DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.01.012

原发性肝癌结肠癌缺失基因杂合缺失研究

杜清书 房殿春 罗元辉 刘为纹 (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆, 630038

提 要 目的: 了解结肠癌缺失基因(DCC基因)在原发肝癌发生发展中的作用。方法: 采用多聚酶链延伸反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)方法对30例外科手术切除原发肝癌标本DCC基因杂合缺失(LOH)进行分析。结果: 28例信息个体中检出LOH 7例,占25.0%。DCC基因LOH与临床病理参数和HBV感染无显著相关。结论: DCC基因LOH可能参与了原发肝癌的发生发展。

关键词 肝肿瘤;缺失基因;基因;杂合缺失
中图法分类号 R735.7

肝癌的发生是由多因素参与并经历了多阶段的演变过程,在其发生发展过程中可能有多种癌基因和抑癌基因的参与。结直肠癌缺失基因(Deleted colorectal carcinoma, DCC基因)是近年发现的重要抑癌基因。研究表明,DCC基因的异常不仅见于结肠癌,也常见于食道癌[1]、胃癌[2]、前列腺癌[3]和胰腺癌[4]。肝癌组织DCC基因变化还不清楚。本研究采用聚合酶链反应(PCR)技术,并配合限制性片段长度多态现象(RFLP)分析,对原发肝癌中DCC基因的杂合缺失(LOH)进行探讨。

1 材料与方法

1.1 标本收集和DNA提取

30例原发性肝癌均为我院1993年6月至1995年10月手术切除标本。手术切下肿瘤后立即收集癌组织和正常肝组织。剔除出血、坏死部分后-80℃冻存。按文献[5]方法提取基因组DNA。冰冻切片染色证实所检测癌组织肿瘤细胞数均在70%以上。

1.2 PCR扩增

本研究所使用的3对DCC基因和HBV-s基因扩增引物均由中科院上海细胞生物所合成,引物序列见表1。

表1 LOH测定使用的引物

Tab 1 The primers used in this study

Primer set	Sequence
DCC1[3]	5′-TTGCACCATGCTGAAGATTGT-3′
	5′-ACCCTCCCCCTGATGACTTA-3′
DCC2[3]	5′-CGACTCGATCCTACAAAATC-3′
	5′-TCTACCCAGGTCTCAGAG-3′
DCC3[3]	5′-GATGACATTTTCCCTCTAG-3′
	5′-GTGGTTATTGCCTTGAAAAG-3′
HBV-s[4]	5′-CATCTTCTTGTTGGTTCTTCTG-3′
	5′-TTAGGGTTTAAATCTATACCC-3′

取1 μg组织DNA加入20 μl PCR反应液中(含10 mmol/L Tris·HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 20 pmol上游及下游引物, dATP dTTP dCTP和dGTP各200 μmol/L, DNA聚合酶2~4 u),在PCR扩增仪(Perkin elmer cetus)上操作。反应条件: 95℃变性40 s, 56℃复性40 s, 72℃延伸60 s,循环35次。最后一个循环后,置72℃继续反应10 min。

1.3 RFLP分析

取DCC基因引物1和引物2扩增产物10 μl,应用限制性内切酶Msp I酶解12 h,消化后的DNA在3%琼脂糖凝胶上进行电泳分离,溴乙锭染色,紫外光下观察并照像。DCC引物3和HBV-s基因扩增产物不用酶切,直接行8%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。

1.4 分析方法

1.4.1 DCC基因杂合缺失分析 引物1扩增片段长396 bp,经MSP I酶切电泳,若出现396+257+139 bp 3条带者为杂合子(信息个体),若只出现396 bp 1条带或257+139 bp 2条带者为纯合子(非信息个体);引物2扩增片段长240 bp,经MSP I酶切若出现240+137+103 bp 3条带者为杂合子,若只出现240 bp 1条带或137+103 bp 2条带者为纯合子;引物3扩增片段长200 bp,经直接电泳分离若形成200+160 bp 2条带者为杂合子,若只出现200 bp或160 bp 1条带者为纯合子。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电泳片段大小及量的差异就可推算出是否存在LOH。

1.4.2 HBV-s基因扩增产物分析

HBV-s基因经PCR扩增,扩增片段413 bp,以去离子水代替肝癌组织抽提和正常血清对照则均为阴性,电泳位置符合预计值。

2 结果

2.1 HCC组织DCC和HBV基因检测结果

为提高检测的敏感性,在DCC基因部位选择了3组引物对30例HCC进行检测,属信息个体28例,其中7例发现有LOH,占信息个体的25.0%,见图1、2、3。30例原发肝癌中HBV-s基因阳性25例,阳性率为83.3%,见图4。

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

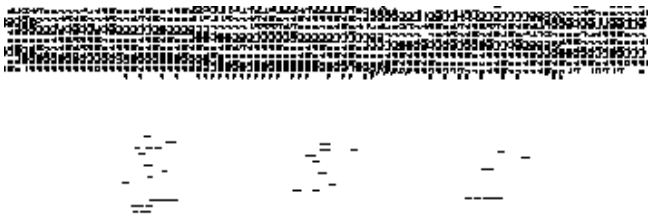


图 1　DCC基因引物 1扩增产物杂合缺失分析

N:正常组织;T:肿瘤组织;2、3、4为杂合缺失

Fig 1　LOH of DCC gene (primer 1)

DNA from tumor (T) and corresponding normal tissue (N) was amplified with primer 1, digested with MspⅠ. LOH was detected in cases 2, 3, 4



图 2　DCC基因引物 2扩增产物杂合缺失分析

N:正常组织;T:肿瘤组织;2、3为杂合缺失;4为非信息个体

Fig 2　LOH of DCC gene (primer 2)

LOH was detected in cases 2, 3, case 4 was noninformative, and, therefor, LOH could not be assessed



图 3　DCC基因引物 3扩增产物杂合缺失分析

N:正常组织;T:肿瘤组织;2、4为杂合缺失

Fig 3　LOH of DCC gene (primer 3)

LOH was detected in cases 2 and 4

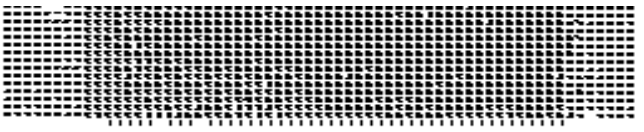


图 4　HBV-s基因扩增产物

Fig 4　Amplified product of HBV-s gene

2.2　HCC组织 DCC基因 LOH与临床病理参数的关系见表 2

将 28例 HCC按血清 AFP水平、有无肝硬化、肿瘤大小、分化程度及有无转移的不同进行分组,DCC基因 LOH与以上临床参数的关系见表 2.经统计学处理,各组间 DCC基因 LOH率差别均不显著($P > 0.05$).

表 2　DCC基因 LOH与临床参数的关系

Tab 2　Relationship of loss of heterozygosity (LOH) at DCC genetic locus with clinical parameters

Groups	Informative cases	LOH (%)
Serum AFP		
≤ 30 ng/ml	8	3 (37.5)
> 30 ng/ml	20	4 (20.0)
Liver cirrhosis		
Absent	7	1 (14.3)
Present	21	6 (28.6)
Tumor size		
≤ 5 cm	6	2 (33.3)
> 5 cm	22	5 (22.7)
Grade (differentiation)		
Well	12	4 (33.3)
Moderate	7	1 (14.3)
Low-differentiated	9	2 (22.2)
Metastasis		
Absent	7	1 (14.3)
Present	21	6 (28.6)

2.3　DCC基因 LOH与 HBV感染的关系见表 3

表 3　DCC基因 LOH与 HBV感染的关系

Tab 3　Relationship between LOH at DCC genetic locus and hepatitis B virus (HBV)

	Informative cases	LOH (%)
HBV-s negative	5	2 (40.0)
HBV-s positive	28	5 (17.9)

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

由表3可见,HBV-s基因阳性组 DCC基因 LOH率与阴性组相比差别不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

染色体上某一特定位点碱基组成的差异造成了这一位点的多态性。同一细胞中某个位点的两个等位基因或 DNA片段显示多态性,遗传学上就称之这个位点的杂合体。对同一病人的正常组织和肿瘤组织 DNA进行分析,如正常组织显示杂合,而肿瘤组织中杂合的两个 DNA的一个全部或部分缺失,就可根据这种缺失推测这一位点存在基因或 DNA片段的缺失[6]。DCC基因是近年发现的新抑癌基因,定位于染色体 $18q^{21.3}$。突变和 LOH为 DCC基因失活的主要方式,可使基因产物的质和量发生异常,由此导致细胞的恶性转化。HCC组织 DCC基因 LOH研究文献中未见明确报道[7],本研究对30例 HCC的 LOH进行分析,28例信息个体中检出 LOH 7例,占25.0%,提示 DCC基因的 LOH在 HCC中并非罕见,可能参与了 HCC的发生和发展。

流行病学和临床资料证实 HBV慢性感染与原发肝癌的发生有相关性。近年研究发现,原发性肝癌中存在 HBV的整合,HBV的整合可能会引起细胞遗传稳定性的破坏,导致细胞 DNA重排,整合位点 DNA的丢失和染色体异常改变。Slagle等[8]发现,HBV阳性肝癌在染色体 17_p整合造成区域片段的丢失,但整合位点不在 p53部位,与细胞内 p53失活无明确关系。本文采用 PCR方法,对原发性肝癌组织 HBV进行检测,30例中有25例检出 HBV,阳性率高达83.3%。但通过分析 HBV存在状态与 DCC基因 LOH的关系,未发现 HBV感染与 DCC基因 LOH有显著相关性,说明 DCC基因 LOH与 HBV整合可能无密切关系。

一般认为 DCC基因 LOH是胃肠道肿瘤的晚期改变,且与肿瘤的临床分期和转移密切相关[2]。本文对 DCC基因 LOH与 HCC的某些生物学行为,如血清 AFP水平、有无伴随肝硬化、肿瘤大小、分化程度和有无转移的关系进行分析,各组间的 LOH率均无显著差别,并未发现 DCC基因 LOH与病期早晚有密切关系。

参考文献

1 Huang Y, Boynton B F, Blount P L *et al*. Loss of Heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. Cancer Res, 1992; 52(23): 6525

2 Uchino S, Tsuda H, Noguchi M *et al*. Frequent loss of heterozygosity at the DCC locus in gastric cancer. Cancer Res, 1992; 52(11): 3099

3 Gao X Z, Honn K V, Grignon D *et al*. Frequent loss of expression and loss of heterozygosity of prostatic carcinoma. Cancer Res, 1993; 53(12): 2723

4 Simon B, Weinel R, Hohne M *et al*. Frequent alterations of the tumor suppressor genes p53 and DCC in human pancreatic carcinoma. Gastroenterology, 1994; 106(6): 1645

5 Tamura G, Maesawa C, Suzuki Y *et al*. Primary gastric carcinoma cells frequently loss heterozygosity at APC and MCC genetic loci. Jpn J Cancer Res, 1993; 84(10): 1015

6 Cohn D, Levinson A. A point mutation in the last intron responssible for increased expression and transforming activity of the c-H-ras oncogene. Nature, 1988; 334(6178): 119

7 Fujimori M, Tokino T, Hino O *et al*. Allelotype study of primary hepatocellular carcinoma. Cancer Res, 1991; 51(11): 89

8 Slagle B L, Zhou Y Z, Butel J S *et al*. Hepatitis B virus integration event in human chromosome 17_p near the p53 gene identifies the region of the chromosome commonly detected in virus-positive hepatocellular carcinomas. Cancer Res, 1991; 51(1): 49

(收稿: 1996-10-05;修回: 1997-01-12)

(编辑 冷怀明)

Loss of heterozygosity of DCC genetic locus in primary hepatocellular cancer

Du Qingshu, Fang Dianchun, Luo Yuanhui, Liu Weiwen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To explore the role of the loss of heterozygosity (LOH) of DCC gene in the occurrence and development of primary hepatocellular cancer (HCC). Methods: LOH of DCC genetic locus was studied in 30 surgically resected specimens of HCC with PCR-RFLP technique. Results: LOH was detected in 7 (25.0%) out of the 28 informative individuals. No significant correlation was found among LOH of DCC gene, clinical parameters and HBV infection. Conclusion: LOH of DCC gene may be involved in the occurrence and development of HCC.

Key words hepatocellular cancer; DCC gene; loss of heterozygosity

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