DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.04.026

食管癌 DCC基因和 YNZ22位点串联重复序列的杂合性丢失

王明荣* 房殿春** 罗元辉** 鲁 荣** 刘为纹** (第三军医大学附属西南医院胸外科)重庆,400038

提 要 目的:探讨抑癌基因杂合性丢失(LOH)在食管癌发生发展中的作用。方法:应用聚合酶链反应技术对 46例食管癌 YNZ22位点和 DCC基因数目可变的串联重复序列(VNTR)区进行了分析。结果:食管癌 YNZ22位点 LOH率为 44.4%;DCC基因为 32.1%。LOH与组织学类型、肿瘤大小、浸润深度和淋巴结转移无明显相关。结论:YNZ22位点和 DCC基因的 LOH参与了食管癌的发生发展。

关键词 食管癌;可变串联重复序列;杂合性丢失;DCC基因

中图法分类号 R394;R735.1

食管癌经常发生特定染色体区域的丢失,染色体 17p和 18q即是常见的丢失区域。数目可变的串联重复序列(Variable number of tandem repeat,VNTR)为一类新的遗传标记,以同一短序列重复串联为特征。近年,在染色体 17p13.3(YNZ22)及 18q部位分别发现了 VNTR区,由于这些区域与抑癌基因 p53和 DCC基因连锁,并具有多态的性质,因此常被作为标记基因用于肿瘤杂合性丢失(Loss of heterozygosity,LOH)的研究。本研究采用多聚酶链反应(PCR)扩增以上区域中的 VNTR片段,对食管癌的 LOH进行分析。

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,镜检证实所检测的癌组织癌细胞数在 50%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

我们参考国外文献,针对 YNZ22位点和 DCC基因合成了 2对引物[1~3](引物由中国科学院上海细胞生物研究所合成),见表 1。

1.3 PCR扩增

PCR反应总体积 20μl,其中模板 DNA约 0.5μg,Tris-HCl 10 mmol/L,KCl 50 mmol/L,MgCl2 1.5 mmol/L,dATP dTTP dCTP和 dGTP各 0.2 mmol/L,上游及下游引物各 20 pmol,Taq DNA多聚酶 1.5U(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。取扩增产物 10μl,3%琼脂糖凝胶进行电泳分离,溴乙锭染色,紫外光下观察并照像。

表 1 食管癌组织杂合缺失测定中使用的引物

Tab 1 The testing primer of the heterozygosity loss of esophageal carcinoma

Testing loci	Amplity segment(bp)	The sequence of primer
YNZ22(17p13.3)	170/780	5′-CACAGTCTTTATTCTTCAGCG-3′
		5′-CGAAGAGTGAAGTGCACAGG-3′
DOC	200/160	5′-GATGACATTTTCCCTCTAG-3′
		5′-GTGGTTATTGCCTTGAAAAG-3′

1.4 LOH分析

正常组织经电泳分离 YNZ22位点如显现两条电泳带者(170~780 bp之间)为杂合子(信息个体),若仅为一条带者为纯合子(非信息个体)。DCC基因位点电泳分离后只出现 200 bp条带者为纯合子,若出现 200 bp和 160 bp 2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-VNTR分析,比较同一病人癌组织及正常组织 DNA条带及量的差异,就可推算出是否存在 LOH。

2 结果

2.1 食管癌组织 YNZ22位点和 DCC基因的 LOH

46例食管癌中,YNZ22位点属信息个体 36例,检出 LOH 16例,占 44.4%,见图 1。DCC基因属信息个体 28例,检出 LOH 9例,占 32.1%,见图 2。

* 王明荣,男,49岁,主任医师,教授

** 消化内科 重庆,400038

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

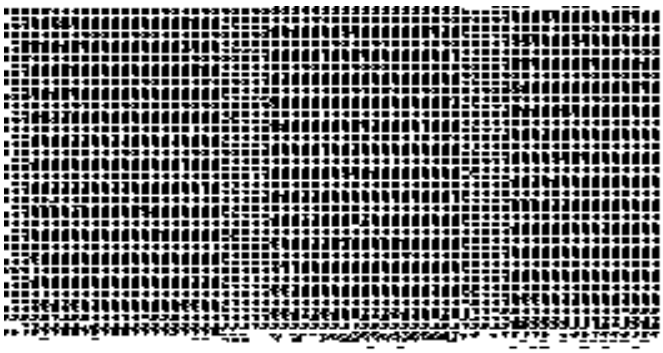


图 1 YNZ22 VNTR多态性分析示杂合缺失

Fig 1 The polymorphic analysis of YNZ22 VNTR and loss of heterozygosity

N: normal tissue; T: tumor tissue; 1: heterozygote, Non-Loss of heterozygosity; 2: Loss of heterozygosity; 3: homozygote; M: molecular weight

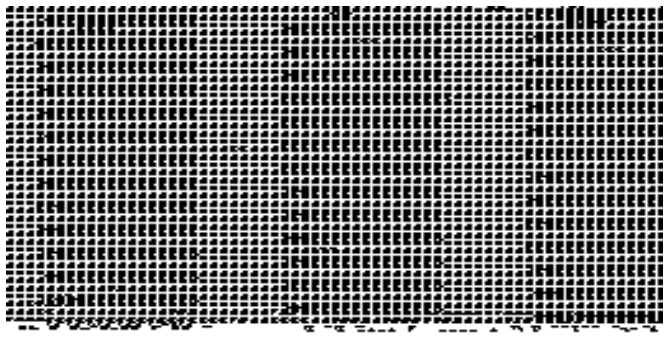


图 2 DCC基因 VNTR杂合缺失分析

Fig 2 The analysis of VNTR loss of heterozygosity of DCC gene

N: Normal tissue; T: Tumor tissue; 1, 3: heterozygosis loss; 2 heterozygote, non-loss of heterozygosity

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、有无穿透肌层及淋巴结转移的不同进行分组,各组 YNZ22位点和 DCC基因 LOH情况见表 2,经统计学处理,YNZ22位点和 DCC基因 LOH率在各组间差异均无显著性 ($P > 0.05$)。

表 2 YNZ22位点和 DCC基因 LOH与临床病理参数的关系

Tab 2 The relationship between the clinic pathological parameter and the loss of heterozygosity at YNZ22, DCC gene

Parameter	LOH/case	
	YNZ22	DCC
The type of histology		
Squamous cell carcinoma	15/33	8/24
Adenocarcinoma	1/3	1/4
The size of carcinoma		
≤ 3 cm	9/21	6/18
> 3 cm	7/15	3/10
The depth of infiltration		
Infiltration muscle layer	10/24	5/19
Non-infiltration muscle layer	6/12	4/9
The metastasis of Lympha		
Metastasis	8/20	5/16
Non-metastasis	8/16	4/12

3 讨论

YNZ22位于人类第 17号染色体短臂 (17p13.3) p53基因远端,是由 70 bp的重复单位组成的串联重复序列。由于 YNZ22与 p53基因连琐,故常用此位点 LOH来代表 p53基因的 LOH。近年研究发现,虽某些个体 p53基因正常,但 YNZ22却有 LOH,提示该位点可能存在尚未克隆出来的抑癌基因[4]。YNZ22 VNTR呈现高度的多态性,有报道 YNZ22的群体杂合率为 86%[2],本结果为 78.3% (36/46)。Horn等报道胃癌 YNZ22位点的 LOH率为 50%,本研究对食管癌进行检测,LOH率为 44.4%,提示该位点的 LOH可能在食管癌的发生发展中起重要作用。

结直肠癌缺失基因 (Deleted in colorectal carcinoma, DCC)是近年发现的肿瘤抑制基因,定位于染色体 18q21.3,编码序列长约 370 bp,编码一种与细胞粘着分子 (CAMS)以及相关的细胞表面糖蛋白具有明显同源与的蛋白质。文献报告,大肠癌 DCC基因 LOH率为 70%,胃癌为 30% ~ 61%[5],而食管癌为 24%[6]。本研究检测了 46例食管癌 DCC基因的 LOH,LOH率为 32.1%,与文献报告的检测结果相近。

多数作者认为,DCC基因 LOH与肿瘤的进展、浸润和转移密切相关[7,8],从本资料看,YNZ22位点和 DCC基因 LOH率与食管癌各项临床病理参数间均无显著相关,因此 DCC基因 LOH在预测食管癌患者预后方面的意义尚需进一步研究。

参考文献

1 Nakamura Y, Ballard L, Leppart M, *et al*. Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (PYNZ 22) on chromosome 17p (d17S30). Nucleic Acids Res, 1988, 16

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

(12): 5707
2 房殿春,罗元辉,柳凤轩,等. PCR检测大肠癌 YNZ22位点 VNTR的杂合性丢失.癌症,1998,17(1): 20
3 Gao X, Honn K V, Gringnon D, *et al*. Frequent loss of expression and loss of heterozygosity of the putative tumor gene DCC in prostatic carcinomas. Cancer Res, 1993, 53(12): 2723
4 Saxena A, Clark W C, Robertson J T, *et al*. Evidence for the involvement of a potential second tunmor suppressor gene on chromosome 17 distinct from P53 in malignant astrocytoas. Cancer Res, 1992, 52(23): 6716
5 Fang D C, Jass J R, Wang D X. Loss of heterozygosity and loss of expression of DCC in gastric cancer. J Clin Pathol, 1998, 51(8): 593
6 Huang Y, Boynton R F, Blount P L, *et al*. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancer. Cancer Res, 1992, 52(23): 6525
7 Shibata D, Reale M A, Lavin P, *et al*. Loss of DCC expression and prognosis in colorectal cancer. N Engl J Med, 1996, 335(23): 1727
8 Kato M, Ito Y, Kobayashi S, *et al*. Detection of DCC and K-ras gene alterations in colorectal carcinoma tissue as prognostic markers for liver metastatic recurrence. Cancer, 1996, 77(8): 1729

(收稿: 1998-09-16;修回: 1999-01-21)
(编辑　汪勤俭)

Loss of heterozygosity at YNZ22 and DCC loci containing variable number of tanden repeat seqment in esophageal carcinoma

Wang Mingrong, Fang Dianchun, Luo Yuanhui, Lu Rong, Liu Weiwen (Departments of Thoracic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To evaluate the role of loss of heterozygosity (LOH) at tumor suppressor genetic loci in the carcinogenesis of esophageal carcinoma. Methods: Polymorphic analysis of the genetic loci of YNZ22 and DCC containing a variable number of tandem repeat was performed in 46 surgically-resected specimens of esophageal carcinoma with PCR. Results: LOH and YNZ22 and at DCC were detected in 44.4% and 32.1% of the cases of our series respectively. No significant correlation existed between the LOH at YNZ22 and DCC loci and the histological types, tumor size, systemic invasion and lymph node metastasis of the carcinoma ($P > 0.05$). Conclusion: Our findings suggest that LOH at YNZ22 and DCC genetic loci may be involved in the carcinogenesis of esophageal carcinoma.

Key words esophageal carcinoma; variable number of tandem repeat; loss of heterozygosity; DCC genes

(上接 290页)

2 讨论

众所周知,腭裂按现有临床分类主要分为四型[1],我们诊治的以上 3例均不属于其中任何一种类型。主要特点: 为腭部呈间断式裂开,在软腭区近硬软腭交界处有一横隔膜将腭裂一分为二。其中 2例硬腭部裂隙为洞穿性缺损,1例裂隙直达牙槽嵴,3例均有悬雍垂裂。问诊体检表明,3例均无外伤炎症史及腭裂修复手术史,为先天性腭裂。目前关于腭裂形成的机制普遍认为[2]在胚胎第 9周时,前颌突与两侧侧腭突相互靠拢,三者在前颌骨部位首先连合,而逐渐向后方推移,如三者在一侧或两侧未能正常连合,则形成了单侧或双侧腭裂。该学说不能圆满解释间断性腭裂病例的发生。作者推测在腭部形成过程中,可能存在前后两个融合起始中心,一个位于前颌突,另一个位于两侧腭突。当胚胎遭遇病毒感染、药物刺激等因素影响时,则腭部两个融合中心停止相互融合,造成本组类型的腭裂。此种说法也能解释传统类型及其他特殊类型的腭裂发生。认为间断式腭裂发生时间晚于III、IV度腭裂,早于I、II度腭裂。

间断式腭裂的治疗方法一般与传统类型腭裂相似。作者建议如硬腭部裂孔直径小于 5 mm,而腭裂隔膜长度大于 15 mm,则分别作硬腭裂孔修补术及悬雍垂裂修补术为宜。

关键词　腭裂;分类
中图法分类号　R782.22

参考文献

1 上海第二医学院 主编.口腔颌面外科学.北京: 人民卫生出版社,1984. 578~ 579
2 余亚雄 主编.小儿外科学(上册).上海: 上海科学技术出版社,1979. 227~ 228

(收稿: 1999-02-02;修回: 1999-04-01)
(编辑　王　红)

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