DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.06.005

胃癌组织中抑癌基因APC/MCC杂合性缺失的研究*

王东旭 房殿春 罗元辉 鲁 荣 刘为纹 (第三军医大学附属西南医院消化科) 重庆,630038

提 要 应用多聚酶链反应(PCR)与限制性片段长度多态性分析法(RFLP),对45例手术切除胃癌组织腺癌性息肉基因(APC)/结直肠癌突变基因(MCC)杂合性缺失(LOH)进行分析。结果表明APC、MCC基因LOH率分别为21.7%(5/23)和31.3%(5/16),APC/MCC缺失率为30.0%(9/30)。LOH率在肠型及胃型胃癌中无明显差异,与肿瘤大小、组织学分类、浸润深度、淋巴转移及临床分期无关。一例早期胃癌出现MCC基因缺失。结果提示APC/MCC基因LOH与两型胃癌的早期发生及发展有关。

关键词 胃肿瘤;APC/MCC基因;杂合性缺失

中图法分类号 R735.2

在肿瘤发生发展过程中,经常发生特定染色体区域片段的丢失。染色体5q就是常见的丢失区域。现已发现,在染色体$5q^{21}$区域毗连存在两个抑癌基因,即腺瘤性息肉病基因(adenomatous polyposis coli,简称APC基因)和结直肠癌突变基因(mutated in colorectal carcinoma,即MCC基因)。国外研究发现,APC/MCC基因杂合性缺失(LOH)不仅见于结肠癌而且也见于食道癌[1]、小细胞[2]和胃癌[3],国内尚未见对胃癌的研究报道。我们采用多聚酶链反应(PCR)及限制性片段长度多态性分析法(RFLP)对胃癌组织中APC/MCC基因LOH进行分析,探讨其在胃癌发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 标本收集

共收集45例胃癌手术切除标本,均未经过放疗或化疗。每例标本包括原发癌肿和手术切缘的正常胃粘膜。标本置于-70℃冰箱保存。癌组织均经冰冻切片、染色镜检证实癌细胞在70%以上,正常组织证实无癌细胞。

1.2 DNA提取

采用蛋白酶K消化、酚/氯仿提取法[4]抽提胃癌组织及正常组织DNA。提取的DNA用TE液稀释,于紫外分光光度计上测定其波长260 nm及280 nm吸收值,计算DNA的浓度和纯度。

1.3 引物设计

我们参考国外文献[5]设计了两对引物。引物情况见表1。

1.4 PCR-RFLP分析

PCR反应总体积40 μl,其中模板DNA约1 μg,Tris-HCl 10 mmol/L,KCl 50 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 mmol/L,dATP、dTTP、dGTP、dCTP各0.2 mmol/L,引物1 μmol/L,Tag DNA多聚酶1~3 U。循环参数94℃ 40″;54℃ 40″;72℃ 1′。循环35周期。最后于72℃继续反应10′。取扩增产物10~12 μl,加入相应内切酶(表1),37℃过夜。在3%琼脂糖凝胶(北京中山生物技术公司产品9101)中电泳分离,溴乙锭染色,于紫外灯光下观察电泳分离带并照像。

1.5 分析方法

正常组织DNA进行PCR扩增,经限制性内切酶消化及电泳后,如形成两条区带,是由于样品中含有两个不同的等位基因片段,其中一个可被酶解,另一个则不能。这个标本可称为杂合子(信息个体)。如只呈现一个区带,是由于它们在这一位点呈纯合状态。对信息个体癌组织DNA以相同的引物进行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,就可以推算出是否存在LOH。

表1 LOH测定中使用的引物

Tab 1 Primers used in LOH analysis

Priming region	Polymorphism type	Ampicon size (base pairs)	Primer sequence
APC exon 11	Rsa 1	133/85+48	5′-GGACTACAGGGCATTGCAGAA-3′ 5′-GGCTACATCTCCAAAAGTCAA-3′
MCC exon 10	VNTR△	93/79	5′-TACGAATTCAATGCCACA-3′ 5′-CTGAAGTAGCTCCAAACA-3′

△: variable number of tandem repeats

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39470332

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

本研究发现肠型胃癌与胃型胃癌两组间 APC/MCC 的 LOH 率并无显著差异，提示 APC/MCC LOH 可能与两型胃癌的发生发展有关。

本研究发现 APC/MCC 基因 LOH 既可见于进展期胃癌又可见于早期胃癌，这与国外多数研究结果相一致[3,5]，说明 APC/MCC LOH 可能与胃癌的早期发生及发展有关。但 Rhyu 最近研究发现 APC/MCC LOH 仅出现在肿瘤组织，癌旁不典型增生组织未见其缺失。看来今后应加强对癌前病变、早期胃癌的研究，以进一步明确 APC/MCC 基因改变在胃癌的发生及演进中的作用。

研究表明，APC、MCC 基因不仅同位于 $5q^{21}$，而且两者蛋白产物结构上有某些同源性，很可能两者结合成复合体共同发挥作用。国外多数研究发现两者缺失常伴随发生[5,6]，但也有相反结果[3]。本研究发现两者缺失无明显相关性，这可能说明两者缺失可以独立发生，提示在两者组成的复合体中，只要其中一个缺失，就可能足以引起整个复合体功能失活，从而导致肿瘤发生。但本研究信息个体过少，可能会产生统计学上偏差，如果扩大样本容量可能会得出明确结论。

然而本研究的多数标本未出现 APC/MCC LOH，可能由于：①本文的引物仅有 2 对，若增加检测位点，可能会提高 LOH 的检出率。②胃癌组织还有其他癌基因及抗癌基因参与，APC/MCC 基因缺失不是唯一的因素。③标本中的正常细胞干扰了检测的准确性。

癌是基因疾病，这一概念已被广泛接受。通过对 APC/MCC 基因的 LOH 的检测使我们对其在肿瘤发生发展中的作用有了初步了解，进一步研究其基因结构与功能关系以及与其他基因间的相互作用，不仅有助于我们从分子水平上认识胃癌的发病机理，而且有可能为胃癌的诊断，治疗提供新的途径。

参考文献

1 Huang Y, Boynton RF, Blount PL et al. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. Cancer Res, 1992; 52(23): 6525

2 D'Amico D, Carbone DP, Johson BE et al. Polymorphic sites within the MCC and APC loci reveal very freguent loss of heterozygosity in human small cell lung cancer. Cancer Res, 1992; 52(7): 1996

3 Sano T, Tsujino T, Yoshida K et al. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 1q. 5q and 17p in human gastric carcinoma. Cancer Res, 1991; 51(11): 2926

4 Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. Biochem Biophys Res Comm, 1985; 130(1): 118

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

6 Rhyu MG, Park WS, Jung YI et al. Allelic deletions of MCC/APC and $P^{53}$are frequent late events in human gastric carcinogenesis. Gastroenterology, 1994; 106(6): 1584

7 Mckie AB, Filipe MI, Lemoine NR. Abnormalities affecting the APC and MCC tumor suppressor gene loci on chromosome 5q occur frequently in gastric cancer but not in pancreatic cancer. Int J Cancer, 1993; 55: 598

(收稿：1995-03-29；修回：1995-08-06)

Study of loss of heterozygosity of tumor suppressor genes of APC/MCC in gastric cancer

Wang Dongxu, Fang Dianchun, Luo Yuanhui, Lu Rong, Liu Weiwen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Loss of heterozygosity (LOH) of APC/MCC genes was investigated in 45 surgical specimens of gastric cancer with PCR－RFLP. LOH of APC, MCC and APC/MCC was found to be 21.7% (5/23), 31.3% (5/16) and 30% (9/30) respectively. LOH of APC/MCC was found in both the intestinal and gastric types of gastric cancer and was not correlated to histological types, tumor size, depth of invasion, lymph node metastasis and clinical stage of gastric cancer. These findings suggest that LOH of APC/MCC plays a role in the carcinogenesis and progress of both intestinal and gastric types of gastric cancer even in its early stage.

Key words gastric cancer; APC/MCC genes; loss of heterozygosity

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