DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.028
第22卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 1
64 2000年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)01-0064-04

# 小鼠高低转移性肝癌微卫星不稳定性的研究

张树辉[1],史景泉[1],魏 泓[2] (第三军医大学:[1]基础医学部病理学教研室;[2]实验动物中心;重庆 400038)

提 要 目的:了解小鼠高、低转移性肝癌细胞系Hca/16A3-F(F)和Hca/A2-P(P)发生微卫星不稳定性(MSI)情况,探讨它们与肝癌发生及转移之间的关系。方法:随机选择3号和16号染色体上15个多态微卫星标记,采用聚合酶链式反应-简单重复序列多态性(SSLP)和单链构象多态性(SSCP)方法对F和P细胞系进行分析。结果:F和P细胞系有信息的微卫星位点其等位基因与C3H相同,且存在多位点MSI。结论:该肝癌细胞系3号染色体的MSI在肝癌发生中起重要作用,16号染色体的MSI与肝癌转移密切相关。

关键词 肝肿瘤;小鼠;转移;微卫星不稳定性
中图法分类号 R329.24;R735.7 文献标识码 A

# Microsatellite instability in hepatocellular carcinomas with low and high metastatic capacity in mice

ZHANG Shu-hui, SHI Jing-quan, WEI Hong (Department of Pathology, Faculty of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

**Abstract** Objective: To investigate the frequency of microsatellite instability (MSI) in murine hepatocellular carcinoma cell lines Hca/A2-P(P) and Hca/163-F(F) with high and low metastatic capacity and explore its association with occurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. Methods: Fifteen microsatellite markers were randomly selected to examine F and P cells for MSI on chromosomes 3 and 16 using PCR-simple sequence length polymorphism (PCR-SSLP) and PCR-SSCP analysis. Results: Allelic genes on the chromosomes in murine hepatocellular carcinoma cell lines with informative loci were parallel to those of C3H. MSI was also detected in F and P cells. Conclusion: MSI of chromosome 3 plays an important role in the occurrence of hepatocellular carcinoma while that of chromosome 16 is associated with metastasis of the tumor in mice.

**Key words** liver neoplasm; mouse; metastasis; microsatellite instability

肝癌的发生是由多因素参与并经历多阶段的演变过程,在其发生、发展过程中涉及到一系列遗传学改变,包括癌基因的激活、抑癌基因的失活等。最近的研究发现,微卫星不稳定性(Microsatellite instability, MSI)在肿瘤发生、发展中起重要作用[1,2]。为了探讨MSI与肝癌发生及转移的关系,我们应用微卫星多态性标记对小鼠高、低转移性肝癌细胞系MSI进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本收集

小鼠高、低转移性肝癌细胞系Hca/16A3-F(F)和Hca/A2-P(P)由大连医科大学病理学教研室凌茂英教授惠赠[3],SPF级C3H小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,BALB/c小鼠由第三军医大学实验动物中心提供。将F、P细胞用15%胎牛血清RPMI 1640培养液配成$10^7$/ml,在SPF条件下的超净层流架中以0.2 ml/只浓度接种至6周龄BALB/c小鼠右腋中线胸腹联合部皮下,每组12只,10 d断颈处死2只,取肿瘤组织供提取DNA用。其余在21 d后断颈处死,取肿瘤、肝、肺和淋巴结作病理学检查。

### 1.2 基因组DNA的提取

小心去除肿瘤内的坏死和结缔组织,取1 cm×0.25 cm×0.2 cm癌组织块用匀浆器研碎,PBS洗2次,常规蛋白酶K消化,苯酚-氯仿-异戊醇抽提基因组DNA,紫外分光光度法定量后,-20℃冻存备用。另取正常C3H小鼠肝组织作对照。

### 1.3 PCR扩增

随机选择3号和16号染色体上15个微卫星位点[4],引物序列、预计产物和退火温度见表1,引物均由上海细胞生物研究所合成。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600079);全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(96M083);重庆市攻关项目
作者简介:张树辉(1964.5),男,江苏省淮安市人,博士研究生,主治医师,主要从事肿瘤分子病理学方面的研究,发表论文15篇。电话:19821099423
收稿日期:1999-05-13;修回日期:1999-10-15

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

**表 1　微卫星引物序列**

**Tab 1　Primer sequences for microsatellite loci**

| Locus name | Primer sequenes | Allele sizes(bp) | Annealing(℃) |
|---|---|---|---|
| D3Mit15 | AATTTGCATTCCACGACCAC | 145 | 55 |
| | ACGAAGTGACGTTGGGTTTG | | |
| D3Mit16 | TGCTTGTCCTGTGTTAATGA | 186 | 53 |
| | TGAGAATGGAGGTGAACAGC | | |
| D3Mit17 | CATGCCTCCATGGTTCTTC | 180 | 54 |
| | CCACGGAGAACAACTGAACA | | |
| D3Mit18 | GAACAGTTCCCAGGTCCTCA | 214 | 57 |
| | CTGCCTTTAAATTCTGTCACCC | | |
| D3Mit19 | CAGCCAGAGAGGAGCTGTCT | 176 | 60 |
| | GAACATTGGGGTGTTTGCTT | | |
| D3Mit21 | AAGCTCTACAGCGGAAGCAC | 218 | 58 |
| | CTGGGGAGTTTCAGGTTCCT | | |
| D3Mit22 | AACGATTGAAGAATGGTTGGC | 240 | 55 |
| | AATCAGCGATTTCAGCACG | | |
| D3Nds2 | ACACATTGGAGATGCACAGCG | 115 | 60 |
| | TCTGCATGCCAGGGTTGTGAT | | |
| D16Mit1 | CGCCCTCTAAGGTGACTCAC | 106 | 61 |
| | AGAGAGGGGTTATGGGGTTG | | |
| D16Mit2 | CCAATGCCCTCTTATGACCT | 189 | 57 |
| | TTCTAGTGCGTCCTACCCAG | | |
| D16Mit3 | TCTAACGCCCTCTCTCTACC | 100 | 59 |
| | CCAAATGTGATTGCACAAGG | | |
| D16Mit4 | AGTTCCAGGCTACTTGGGGT | 123 | 59 |
| | CAGCCCTCATTGCAAATCAT | | |
| D16Mit5 | CGGGGATCATCCCTAAAAAC | 160 | 59 |
| | TCCCCAATTCCTCTTGTGTC | | |
| D16Mit6 | CAGGTCCAAGACGAGAACCA | 190 | 60 |
| | TTTGACCTGTGAGCCTGTGC | | |
| D16Mit7 | CTGCCAGCCCTGAACCATTA | 162 | 64 |
| | CTACAAGATGTGGGGCATGA | | |

每个 PCR 反应体系共 25 μl, 其中 10× buffer 2.5 μl, 1.5 mmol/L $Mg^{2+}$, 100 pmol/L 上游及下游引物、4× dNTP 100 μmol/L, $Taq$ 聚合酶 1 U, 100 ng 基因组 DNA。反应条件:94℃预变性 3 min, 94℃变性 1 min, 退火 1 min, 72 ℃延伸 1 ~ 2 min, 循环 30 ~ 35 次, 最后一个循环后置 72 ℃继续延伸 7 ~ 10 min。扩增产物 10 μl 行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测简单重复序列多态性(PCR-SSLP)、5 μl 行 94 ℃变性 5 min 后行 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测单链构象多态性(PCR-SSCP), 银染后观察结果。将肿瘤组织标本与正常肝组织比较, 根据 Arzimanoglou 等[2]的判断标准, 等位基因带增多、移位和丢失记为 MSI。

## 2　结果

### 2.1　高、低转移性肝癌移植瘤的病理学特征

移植瘤大多呈圆形, 直径 2 ~ 3 cm, 灰白色, 切面部分区域可见坏死, 肿瘤很少有完整包膜。瘤细胞呈巢状、片状排列, 其间可见纤维、血管间质;瘤细胞呈多边形或圆形, 排列尚紧密, 可见瘤巨细胞, 核大小不一, 形状不规则, 可见病理性核分裂像, 瘤细胞常侵入周围肌肉组织。接种 21 d 后, P 组仅 2 例发生右腋下淋巴结转移, 瘤细胞局限于边缘窦。F 组 8 例发生淋巴结转移, 包括双侧腋下和腹股沟皮下, 瘤细胞散布于整个淋巴结, 部分淋巴结几乎完全被瘤细胞占据; 3 例可见肺内广泛癌转移灶; 肝组织可见嗜酸性或嗜碱性变, 枯否氏细胞增生, 部分区域可见中性粒细胞浸润。

### 2.2　高、低转移性肝癌微卫星改变

在 P、F 细胞, 有信息的微卫星位点其 PCR 扩增产物等位基因大小均与 C3H 小鼠相同。F、P 细胞微卫星改变见表 2。在 3 号染色体 D3Mit18 位点, P 和 F 细胞均发生等位基因丢失, 见图 1; D3Mit21、D3Nds2 出现额外等位基因条带, 见图 2; 在 D3Mit17 位点, P 细胞等位基因丢失, F 细胞出现额外条带, 见图 3; 在 16 号染色体 D16Mit2、D16Mit3 和 D16Mit5 仅 F 细胞发生等位基因丢失; D16Mit4 位点 P 细胞发生带移位、条带增加, F 细胞发生等位基因丢失, 见图 4。

**表 2　高、低转移性肝癌微卫星改变**

**Tab 2　Summary of microsatellite alterations in mouse HCC cell lines**

| Locus names | P cells | F cells |
|---|---|---|
| D3Mit15 | - | - |
| D3Mit16 | - | - |
| D3Mit17 | loss | additional band |
| D3Mit18 | loss | loss |
| D3Mit19 | - | - |
| D3Mit21 | additional band | additional band |
| D3Mit22 | - | - |
| D3Nds2 | additional band | additional band |
| D16Mit1 | - | - |
| D16Mit2 | - | loss |
| D16Mit3 | - | loss |
| D16Mit4 | shifted/additional band | loss |
| D16Mit5 | - | loss |
| D16Mit6 | - | - |
| D16Mit7 | loss | loss |

"-": No additional, shifed band and allelic losses




**图 1　D3Mit18 位点、PCR-SSLP**

**Fig 1　MSI at D3Mit18, PCR-SSLP**

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

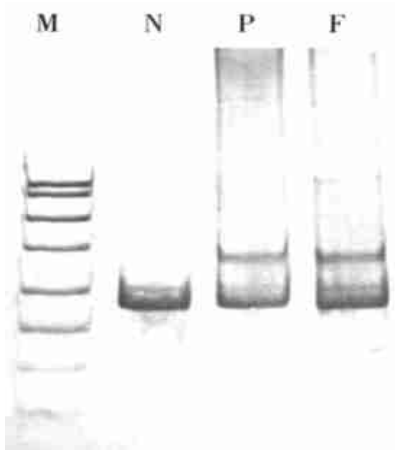



图 2 D3Mit21 位点、PCR-SSLP
Fig 2 MSI at D3Mit21, PCR-SSLP

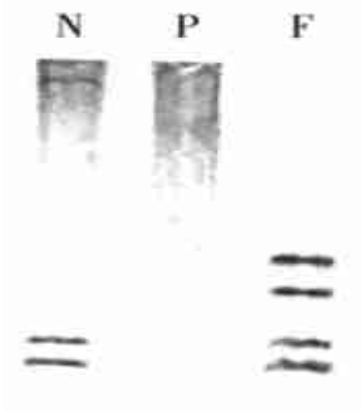



图 3 D3Mit17 位点、PCR-SSLP
Fig 3 MSI at D3Mit17, PCR-SSLP

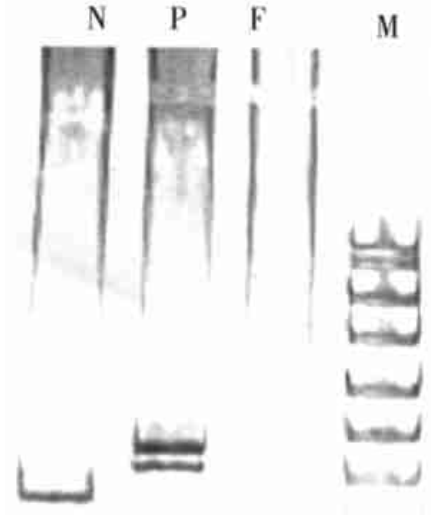



图 4 D3Mit4 位点、PCR-SSLP
Fig 4 MSI at D3Mit4, PCR-SSLP
M =Markers; N =C3H; P =P cells; F =F cells

## 3 讨论

微卫星(Microsatellite)是由 2~6 个核苷酸组成, 具有高度多态性的简单串联排列而成的 DNA 重复序列, 广泛存在于原核及真核细胞基因组中, 位于很多基因的内含子、基因间隔区, 甚至启动子中。微卫星不稳定性(MSI)是指由于复制错误引起的简单重复序列的改变。肿瘤遗传学研究表明, 细胞恶性转化与细胞遗传物质的不稳定性有关, 而遗传物质的不稳定性系错配修复基因(Mismatch repair gene)突变所致。由于错配修复基因的突变及功能异常造成 DNA 频发的复制错误(Replication errors, RER)并不断积累导致细胞的微卫星 DNA 序列发生改变。MSI 首先在遗传性非多发性息肉性结肠癌中观察到, 以后相继在肺癌、乳腺癌、食管癌、胃癌、膀胱癌、前列腺癌等肿瘤中发现 MSI[1,2]。最近 Macdonald 等[5]报道了在人肝细胞癌(HCC)存在 MSI, 且与 DNA 错配修复基因 $hMSH_2$ 和/或 $hMSH_1$ 位点杂合性丢失(LOH)密切相关。Kazachkov 等[6]发现 4/10 例(40%)HCC 也检出 MSI, 提示在肝癌发生、发展过程中 MSI 扮演重要角色。Chen 等[7]用 PCR-SSCP 技术对 N-β-N-(4-羟丁酸)亚硝胺诱发 NON/Shi 小鼠膀胱癌 MSI 研究发现, 未发生转移的肿瘤组织 2/18 例存在 MSI, 而 10 例发生转移的瘤组织及其转移灶肿瘤组织均未检出 MSI。本研究发现由小鼠 $H_2$ 腹水瘤经筛选获得的两个低分化肝细胞癌高低转移性亚克隆细胞系均存在多位点的 MSI。

已证实小鼠 3 号染色体与人 1、3、4 和 8 号染色体的某些区域具有同源性, 在人 HCC 的 $4q26\sim27$(IL-2 基因位座, 此区亦是 HBV 整合部位)、$4q25$(EGF 基因位座)存在等位基因丢失[8,9], $1p35\sim36$ 亦存在 LOH[10]。本研究发现, 小鼠高低转移性肝癌 3 号染色体 D3Mit17、D3Mit18 位点均存在等位基因丢失, D3Mit21(IL-2 基因位座)、D3Nds2(EGF 基因位座)位点出现额外条带。提示在小鼠 3 号染色体上存在肿瘤抑制基因, 其失活或突变与肝癌的发生密切相关。在 D3Mit17 位点, P 细胞等位基因丢失, F 细胞出现额外条带, 提示同一肿瘤的不同亚克隆具有异质性。

小鼠 16 号染色体与人的 2、3、16、21 和 22 号染色体的某些区域亦具有同源性。Takahashi 等[11]发现在人 HCC $22q$ 频繁发生 LOH。小鼠纤维肉瘤 505 细胞系 16 号染色体多位点的 LOH 与转移能力密切相关[12]。本研究结果显示, 与 P 细胞相比, F 细胞的 D16Mit2、D16Mit3 和 D16Mit5 存在等位基因丢失。表明在 16 号染色体上, 高转移的 F 细胞系微卫星位点等位基因丢失明显高于低转移的 P 细胞系, 提示在小鼠 16 号染色体上存在一个与肿瘤转移密切相关的基因, 其失活或

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

突变使肝癌细胞发生转移。本研究还发现 P 细胞系 D16Mit4 位点发生带移位、条带增加，而 F 细胞系发生等位基因丢失，可能是由于肿瘤发展过程中，MSI 的不断积累导致该等位基因丢失。一般认为 MSI 是肿瘤发生早期阶段的遗传物质的改变，但在一些具转移能力的肿瘤中也广泛存在 MSI，因此对 MSI 与肿瘤发生、发展的关系仍须进一步加以研究。

## 参考文献


[1] Jackson A L, Leob L A. The mutation rate and cancer[J]. Genetics, 1998, 148(4): 1483—1491.

[2] Arzimanoglous Ⅱ, Gilbert F, Barber H R K. Microsatellite instability in human solid tumors[J]. Cancer, 1998, 83(9): 1808—1820.

[3] 凌茂英，王明辉，郭伶伶．Hca/16A3-F 及 HCa/A2-P 两株小鼠淋巴道转移细胞的特性研究[J]．中华医学杂志，1995, 75(3): 170.

[4] Dietrich W, Katz H, Lincoln S E, *et al*. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses[J]. Genetics, 1992, 131(2): 423—447.

[5] Macdonald G A, Greenson J K, Saito G, *et al*. Microsatellite instability and loss of heterozygosity at DNA mismatch repair gene loci occurs during hepatic carcinogenesis[J]. Hepatology, 1998, 28(1): 90—97.

[6] Kazachkov Y, Yoffe B, Khaoustov V I, *et al*. Microsatellite instability in human hepatocellular carcinoma: relationship to P53 abnormalities[J]. Liver, 1998, 18(3): 156—161.

[7] Chen T, Yamamoto S, Gen H, *et al*. Infrequent involvement of microsatellite instability in urinary bladder carcinomas of the NON/shi mouse treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine[J]. Cancer Lett, 1998, 123(1): 41—45.

[8] Copeland N G, Jenkins N A, Gilbert D J, *et al*. A genetic linkage map of the mouse: current applications and future prospects[J]. Science, 1993, 262(5130): 57—66.

[9] Chou Y H, Chung K C, Jeng L B, *et al*. Frequent allelic loss on chromosome 4q and 16q associated with human hepatocellular carcinoma in Taiwan[J]. Cancer Lett, 1998, 123(1): 184—192.

[10] Yeh S H, Chen P J, Lai M Y, *et al*. Frequent genetic alterations at the distal region of chromosome $1_p$ in human hepatocellular carcinomas[J]. Cancer Res, 1994, 54(15): 4 188—4 192.

[11] Takahashi K, Kudo J, Ishibashi H, *et al*. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 22 in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 1993, 17(5): 794—799.

[12] Mafune Y, Asakura H, Kominami R. Allelic losses and metastatic ability of mouse tumor cell clones derived from a heterozygous mouse[J]. Oncogene, 1994, 9(8): 2191—2196.


（编辑　冷怀明）

（上接 59 页）

## 2　结果

不同吸氧方式对冠心病治疗效果观察，见表 1。

**表 1　不同吸氧方式对冠心病治疗效果观察**

| 组别 | 心绞痛消失 | 心绞痛改善 | T 波恢复正常 | S-T 恢复正常 | 心律失常消失 |
|---|---|---|---|---|---|
| 高压氧疗组 | 16#* | 20#* | 9# | 18#* | 13#* |
| 指定吸氧组 | 11# | 18# | 8# | 16#* | 11# |
| 随意吸氧组 | 8 | 17# | 4 | 7 | 5 |
| 对照组 | 3 | 6 | 2 | 8 | 4 |

#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ 与对照组相比；

*：$P<0.05$ 与随意吸氧组相比

高压氧疗组在心绞痛消失、心绞痛改善、T 波恢复正常、S-T 段恢复正常、心律失常消失例数明显好于对照组。在心绞痛消失、S-T 段 恢复正常、心律失常消失例数明显好于随意吸氧组。

指定吸氧组在心绞痛消失、心绞痛改善、T 波恢复正常、S-T 段恢复正常、心律失常消失例数明显好于对照组。在 S-T 段恢复正常例数明显好于随意吸氧组。

随意吸氧组在心绞痛改善例数明显好于对照组。

## 3　讨论

进餐和排便可使心率加快，心脏负担增加，加重心肌缺血和耗氧。有研究表明，用力排便 5～10 min 可使冠状动脉舒张期血流下降，造成致命性心律失常。睡眠期间因迷走神经兴奋、多梦等诸多因素，冠心病患者可出现心肌缺氧、心律失常甚至猝死[2]。故进餐、排便、睡眠形成了冠心病人发生心脏事件的三个危险期。心脏是一个由肌肉构成的泵，它将血液压向全身各部位，它本身同样需要靠冠状血管供应血液和氧气，而且心肌对缺氧十分敏感，心肌乏氧几秒钟即发生心肌损伤[3]，导致心脏事件。由此可见，对冠心病患者在进餐、排便和睡眠前实施 30 min 吸氧可使冠心病患者血氧浓度在此三期保持高水平，以达到在心肌缺血或心律失常时发挥显著作用。应用高压氧治疗冠心病，能使患者在高压氧吸入后，血氧浓度较长时间内保持高水平状态，从而减少心脏事件的发生。本试验提示：指定吸氧组与高压氧疗组对冠心病治疗效果无明显差异，均好于随意吸氧组和对照组，可以达到同样的目的，而指定吸氧有使用方便、副作用小、费用少、病人易接受等诸多优点，值得在临床上推广应用。

关键词　吸氧；冠心病；疗效

中图法分类号　R541.4　　文献标识码　B

## 参考文献


[1] 中华心血管杂志编辑部译．缺血性心脏病的命名及诊断标准(WHO)[J]．中华心血管杂志，1981, 9(1): 75.

[2] 沈琳丽．50 例老年冠心病患者的护理观察[J]．中华护理杂志，1989, 24(2): 79.

[3] 王济东，李洪珍．急性心肌梗塞病人管理中护士的作用[J]．国外医学：护理学分册，1996, 15(4): 145—147.


（编辑　王　红）

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