DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.04.012

肝细胞癌多种抑癌基因失活机理的研究

肖文华* 刘为纹 吕有勇 高崇峰 (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆,630038

提 要 目的:分析肝细胞癌多种抑癌基因失活的机理。方法:应用 PCR Southern杂交技术对 pYNZ22.1 p53和 Rb抑癌基因失活及其机理进行了研究。结果:41.7% (5/12)的肝癌存在 pYNZ22.1位点基因的高甲基化,35% (7/20)存在杂合缺失,过度高甲基化病例都伴有杂合缺失;50%的肝癌存在 p53基因突变,突变病例多伴另一等位基因缺失;约25%的肝癌存在 Rb基因缺失,一例肝透明细胞癌存在 Rb基因 CpG岛的高甲基化,未发现重排现象。结论:肝细胞癌存在多种抑癌基因的异常;抑癌基因失活的机理是多种的,多种机理共同参与基因的完全失活。

关键词 肝肿瘤;抑癌基因;失活机理
中图法分类号 R735.7

肿瘤分子遗传学研究表明:肿瘤的发生和演进为多种遗传学事件积累的结果,其中抑癌基因的失活是肿瘤发生发展的重要遗传学事件[1,2]。肝细胞癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,其发病机理尚不清楚。限制性片段长度多态性分析表明:人类肝癌存在多个染色体位点的较高频率杂合缺失,提示肝癌的发生和发展过程需要多个抑癌基因失活的参与[2]。本实验运用分子生物学实验技术对肝细胞癌多个抑癌基因失活机理进行了研究。

1 材料与方法

1.1 标本收集及临床资料

28例肝细胞癌均系我院肝胆外科住院病人,平均年龄48岁,男24例,女4例。瘤体直径小于或等于5 cm的小肝癌4例,大于5 cm但不伴肝内、外转移的中期肝癌11例,伴肝内、外转移的晚期肝癌13例。将手术切下或术中活检的癌组织和远离癌灶的肝组织以及因良性肝病手术的正常肝组织于液氮中速冻,-70℃保存。

1.2 主要实验材料

9600型 PCR热循环仪(PE公司);高压电泳仪、测序板及干胶器均为 Bio-Rad公司产品;限制性内切酶 HpaⅡ、MspⅠ、HindⅢ、SadⅠ、SadⅠ和 NotⅠ以及随机引物标记试剂盒为 Promega公司产品。双链 PCR测序盒为 USB公司产品;[α-^{32}P]-dCTP ^{35}S-dATP和尼龙膜为 NEN公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 高分子量 DNA提取 采用蛋白酶 k消化,酚/氯仿抽提,乙醇沉淀的方法。

1.3.2 探针制备 本实验所用目的基因片段 pYNZ22.1、Rb cDNA和 Rb5′端 DNA片段均来自北京市肿瘤防治研究所。采用随机引物法标记目的基因片段,操作按说明书进行。本实验探针的比放射活性大于 1×10^9 min^{-1} DNA

1.3.3 Southern杂交 取10μg DNA,相应内切酶酶切(10~20 u/μg DNA),0.8%琼脂糖凝胶电泳,(若检查基因缺失和重排,癌组织和同一病例远离癌灶的肝组织样品在相邻的泳道中电泳),凝胶经脱嘌呤、变性和中和处理后,于10×SSC缓冲液中转印,膜在80℃中烘烤2 h;在含50%甲酰胺的预杂交液中42℃预杂交12~24 h,加入探针继续杂交16~24 h 2×SSC 0.1% SDS室温下洗膜20 min×2,0.2×SSC,0.1% SDS 60℃洗膜30 min,-70℃曝光3~12 d

1.3.4 PCR扩增 反应总体积10μl,模板100 ng,dNNTP 200μmol/L,Mg^{2+} 1.5 mmol/L,10×缓冲液1μl,引物0.25 μmol/L(引物序列见附表),Taq酶0.3 min首次94℃变性4 min30 s,进入循环:94℃变性15 s,退火11 s(温度见表),72℃延伸15 s,循环结束后,72℃延伸10 min。

1.3.4.1 VNTR技术检测 pYNZ22.1基因位点杂合缺失:参照 Horn[3]的方法进行。癌和同一病例远离癌灶的肝组织样本在相邻泳道中电泳。

1.3.4.2 RFLP技术检测 p53基因外显子4和 Rb基因内含子1杂合缺失[1]:具体方法参照文献进行。癌和同一病例远离癌灶的肝组织样品在相邻泳道中电泳。

1.3.4.3 SSCP银染技术检测 p53基因结构异常[4]:取 PCR产物1μl与4μl 5×变性载样缓冲液(含95%甲酰胺)混匀,95℃变性5 min,12%聚丙烯酰胺凝胶(含5%甘油,0.5×TBE,Acr:Bis=29:1),10℃恒流(10mA)电泳5~6 h,凝胶分别经10%乙醇固定,1% HNO_3浸泡,0.02mol $AgNO_3$(含0.1%甲醛)染色,预冷的0.28 mol/L Na_2CO_3(含0.05%甲醛)显色,10%乙酸终止反应。

1.3.4.4 PCR双链测序检测 p53基因第7外显子突变:用4%聚丙烯酰胺凝胶纯化 PCR双链 DNA模板。测序反应按美国 USB PCR双链直接测序盒操作说明进行。反应产物于6%聚丙烯酰胺凝胶(含7mol尿素),35 W恒功率电泳,胶经15%甲醇和5%乙酸混合液固定20 min,干胶40 min,-70℃曝光1~3 d

* 肖文华,男,34岁,副教授,副主任医师,博士

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

表 1　PCR-SSCP和 PCR-RFLP检测所需引物

Tab 1　Primcr sets used in PCR-SSCP or PCR-RFLP assays

Primer set	Priming Rcgion	Amplicon Sizw(bp)	Ann. Temp	Polymorphism type	Primer sequences
1	p53 exon4	176	60℃	BstuI RFLP	5′-CAATGGATGATTCGATGCTG-3′
					5′-AGAATGCAAGAAGCGCAGAC-3′
2	p53 exon5	244	60℃	——	5′-CGTCTAGACTGTCTCTTTCCTCTTCC-3′
					5′-CGGTGGACTCTCCAGCCCCAGCTGC-3′
3	p53 exon6	166	56℃	——	5′-CGTCTAGAATTCCTCACTGATTGCTC-3′
					5′-CGGTCGACTGTTGCAAAGCAGA-3′
4	p53 exon7	165	60℃	——	5′-CGTCTAGAGGCCTGTGTTGTCTCC-3′
					5′-CGGTCGACGGTGGCAAGTGGCTCC-3′
5	p53 exon8	195	56℃	——	5′-CGTCTAGACTCTTTTCCTATCCTGAG-3′
					5′-CGGTCGACCTTCTTGTCCTGCTTG-3′
6	pYNZ 22.1	170~ 800	55℃	VNTR	5′-CACAGTCTTTATTCTTCAGCG-3′
					5′-CGAAGAGTCAAGTGCACAGG-3′
7	Rb intorn 1	180	62℃	BamHI RFLP	5′-CAGGACGACGGCCCGG-3′
					5′-CTGAGACGCTCCGOCGT-3′

1.4　DNA甲基化分析原理

根据甲基化敏感的内切酶不能识别含有被甲基修饰了的 CpG序列的原理来测定 DNA甲基化水平,即当 CpG被甲基化时,不能酶切,产生较大的片段,相反则产生较小的片段[5]。Rb基因 5′端和 pYNZ 22.1基因位点 CpG岛的甲基化检测分别根据 Sakai[5]和 Makos[6]建立的内切酶图谱进行。

2　结果

2.1　肝细胞癌 Rb基因异常

2.1.1　Rb基因 5′端 CpG岛的甲基化状态　6例正常肝组织和 14例肝癌组织显示 3.8 kb和 1.6 kb两条带,表明 Rb基因 5′端 SacII酶切位点未被甲基修饰。但 1例肝透明细胞癌产生 5.7 kb的高甲基化带,而同一病例远离癌灶的肝组织呈正常肝组织的低甲基化模式,见图 1A

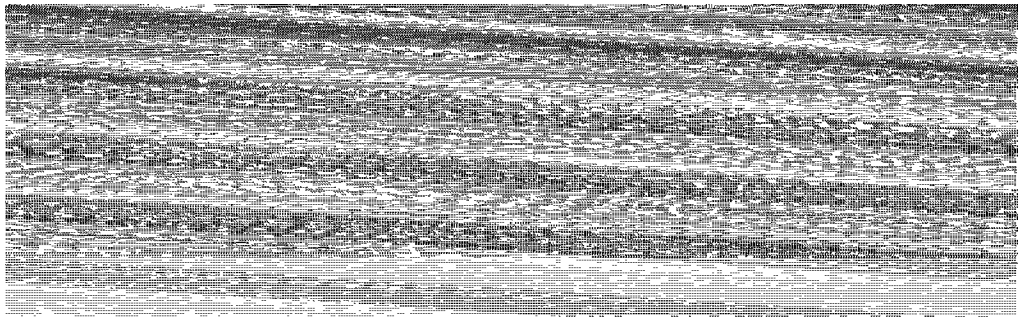


图 1　Southern杂交检查肝细胞癌 DNA甲基化状态

A:示 Ti Rb基因甲基化异常　B:示肝 pYNZ22.1基因不同程度的高甲基化

N:正常肝组织　T:肝癌组织　kb千碱基对

Fig 1　Analysis of DNA methylation by Southern blot in HCC

A: abnormal methylation of RB gene

B: hypermethylation of pYNZ22.1 gene

N: normol　T: tumor　kb: kilobase

2.1.2　Rb基因杂合缺失　Rb基因内含子 1杂合率为 50%(12/24例),杂合缺失率为 25%(3/12例)。HindIII酶切,Rb基因 cDNA探针 Southern杂交发现 10例肝癌中 2例肝癌分别在 4.5kb和 9.8kb、7.5kb处缺失,未发现 Rb基因重排现象,见图 2伴 Rb基因缺失的肝癌均属晚期。

2.2　肝细胞癌 pYNZ 22.1基因异常

2.2.1　pYNZ 22.1基因杂合缺失　杂合率为 80%(20/25例),其中杂合缺失率为 35%(7/20例),伴杂合缺失的肝癌有 2例属中期,5例为晚期,见图 3

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

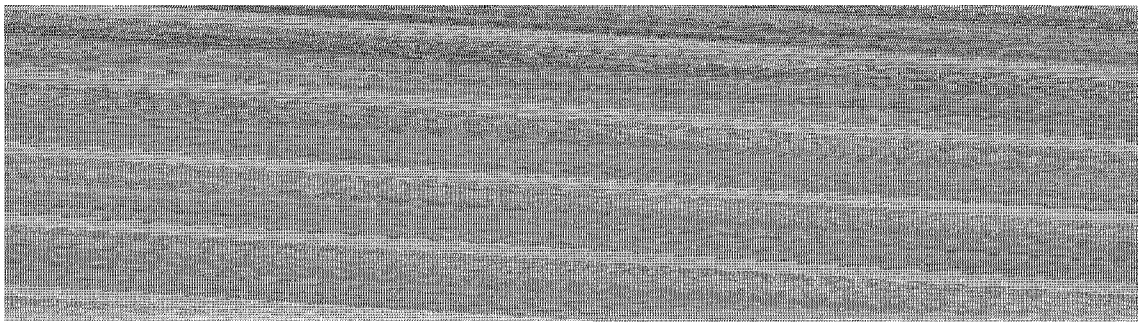


图2 肝细胞癌 Rb基因异常

A:示 Rb基因内含子Ⅰ 杂合缺失 B:示 Rb基因缺失 N:正常肝组织 T:肝癌组织 M:分子量标准为 puc 19/HadⅢ

Fig 2 Analysis of abnormal Rb gene in HCC

A: LOH of Rb gene at intmonⅠ B: deletion of Rb gene N: normal T: tumor M: standard molecular wt. puc19/HadⅢ.

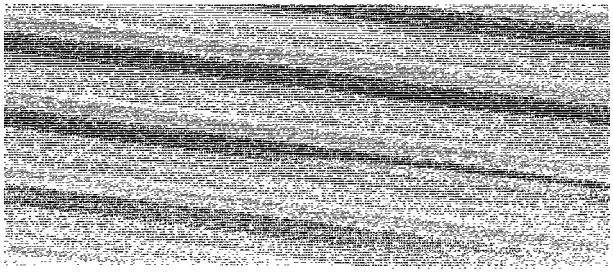


图3 PCR-VNTR检测 pYNZ22.1基因杂合缺失

Fig 3 Andysis of LOH of pYNZ22 1 by PCR-VNTR in HCC arrow LOH

2.2.2 pYNZ 22.1基因 CpG岛甲基化状态: 5例正常肝组织产生 4.5 kb带,提示 NotⅠ 酶切位点均未甲基化。但在12例肝癌组织中5例产生 6.0~ > 20 kb之间大小不同的片段,提示这些肝癌有不同程度的高甲基化状态。3例显著高甲基化病例 (> 20 kB)均为晚期肝癌,其中2例为杂合子,并都发生杂合缺失。1例高甲基化程度较低的病例 (8.0kb)为早期肝癌,见图1B

2.3 肝细胞癌 p53基因异常

2.3.1 p53基因外显子4杂合缺失 杂合率54% (13/24例),杂合缺失率为61.5% (8/13例),见图4

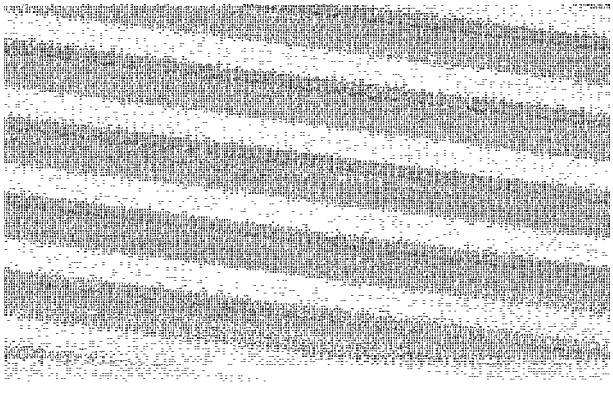


图4 PCR-RFCP检测 p53基因外显子4杂合缺失

Fig 4 Analysis of LOH of p53 gene at exon 4

2.3.2 p53基因突变 共检测28例肝癌,发现泳动变位14例,总的突变率为50% (14/28例),其中外显子5, 6分别为10.7%。外显子7为21.4%,外显子8为71.%,序列分析第7外显子突变发生在249位密码子的 G: C→ T: A的颠换突变,见图5。在8例伴有 p53基因等位缺的肝癌中,6例存在另一等位基因的突变。发生 p53基因结构异常的共16例,其中5例为中期肝癌,11例为晚期肝癌。

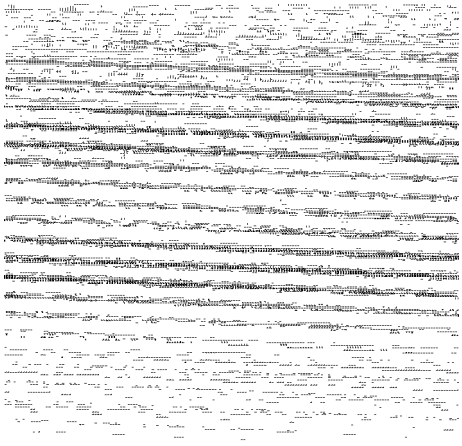


图5 PCR直接序列分析检查 p53基因第七外显子突变

图示第七外显子249位密码子发生 G→ T的颠换突变, G. A. T和 C分别代表乌嘌呤腺嘌呤、胸腺啶和胞嘧啶, N:正常肝组织 T:肝癌组织

Fig 5 Analysis of mutation of p53 gene at 7th exon by PCR direct sequencing

G to T transversion mutation of 7th exon N: Normal tissue T: Tumoth tissue

3 讨论

肝细胞癌是世界范围内常见肿瘤之一,其发生发展过程与多种抑癌基因异常有关[2]。RFLP分析表明:

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

发生于原发性肝癌的杂合缺失分布于 20对染色体,其中以 4q、11p、13q、16q和 17p的杂合缺失频率最高[2,7],提示这些染色体某些位点可能存在肝癌相对专一的抑癌基因。pYNZ 22.1位点基因位于 p53基因附近,在许多肿瘤发生高频率的杂合缺失,并且这种缺失可独立于 p53基因而存在。因此,该位点基因可能为抑癌基因。本实验也表明:肝癌存在 pYNZ 22.1位点基因较高频率的杂合缺失(35%),与日本人肝癌类似[2]。同时也发现 pYNZ 22.1位点基因可独立于 p53基因缺失,从而表明该位点处的基因不同于 p53基因。有资料表明:甲基化敏感的限制性内切酶 NotⅠ识别的 CpG序列聚集区,86%以上位于活跃转录基因的调控序列[9]。pYNZ 22.1位点附近富集 NotⅠ识别的未甲基化的 CpG序列,也提示该位点附近存在转录活跃的基因。业已证实 CpG岛的甲基化状态对基因的转录起重要调控作用,高甲基化可使基因失活,低甲基化是基因表达的条件[5]。本实验结果表明:pYNZ 22.1位点基因 CpG岛在正常肝组织是未甲基化的,然而 41.7%的肝癌组织呈现不同程度的高甲基化,且显著高甲基化病例都伴有杂合缺失。根据肿瘤发生的"二次打击"理论,我们认为部分肿瘤 pYNZ 22.1位点基因的完全失活可能是通过一等位基因缺失,另一等位基因被高甲基化来完成的。此外,我们还发现一例早期肝癌已出现高甲基化,推测 DNA甲基化改变是肿瘤发生的早期事件。

p53基因异常存在于 50%的人类肿瘤,突变和缺失是其失活的主要机理[7]。本实验结果也表明:50%的肝癌存在 p53基因突变,突变的病例都伴有另一等位基因的缺失。因此,突变和缺失一道参与 p53基因两等位基因完全失活,也是肝癌 p53基因失活的主要形式。

Rb基因可能为 Rb瘤、膀胱癌以及前列腺癌的抑癌基因。既往有限的研究表明肝癌存在 Rb基因的缺失[7,10],但 Rb基因是否为肝癌的抑癌基因尚未定论。本实验对 Rb基因失活的常见机理缺失、重排及甲基化进行了研究。结果与国外报道类似,即缺失是肝癌 Rb基因失活的较常见的机理;DNA甲基化异常可能与少数肝癌类型 Rb基因失活有关,尚不能成为肝癌 Rb基因失活的主要机理。

参考文献

1 Huang Y, Boynton R F, Blount P C *et al*. Loss of heterozygosity involve multiple suppressor gene in human esophageal cancers. Cancer Res, 1992, 52: 6525

2 Nishida N, Fukuda Y, Kokuryu H *et al*. Accumulation of allelic loss on arms of chromosome 13q, 16q and 17p in the advaced stages of human hepatocellular carcinoma. Int J Cancer, 1992, 51: 862

3 Horn G T, Richards B, Klinger K W *et al*. Amplification of highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. Nucl Acids Res, 1989, 17: 2140

4 Gottlieb M, Chavko M. Silver staining of native and denatured eukaryotic DNA in agarose gels. Analytic Biochemistry, 1987, 165: 33

5 Sakai T, Toguchida J, Dryja T P *et al*. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumour-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. Am J Hum Gent, 1991, 48: 480

6 Makos M, Nelkin B D, Lerman M I *et al*. Distinct hypermethylation pattern occur at altered chromosome loci in human lung and colon cancer. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 1929

7 Murakami L A, Hayashi K, Hirohashi S *et al*. Abberation of the tumour suppressor p53 and retinoblastoma gene in human hepatocellular carcinoma. Cancer Res, 1991, 51: 5520

8 Comelis R S, Van Vliet M, Vos C B J *et al*. Evidence for a gene on 17 p13.3, distal to TP53, as a target for allele loss in breast tumours without p53 mutation. Cancer Res, 1994, 54: 4200

9 Lindsay S, Bird A P. Use of restriction enzymes to detect potential gene sequence in mammalian DNA. Nature, 1987, 327: 336

10 Zhang X, Xu H J, Murakami Y *et al*. Deletion of chromosome 13q, mutation in retinoblastoma Ⅰ, and retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma. Cancer Res, 1994, 54: 4177

(收稿:1996-12-30;修回:1997-04-29)

(编辑　冯崇英)

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

Studies on the mechanism of inactivation of multiple tumour suppressor genes in hepatocellular carcinoma

Xiao Wenhua, Liu Weiwen, Lu Youyong, Gao Chongfeng (Department of Gastroenterology, Southwest Hopital, Third Military Medical Univsersity, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To study the mechanism of inactivation of multiple tumour suppressor genes in hepatocellular carcinoma (HCC). Methods: Inactivation of pYNZ22.1, p53 and Rb tumour suppressor genes and mechanism were studied by PCR, Southern blot and gene sequencing. Results: The hypermethylation and loss of heterozygosity (LOH) at pYNZ221 gene were found in 41.7% (5/12) and 35% (7/20) of HCC respectively. Markedly hypermethylation was accompanied usually with LOH. There are mutation of p53 gene in 50% (14/28) of HCC, most of which presented allelic loss simultaniously. The LOH of Rb gene appeared in 25% (3//13) of HCC. The hypermethylaton of promoter region at Rb gene was only found in one case of hepatic clear-cell cacinoma, but no rearrangement was found. Conclusion: The findings indicate that there are alteration of multiple suprressor genes in HCC; the mechanism of inactivation is multiple and the complete inactivation of gene are participated by valious mechanism.

Key mords liver neoplasms; multiple genes; mechanism of inactivation

(上接320页)

察了7.5% NaCl1/6%葡聚糖70溶液(HSD)对烧冲复合伤早期肺部损伤的影响,旨在进一步探讨烧伤后肺损伤的机理。本研究主要结果及结论如下:

(1)烧冲复合伤的血浆和肺组织 MDA含量、BALF中白蛋白含量、肺组织及 BALF中 MPO活性均不同程度增多,表明伤后脂质过氧化反应增强,肺微血管通透性增加,致伤动物都有不同程度的 PMN肺内扣押。光镜观察见致动物的肺组织中都有炎性细胞浸润,电镜观察也发现于肺毛细血管腔内有多形核白细胞扣押。肺微血管通透性增高可能与 PMN在肺内聚集的增多有关。

(2)原位杂交结果显示:烧冲复合伤早期肺组织的 E-selectin mRNA、VCAM-1 mRNA及 ICAM-1 mRNA均明显增多,以伤后6小时最为明显。E-selectin VCAM-1主要分布于肺泡毛细血管内皮、支气管粘膜下层及基底层,而 ICAM-1主要位于肺泡上皮细胞、毛细血管内皮细胞及支气管粘膜层。免疫组化及肺组织匀浆 ICAM-1相对含量测定结果显示:正常肺组织有一定量的 ICAM-1蛋白质表达,烧冲复合伤后肺 ICAM-1蛋白质含量明显增多,其分布与原位杂交结果相同。流式细胞技术检测结果显示:烧冲复合伤早期外周血 PMN表面 CD11b表达明显增多。这些 CAMs的增多与 PMN在肺内聚集增多密切关系。

(3)烧冲复合伤早期肺 E-selectin、VCAM-1、ICAM-1及 PMN表面 CD11b的表达上调可能与创伤所致的细胞因子和炎症介质的产生增多有密切关系,其中 TNFα是起重要作用的细胞因子之一。

(4)体外研究表明:ICAM-1、CD11b单克隆抗体均能降低烧冲复合伤大鼠肺微血管内皮细胞与 PMN间的粘附,其中 I-CAM-1抗体的作用明显强于 CD11b抗体的作用,提示 ICAM-1、CD11b在肺微血管内皮细胞与 PMN粘附过程中均起重要作用,其中 ICAM-1的作用更为重要,在肺微血管内皮细胞与 PMN粘附过程中,内皮细胞的作用可能居主导地位。这一结论尚未见文献报道。

(5)烧冲复合伤早期用 HSD(4 gm/Kg体重)一次性注入,初步观察能在一定程度上缓解肺组织的损伤。其机理可能与 HSD改善血液流变特性及组织血液灌流等有关。

关键词 灼伤;冲击伤;肺损伤;微血管内皮;细胞粘附分子;E选择素;血管细胞粘附分子-1;细胞间粘附分子-1;CD11b

中图法分类号 R64

(收稿:1996-06-30;修回:1997-07-25)

(编辑 张大春)

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