DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.002
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

文章编号:1000-5404(2001)09-1007-03

论著

多重PCR和DNA测序技术检测胃癌APC基因15外显子突变

房殿春,罗元辉,杨仕明,李小安,凌贤龙,方 丽,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APC基因突变在胃癌发生中的作用及与微卫星DNA不稳的关系。方法 采用多重PCR、DGGE电泳和DNA测序技术检测APC15外显子突变,采用PCR为基础的方法检测微卫星DNA不稳。结果 68例胃癌中检出APC基因15外显子突变15例(22.1%),APC基因突变在肠型胃癌的检出率显著高于弥漫型胃癌($P<0.05$),而与肿瘤大小、分化程度、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,结果APC基因突变均发生于MSI-L和MSS组,而MSI-H未见有突变者。结论 APC基因可能是肠型胃癌的易感基因,APC基因突变可能参与了LOH病理途径,而与MSI途径无关。

关键词:胃癌;APC突变;微卫星不稳
中图法分类号:R394-33;R394.3;R735.2 文献标识码:A

Detection of mutation at exon 15 of APC gene in gastric cancer with multiplex PCR and DNA sequencing

FANG Dian-chun, LUO Yuan-hui, YANG Shi-ming, LI Xiao-an, LING Xian-long, FANG Li, LIU Wei-wen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective To evaluate the role of APC mutation in gastric carcinogenesis and its relationship with microsatellite instability (MSI) in gastric carcinomas. Methods Normal and sporadic cancerous tissues were taken from 68 cases of gastric cancer. APC mutation was measured with multiplex PCR, denaturing gradient gel electrophoresis and DNA sequencing. MSI was analyzed with PCR-based methods. Results APC mutations at exon 15 were detected in 15(22.1%) cases. APC mutation rate was significantly higher in intestinal type than in diffuse gastric cancer ($P<0.05$). No correlation was observed between APC mutation and tumor sizes, differentiation, invasion depths, metastasis and stages. By using 5 microsatellite markers, MSI in at least one locus was detected in 17 of 68 (25.0%) cancerous tissues. APC mutations were all detected in MSI-Low (only 1 locus, $n=9$) or microsatellite stability cases (tumor lacking MSI or stable, $n=51$), but no mutation was found in MSI-High cases (≥2 loci, $n=8$). Conclusion APC mutation is involved in the carcinogenesis of intestinal type of gastric cancer, and is independent of MSI-High phenotype but related to the loss of heterozygosity pathway in gastric cancer.

Key words gastric carcinoma; APC mutation; microsatellite instability

腺瘤性息肉病基因(Adenomatous polyposis coli,简称APC基因)位于染色体5q21,由15个外显子组成[1]。由于APC基因突变在大肠癌发生"腺瘤-腺癌"序列中早于K-ras和p53基因突变,故被称为大肠癌发生的"守门者"或"门卫"基因(Gatekeeper)[2]。APC基因不但与大肠癌的发生密切相关,而且可能在胃癌发生中亦起重要作用。我们过去的研究发现,在胃粘膜肠上皮化生、异型增生及胃癌中不仅存在APC基因突变,亦存在杂合缺失和蛋白表达异常,提示APC基因以多种方式的失活参与胃癌的发生[3]。为进一步阐明APC基因突变在胃癌发生发展中的作用及与微卫星DNA不稳的关系,我们采用多重PCR、变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和DNA测序技术对68例胃癌组织APC第15外显子的全长序列的突变进行了分析。

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 APC基因突变分析

1.2.1 引物 根据APC基因15外显子全长序列设计25对引物,引物序列见表1。

1.2.2 多重PCR扩增 PCR反应体积15 μl,包括10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3)、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L $MgCl_2$、250 μmol/L dNTPs、每个反应体积加3对引物,各0.5 μmol/L,0.25单位Taq DNA多聚酶(Perkin-Elmer, USA)和100 ng基因组DNA。PCR反应先95 ℃变性12 min,然后94 ℃ 40 s,49 ℃ 60 s,72 ℃ 1.5

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,主要从事胃癌发生的分子机制及防治研究,发表论文200余篇。电话:(023)68754124
收稿日期:2001-05-08;修回日期:2001-08-31

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

min, 32 个循环, 最后 72 ℃ 10 min, 98 ℃ 10 min, 50 ℃ 30 min, 37 ℃ 30 min。然后 PCR 产物行 DGGE 电泳。

1.2.3 DGGE 电泳 变性梯度胶含 10% 聚丙烯酰胺, 10% ~ 60% 尿素-formamide。每份加样 8 μl, 在 50 ℃缓冲液中、电压 90 V 电泳 17 h。凝胶用 0.5× Sybr Green Ⅰ 和 Ⅱ 中染色 20 min, 紫外光下观察并照相。选取有异常带型者进行 DNA 测序。

1.2.4 DNA 序列分析 DNA 测序所用引物无 GC 夹(GC clamp)。PCR 反应体积 50 μl, 包括基因组 DNA 200 ~ 400 ng、0.25 μmol/L 引物、1.5 mmol/L $MgCl_2$、0.25 mmol/L dNTPs、2.5 单位 Taq DNA 多聚酶(Perkin-Elmer, USA)。PCR 反应先 94 ℃变性 3 min, 然后 94 ℃ 60 s、55 ℃ 60 s、72 ℃ 60 s, 最后 72 ℃延伸 10 min, 共 35 个循环。PCR 产物用 Wizard(r) PCR Preps DNA 纯化试剂盒(Promega)进行纯化。采用 DNA 测序试剂盒(Amersham Life Science, Inc)进行测序, 操作按说明书进行。

表 1 检测 APC 基因 15 外显子所用引物

Tab 1 Primer sequences used in APC mutation analysis

Exon	GC clamp	Primer sequences	Size(bp)
15.1	2/0	F-TTCAGGCAAATCCTAAGAGA/ R-TTGAGCCAGGAGACATAATA	329
15.2	0/2	F-GGAATCTCATGGCAAATAGG/ R-TCATCATGTCGATTGGTGTC	284
15.3	2/0	F-AGCAAAGTCTCTATGGTGAT/ R-TGACACTTCTTCCATGACTT	387
15.4	0/2	F-CTACCATCCAGCAACAGAAA/ R-TCGCATAAGGCATAGAACAT	312
15.5	2/0	F-AAGCTCTGCTGCCCATACAC/ R-CTAGGTCGGCTGGGTATTGA	282
15.6	2/5	F-CTTATGCCAAATTAGAATAC/ R-ACTGCTCATCTGAATATTTA	306
15.7	7/5	F-ATGATGGAGAACTAGATACA/ R-ATCAGTGCTCTCAGTATAAA	253
15.8	2/5	F-AAGACCCAAACACATAATAG/ R-TAATTGGTAGGCTTATCATC	327
15.9	2/0	F-AAATCGAGTGGGTTCTAATC/ R-TTCTCACTGCTTGAAGACAT	355
15.10	2/6	F-CAGCCTATTGATTATAGTTT/ R-AACATATTGGAGTATCTTCT	344
15.11	2/0	F-TTAACCAAGAAACAATACAG/ R-CTTCGCTCACAGGATCTT	320
15.12	2/0	F-GGAAGCAGATTCTGCTAATA/ R-ATAGTGTTCAGGTGGACTTT	287
15.13	2/5	F-AGAATCAGCCAGGCACAAAG/ R-CATGGTTTGTCCAGGCTAT	310
15.14	2/6	F-TGGTAAGTGGCATTATAAGC/ R-AGTATCAGCATCTGGAAGAA	279
15.15	5/2	F-AAACCAAGCCAGAAGTACCT/ R-AGGCTGCTCTGATTCTGTTT	335
15.16	2/5	F-CGATGAGCCATTTATACA/ R-TTTGCTTTACGTGATGAC	291
15.17	4/2	F-ATTATTTCTGCCATGCCAAC/ R-TTCGATTGTTAGATCACTTA	300
15.18	2/6	F-TGCCACGGGTGTATTGTGTT/ R-TTTCCCTTTGGGCATAGCAG	351
15.19	4/2	F-GGTGATATTCTTGCAGAATG/ R-CACGTGTCCTATATTCAGTA	250
15.20	2/0	F-GAAACCAACTTCACCAGTAA/ R-AATAGGCGTGTAATGATGAG	378
15.21	2/0	F-AGCTCCCAAATAATGAAGAT/ R-GATTGTTGGTTGCAGGTTAG	342
15.22	2/6	F-GCTAAAGTTACCAGCCACAC/ R-TTGGTCAATGTCACTGAGAG	
15.23	2/0	F-CCAGTCATCCAAGACATAC/ R-CAACAGGTCATCTTCAGAGT	
15.24	2/5	F-TCACAGGGAGAACCAAGTAA/ R-TTTGCACCTTCCTGAATAGC	
15.25	2/3	F-ATGCGTGGCATATTAGGTGA/ R-TCGTGCGCCTTTATTACTTG	

GC clamp: 1 = CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG; 2 = CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCG; 3 = CG; 4 = GCGCG; 5 = CGTCCCGC; 6 = GCGCCCGTCCCGCCG; 7 = CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGGCCCG

1.3 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[4]。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。

1.4 统计学分析

采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 胃癌组织 APC 基因突变率

利用多重 PCR 扩增和 DGGE 电泳作为 APC 基因 15 外显子 DNA 全长序列突变的初步筛选, 见图 1。再对 DGGE 发现的异常电泳条带进行 DNA 测序以确定突变存在的部位和类型, 见图 2。68 例胃癌组织检出突变 15 例, 突变率为 22.1%。15 例胃癌的突变情况, 见表 2。

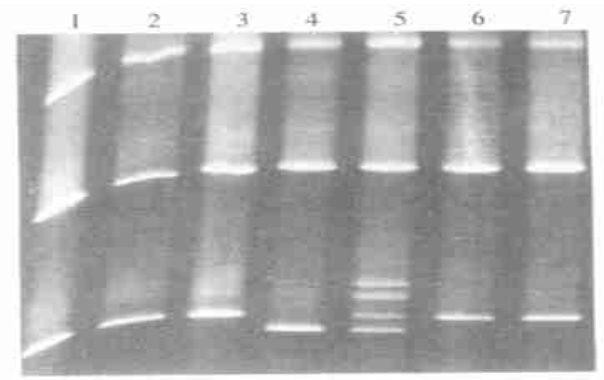


图 1 胃癌组织经多重 PCR 扩增、DGGE 电泳后于第 5 泳道显示 4 条带的异常带型

Fig 1 Abnormal four-band patterns in lane 5 after multiplex PCR and denaturing gradient gel electrophoresis

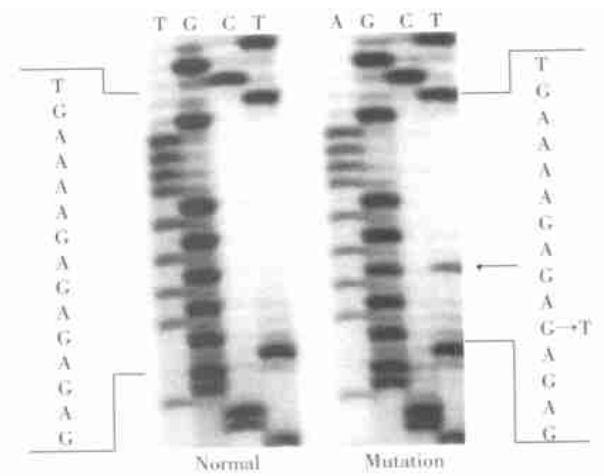


图 2 DNA 测序可见 APC 基因第 1 464 密码子中的 G 变为 T

Fig 2 DNA sequencing showed a G→T change at 1 464 coden

表 2 12 例胃癌 APC 基因突变情况

Tab 2 APC mutations in 12 cases of gastric carcinoma tissues

Exon region	Nucleotide alteration	Nucleotide location	Codon number
15.4	C→A	2 883	940
15.5	insA	2 866	935
15.10	del A	3 835 or 3 836	1 258
15.11	del AAAA	3 981	1 307
15.12	del AAAGA	3 988	1 309
15.12	G→T	4 010	1 317
15.13	delT	4 146	1 362
15.13	delGT	4 254	1 398
15.13	delT	4 282	1 407
15.14	C→T	4 410	1 450
15.14	G→T	4 452	1 464
15.15	delAG	4 455	1 465
15.19	insCT	5 326	1 755
15.21	insT	5 596	1 845
15.22	delG	5 940	1 960

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

2.2　胃癌组织 APC 基因突变与临床病理参数的关系

将 68 例胃癌按肿瘤大小、分化程度、组织起源、浸润深度和临床病理分期的不同进行分组, APC 突变与临床病理参数的关系见表 3。由表 3 可见, 肠型胃癌 APC 基因突变的检出率显著高于弥漫型胃癌($P<0.05$), 其他各组间 APC 基因突变的检出率则无显著性差异($P>0.05$)。

表 3　APC 突变与临床病理参数的关系

Tab 3　Relationship between the mean TRF length and clinicopathological parameters

Parameters	No. of cases	APC mutation
Size		
＜5 cm	31	7
＞5 cm	37	8
Differentiation		
Well	14	4
Moderate	20	6
Poor	28	3
Mucinous	6	2
Lauren classification		
Intestinal type	30	10 *
Diffuse type	38	5
Serosal invasion		
Absent	30	6
Present	38	9
Metastasis		
Absent	33	8
Present	35	7
Clinical stage		
Ⅰ and Ⅱ	36	9
Ⅲ and Ⅳ	32	6

*: $P<0.05$ *vs* Diffuse type

2.3　MSI 与 APC 基因突变的关系

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 APC 突变的关系见表 4, APC 突变均发生于 MSI-L 和 MSS 组, 而 MSI-H 组未发现有 APC 突变者。

表 4　MSI 与 APC 突变的关系

Tab 4　Relationship between MSI and APC mutation

MSI status	No. of cases	APC mutation
MSI-H	8	0
MSI-L	9	2
MSS	51	13

3　讨论

应用多重 PCR 方法对 68 例散发性胃癌 APC 基因第 15 外显子全序列突变进行了检测, 检出突变 15 例, 突变率为 22.1%, 此结果与文献[5]报告的检测结果相一致。APC 基因由 15 个外显子组成, 突变多集中在第 15 外显子的前半部分, 所以该区被称为"突变密集区"(Mutation cluster region)[6,7]。本组 15 例突变病例中有 12 例突变分布在 15 外显子的前半部分, 提示此部位亦为胃癌的突变热点部位。APC 基因突变将导致其编码蛋白的改变, 使其不能正常地发挥生理功能, 导致细胞粘附、生长、分化、增殖、凋亡调控和细胞内信号传导等方面的重要改变, 使细胞发生癌变[8]。

进一步分析 APC 基因突变与胃癌生物学行为的关系, 我们未发现 APC 基因突变与肿瘤大小、分化程度、侵润深度、淋巴转移及临床分期有密切关系, 但发现肠型胃癌 APC 突变的检出率显著高于弥漫型胃癌。从细胞起源的角度, 胃癌可以分为肠型和弥漫型, 前者常常伴有广泛的肠上皮化生。APC 基因在肠型胃癌的检出率显著高于弥漫型胃癌, 提示 APC 基因不但是大肠癌的易感基因, 而且也是肠型胃癌的易感基因, 可能在肠上皮化生恶性转化的早期阶段起作用。我们过去的研究发现, 在犬动物模型胃粘膜肠化生阶段中即可出现 APC 蛋白异常表达也支持这一结论[8]。

基因不稳在肿瘤的发生中起重要作用。我们过去的研究表明, 胃癌基因不稳可以分为二种不同的形式, 即经典的抑癌基因丢失(LOH)途径和 MSI 途径。前者包括 MSS 和 MSI-L 组的多数胃癌, APC/MCC、DCC 和 p53 抑癌基因的丢失在其发生发展中起重要作用; 而后者包括少数 MSI-H 胃癌, 由于错配修复基因突变导致了广泛的 MSI。进一步研究发现, TGF-βRⅡ、BAX 和 hMSH6 基因移码突变均发生于 MSI-H 组胃癌, 而 MSI-L 和 MSS 组胃癌未见有移码突变者, 提示这些基因是 MSI 途径的突变靶位[9]。本研究进一步分析了 APC 基因 15 外显子突变与 MSI 状态的关系, 发现 APC 基因突变均发生于 MSI-L 和 MSS 组, 而 MSI-H 胃癌未发现有 APC 基因突变, 提示 APC 基因 15 外显子并非 MSI 途径的突变靶位, 而可能参与了 LOH 途径。

参考文献:

[1] Groden J, Thilveris A, Samowitz W, *et al*. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene[J]. Cell 1991, 66(3): 589－600.

[2] Powell SM, Zili N, Beazer-Barclay Y, *et al*. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis[J]. Nature 1992, 359(6 392): 235－237.

[3] 王东旭, 房殿春, 刘为纹, 等. 胃粘膜肠化生组织中多种抑癌基因的杂合缺失[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(4): 264－267.

[4] 房殿春, 杨仕明, 罗元辉. 胃癌粘膜基因不稳与染色体端粒长度改变的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(1): 2－5.

[5] Nakatsuru S, Yanagisawa A, Ichii S, *et al*. Somatic mutation of the APC gene in gastric cancer: frequent mutations in very well differentiated adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma[J]. Hum Mol Genet, 1992, 1(8): 559－563.

[6] Toyooka M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, *et al*. Somatic mutations of the adenomatous polyposis coli gene in gastroduodenal tumors from patients with familial adenomatous polyposis[J]. Cancer Res, 1995, 55(14): 3 165－3 170.

[7] Fearnhead N S, Britton M P, Bodmer W F. The abc of apc[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(7): 721－733.

[8] 王东旭, 房殿春, 刘为纹. 犬胃粘膜肠上皮化生模型的建立及其肠化过程中癌相关蛋白的表达[J]. 中华消化内镜杂志, 2000, 17(6): 352－354.

[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(7): 504－508.

(编辑　郭建秀)

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