DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.07.017
第22卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 7
2000年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2000

文章编号:1000-5404(2000)07-0653-03

论著

食管癌 APC/MCC 基因杂合缺失的研究

王明荣,王海东,熊 刚,房殿春 (第三军医大学附属西南医院胸心外科,重庆 400038)

提 要:目的 研究APC/MCC基因杂合性缺失(LOH)与食管癌发生发展的关系。方法 应用多聚酶链反应技术及限制性片段长度多态现象对46例食管癌APC和MCC基因的LOH进行了分析。结果 食管癌APC和MCC基因LOH阳性表达分别为29.0%(9/31)和33.3%(8/24)。结论 APC、MCC基因的LOH是食管癌的常见改变,可能参与了食管癌的发生。

关键词:食管肿瘤;食管癌;抑癌基因;杂合缺失
中图法分类号:R735.1;R394.3 文献标识码:A

Loss of heterozygosity at APC and MCC genetic loci in esophageal carcinoma

WANG Ming-rong, WANG Hai-dong, XIONG Gang, FANG Dian-chun (Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the relationship between the loss of heterozygosity (LOH) at APC and MCC genetic loci and the incidence and development of esophageal carcinoma. Methods LOH at APC and MCC genetic loci in 46 specimens resected from esophageal neoplasm was studied with polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). Results LOH was 29.0% and 33.3% at APC and MCC genetic loci, respectively. Significant correlation was found between LOH at genetic loci and clinical parameters ($P>0.05$). Conclusion This study suggests that LOH at APC and MCC genes is the common genetic alteration in esophageal carcinoma and may participate in the genesis of esophageal carcinoma.

Key words: neoplasma; esophageal carcinoma; suppressor gene; loss of heterozygosity

研究发现,特定染色体区域的丢失在食管癌发生发展过程中起重要作用,染色体5q即是常见的丢失区域[1,2]。现已发现,在染色体$5q^{21}$区域毗邻存在2个抑癌基因,即腺瘤性息肉病基因(APC基因)[3]和结肠癌突变基因(MCC基因)[4]。有关食管癌APC和MCC基因杂合缺失(Loss of heterozygosity, LOH)的研究国外已见报道,国内却鲜见报道。为探讨这些基因改变和食管癌发生发展的关系,我们采用聚合酶链反应技术(PCR),并配合限制性片段长度多态现象(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析,对食管癌组织APC、MCC基因的杂合缺失进行研究。

1 材料与方法

1.1 标本收集和DNA提取

46例食管癌为我院1995年6月至1997年6月手术切除标本。手术切下肿瘤后立即收集癌组织和手术切缘处的正常粘膜组织,剔除出血、坏死部分,-80℃冻存备用。癌组织均经冰冻切片染色,镜检证实所测的癌组织癌细胞在50%以上,正常组织证实无癌细胞。采用蛋白酶K消化、酚/氯仿提取法抽提癌组织及正常组织DNA,用TE液稀释,于紫外分光光度计上测定其波长260 nm和280 nm处吸光度,计算DNA的浓度和纯度。

1.2 引物设计

根据文献[2],针对APC和MCC基因合成了2对引物(引物由中国科学院上海细胞生物研究所合成),见表1。

表1 食管癌组织杂合缺失测定中使用的引物

Tab 1 Primer for testing heterozygosity loss of esophageal carcinoma

Testing loci	Enzyme	Amplified segment (bp)	Sequence of primer
11th exon of APC	RsaI	133/85+48	5'-GGACTACAGGCCATTGCAGAA-3'
			5'-GGCTACATCTCCAAAAGTCAA-3'
10th exon of MCC		93/79	5'-TACGAATCCAATGCCACA-3'
			5-CTGAAGTAGCTCCAAACA-3'

作者简介:王明荣(1950—),男,江苏省南通市人,主任医师,教授,主要从事体外循环损伤、肺癌血管生长抑制治疗方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68754638

收稿日期:1999-09-22;修回日期:2000-03-19

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

1.3 PCR 扩增

PCR 反应总体积 20 μl，其中模板 DNA 0.5 μg，Tris-HCl 10 mmol/L，KCl 50 mmol/L，MgCl 1.5 mmol/L，dATP、dCTP、dGTP 各 0.2 mmol/L，上游及下游引物各 20 pmol，Tap DNA 多聚酶 1.5 μl(华美生物工程公司)。在 PCR 扩增仪上(Perkin Elmer Cetus 2400型)操作。反应条件：95 ℃变性 5 min 后，94 ℃ 40 s，52 或 56 ℃ 40 s，72 ℃延伸 60 s，循环 35 次，最后在 72 ℃继续延伸 10 min。

1.4 RFLP 分析

APC 第 11 外显子扩增产物用内切酶 RsaI 16U 酶切 12 h，MCC 扩增产物无需酶切，直接在 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，溴乙锭染色，紫外光下观察电泳分离带并照像。

1.5 分析方法

正常组织 DNA 进行 PCR 扩增，APC 第 11 外显子酶切和电泳分离后仅出现 133 bp 条带为纯合子(非信息个体)，若出现 133、85 和 48 bp 条带为杂合子(信息个体)。MCC 第 10 外显子直接电泳分离后只出现93 bp 条带者为纯合子，出现93 bp 和79 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 条带及量的差异，就可以推算出是否存在 LOH。

2 结果

2.1 食管癌组织 APC 和 MCC 基因的 LOH

46 例食管癌中，APC 基因属信息个体者 31 例，检出 LOH 9 例，占 29.0%，见图 1；MCC 基因属信息个体者 24 例，检出 LOH 8 例，占 33.3%，见图 2。将 APC/MCC 综合分析，属于信息个体者 37 例，检出 LOH 16 例，占 43.25。

2.2 LOH 与临床病理参数的关系

根据食管癌组织学分类、肿瘤大小、有无浆膜浸润及淋巴结转移的不同类型进行分组，各组 APC 和 MCC 基因 LOH 情况见表 2。经统计学处理，APC 和 MCC 基因 LOH 阳性表达在各组间差异均不显著($P > 0.05$)。



图 **1** 食管癌组织 **APC** 基因的杂合缺失分析

N：正常组织；T：肿瘤组织

Fig 1 Analysis of APC heterozygosity loss of the esophageal carcinoma

N: Normal tissue; T: Cancerous tissue

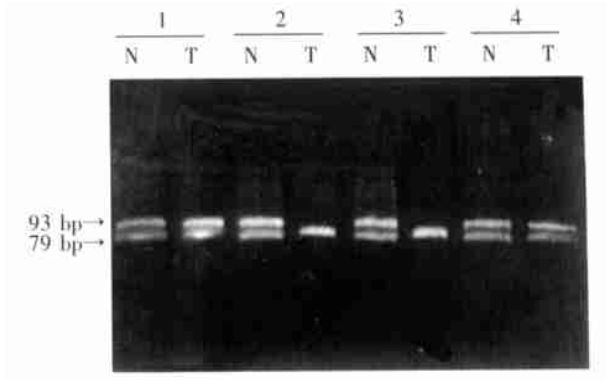


图 **2** 食管癌组织 **MCC** 基因的杂合缺失分析

N：正常组织；T：肿瘤组织；2、3：杂合缺失

Fig 2 Analysis of MCC heterozygosity loss of the esophageal carcinoma

N: Normal tissue; T: Cancerous tissue; 2、3: Heterozygosity loss

表 **2** **APC** 和 **MCC** 基因的杂合缺失与临床病理参数的关系

Tab 2 Relationship between clinical pathological parameter and the heterozygosity loss of APC and MCC gene

Clinical pathological parameter	LOH/case	
	APC	MCC
Histological type		
Squamous cell carcinoma	8/26	6/19
Adenocarcinoma	1/5	2/5
Size of carcinoma		
＜3 cm	5/17	5/17
＞3 cm	4/14	3/7
Penetrating muscle layer		
Not penetrated	6/19	5/15
Penetrated	3/12	3/9
Lymph node metastasis		
No metastasis	4/12	4/10
Metastasis	5/19	5/14

3 讨论

食管癌发生的分子机制颇为复杂，涉及到多种癌基因的扩增与高表达，抑癌基因的突变和缺失及微卫星 DNA 不稳定性[1]。国外文献[1,2]报道食管癌 APC 和 MCC 基因有较高的 LOH 阳性表达，APC 基因 LOH 阳性表达为38%～66%，MCC 为 63%。国内研究也发现，在人原发性食管癌中有一些标本存在 APC 和 MCC 的缺失和突变[3]。本研究对 APC 和 MCC 的 LOH 进行

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

检测, APC 和 MCC 基因的 LOH 阳性表达分别为 29% 和 33.35%。若将 APC/MCC 综合分析, 其 LOH 阳性表达为 43.2%, 说明 APC/MCC 基因 LOH 是食管癌的常见改变, 可能参与了食管癌的发生和发展。APC 和 MCC 基因均定位于染色体 5q21, 一般认为 APC 基因只有当一等位基因拷贝的 LOH 和另一拷贝的突充同时存在时才能使 APC 基因失活[6]。尽管多数食管癌存在 APC 基因 LOH, 但 APC 基因突变却很罕见, 因此有作者认为 APC 基因 LOH 并不是食管癌发生的主要原因[7]。晚近 Ogasawara 等[1] 检测食管癌组织染色体 5q 二核苷酸重复序列(微卫星)位点, 结果发现多数食管癌存在 5q 部分或完全丢失, 与 APC 基因位点不同, 最常见的异变区域定位于 5q31.1, 提示此部位存在一食管癌的候选抑癌基因。因此, APC 和 MCC 在食管癌发生发展中的确切作用尚需进一步研究。

多数作者认为, APC 和 MCC 基因 LOH 是胃肠道肿瘤的早期改变, 可能与肿瘤发生有关[8]。本文对 APC 和 MCC 基因 LOH 与临床病理参数的关系进行分析, 并未发现以上基因 LOH 与食管癌组织学类型、肿瘤大小、浸润深度和淋巴结转移有显著相关关系。

癌是一种基因性疾病, 这已被人们普遍接受。本研究表明, APC 和 MCC 基因的 LOH 是食管癌发生、发展过程中较常见改变。通过对癌基因和抑癌基因的检测, 不仅有助于我们从分子水平认识食管癌的发病机制, 同时也可为食管癌的一级病因学预防提供分子生物学证据, 有重要的理论和实践意义。

参考文献:

[1] Ogasawara S, Tamura G, Maesawa G, *et al*. Common deleted region on the long arm of chromosome 5 in esophageal carcinoma [J]. Gastroenterology, 1996, 110(1): 52—57.

[2] Huang Y, Boynton R F, Blunt P L, *et al*. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancer[J]. Cancer Res, 1992, 52(47): 6 525—6 530.

[3] Greenwald B D, Harpaz N, Yin J, *et al*. Loss of heterozygosity affecting the p53, Rb and APC/MCC tumor suppressor gene loci in dysplastic and cancerous ulcerative colitis[J]. Cancer Res, 1992, 52(47): 741—745.

[4] Ashton-Rickardt P G, Wyllie A H, Bird C C, *et al*. MCC, candidate familial polyposis gene in 5q21, show frequent allele loss in colorectal and lung cancer[J]. Oncogene, 1991, 6(10): 1 881—1 886.

[5] 李华川, 陆士新. 人原发食管癌组织中多种抑癌基因的研究[J]. 中华医学杂志, 1994, 74(11): 489—491.

[6] Aoki T, Mon T, Ciqun D, *et al*. Allelotype study of esophageal carcinoma[J]. Genes Chromosome Cancer, 1994, 10(2): 177—182.

[7] Powell S M, Papadopoulos N, Kinaler K W, *et al*. APC gene mutations in the mutation cluster region are rare in esophageal cancer[J]. Gastroenterology, 1994, 107(6): 1 759—1 763.

[8] Tamura G, Macsawa C, Suzuki Y, *et al*. Primary gastric carcinoma cell frequently lose heterozygosity at the genetic loci[J]. Jpn Cancer Res, 1993, 84(7): 1 015—1 021.

(编辑　谢义霞)

(上接 652 页)

般认为与内分泌因素、遗传、日晒、药物、化妆品、慢性肝、肾疾病有关, 目前无满意疗效[1]。祖国医学历来强调, "有诸内必形之于外"。黄褐斑并不是孤立存在的一种皮肤病, 而是患者气血失调外在表现, 主要由于情志抑郁, 伤及肝脾, 肝郁气滞, 脾虚不能生化精微, 以致血虚不华, 郁结于面, 出现色素沉着, 常分为肝郁阴虚或肾阳不足两型[2]。笔者观察黄褐斑患者, 均有不同程度的伴随症状, 认为该病通常病程较长, 病情复杂, 多为肝气郁结, 气血淤滞, 经络不通, 久病必瘀, 内有瘀则外现斑者使然, 故拟祛斑汤即舒肝解郁, 又活血逐瘀, 畅通肌表气血之流行, 使瘀祛斑除, 方中柴胡、白芍、香附疏肝解郁, 调畅气机, 川芎、益母草、泽兰活血逐瘀, 促进面部血液循环, 祛瘀生新, 畅通血脉; 浮萍、白芷、白蔹皮、当归、合欢皮化瘀祛风养颜。中药面膜中的僵蚕、白附子、白芷亦具有祛风化瘀之功,《从本草经疏》出: 僵蚕去皮肤诸风能灭黑墨,《名医别录》谓"白芷主治风邪", 云苓、益母草、当归、行气养血, 密佗僧、珍珠粉悦泽肌肤, 上述诸药组成祛风邪、行气活血、化痰渍、消斑之功效, 直接作用于面部, 内外结合, 相互作用, 使面部皮肤得以滋养, 瘀祛斑除。

关键词: 祛斑汤; 黄褐斑; 面膜
中图法分类号: R758.43　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 冯　峥, 李恒进, 虞瑞尧. 黄褐斑用维生素 E·C 复合剂治疗与加味逍遥丸治疗的对比观察[J]. 中华医学美容杂志, 1999, 5(3): 160—161.

[2] 朱学俊, 顾有守, 沈丽云. 实用皮肤病性病治疗学[M]. 第 2 版. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998. 426—427.

(编辑　张大春)

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