DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.002
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
2 2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

文章编号:1000-5404(2001)01-0002-04

论著

胃癌粘膜基因不稳与染色体端粒长度改变的研究

房殿春,杨仕明,罗元辉 (第三军医大学附属西南医院消化内科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨端粒长度与微卫星不稳定(MSI)和APC/MCC及DCC基因杂合丢失(LOH)的关系。方法 采用Southern杂交检测端粒限制性片段长度;采用PCR为基础的方法对MSI、LOH和移码突变进行分析。结果 68例胃癌中,至少有1个位点发现MSI者17例(25%)。将MSI分为高频率MSI(≥2个位点)8例、低频率MSI(仅为1个位点)9例和MSI阴性51例3组,结果8例高频率MSI中检出TGF-βRⅡ移码突变6例,BAX移码突变3例,hMSH6移码突变2例,而低频率MSI和MSI阴性组未见有移码突变者。35例胃癌行TRF分析,其中端粒缩短20例(57.1%),基本不变12例(34.3%),延长3例(8.6%)。端粒长度与临床病理参数无关。DCC基因LOH与TRF缩短有关,APC和MCC基因亦有随TRF缩短而LOH率增高的倾向。TRF长度与MSI和移码突变无相关性。结论 胃癌发生涉及二条不同的分子途径。高频率MSI胃癌由于错配修复基因缺陷导致单核苷酸水平突变的积聚和高频率MSI表型,而低频率MSI和MSI阴性胃癌可能涉及LOH病理途径。端粒丢失可能参与了LOH病理途径,而与MSI途径无关。

关键词:胃癌;端粒限制性片段长度;染色体不稳;微卫星不稳
中图法分类号:R735.202;R394.3 文献标识码:A

Analysis on genetic instability and telomeric restriction fragment length of gastric cancer *in vitro*

FANG Dian-chun, YANG Shi-ming, LUO Yuan-hui (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

Abstract Objective To explore the relationship of the telomere length to microsatellite instability (MSI) and to loss of heterozygosity (LOH) of APC, MCC and DCC genes in gastric carcinomas. Methods The specimens were collected from 68 cases of gastric cancer. The length of telomeric restriction fragment (TRF) was measured with Southern blot. LOH of APC, MCC and DCC genes, MSI and frameshift mutation of hMSH6, TGF-βRⅡ and BAX genes were analyzed with PCR-based methods. Results Among all 68 samples, MSI was found in 17 (25%), including 8 of MSI-High (≥2 loci) and 9 of MSI-Low (only one locus). The left 51 samples were found to be lacking MSI or microsatellite stability (MSS). Out of the 8 cases of MSI-High, frameshift mutation of TGF-βRⅡ, BAX and hMSH6 genes was showed in 6, 3 and 2 cases respectively, but no mutation of these genes was found in MSI-Low and MSS samples. In 35 cases, including all MSI-High and MSI-Low studied for TRF, TRF length was shown to be shorter in 20 cases (57.1%), similar in 12 (34.3%) and elongated in 3 (8.6%). The mean TRF length had no correlation with clinicopathological parameters. No association was observed between TRF length and MSI or frameshift mutation. But LOH at the DCC locus were associated with telomere shortening ($P<0.01$). This tendency was also observed in APC and MCC genes although there was no statistical significance. Conclusion The development of gastric cancer can occur through 2 different genetic pathways. In MSI-High gastric cancers, defective mismatch repair leads the accumulation of mononucleotide mutation and the demostration of MSI-High phenotype. In gastric cancers showing MSI-Low or MSS, multiple deletions may represent the LOH pathway. Telomere erosion might participate in the LOH pathway but be unassociated with MSI-High phenotype in gastric cancer.

Key words gastric carcinoma; length of telomeric restriction fragment; chromosome instability; microsatellite instability

真核细胞染色体末端序列-端粒对维持基因的稳定性起重要作用。我们过去的研究表明,基因不稳可以分为二种不同的形式,即染色体不稳(Chromosome instability)和微卫星DNA不稳(Microsatellite instability, MSI)[1]。日益增多的证据表明,染色体端粒丢失可能与染色体不稳有关,但是否参与了MSI尚不清楚。为进一步阐明染色体端粒长度丢失在基因不稳发生中的作用,本研究对端粒限制性片段(Telomeric repeat fragment, TRF)长度与APC/MCC和DCC基因杂合丢失(Loss of heterozygosity, LOH)及MSI的关系进行了分析。

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 MSI的检测

包括5个微卫星位点:BAT25、BAT26、BAT40、D2S123、和D5S346。PCR反应体积15 μl,包括10 mmol/L Tris-HCl(pH8.3)、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L $MgCl_2$、200 μmol/L dNTPs、0.5 μCi

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670347)
作者简介:房殿春(1951-),男,吉林省长春市人,博士,主任医师,教授,主要从事胃癌早期诊断方面的研究,发表论文180余篇。电话:(023)68754124
收稿日期:2000-06-15;修回日期:2000-09-14

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

[33p] dATP, 各种引物 0.5 μmol/L 、0.75 单位 Taq DNA 多聚酶(Perkin-Elmer, USA)和 100 ng 基因组 DNA。PCR 反应为 94 ℃ 1 min, 55 ~ 62 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 35 个循环, 最后 72 ℃延伸 10 min。PCR产物于5%变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 放射自显影观察。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(≥2 个位点)、低频率 MSI(仅为 1 个位点)和 MSI 阴性 3 组。

1.3　移码突变分析

错配修复基因 hMSH6 、TGF-βRⅡ和 BAX 基因分别存在(C)8、(A)10 和(G)8 单核苷酸重复序列, 采用 PCR 方法对这些基因编码区的移码突变进行检测, 所用引物参照文献[2 ~ 4] 合成。PCR 反应条件为 94 ℃ 1 min、55 ℃或 56 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min, 35 个循环, 除 TGFβRⅡ用 8%变性胶电泳外, 其他 DNA 变性、电泳和放射自显影方法同 MSI 检测。

1.4　TRF 分析

高分子量 DNA 采用蛋白酶 K 消化, 酚/氯仿/异戊醇/酒精提取, 3 mol/L 醋酸钠和已醇沉淀基因组 DNA, 用 *Hinf* Ⅰ (Promega, USA) 消化, 取 10 μg 消化过的 DNA 在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 然后将 DNA 转到醋酸纤维膜上(Promega, USA), 与末端标记(TTAGGG)4 的 α-^{32}P-ATP 探针杂交, 放射自显影 24 h。经 CAMIS 型图像分析进行积分光密度扫描, TRF 长度按以下公式计算: 平均 TRF = Σai/Σ(Ai/Li), Ai 为 i 点的吸光度值, Li 为 i 点的标记长度。

1.5　LOH 分析

对 APC/MCC 和 DCC 基因进行 LOH 分析, 所用引物参见文献[5, 6] 。PCR扩增后 APC 第 11 外显因子扩增产物用限制性内切酶 RsaⅠ(Sigma)30 单位酶切 12 h; 为提高检测的敏感性, DCC 基因部位选择应用了 3 组引物, 引物 1、2 扩增产物用 MSPⅠ(Sigma)10 单位酶切 12 h, 消化后的 DNA 在 3%琼脂糖凝胶中进行电泳分离。MCC 第 10 外显子引物与 DCC 引物 3 扩增产物分别直接在 8%聚丙烯酰胺凝胶和 3% 琼脂糖凝胶中电泳分离, 溴乙锭染色, 紫外光下观察并照像。

正常组织 DNA 进行 PCR 扩增, APC 第 11 外显子酶解和电泳分离后若仅出现 133 bp 条带者为纯合子(非信息个体), 若出现 133、85 和 48 bp 3 条带者为杂合子(信息个体)。MCC 第 10 外显子直接电泳分离后出现 93 bp 条带者为纯合子, 出现 93 bp 和 79bp 2 条带者为杂合子。酶解电泳分离后, DCC 引物 1 只出现 396 bp 条带者为纯合子, 若出现 396、257 和 139 bp 3 条带者为杂合子; DCC 引物 2 仅出现 240 bp 条带者为纯合子, 若出现 240、137 和 103 bp 3 条带者为杂合子; DCC 引物 3 直接电泳分离后只出现 200 bp 条带者为纯合子, 若出现 200 bp 和 160 bp 两条带者为杂合子。对信息个体癌组织 DNA 以同样的引物进行 PCR-RFLP 分析, 比较同一病人癌组织及正常组织 DNA 电泳片段大小及量的差异, 就可推算出是否存在 LOH。

1.6　统计学分析

采用单因素方差分析和 χ^2 检验。

2　结果

2.1　MSI 与移码突变的关系

5 个微卫星位点、TGF-βRⅡ、BAX 和 hMSH6 基因经 PCR 扩增电泳变化图形, 见图 1、2。68 例胃癌中至少有 1 个位点检出 MSI 者 17 例(25%), 其中属高频率 MSI 8 例(11.8%)、低频率 MSI 9 例(13.2%)和 MSI 阴性 51 例(75%)。MSI 与移码突变的关系见表 1。68 例肿瘤检出 TGF-βRⅡ移码突变 6 例、BAX 移码突变 3 例、hMSH6 移码突变 2 例。所有移码突变均发生于高频率 MSI 肿瘤, 而低频率 MSI 和 MSI 阴性肿瘤无移码突变者。

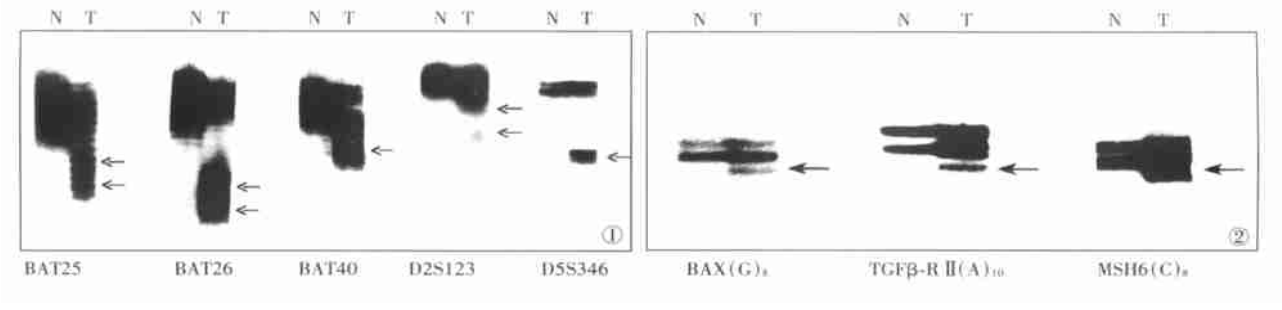


图 1　胃癌微卫星不稳检测, 检测了 5 个微卫星位点(BAT-25, BAT-26, BAT40, D2S123 and D5S346), 箭头所指为异常带型

Fig 1　Determination of MSI in gastric cancer using 5 microsatellite loci (BAT-25, BAT-26 BAT40, D2S123, and D5S346). Arrows indicate variant comformers　N: Normal DNA pattern; T: Tumor specimens containing variant conformers representing MSI

图 2　胃癌 hMSH6、TGF-beta RⅡ, and BAX 基因移码突变检测, 箭头所指为移码突变带形

Fig 2　Frameshift mutations of hMSH6 TGF-β RⅡ, and BAX genes in gastric cancers. Arrows indicate conformational variants associated with frameshift mutations　N: Normal DNA; T: Tumor DNA

表 1　微卫星不稳与移码突变的关系

Tab 1　Relationship between MSI status and frameshift mutation

MSI status	*n*	Frameshift mutations		
		MSH6	TGFβRⅡ	BAX
MSI-H	8	2	6	3
MSI-L	9	0	0	0
MSS	51	0	0	0

2.2　TRF 与临床病理参数的关系

35 例胃癌, 包括 8 例高频率 MSI、9 例低频率 MSI 和 18 例 MSI 阴性胃癌检查了 TRF 长度, 见图 3。与正常组织相比, 若肿瘤组织TRF 长度短于正常组织80%为缩短, 若长于正常组织的 120%为延长, 80% ~120%为无明显变化。根据此标准, 35 例胃癌TRF 属缩短者 20 例(57.1%), 属无明显变化 12 例(34.3%), 属延长者 3 例(8.6%)。TRF 长度变化与临床病理参数的关系,

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

除了 50～59 岁组以外，各组 TRF 的长度均随年龄的增长而缩短，30～39 岁组平均 TRF 长度显著长于 60～69 岁或 70～79 岁组（$P<0.01$），其他各组间均差别不显著（$P>0.05$）。

2.3 TRF 与 MSI 和移码突变的关系

TRF 与 MSI 和移码突变的关系，见表 2。肿瘤组织 TRF 长度与 MSI 和移码突变无显著性差异（$P>0.05$）。

2.4 TRF 与 LOH 的关系

35 例胃癌进行了 LOH 分析，APC、MCC 和 DCC 基因 LOH 的检出率分别为信息个体的 27.3%（6/22）、36.8%（7/19）和 56.3%（18/32），见图 4。TRF 与 LOH 的关系，见表 3。DCC 基因 LOH 与 TRF 缩短有关（$P<0.05$）。虽然 APC 和 MCC 基因 LOH 组 TRF 缩短的例数高于非 LOH 组，但经统计学处理差别无显著性（$P>0.05$）。

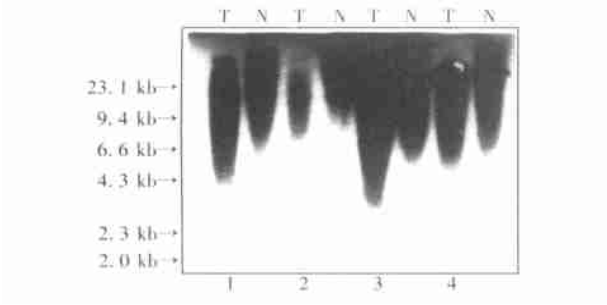


图 3 胃癌标本 DNA 限制性片段 Southern 杂交分析

Fig 3 Southern blot analysis of telomere repeat arrays in DNA samples of patients with gastric cancer

DNA was digested with Hinf I and hybridized with α-^{32}P ATP end-labeled $(TTAGGG)_4$ probe; T: Tumor DNA; N: Normal tissues

表 2 TRF 长度与 MSI 或移码突变的关系

Tab 2 Relationship between alterations of TRF length and MSI status or frameshift mutation

	n	Alteration in TRF length		
		Shortened (n=20)	Normal (n=12)	Elongated (n=3)
MSI status				
MSI-H	8	4	4	0
MSI-L	9	4	4	1
MSS	18	9	7	2
Frameshift mutation				
MSH3	35	1	1	0
TGFβR Ⅱ	35	3	2	1
BAX	35	2	1	0

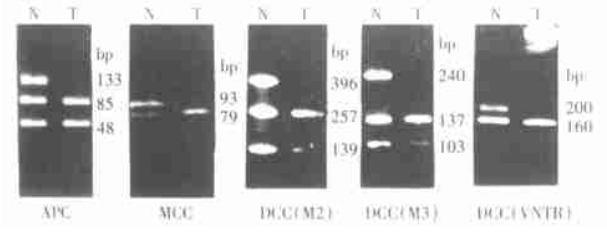


图 4 胃癌 APC、MCC 和 DCC 基因杂合缺失分析

Fig 4 LOH analysis of APC, MCC and DCC genes in gastric cancer

T: Tumor DNA; N: Normal tissues

表 3 TRF 长度与 APC/MCC 和 DCC 基因杂合丢失的关系

Tab 3 Relationship between alteration of TRF length and loss of heterozygosity of APC, MCC and DCC Genes

LOH	Alteration in TRF length (LOH/Informative)		
	Shortened (n=20)	Normal (n=12)	Elongated (n=3)
APC	5/13	1/7	0/2
MCC	6/11	1/6	0/2
DCC	14/18 *	3/11	1/3

*: $P<0.01$ *vs* normal and elongated

3 讨论

本研究发现，68 例胃癌中至少有 1 个位点检出 MSI 者为 17 例（25%），与过去文献报告的相似。现已明确，胃肠道肿瘤由高频率 MSI 和低频率 MSI 肿瘤所组成，高频率 MSI 肿瘤无论在临床病理特点还是在基因改变方面均与低频率 MSI 肿瘤有明显不同[7]。我们过去的研究表明，高频率 MSI 胃癌 APC、MCC 和 DCC 基因 LOH 率明显低于低频率 MSI 和 MSI 阴性胃癌[6]。本组 68 例胃癌中，属高频率 MSI 8 例（11.8%）、低频率 MSI 9 例（13.2%）和 MSI 阴性 51 例（75%）。TGF-βR Ⅱ、BAX 和 hMSH6 基因移码突变均发生于高频率 MSI 胃癌，而低频率 MSI 和 MSI 阴性胃癌未见有移码突变者，提示这些基因是高频率 MSI 胃癌的突变靶位。以上结果提示，高频率 MSI 胃癌的发生途径可能与 Vogelstein 及其同事们所提出的分子途径完全不同[8]。

应用 Southern 杂交方法检测了 35 例胃癌 TRF 长度，发现 57.1%的胃癌 TRF 明显短于正常对照，提示端粒丢失可能在胃癌的发生中起一定作用。文献报告，端粒丢失与前列腺癌的复发和预后密切相关[9]，但本研究并未发现端粒丢失与肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移和临床分期有何密切关系，提示端粒丢失在评价病人预后方面的价值有限。

业已发现，在多种恶性肿瘤如结肠癌、肝癌、肺癌和肾细胞癌中有端粒丢失。本研究显示，胃癌除端粒丢失外亦有大致正常和延长者。造成这种差别可能有几种原因。根据文献报告和本结果，笔者认为肿瘤组织端粒长度无明显改变的原因至少有三方面。其一为可能这些肿瘤中的大多数细胞分裂的次数不多，尚无明显的端粒丢失；其二为可能这些肿瘤大部分细胞中的端粒酶已经活化，使得已经丢失了的端粒又复原到正常长度；其三，若肿瘤组织里搀杂过多正常细胞亦会影响检测结果。本研究还发现，肿瘤组织 TRF 长度随着年龄的增高而逐渐减少，提示在评价肿瘤端粒长度时年龄因素亦应考虑在内。最后，在某些肿瘤中观察到的端粒端端融合可能会导致 TRF 的延长。

研究表明，染色体不稳与端粒丢失有关。端粒丢失常伴有 p53 和 RB 基因的 LOH，但少有 K-ras 和 p53 基因突变[10]。本研究发现，端粒丢失与 DCC 基因 LOH 显著相关，APC 和 MCC 基因 LOH 亦与 TRF 长度减少有关，虽然没有达到统计学差别，但 APC 和 MCC 基因

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

LOH 倾向发生于 TRF 长度减少的肿瘤。以上提示端粒丢失可能参与了 LOH 病理途径。文献报告,结肠癌端粒酶活性与 MSI 无关[11],但 TRF 与 MSI 的关系国内外尚无文献报告。本研究对 TRF 与 MSI 的关系进行分析,结果未发现端粒丢失与 MSI 有显著相关性,提示 MSI 途径独立于端粒丢失。

我们的研究表明,端粒丢失在胃癌的发生中可能起一定作用。胃癌发生至少涉及两种不同的基因不稳方式,即染色体不稳(亦称 LOH 途径)和微卫星不稳(MSI 途径)。前者可能包括低频率 MSI 和 MSI 阴性胃癌,肿瘤抑制基因如 p53 、APC、MCC、APC 和 DCC 基因 LOH 在癌变过程中起重要作用。而后者可能包括了高频率 MSI 胃癌,由于错配修复基因突变使单核苷酸水平突变率增加,结果导致高频率 MSI。端粒丢失可能参与了 LOH 途径,但独立于 MSI 途径。我们对 TRF 的分析为进一步揭示肿瘤发生过程中 LOH 和 MSI 二条途径的分子机制提供了新的线索。

参考文献:

[1] 房殿春, 罗元辉, 杨仕明, 等. 胃癌微卫星不稳及其相关突变研究[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(12): 920—922.
[2] Togo G, Toda N, Kanai F, *et al*. A transforming growth factor beta type Ⅱ receptor gene mutation common in sporadic cecum cancer with microsatellite instability[J]. Cancer Res, 1996, 56(24): 5 620—5 623.
[3] Yagi O K, Akiyama Y, Nomizu T, *et al*. Proapototic gene BAX is frequently mutated in hereditary nonpolyposis colorectal cancers but not in adenomas[J]. Gastroenterology, 1998, 114(2): 268—274.
[4] Yin J, Kong D, Wang S, *et al*. Mutation of hMSH3 and hMSH6 mismatch repair genes in genetically unstable human colorectal and gastric carcinomas[J]. Human Mutat, 1997, 10(6): 474—478.
[5] Fang D C, Jass J R, Wang D X. Loss of heterozygosity and loss of expression of the DCC gene in gastric cancer[J]. J Clin Pathol, 1998, 51(6): 593—596.
[6] 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.
[7] Jass J R, Biden K G, Cummings M C, *et al*. Characterization of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways[J]. J Clin Pathol, 1999, 52(6): 455—460.
[8] Vogelstein B, Fearon E R, Hamilton S R, *et al*. Genetic alterations during colorectal tumor development[J]. N Engl J Med, 1988, 319(9): 525—532.
[9] Donaldson L, Fordyce C, Gilliland F, *et al*. Association between outcome and telomere DNA content in prostate cancer[J]. J Urol, 1999, 162(5): 1 788—1 792.
[10] Hiyama K, Ishioka S, Shirotani Y, *et al*. Alterations in telomeric repeat length in lung cancer are associated with loss of heterozygosity in p53 and Rb[J]. Oncogene, 1995, 10(5): 937—944.
[11] Unate H, Ikeguchi M, Kaibara N, *et al*. Telomerase activity and microsatellite instability in colorectal cancer and adenoma[J]. Int J Oncol, 1998, 13(6): 1 223—1 228.

(编辑 郭建秀)

文章编号: 1000-5404(2001)01-0005-01

经验与短篇

西比灵对缺血性脑血管病的治疗作用研究

Therapeutic effect of Sibelium on ischemic cerebrovascular disease

陈康宁, 史树贵 (第三军医大学附属西南医院神经内科, 重庆 400038)

神经元缺血损伤的机制尚不清楚,较为大家接受的是钙超载学说,有人提出钙是细胞死亡的最终共同通路(A final common pathway)。为此,我们选用钙通道阻滞剂西比灵(Sibelium)治疗缺血性脑血管病患者,观察其对患者脑脊液钙浓度及神经功能的影响,旨在为缺血性脑血管病的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

56 例缺血性脑血管病的患者(均经头颅 CT 或 MRI 证实),男性 33 例,女性 23 例,平均年龄 60.7 岁。起病至开始治疗时间为(1.89±0.45) d。对照组 28 例,采用我科的常规治疗(不使用钙通道阻滞剂)。治疗组 28 例,除常规治疗外,加用钙通道阻滞剂西比灵,5 ~ 10 mg 每晚 1 次口服。患者神经功能的评定(BI 指数)及脑脊液钙含量的测定分别在入院时、治疗后 14 d 及 28 d 进行。梗塞体积按梗塞面积以最大层面的最大长× 宽 × 梗塞的层面÷2 计算,分别于入院时及治疗后 28 d 测定。脑脊液钙浓度用全自动生化分析仪(Beckman CX-7)测定。数据采用组间 t 检验。

(下转 8 页)

作者简介: 陈康宁(1964—), 男, 四川省雅安市人, 博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事脑血管病, 神经症方面的研究, 发表论文 18 篇。电话: (023)68754000-73070

收稿日期: 2000-04-25; 修回日期: 2000-08-20

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