DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.004
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1012 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1012-03

胃癌错配修复基因 hMLH1 突变与微卫星 DNA 不稳的关系

房殿春,罗元辉,刘为纹 (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 探讨胃癌错配修复基因 hMLH1 突变与微卫星不稳(MSI)的关系。方法 采用 PCR 为基础的方法检测 MSI;采用二维 DNA 电泳和 DNA 测序技术检测 hMLH1 突变。结果 68 例胃癌中检出 hMLH1 基因突变 3 例,突变率为 4.4%。hMLH1 突变与肿瘤大小、分化程度、组织学类型、浸润深度和临床病理分期无显著相关。至少有 1 个位点发现 MSI 者 17 例(25.0%)。将 MSI 分为高频率 MSI(MSI-H,≥2 个位点)8 例、低频率 MSI(MSI-L,仅为 1 个位点)9 例和 MSI 阴性(MSS)51 例 3 组,4 例 hMLH1 基因突变均发生于 MSI-H 组,而 MSI-L 和 MSS 组未见有突变者。结论 hMLH1 基因突变仅是部分 MSI 发生的原因,MSI 的发生可能还涉及到 hMLH1 以外错配修复基因改变。

关键词:胃癌;hMLH1 突变;二维 DNA 电泳
中图法分类号:R342.3;R394;R735.2 文献标识码:A

Relationship between mismatching repair gene hMLH1 mutation and microsatellite instability

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 role of hMLH1 mutation in gastric carcinogenesis and to correlate hMLH1 mutation with microsatellite instability in gastric carcinomas. **Methods** hMLH1 mutation was measured by two-dimentional DNA electrophoresis and DNA sequencing; MSI was analyzed by PCR-based methods. **Results** Sixty-eight cases of sporadic gastric carcinoma were studied for hMLH1 mutation and MSI. hMLH1 mutaions were detected in 3(4.4%) gastric cancer. No association was observed between hMLH1 mutation and tumor size, differentiation, histological type, depth of invasion, metastasis or stages. By using five microsatellite markers, MSI in at least one locus was detected in 17 of 68 (25%) of the tumors analyzed. hMLH1 mutations were all detected in MSI-H (≥2 loci, $n=8$), but no mutation was found in MSI-Low (only one locus, $n=9$) or MSS (tumor lacking MSI or stable, $n=51$). **Conclusion** hMLH1 mutation is involved in carcinogenesis of some gastric cancer with MSI-H in the majority MSI cases in gastric tumors may be due to defects in other genes responsible for DNA replication fidelity than the hMLH1.

Key words gastric carcinoma; hMLH1 mutation; two-dimentional DNA electrophoresis

我们过去的研究表明,基因不稳在胃癌的发生中起重要作用。这种基因不稳涉及到两种不同的形式,亦即染色体不稳和微卫星不稳(MSI)[1]。MSI 是指由于复制错误引起的简单重复序列的改变,系错配修复(Mismatching repair gene,MMR)基因的突变所致。由于 MMR 基因的突变及功能异常造成 DNA 频发的复制错误(Replication errors,ERE)并不断积累,导致细胞的微卫星 DNA 序列发生改变。目前已分离和鉴定的 MMR 基因主要有 hMSH2、hMLH1、hPMS1 和 hPMS2,他们分别定位于染色体 2p21-22、3p21、2q31-33 和 7p22。业已证明,MSI 阳性胃癌常伴有 hMLH1 启动子区的低甲基化和 hMLH1 表达的下调[2],但与 hMLH1 突变的关系尚缺乏深入的研究。本研究应用二维 DNA 电泳及 DNA 测序技术对胃癌错配修复基因 hMLH1 突变进行检测,并探讨 hMLH1 突变与 MSI 的关系。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070043);全军"十五"科研基金重点资助项目(01Z075)

作者简介:房殿春(1951-),男,吉林省长春市人,博士,主任医师,教授,主要从事胃粘膜病变的分子机制及防治方面的研究,发表论文 200 余篇。电话:(023)68754124

收稿日期:2001-07-30;修回日期:2001-08-23

1 材料和方法

1.1 组织标本

68 例胃癌及相应正常组织均为我院外科手术切除标本。标本切除后立即置-80 ℃冻存备用。每例组织行冰冻切片 HE 染色,以确定肿瘤细胞的丰度。DNA 提取采用蛋白酶 K 消化,酚/氯仿提取法。68 例胃癌中,男 45 例,女 23 例,年龄 30~76 岁,平均 56.2 岁。所有病人均无肿瘤家族史,亦未接受过放疗和化疗。

1.2 引物

参照文献[3]合成长 PCR 和短 PCR 引物,序列见表 1。

1.3 长 PCR 扩增

应用 LA PCR 试剂盒(TakaRa, Otsu, Shiga, Japan)进行长 PCR 扩增。PCR 反应体积 50 μl,包括 200~400 ng 基因组 DNA,不同浓度引物(hMLH1 基因外显子 1~4 正义和反义引物各 0.16 μmol/L,5~10 外显子正义和反义引物各 0.125 μmol/L,11~13 外显子正义和反义引物各 0.094 μmol/L,14~19 外显子正义和反义引物各 0.125 μmol/L)。操作步骤按说明书进行。PCR 反应条件 94 ℃热启动 2 min,加 Taq 酶,94 ℃ 1 min,然后 98 ℃ 15 s,69 ℃ 1 min(每个循环递减 0.5 ℃),68 ℃ 12 min,×8 个循环。接着 96 ℃ 20 s,68 ℃ 12 min,×6 个循环。然后 96 ℃ 20 s,68 ℃ 12 min(每个循环递减 15 s),×16 个循环。最后,72 ℃反

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

应 10 min。长 PCR 产物行 0.5% 琼脂糖凝胶电泳观察。

表 1　长 PCR 和短 PCR 所用引物

Tab 1　Primer information for long and short PCR for HMLH1

A. Primer pairs for long-distance PCR				
Exons 1-4				
MLH1-4F GCG. GCT. AAG. CTA. CAG. CTG. AAG. GAA. GAA. CGT. GA[a]				
MLH1-4R GGC. GAG. ACA. GGA. TTA. CTC. TGA. GAC. CTA. GGC. CC				
Product size: 10.8 kb				
Exons5-10				
MLH5-10F GCG. CCC. CTT. GGG. ATT. AGT. ATC. TAT. CTC. TCT. ACT. GG				
MLH5-10R GCG. CTC. ATC. TCT. TTC. AAA. GAG. GAG. AGC. CTG				
Product size: 10.5 kb				
Exons11-13				
MLH11-13F CGG. CTT. TTT. CTC. CCC. CTC. CCA. CTA. TCT. AAG. G				
MLH11-13R GGG. TTA. GTA. AAG. GAA. GAG. GAG. CTT. GCC. C				
Product size: 8.7 kb				
Exons14-19				
MLH14-19F GGT. GCT. TTG. GTC. AAT. GAA. GTG. GGG. TTG. GTA. G				
MLH14-19R GCG. CGC. GTA. TGT. TGG. TAC. ACT. TTG. TAT. ATC. ACA. C				
Product size=10.5 kb				
B. Primer pairs for short PCR				
Exon	Clamp[b]	Product size	T_m	Primer sequence
1	5	258	64.13	GCA. CTT. CGG. TTG. AGC. ATC
	40			CGG. TTA. AGT. CGT. AGC. CCT
2	40	187	38.14	ATA. AAT. TAT. TTT. CTG. TTT
				CAT. CCT. GCT. ACT. TTG. AGG
3	40	237	32.22	GGA. AAA. TGA. GTA. ACA. TGA
	2			TGT. CAT. CAC. AGG. AGG. ATA
4	2	218	36.26	ACC. CAG. CAG. TGA. GTT. TT
	40			GCC. CAA. AAT. ACA. TTT. CAG
5	40	170	30.19	ATA. TTA. ATT. TGT. TAT. ATT
				CAA. TTT. ACT. CTC. CCA. TGT
6	40	228	35.58	TTT. CAA. GTA. CTT. CTA. TGA
				ACT. TTG. TAG. ACA. AAT. CTC
7		194	30.88	GAC. ATC. TAG. TGT. GTG. TTT
	40			CCC. CTT. TTT. TCT. TTT. CAT
8	5	213	42.21	GAC. AAT. AAA. TCC. TTG. TGT
	50			AAG. ATT. TTT. TTA. TAT. AGG
9	40	249	33.73	TTT. GAG. TTT. TGA. GTA. TTT
				TGG. GTG. TTT. CCT. GTG. AGT
10	50	240	41.47	CAC. CCC. TCA. GGA. CAG. TTT
				ACA. TCT. GTT. CCT. TGT. GAG
11.1	50	145	40.58	AGG. TAA. TTG. TTC. TCT. CTT
				GAA. GTG. AAC. TTC. ATG. CTT
11.2	40	224	60.81	TCC. CAA. GAA. TGT. GGA. TGT
	2			AAA. GGC. CCC. AGA. GAA. GTA
12.1	40	184	44.53	TTT. TTT. TTT. TTT. TAA. TAC. A
				AAT. CTG. TAC. GAA. CCA. TCT
12.2	8	366	53.23	TGG. AAG. TAG. TGA. TAA. GGT
	40			TGT. ACT. TTT. CCC. AAA. AGG
13	40	272	49.06	ATC. TGC. ACT. TCC. TTT. TCT
				AAA. ACC. TTG. GCA. GTT. GAG
14	45	235	48.94	TAC. TTA. CCT. GTT. TTT. TGG
	5			GTA. GTA. GCT. CTG. CTT. GTT
15	40	179	29.97	CAG. CTT. TTC. CTT. AAA. GTC
				CAG. TTG. AAA. TGT. CAG. AAG
16		261	47.56	CTT. GCT. CCT. TCA. TGT. TCT. TG
	40			AGA. AGT. ATA. AGA. ATG. GCT. GTC
17	40	199	47.01	ATT. ATT. TCT. TGT. TCC. CTT
				AAT. GCT. TAG. TAT. CTG. CCT
18	45	215	46.67	CCT. ATT. TTG. AGG. TAT. TGA. AT
				GCC. AGT. GTG. CAT. CAC. CA
19		282	43.43	TGT. TGG. GAT. GCA. AAC. AGG
	40			ATC. CCA. CAG. TGC. ATA. AAT

a: Underlined nucleotides represent nucleotides added to modify melting temperatures of the primers; b: GC clamps are: 50 GC clamp, CGC. CCG. CCG. CCG. CCC. GCC. GCG. CCC. CGC. GCC. CGT. CCC. GCC. GCC. CCC. GCC. CG; 45 GC clamp, CGC. CCG. CCG. CGC. CCC. CGC. CCC. GTC. CCG. CCG. CCC. CCG. CCC. GGC. CCG; 40 clamp, CGC. CCGCCG. CGC. CCC. GCG. CCC. GGC. CCG. CCG. CCC. CCG. CCC. G; 8 clamp, CGT. CCC. GC; 5 clamp, GCG. CG; 2 clamp, CG; CTM is given in % UF

1.4　多重短 PCR 扩增

取长 PCR 产物 1 μl 作为模板, 进行多重短 PCR 扩增。分为 2 个多重 PCR 组, 组 I 包括 11 对引物, 组 II 包括 10 对引物, 每对引物终浓度见表 2。PCR 反应体积 50 μl, 包括 1× PCR buffer, 7 mmol/L $MgCl_2$, 0.25 mmol/L dNTPs, PCR 反应条件 94 ℃热启动 3 min, 加 Taq DNA 多聚酶 0.5 U。然后 94 ℃ 1 min, 52 ℃ 45 s (每个循环递减 1 ℃), 72 ℃ 1 min, × 5 个循环。然后 94 ℃ 1 min, 48 ℃ 45 s, 72 ℃ 1.5 min (每个循环增加 2 s), × 15 个循环。然后 94 ℃ 1 min, 38 ℃ 45 s, 72 ℃ 1.5 min, × 15 个循环。最后 72 ℃ 10 min, 98 ℃ 10 min, 45 ℃ 30 min, 37 ℃ 30 min。

表 2　多重短 PCR 分组及引物浓度

Tab 2　Multiplex groups for short PCR

Multipex group I		Multipex group II	
Exon	Final concentration (μmol/L)	Exon	Final concentration (μmol/L)
11.1	0.375	5	1.5
15	0.5	2	1.25
12.1	0.375	7	1.75
17	0.5	4	1.625
8	0.375	11.2	0.5
18	1.25	6	1.625
14	1.25	9	1.5
3	0.625	1	1.25
10	0.625	13	1.625
16	1.0	12.2	0.325
19	1.75		

1.5　二维电泳

应用美国 CBS Scientific Co. 研制的 DGGE 电泳仪 (Solana Beach, CA) 进行二维电泳。将 PCR 产物与上样缓冲液 9∶1 混合, 组 I 取 6.5 μl, 组 II 取 8.5 μl 混合后上样, 在 0.75 mm 厚 10% 聚丙烯酰胺凝胶, 于电压 140 V、温度 50 ℃条件下进行大小 (size) 分离 7.5 h。SYBR Green 染色, 紫外光下观察分离情况。然后将在 120 ~ 420 bp 区的条带呈条形切下, 放在预先制备好的 1 mm 厚 DGGE 胶 (含 10% ~ 6.5% 逆浓度聚丙烯酰胺, 25% ~ 70% 尿素/甲酰胺) 上方, 用 10% 聚丙烯酰胺凝胶封闭后, 于电压 90 ~ 110 V, 温度 56 ℃条件下电泳 16 h。凝胶 SYBR Green I 和 II 的混合液中染色 30 min, 紫外光下观察并照相。

1.6　DNA 测序

对发现有异常 DNA 条带者应用 ABI377 测序仪 (Foster City, CA) 进行 DNA 测序。

1.7　微卫星不稳 (MSI) 的检测

包括 5 个微卫星位点: BAT25、BAT26、BAT40、D2S123、和 D5S346。检测方法、步骤见文献[1]。与正常组织相比, 若肿瘤组织出现泳动的条带即判断为 MSI。根据每例肿瘤组织突变型微卫星位点的多少, 将其分为高频率 MSI (MSI-H, ≥2 个位点)、低频率 MSI (MSI-L, 仅为 1 个位点) 和 MSI 阴性 (MSS) 3 组。

2　结果

2.1　胃癌 hMLH1 突变率

经二维电泳发现异常者均表现为 4 条 DNA 带型, 见图 1。经 DNA 测序发现 68 例胃癌中有 3 例发生 hMLH1 突变, 突变率为 4.4%, hMLH1 第 226 密码子 CGG 变为 TGG, 导致相应的精氨酸变为色氨酸。hMLH1 突变与肿瘤大小、分化程度、组织学类型, 浸润深度和临床病理分期无显著相关。

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

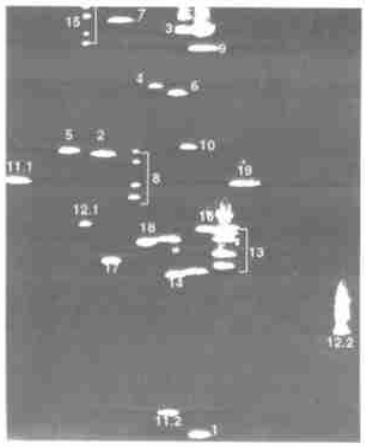


图 1 应用二维 DNA 电泳检测胃癌错配修复基因 hMLH1 突变 8, 13 和 15 外显子见 4 条带带型

Fig 1 Detetion of mismatching repair gene hMLH1 mutation in gastric cancer by two-dimentional DNA electrophoresis

Four-band pattern was observed at exon 8, 13 and 15

2.2 MSI 与 hMLH1 突变的关系

68 例胃癌中至少有 1 个位点检出 MSI 者 17 例(25%), 其中属 MSI-H 8 例(11.8%)、MSI-L 9 例(13.2%)和 MSS 51 例(75%)。MSI 与 hMLH1 突变的关系见表 3, 可见, hMLH1 突变均发生于 MSI-H 组, 而 MSI-L 和 MSS 组未发现有 hMLH1 突变者。

表 3 MSI 与 hMLH1 突变的关系

Tab 3 The relationship between MSI and hMLH1 mutation

MSI Status	No. of cases	hMLH1 mutation
MSI-H	8	3
MSI-L	9	0
MSS	51	0

3 讨论

错配修复基因 hMLH1 是遗传性非息肉性大肠癌(HNPCC)的易感基因, 约 50%HNPCC 家系存在 hMLH1 的突变[4,5]。已有研究发现, 部分家族性胃癌有 hMLH1 胚系突变[6], 但散发性胃癌 hMLH1 的体细胞突变情况国内外尚缺乏深入研究。本研究采用二维电泳和 DNA 测序技术检测了 68 例胃癌组织错配修复基因 hMLH1 突变, 检出突变 3 例, 突变率为 4.4%, 提示 hMLH1 突变在散发性胃癌中并非常见。

我们过去的研究表明, 部分胃癌表现 MSI。我们首先根据胃癌 MSI 检出位点的多少, 将胃癌分为高频率 MSI(MSI-H), 低频率 MSI(MSI-L)和无 MSI(MSS)3 组, 结果发现 MSI-H 胃癌表现为高频率的 TGF-βRⅡ、IGF-ⅡR、BAX、MSH3 基因的移码突变和低频率的 APC、MCC 和 DCC 的杂合丢失, 而 MSI-L 和 MSS 胃癌却表现为相反的结果。但 MSI 与 hMLH1 突变的关系尚缺乏深入的研究。本研究发现, 3 例 hMLH1 突变均发生于 MSI-H 胃癌, 而 MSI-L 胃癌未发现有 hMLH1 突变者, 提示 hMLH1 突变与部分 MSI-H 胃癌有关。但多数 MSI-H 胃癌并未发现有 hMLH1 突变, 提示多数 MSI-H 胃癌可能是 hMLH1 以外的错配修复基因异常, 或 hMLH1 基因的其它失活方式所致。业已发现, 在晚期 MSI-H 胃癌常伴有 hMLH1 启动子区的高甲基化和 hMLH1 表达的下调[6]。因此进一步研究 MSI-H 胃癌 hMLH1 启动子区的甲基化状态、hMLH1 的表达和其他错配修复基因改变, 对揭示 MSI-H 胃癌的发生机制可能有重要意义。

hMLH1 基因较大, 含有 19 个外显子, 以往检测 hMLH1 基因突变多采用 SSCP 方法、梯度变性胶电泳和 DNA 测序等技术, 但这些技术需时长, 工作量大, 花费亦大, 不适合大规模的突变分析[3]。二维凝胶电泳是近年建立的新的基因突变分析方法[8,9]。本方法包括 2 步 PCR 扩增和 2 步电泳分离。即先行包括 4 对引物的长 PCR 扩增 hMLH1 基因的 19 个外显子的全长序列, 再以长 PCR 产物为模板, 进行 2 套多重短 PCR 扩增, 然后先在非变性丙烯酰胺凝胶进行扩增片段大小分离, 再在梯度变性胶上进行第 2 次分离。本研究采用二维电泳方法检测了 hMLH1 基因 19 个外显子突变, 结果表明该法操作简便, 无需复杂设备, 所需的检测样品少, 准确性和可重复性好, 能在同 1 张电泳胶上同时观察 hMLH1 基因 19 个外显子突变, 因此可降低工作量, 并降低花费, 不但可以用于科学研究, 而且可以用于临床标本的检测。

参考文献:

[1] 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.

[2] Fleisher A S, Esteller M, Tamura G, *et al*. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia[J]. Oncogene, 2001, 20(3): 329—335.

[3] Smith W M, Van Orsouw N J, Fox E A, *et al*. Accurate, high-throughput "snapshot" detection of hMLH1 mutations by two-dimensional DNA electrophoresis[J]. Genet Test, 1998, 2(1): 43—53.

[4] Peel D J, Ziogas A, Fox E A, *et al*. Characterization of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from a population-based series of cases[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(18): 1 517—1 522.

[5] Scott R J, McPhillips M, Meldrum C J, *et al*. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in 95 families: differences and similarities between mutation-positive and mutation-negative kindreds[J]. Am J Hum Genet, 2001, 68(1): 118—127.

[6] Keller G, Grimm V, Vogelsang H, *et al*. Analysis for microsatellite instability and mutations of the DNA mismatch repair gene hMLH1 in familial gastric cancer[J]. Int J Cancer, 1996, 68(5): 571—576.

[7] Bevilacqua R A, Simpson A J. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability[J]. Int J Cancer, 2000, 87(2): 200—203.

[8] Nagai H, Kim Y S, Lee K T, *et al*. Inactivation of SSI-1, a JAK/STAT inhibitor, in human hepatocellular carcinomas, as revealed by two-dimensional electrophoresis[J]. J Hepatol, 2001, 34(3): 416—421.

[9] Itano O, Ueda M, Kikuchi K, *et al*. A new predictive factor for hepatocellular carcinoma based on two-dimensional electrophoresis of genomic DNA [J]. Oncogene, 2000, 19(13): 1 676—1 683.

(编辑 谢义霞)

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