DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.001

文章编号:1000-5404(1999)10-0699-03

121

胃癌组织幽门螺杆菌感染与微卫星不稳定性研究*

论著

房殿春** 周晓东 罗元辉 鲁 荣 刘为纹 (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆,400038

提 要 目的:通过分析胃癌组织幽门螺杆菌(Hp)感染与微卫星DNA不稳定性(MSI)的关系,探讨幽门螺杆菌在胃癌发生中的作用。方法:采用PCR为基础的方法对49例胃癌组织中Hp尿素酶A(HpA)和B(HpB)基因以及6个微卫星位点(D17s261,D17s799,TCF-2,D18s34,D5s409和D5s82)进行检测,对Hp感染与微卫星不稳定性间的关系进行分析。结果:胃癌组织Hp DNA的检出率为40.8%(20/49),其D17s261,D17s799,TCF-2,D18s34,D5s409和D5s82位点MSI的检出率分别为22.4%(11/49),22.4%(11/49),18.4%(9/49),28.6%(14/49),14.3%(7/49)和20.4%(10/49)。Hp阳性组各位点MSI检出率与Hp阴性组比较无显著差异($P>0.05$)。结论:Hp感染与MSI无显著相关,在胃癌的发生中可能不起直接作用。

关键词 肿瘤/病因学;幽门螺杆菌;微卫星不稳定性
中图法分类号 R735.2 **文献标识码**:A

流行病学研究资料提示,幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*,Hp),特别是含细胞毒相关A蛋白(Cytotoxin-associated gene A protein,CagA)基因的Hp感染与胃癌之间存在因果关系[1]。体外实验证实Hp培养滤液可诱导胃粘膜细胞DNA损伤[2],分子生物学方面研究亦提示Hp感染与ras基因活化有关[3]。为从分子水平揭示Hp的致癌机制,本文采用PCR技术对胃癌组织Hp进行检测,并对Hp感染与胃癌组织微卫星不稳定性(Microsatellite instability,MSI)之间的关系进行分析。

1 材料与方法

1.1 标本

49例胃癌为我院1994年1月至1996年7月手术切除标本,手术切下肿瘤后立即收集癌及切缘处正常组织,剔除出血坏死部分后置−80°C冰箱保存备用。采用蛋白酶K消化、酚/氯仿法提取基因组DNA,冰冻切片染色证实所检测癌组织肿瘤细胞数均在50%以上。

1.2 引物

参照文献[4~8]合成D17s261、D17s799、TCF-2、D18s34、D5s409及D5s82 6个微卫星位点和Hp尿素酶A(HpA)和B(HpB)基因引物,引物序列见表1。D17s799和TCF-2引物序列由Garden博士提供。

1.3 PCR扩增

采用2400型PCR仪(Perkin Elmer Cetus)扩增微卫星及HpA和HpB基因DNA,循环参数为94°C 30 s,56°C 40 s,72°C 30 s,32个循环后置72°C继续反应10 min,反应总体积为20 μl(含10×Buffle 2 μl,引物各10 pmol,4×dNTP各0.2 mmol/L,Taq DNA聚合酶2 U,基因组DNA 100 ng),扩增产物在1.5%琼脂糖(北京中山生物公司)上电泳,溴乙锭染色,紫外光下观察。各微卫星位点的检测经证实无杂带后,以首次扩增产物为模板,另加0.8 μl a-^{32}P dNTP(10 U/μl)进行第2次扩增,取扩增产物5 μl与等量上样缓冲液(98%甲酰胺,0.025%二甲苯蓝和溴酚蓝,10 mmol/L EDTANa_2)混合,95°C变性3 min后快速冷却,在10%的变性聚丙烯酰胺凝胶(含7 mol/L尿素)电泳(恒功率55 W)2~4 h,凝胶干燥,放射自显影,洗片观察结果。

表1 微卫星位点及HpA和HpB基因引物序列

Tab 1 Primer sequence of microsatellite loci and HpA, HpB

Loci	Position in chromosomes	Primer sequence
D17s261	17p12-11.2	5′-CAGGTTCTGTCATAGGACTA-3′
		5′-TTCTGGAAACCTACTCCTGA-3′
D17s799	17p13.1-12	5′-ATTGCCAGCCGTCAGTT-3′
		5′-GACCAGCATATCATTATAGACAA-3′
TCF-2	17p11.2	5′-GACCCCACAGCCTATTCAGA-3′
		5′-TTGACTGCTGAACGGCTGCA-3′
D18s34	18q	5′-CAGAAAATTCTCTCTGGCTA-3′
		5′-CTCATGTTCCTGGCAAGAAT-3′
D5s409	5q	5′-GAAGGGATGAAGTGTGGATT-3′
		5′-TCAAGGACTGTAGGATGGCA-3′
D5s82	5q23-15	5′-CCCAATTGTATAGATTTAGAAGTC-3′
		5′-ATCAGAGTATCAGAATTTCT-3′
HpA	—	5′-GCCAATGGTAAATTAGTT-3′
		5′-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3′
HpB	—	5′-TGGGATTAGCGAGTATGT-3′
		5′-CCCATTCGACTCAATG-3′

1.4 结果分析

与正常组织比较,胃癌组织有额外的DNA等位片段或出现等位片段泳动,即可判断为MSI。经1.5%琼脂糖电泳,HpA可见411 bp片段,HpB则可见132 bp片段。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39670347
** 房殿春,男,47岁,主任医师,教授

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

1.5 统计学分析

以 χ^2、四格表确切概率法对实验数据进行统计学分析，$P<0.05$ 为相差显著。

2 结果

2.1 胃癌组织 MSI 检出率

49 例胃癌经 PCR 扩增、放射自显影观察，TCF-2 位点 MSI 检出率为 18.4%(9/49)，D17s261 和 D17s799 位点均为 22.4%(11/49)，D18s34 位点为 28.6%(14/49)，D5s409 位点为 14.3%(7/49)，D5s82 位点为 20.4%(10/49)，见图 1，若将以上位点综合分析，49 例胃癌中有 26 例检出 MSI，总检出率为 53.1%，其中同一胃癌 2 个位点以上检出 MSI 15 例，占 MSI 阳性者的 57.8%。

2.2 Hp 感染与 MSI 发生的关系

49 例胃癌中检出 HpA 和 HpB 基因片段者 20 例，检出率为 40.8%，见图 2,3。Hp 阳性与阴性组各位点 MSI 检出情况见表 2。Hp 阳性胃癌组各位点 MSI 检出率与 Hp 阴性组相比无显著差异($P>0.05$)，将 6 个位点 MSI 综合分析，29 例 Hp 阴性和 20 例 Hp 阳性胃癌组各检出 MSI 13 例，Hp 阳性与阴性胃癌组 MSI 检出率亦无显著差异($P>0.05$)。

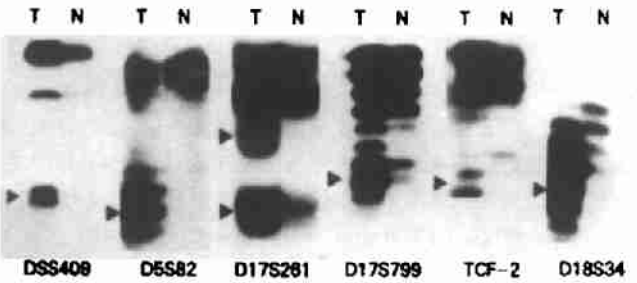


图 1 胃癌微卫星 DNA 不稳定性

N：正常组织；T：肿瘤组织

Fig 1 Microsatellite instability in gastric cancer

N: Normal tissue; T: Tumor tissue

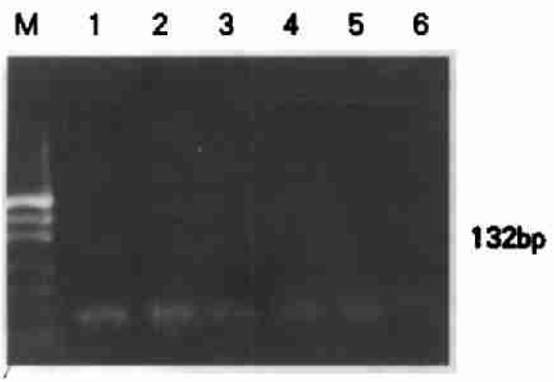


图 2 胃癌组织 Hp 尿素酶 A 基因检测

M：分子量；1～6 均为阳性

Fig 2 Detection of HpA in gastric cancer

M: Molecular marker; Lane 1～6: Positive



图 3 胃癌组织 Hp 尿素酶 B 基因检测

M：分子量；3,5,7 为阳性

Fig 3 Detection of HpB in gastric cancer

M: Molecular marker; Lane 3,5,7: Positive

表 2 Hp 感染与 MSI 发生的关系

Tab 2 The relationship between Hp and MSI

Group	n	TCF-2	D17s261	D17s799	D18s34	D5s409	D5s82
Hp(−)	29	5	5	7	7	5	7
Hp(+)	20	4	6	4	7	2	3

3 讨论

尽管众多流行病学调查表明，Hp 感染可能与胃癌的发生有关，但 Hp 感染在胃癌发生中如何起作用仍是有待深入研究的课题。Hp 致癌机制目前有以下几种推测[9]：①Hp 感染为慢性胃炎的主要原因，而慢性胃炎→胃粘膜萎缩→肠上皮化生→异型增生→胃癌这一癌变的模式过程已为多数国内外学者所接受，因此有理由认为，Hp 感染为胃癌发生的启动因子。②胃粘膜细胞染色体被 Hp DNA 片段插入，引起癌基因的活化和抑癌基因的失活。③Hp 感染可使胃粘膜细胞增殖速度加速，Hp 产生的某些毒素物质可损伤细胞 DNA，这二方面都容易产生 DNA 复制错误。微卫星不稳定性是指由于复制错误引起的 DNA 简单重复序列的改变。最近研究发现其在胃癌发生过程中扮演重要角色，因此研究 Hp 感染与微卫星不稳定性的关系对揭示 Hp 的致癌机制可能有重要意义。

文献报告胃癌 MSI 的检出率为 18%～39%[10]，本研究采用 PCR 为基础的方法对 49 例胃癌组织 TCF-2、D17s261、D17s799、D18s34、D5s409 和 D5s82 6 个微卫星位点的 MSI 进行检测，MSI 的检出率分别为 18.4%、22.4%、22.4%、28.6%、14.3%和 20.4%。

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

若将以上位点综合分析，则总检出率为 53.1%，提示 MSI 在胃癌的发生中起重要作用，可能是胃癌发生的一种新机制。但通过分析 Hp 阳性与阴性组的 MSI，并未发现 Hp 感染与 MSI 有密切相关关系，提示 Hp 并非通过引起 MSI 导致胃癌发生。

近年来对 Hp 感染与胃癌关系的临床研究逐渐增多，但大多为对胃癌患者 Hp 感染率的流行病学调查，其结果各家报道不一。从本文资料看，胃癌组织 Hp 的检出率仅为 40.8%，明显低于以往报告的慢性胃炎和溃疡病检出率，其原因考虑为由于胃癌形成后，造成胃粘膜组织结构和微环境的改变，不适宜 Hp 的生存，导致 Hp 的"丢失"所致[11]。但晚近流行病学资料表明，在某些 Hp 感染率高的地区，胃癌的发生率并不高[12]，且胃癌可以发生在无 Hp 感染者。因此作者认为，Hp 感染不是胃癌发生所必须或直接的致病因素。胃癌的发生是多因素作用的结果，若将胃癌发病研究的主流限于 Hp，则有可能会误导或减慢我们对胃癌复杂发病机制的研究。因此，我们应客观评价 Hp 在胃癌发生中的作用。

参考文献

1 Parsonnet J, Friedman G D, Orentreich N, *et al*. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. Gut, 1997, 40(3): 297

2 梁后杰，刘为纹，房殿春，等. 幽门螺杆菌培养滤液诱导胃粘膜细胞 DNA 损伤. 中华消化杂志，1995，15(增刊)：21

3 于　君，张锦坤. 应用分子生物学技术研究幽门螺杆菌感染与胃癌变的关系. 中华消化杂志，1995，15(增刊)：28

4 Weber J L, May P E. Dinucleotide repeat polymorphism at the D18s34 locus. Nucleic Acids Res, 1990, 18(11): 3431

5 Wada C, Shionoya S, Fujino Y, *et al*. Genetic instability of microsatellite repeats and its association with the evolution of chronic myelogenous leukemia. Blood, 1994, 83(12): 3449

6 Tamura G, Sakata K, Maesawa C, *et al*. Microsatellite alterations in adenoma and differentiated adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res, 1995, 55(9): 1933

7 Breukel C, Top C, Van leeuwen C, *et al*. CA repeat polymorphism at D5s82 locus, proximal to APC. Nucleic Acids Res, 1991, 19(20): 5804

8 Clayton C L, Kleanthous H, Coutes P J, *et al*. Sensitive detection of helicobacter pylori by using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, 1992, 30(1): 192

9 Parsonnet J. Helicobacter pylori and gastric cancer. Gastroenterol Clin North Am, 1993, 22(1): 89

10 Strickler J G, Zheng J, Shu Q, *et al*. p53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: When guardians fail. Cancer Res, 1994, 54(17): 4750

11 Karnes W E, Samloff I M, Siurala M, *et al*. Positive serum antibody and negative tissue staining for H. pylori in subjects with atrophic body gastritis. Gastroenterology, 1991, 101(1): 167

12 Lin J T, Wang L Y, Wang J T, *et al*. Ecological study of association between Helicobacter pylori infection and gastric cancer in Taiwan. Dig Dis Sci, 1995, 40(2): 385

(收稿：1999-02-10；修回：1999-08-06)

(编辑　冷怀明)

The relationship of *Helicobacter pylori* infection with microsatelliate instability in gastric cancer*

Fang Dianchun, Zhou Xiaodong, Luo Yuanhui, Lu Rong, Liu Weiwen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To evaluate the role of *Helicobactor pylori* (Hp) in the development of gastric cancer. **Mehtods**: The urease genes A and B of Hp and microsatellite instability (MSI) at loci D17s261, D17s799, TCF-2, D18s34, D5s409 and D5s82 were examined with PCR-based technique. The relationship of Hp infection with MSI was analyzed. **Results**: Hp DNA was found in 40.8% (20/49) of the cases of gastric cancer and MSI detected in 22.4% (11/49) at D17s261, 22.4% (11/49) at D17s799, 18.4% (9/49) at TCF-2 and 28.6% (14/49) at D5s82. No significant difference was found in the frequency of MSI between Hp positive and Hp negative cases ($P>0.05$). **Conclusion**: Hp infection showed no association with MSI and may exert indirect effect on the development of gastric cancer.

Key words gastric cancer/etiology; H. pylori; microsatellite instability

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670347

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