期幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,Hp)感染可能与胃癌发生有关。动物实验研究亦发现,Hp感染不但可增加甲基硝基亚硝基胍致癌作用,长期Hp感染本身即可诱发出胃窦腺癌[1]。但Hp诱发胃癌的分子机制尚不清楚。线粒体DNA(mtDNA)是线粒体自身的遗传物质,由于其所处的环境以及其自身的某些缺陷,因此易受氧自由基损伤,而成为Hp诱发胃粘膜氧自由基的损伤靶点,使mtDNA突变或发生微卫星不稳定性(Microsatellite instability, MSI)改变[2]。已有研究发现,mtMSI不仅发生于结直肠癌[3~5]、乳腺癌[6]、血液系统肿瘤[7],而且也发生于胃癌粘膜[8]。胃粘膜Hp感染对胃粘膜上皮细胞mtDNA MSI(mtMSI)的影响目前国内外尚未见研究报道,本研究旨在检测胃癌及其癌前病变组织mtMSI,并探讨其与Hp感染的关系。

1 材料和方法

1.1 病例资料

胃粘膜肠上皮化生15例,不典型增生10例,胃癌30例,均为胃镜或手术切除标本,取材包括病变组织和相应的正常胃粘膜组织。所有病例近期均未接受抗Hp治疗,无服用非类固醇类抗炎药物史,胃癌患者无化疗和放疗史。取材后部分标本用10%甲醛固定,石蜡包埋,HE染色,作组织学诊断,其余立即置于-70 ℃保存备用。

1.2 Hp检测

采用改良的Giemsa染色、免疫组化和PCR方法。免疫组化一抗(兔抗Hp IgG)由本校临床微生物教研室馈赠,二步法免疫组化试剂盒购于博士德公司。Hp及其cagA PCR基因扩增试剂盒购于复星科技公司。检测步骤按说明书进行。

1.3 mtMSI PCR-SSCP分析

1.3.1 组织总DNA提取 采用酚/氯仿方法。

1.3.2 mtDNA长距离PCR扩增 引物设计参照Habano等[8]报道的资料。引物序列:P1:5′-CCCATACTACTAATCTCATCAA-3′(nt:467~488);P2:5′-AAAGTGCATACCGCCAAAAG-3′(nt:404~423)。应用LA PCR(Takara)试剂盒,反应体积50 μl,内含LA Takara DNA聚合酶2.5 U,dNTP 400 μmol/L,$MgCl_2$ 2.5 mmol/L,引物各0.15 μg,模板DNA 100 ng,10× PCR buffer 5 μl。在2400 PCR循环仪上进行扩增。循环条件:先94 ℃预变性3 min,然后94 ℃ 30 s,62 ℃ 30 s,68 ℃ 10 min,共30个循环,最后68 ℃延伸10 min。

PCR产物的鉴定:0.6%琼脂糖凝胶(含EB)上电泳,电压50 V,电泳2 h后,紫外光下观察并照相。限制性酶切分析:取PCR产物5 μl,10× buffer 2 μl,限制性内切酶*Xba*Ⅰ,*Pst*Ⅰ,*Hind*Ⅲ,*BamH*Ⅰ(华美公司产品)各2 U,单一酶切,总反应体积20 μl。混合后置于37 ℃反应4 h。反应完毕后,酶切产物在1.0%琼脂糖凝胶(含EB)上电泳,电压50 V,电泳2 h后,紫外

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870345);全军"十五"科研基金重点资助项目(01Z075)
作者简介:凌贤龙(1963-),男,安徽省合肥市人,博士,主治医师,讲师,主要从事线粒体DNA突变整合研究。电话:(023)68755497
通讯作者:房殿春(E-mail:fangdianchun@hotmail.com)
收稿日期:2001-06-29;修回日期:2001-08-30

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

透射仪下观察并照相。酶切结果与剑桥标准进行对比。

1.3.3　mtMSI PCR-SSCP 分析　　采用 PCR 方法扩增 mtDNA 微卫星序列。以长距离 PCR 产物为模板, 引物设计及 PCR 循环参数参照 Habano 等[8] 的资料。包括 2 个控制区和 6 个编码区 mtDNA 微卫星序列, 见表 1。PCR 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。病变样本与正常样本配对加样, 在 7.5% 非变性聚丙烯酰胺上低温下电泳。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-SSCP 分析所用的引物序列

Tab 1　Sequences of primer in analysing mtMSI PCR-SSCP

Repeat sequence	mtDNA region	Position	Annealing(℃)	Primer sequence(5′—3′)
(C)n	270—425	D-loop	58	TCCACACAGACATCAATAACA AAAGTGCATACCGCCAAAAG
(CA)n	467—556	D-loop	55	CCCATACTACTAATCTCATCAA TTTGCTTGGTTCGGGTATG
(C)6	3 529—3 617	ND1	55	CCGACCTTAGCTCTCACCAT AATAGGAGGCCTAGGTTGAG
(A)7	4 555—4 644	ND2	55	CCTGAGTAGGCCTAGAAATAAA ACTTGATGGCAGCTTCTGTG
(A)7	6 644—6 733	COI	55	CCTAGCAGGCTTCGGAATAA ATAGCTCAGACCATACCTATG
(T)7	9 431—9 526	COIII	55	CCAAAAAGGCCTTCGATACG GCTAGGCTGGAGTGGTAAAA
(C)6 and (A)8	12 360—12 465	ND5	55	CACCCTAACCCTGACTTCC GGTGGATGCGACAATGGATT
(CCT)3and (AGC)3	12 940—13 082	ND5	55	GCCCTTCTAAACGCTAATCC TCAGCGCTGGAGACCTAATT

1.4　统计学分析

采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　mtDNA 长 PCR 扩增和酶切分析

所有标本均可见稳定的扩增条带, 扩增产物的长度约 16.5 kb, 见图 1。mtDNA 长 PCR 扩增产物经酶切、电泳, *Pst* Ⅰ 酶切后可见 2 条酶切条带, *BamH* Ⅰ 酶切后仅见 1 条酶切条带, *Hind* Ⅲ 酶切后可见 3 条酶切条带, *Xba* Ⅰ 酶切后可见 5 条酶切条带, 与人类 mtDNA 序列酶切剑桥标准基本相符, 未见异常的条带或正常条带的丢失。

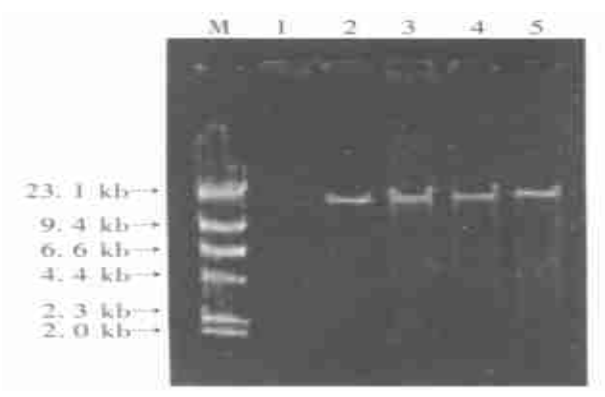


图 1　mtDNA 长距离 PCR 扩张, PCR 产物长度为 16.5 kb

1: 阴性对照; 2～5: 扩增样本

Fig 1　Entire whole mtDNA was amplified by long distance PCR, PCR product was about 16.5 kb

M: DNA marker (λDNA/*Hind* Ⅲ); 1: Negative control; 2～5: Sample

2.2　胃癌及其癌前病变组织 mtMSI 检出情况

30 例胃癌检出 mtMSI 11 例, 检出率为 36.7%, 11 例中有 10 例于 D-loop 区 (C)n 和 (CA)n 序列检出 mtMSI, 有 6 例于编码区检出 mtMSI, 编码区 6 例发生 mtMSI 的病例中有 5 例同时有 D-loop 区 mtMSI, 见表 2, 图 2, 提示 D-loop 区为 mtMSI 的热点部位。15 例肠化中有 4 例(26.7%)检出 mtMSI, 10 例异型增生胃粘膜有 3 例(30%)检出 mtMSI。胃癌组织 mtMSI 检出率与肠化和异型增生组织相比无统计学差异($P>0.05$)。

表 2　胃癌及其癌前病变组织 mtMSI 检出情况

Tab 2　mtMSI detected in gastric cancer and precancerous lesions

Repeat sequence	Intestinal metaplasia (n=15)	Dysplasia (n=10)	Gastric cancer (n=30)
(C)n in D-loop	1	1	6
(CA)n in D-loop	1	0	4
(C)6 in ND1	0	0	2
(A)7 in ND2	1	1	1
(A)7 in COI	0	0	0
(T)7 in COIII	0	0	0
(C)6 and (A)8 in ND5	0	1	2
(CCT)3 and (AGC)3 in ND5	1	0	1

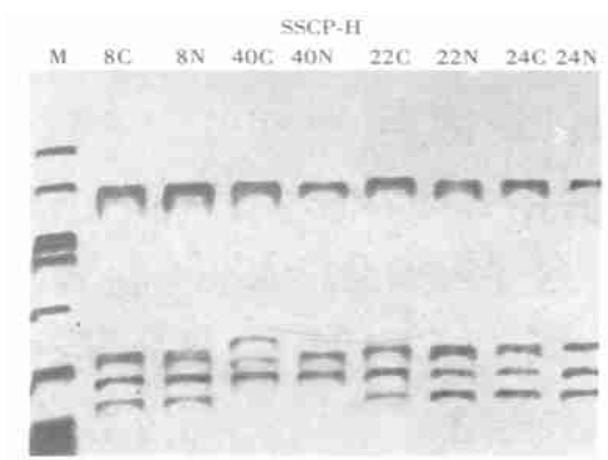


图 2　mtDNA D-loop $(c)_n$ PCR-SSCP 分析, 40 C 发生 mtMSI

Fig 3　PCR-SSCP for mtDNA D-loop $(c)_n$, mtMSI was found in 40 C

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

2.3　mtDNA MSI 与 Hp 感染的关系

胃粘膜组织 mtMSI 发生与 Hp 感染有密切关系, Hp 感染较之于非 Hp 感染, 两者差异非常显著($P<0.01$)。mtMSI 发生与 Hp cagA 表达状态没有显著关联($P>0.05$), 见表 3。

表 3　mtMSI 与 Hp 感染的关系

Tab 3　Relationship between mtMSI and Hp infection

MtMSI region	Hp^+ (n=35)	Hp^- (n=20)	$cagA^+Hp$ (n=27)	$cagA^-$ Hp (n=8)
D-loop	12	1	10	2
Coding region	10	0	7	3
Total	22	1*	17	5

*: $P<0.01$ *vs* Hp^+

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

3 讨论

基因不稳在肿瘤的发生中起重要作用。这种基因不稳包括核基因组的不稳和mtDNA的不稳(mtMSI)。我们过去的研究表明,核基因组的不稳在胃癌的发生中起重要作用[9]。本研究又对30例胃癌mtMSI进行检测,结果检出mtMSI 11例,占36.7%,提示mtMSI在胃癌是常见现象,可能在胃癌的发生中起重要作用。Habano等[8]报道62例胃癌中16%的病例出现mtMSI表型,且mtMSI常与mtDNA损伤或突变同时存在。本研究中mtMSI的检出率高于Habano的报道,此检出率的不同可能与种族、环境或致癌因素的不同有关。人类mtDNA D-loop区微卫星(C)n和(CA)n呈现高度多态性,是mtMSI的好发部位。本研究11例mtMSI中有10例位于D-loop闭环区,6例mtDNA位于编码区,6例于编码区检出mtMSI者有5例同时在D-loop区检出mtMSI,亦提示D-loop区系mtMSI发生的热点部位。

导致mtMSI发生的机制尚不明了,推测可能与氧自由基产生过多以及DNA聚合酶γ的修复功能缺陷有关。肿瘤细胞的mtDNA突变频率明显高于正常组织细胞,亦明显不同与其它线粒体疾病的mtDNA结构异常。结肠癌研究提示,mtMSI发生不是非特异性染色体变异的结果,它可能在细胞癌变过程中起重要作用[5]。Habano[8]的研究提示,mtMSI发生与核基因MSI相关,但Schwartz等[10]的研究却得出了相反的结论。本研究发现,不但胃癌组织中检出mtMSI,而且肠上皮化生和异型增生组织中也检出了mtMSI,提示mtMSI可能发生于胃粘膜癌变的早期阶段。

Hp感染导致胃癌的分子机制尚不清楚。Hp属非侵入性细菌,它不会与宿主细胞直接发生遗传物质的交换。但Hp及其代谢产物,以及Hp引起胃粘膜炎细胞可导致大量氧自由基的产生,部分代谢产物为基因毒性物质。研究证明,Hp感染与胃粘膜核基因组MSI发生关系密切,并可引起错配修复基因的突变,但与mtMSI的关系尚无明确报道。本研究表明,Hp感染组mtMSI发生率明显高于非Hp感染组,提示胃粘膜上皮Hp感染与mtMSI发生相关,但Hp CagA表达状态与mtMSI发生没有明显的关系。

我们采用长距离PCR方法扩增人全长序列mtDNA,凝胶电泳显示,扩增产物长度约16.5 kb。酶切分析证明,该产物系人mtDNA,说明采用长距离PCR方法扩增近似人全长序列mtDNA是可行的。近年来,长距离PCR已被应用于人mtDNA全序列的扩增,其产物被用于突变分析以及其它分子生物学实验。关于成功地进行长距离PCR扩增,我们体会应注意以下几点:①尽量降低变性温度,缩短变性时间,以保存DNA聚合酶的活性;②尽可能增加退火温度,以减少错配的机率;③要有足够长的延伸时间以保证DNA的延长;④要有适当的dNTP含量,以保证有足够的dNTP供DNA链合成,通常在50 μl反应体积的扩增体系中应加入400~500 μmol/L的dNTP。本研究PCR产物酶切分析表明,在胃癌及其癌前病变的胃粘膜上皮细胞中,mtDNA未发生大片段的缺失或重排,此与文献[5]报道的结果相符。

以上研究说明,在胃癌前病变向胃癌发生过程中存在mtMSI,这种mtMSI可能与胃癌的发生和发展有关。Hp感染可能是胃粘膜组织mtMSI的发生的重要原因。

参考文献:

[1] Shimizu N, Inada K, Nakanishi H, *et al*. Helicobacter pylori infection enhances glandular stomach carcinogenesis in mongolian gerbils treated with chemical carcinogens[J]. Carcinogenesis, 1999, 20(4): 669—676.

[2] Wallace D C. Mitochondrial diseases in man and mouse[J]. Science, 1999, 283(5 407): 1 482—1 488.

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

[4] Habano W, Nakamura S I, Sugai T, *et al*. Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: Evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome[J]. Oncogene, 1998, 17(15): 1 931—1 937.

[5] 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.

[6] 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): 4 231—4 237.

[7] Ivanova R, Lepage V, Loste M N, *et al*. Mitochondrial DNA sequence variation in human leukemic cells[J]. Int J Cancer, 1998, 76(4): 495—498.

[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] 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: 504—508.

[10] Schwartz S, Perucho M. Somatic mutations in mitochondrial DNA do not associate with nuclear microsatellite instability in gastrointestinal cancer[J]. Gastroenterology, 2000, 119(6): 1 806—1 808.

(编辑 潘式文)

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