

肺增生病变FHIT基因微卫星不稳定和杂合性丢失的研究

到目前为止肺癌前病变与肺癌的关系越来越复杂。究竟哪些癌前病变会发展为浸润癌？哪些是发生了“真正癌变”的癌前病变？大量肺癌前病变分子水平方面的研究表明，癌前病变存在多基因损伤，其中抑癌基因的失活在肺癌发生的早期阶段所起的作用尤为突出。近来发现，除p53、RB基因和p16基因外，肿瘤候选抑制基因脆性组氨酸三联体(fragile histidine triad, FHIT)跨越位于3p14.2区域的FRA3B脆性位点[1][2]。目前已知在肺癌前病变发生过程中，FHIT基因及其产物的改变是临床所能检测到的最早、频率最高的基因事件。它在癌变发生中的作用是否可以作为早期肺癌的检测指标之一，是否可以作为分子标记物来确定发生“真正癌变”的癌前病变，有待进一步研究。因此本实验采用PCR-杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH)银染技术检测癌性增生病变和非癌增生病变的FHIT的LOH现象。

1 材料与方法

1.1 临床标本

所用标本来自山西省肿瘤医院和第一军医大学南方医院病理科1999年1月~2001年11月手术切除的肺大体标本，包括鳞状细胞癌230例和炎性切除标本(主要包括肺炎性假瘤、肺结核、支气管扩张症)130例。将360例1260个蜡块进行切片、HE染色后，显微镜下观察寻找各级增生病变，分别为：正常支气管上皮(I)、基底细胞增生(II)、鳞状上皮化生(III)、轻-中度不典型增生(IV)、重度不典型增生-原位癌(V)、浸润性鳞状细胞癌(VI)。将筛选出的病变分为2大组：癌旁增生病变组(A组)和非癌增生病变组(B组)。形态学分组由2名病理专家阅片。

1.2 组织切片DNA的制备

对各级增生病变和癌组织进行微切割，即在Narishige控制器上将直径0.5 mm 空心玻璃管控制成用于切割和吸取组织细胞的玻璃针，在Olympus显微镜(日本)下对不封片7 μm厚的石蜡切片寻找病变组织，用切割玻璃针将病变组织与周围组织分割开，再用吸取针吸取组织。采用配制的DNA裂解液56 °C消化3 h后，100 °C煮沸8~10 min，灭活蛋白酶K。离心取上清，用酚、氯仿抽提(1:1)，无水乙醇沉淀DNA。室温干燥，加50 μl TE溶解沉淀。经紫外分光光度计260 nm定量后-20 °C储存备用。

1.3 引物设计及合成

引物序列由GenBank提供，由上海博亚生物技术有限公司合成(表1)。

表 1 PCR 中引物的序列

Tab.1 Sequences of the primers used in PCR

Locus	Primer sequence	Product size(bp)	Anncaling temperature(°C)
p1(D3S1234)	5'-CCTGTGAGACAAAGCAAGAC-3'	99-100	60
	5'-GACATTAGGCACAGGGCTAA-3'		
p2(D3S1300)	5'-GCCAATTCCCAGATG-3'	237	56
	5'-AGCTCACATTCTAGTCAGCCT-3'		
P3(D3S1481)	5'-GATGCATATTGTTAGTCC-3'	92	54
	5'-ATTATACTCTTTGTAGC-3'		
P4(D3S1313)	5'CTTGACCCAATTTGCAAC-3'	205	54
	5'CTTCAACAGGGAAGTACTAGGG-3'		

1.4 PCR扩增

反应容积为50 μl，含模板DNA 1 μl、10×TaqDNA聚合酶缓冲液5 μl、1.5 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L dNTP_s、20 pmol上下游引物及TaqDNA聚合酶1 U。反应条件：94 °C 5 min，94 °C 1 min，60 °C 40 s，72 °C 1 min，循环40次后，72 °C 7 min。

1.5 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

配制12%的变性聚丙烯酰胺凝胶：30%的丙烯酰胺，5×TBE，10%过硫酸胺，TEMED，8 mmol/L尿素，加双蒸水。灌胶并插好梳子，

待胶凝固移去样品梳后，加入 1×TBE 1 000 ml于上下两电泳槽里，用1×TBE冲洗加样孔，样品点样(10 μl PCR产物加等体积的变性上样液)，120 V电压下进行电泳，待指示剂迁移到合适的位置停止电泳。

1.6 染色及结果判断

银染参照文献[3]银染法：将凝胶置于固定液中摇动30 min，倒出固定液，加入双蒸水漂洗5 min。然后用新鲜配制的硝酸银染色液染色30 min，漂洗后加入显色液直到条带清楚为止。结果判断：与同一个体的正常肺组织或淋巴结比较，若某一等位基因的主要条带消失或相对密度减少50%以上，则可判断为LOH阳性；如果肿瘤组织中出现正常对照没有的带型，称为微卫星不稳定(microsatellite instability, MI) [4][5]。

1.7 统计学处理

应用SPSS10.0软件进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 分级结果

癌性增生病变组分为6个级别：正常上皮、基底细胞增生、鳞状上皮化生、轻度-中度不典型增生、重度不典型增生-原位癌、浸润性鳞状细胞癌。非癌增生病变组分为4个级别：正常上皮、基底细胞增生、鳞状上皮化生、轻度-中度不典型增生。

2.2 癌性增生病变组和非癌增生病变组

FHIT基因D3S1234、D3S1300、D3S1481、D3S1313微卫星位点的LOH和MI结果。

2.2.1 两组的FHIT基因微卫星位点LOH和MI图谱 1、2为同一病例，3、4为同一病例，5、6为同一病例，7、8为同一病例，9、10分别为同一病例。其中1、3、5、7、9为正常支气管上皮组织，2、4、6、8、10为II、III、IV、V、VI各级增生病变，结果见图1~6。

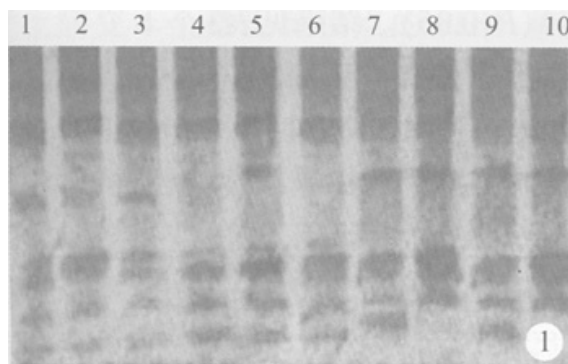


图1 癌性增生组D3S1234位点图谱

Fig.1 Electrophoresis of D3S1234 in cancerous hyperplastic lesions in the lung Lanes 4, 6, 8, 10: LOH (+)

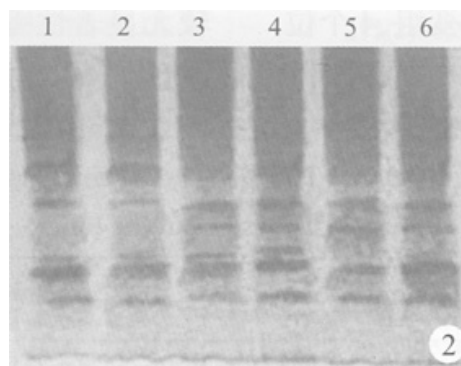


图2 非癌增生组 D3S1234位点图谱

Fig.2 Electrophoresis of D3S1234 in non-cancerous hyperplastic lesions in the lung Lanes 1-6: LOH(-)

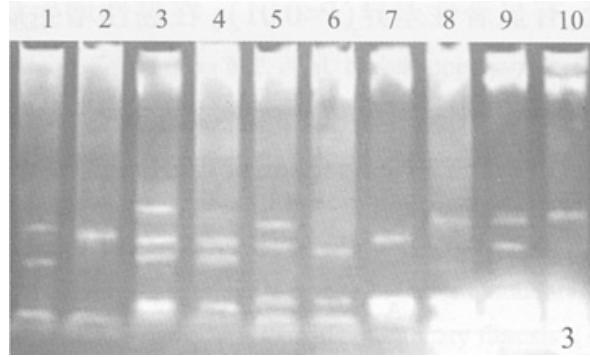


图3 癌性增生组D3S1300位点图谱
 Fig.3 Electrophoresis of D3S1300 in cancerous hyperplastic lesions in the lung Lanes 2,4,6,10: LOH(+);
 Lane 8: MI(+)

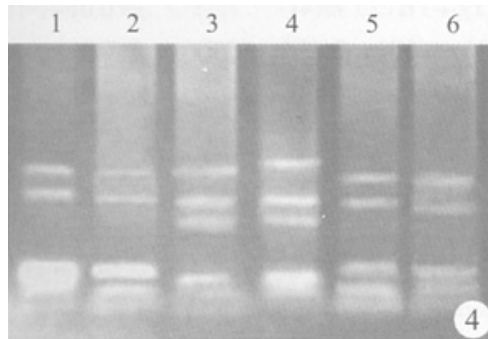


图4 非癌增生组 D3S1300位点图谱
 Fig.4 Electrophoresis of D3S1300 in non-cancerous hyperplastic lesions in the lung Lanes 1-6: LOH(-)

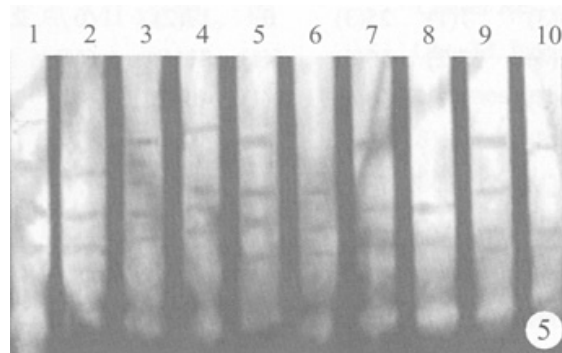


图5 癌性增生组D3S1481位点图谱
 Fig.5 Electrophoresis of D3S1481 in cancerous hyperplastic lesions in the lung Lane 4: MI(+); Lanes
 6, 8, 10: LOH(+)

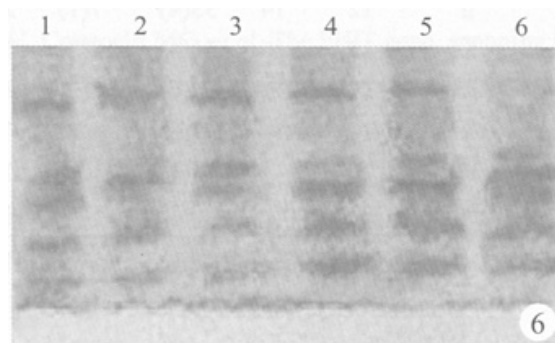


图6 非癌增生组 D3S1481位点图谱
 Fig.6 Electrophoresis photograph of D3S1481 in non-cancerous hyperplastic lesions in the lung Lanes 1-5:
 LOH(-); Lane 6: LOH(+)
 LOH: Loss of heterozygosity; MI: Microsatellite instability

2.2.2 癌性增生组FHIT基因LOH和MI发生率 微卫星位点D3S1234、D3S1300、D3S1481、D3S1313在癌性增生组的LOH发生率均明显大于MI发生率，分别为32%(26/82)>10%(8/82)、28%(23/82)>9%(7/82)、28%(23/82)>10%(8/82)、29(24/82) >5(4/82)。4个

位点联合检测的LOH发生率为52% (43/82)，明显大于MI发生率22% (18/82) ($P < 0.01$)。结果见表2。

表 2 癌性增生病变组 FHIT 基因 LOH 和 MI 发生率(%)

Tab.2 Frequency of LOH and MI of FHIT gene in patients with cancerous hyperplastic lesions in the lung

Group	n	P1		P2		P3		P4		P1/P2/P3/P4	
		LOH	MI	LOH	MI	LOH	MI	LOH	MI	LOH	MI
I	16	6(2)	0	0	6(1)	0	6(1)	0	0	6(2)	6(2)
II	12	17(2)	17(2)	25(3)	0	17(2)	8(1)	17(2)	0	25(3)	17(2)
III	13	23(3)	8(1)	23(3)	8(1)	38(5)	8(1)	23(3)	8(1)	54(7)	23(3)
IV	10	50(5)	10(1)	20(2)	10(2)	50(5)	10(1)	40(4)	0	70(7)	20(2)
V	11	55(6)	9(1)	27(3)	18(2)	36(4)	18(2)	27(3)	9(1)	73(8)	27(3)
VI	20	40(8)	15(3)	60(12)	10(2)	35(7)	10(2)	60(12)	10(2)	80(16)	30(6)
Total No	82	32(26)	10(8)	28(23)	9(7)	28(23)	10(8)	29(24)	5(4)	52(43)	22(18)
LOH:MI		$P < 0.01$		$P < 0.01$		$P < 0.01$		$P < 0.01$		$P < 0.01$	

Figures in the brackets are total number of positive samples; P1-4: Frequencies of D3S1234, D3S1300, D3S1481, and D3S1313 respectively; FHIT: Fragile histidine triad

2.2.3 两组FHIT基因的LOH和MI总发生率 联合检测微卫星位点D3S1234、D3S1300、D3S1481、D3S1313的FHIT基因阳性率(LOH和MI总发生率)，癌性组的各级增生病变均明显大于非癌性组的相应各级增生病变，有显著性差异($P < 0.01$)。在癌性增生病变组，4个位点的FHIT阳性率比较，分别为41% (33/82)、37% (30/82)、38% (31/82)、34% (28/82)，无显著性差异($P > 0.05$)。另外癌性增生组 I ~ III 级病变FHIT阳性率比较 I > II > III，存在显著性差异($P < 0.01$)。IV ~ VI 级病变比较无显著性差异($P > 0.05$)。结果见表3。

表 3 癌性增生病变组和非癌性增生病变组的 FHIT 基因阳性率(LOH 和 MI 总发生率)

Tab.3 Comparison of LOH and MI frequency of FHIT gene between patients with cancerous and non-cancerous hyperplastic lesions in the lung

Group	n		P1		P2		P3		P4		P1+P2+P3+P4		P1/P2/P3/P4		P1/P2/P3/P4
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
I	16	16	6(2)	0	6(1)	0	6(1)	0	0	0	0	0	19(3)	0	$P < 0.01$
II	12	14	33(4)	7(1)	25(3)	7(1)	25(3)	0	17(2)	0	25(2)	0	33(4)	7(1)	$P < 0.01$
III	13	16	31(4)	12(2)	31(4)	12(2)	46(6)	6(1)	31(4)	6(1)	8(1)	6(1)	54(7) ^a	12(2)	$P < 0.01$
IV	10	11	60(6)	18(2)	30(3)	9(1)	60(6)	9(1)	40(4)	0	20(2)	0	70(7)	18(2)	$P < 0.01$
V	11		55(6)		45(5)		55(6)		36(4)		18(2)		81(9)		
VI	20		55(11)		70(14)		45(9)		70(14)		20(4)		85(17) ^Δ		
Total No	82		40(33)		37(30)		38(31)		34(28)*						

* $P > 0.05$ vs frequency of LOH and MI at the 4 loci, p1, p2, p3, p4 (FHIT) in cancerous lesions; ^a $P < 0.01$ vs frequency of LOH and MI (FHIT) in cancerous lesions of grades I, II and III; ^Δ $P > 0.05$ vs frequency of LOH and MI (FHIT) in cancerous lesions of grades IV, V and VI

3 讨论

临床资料表明，在肺癌前病变只有11%的中度不典型增生、19%~46%的重度不典型增生和原位癌向浸润癌发展[6]。病理形态学确定的癌前病变存在差异，那么究竟哪些是发生“真正癌变”的癌前病变？只凭借常规病理诊断和DNA倍体测定是无法区分的。迄今为止，有关肺癌前病变分子水平方面的研究报道主要集中在3号染色体3p21、3p25、3p14.2区域。其中FHIT基因的改变是目前已知在肺癌前病变发生最早、频率最高的基因事件[1][2][7]。Ohta等[8]于1996年通过定位克隆的方法分离鉴定，FHIT基因是一种候选抑癌基因，位于人染色体3p14.2位点。该基因在多种肿瘤组织和细胞系如消化道癌、肾癌、乳癌、头颈癌和肺癌中都广泛地存在同源缺失。由于该基因的广泛性表达及其在肿瘤中普遍高频缺失，推测 FHIT的缺失或功能丧失与肿瘤的发生和发展存在某种必然的联系。也有研究对它在肿瘤中的作用提出一些质疑，认为FHIT的改变是非肿瘤特异性的[9]。总之，目前对FHIT基因是否为一抑癌基因仍有一些争议。因此我们收集手术切除的肺大体标本，分为鳞状细胞癌切除标本和炎性切除标本2组，分别寻找各级增生病变。在此分组设计的基础上，确定FHIT基因在2组增生病变中是否存在差异，试图为临床病理诊断“真正癌变的癌前病变”，即对癌前病变风险性进行预测，提供FHIT能

否作为分子标记物的可靠实验依据。

迄今为止的研究表明,肿瘤中FHIT基因罕见点突变,而主要表现为一个或数个外显子缺失[10][11]。本实验采用的微卫星位点D3S1234、D3S1300、D3S1481、D3S1313位于外显子4~6之间,是该基因频发缺失的集中位点[12][13]。我们的结果显示4个微卫星位点在各级增生病变以LOH现象为主,MI的发生率较低。表明LOH是肺癌前病变FHIT基因功能失活的主要方式。癌旁各级增生病变的4个微卫星位点的LOH和MI总发生率(FHIT阳性率)均明显高于相对应的炎性各级增生病变,具有显著性差异($P < 0.01$)。4个微卫星位点的FHIT阳性率间比较无明显差别($P > 0.05$)。但联合应用4个微卫星位点检测出的阳性率,比单个位点的阳性率有明显提高,其中癌旁基底细胞增生病变的FHIT阳性率为33%(4/12)、鳞状上皮化生为54%(7/13),轻-中度不典型增生为70%(7/10)。相比之下对应的炎性各级增生病变的发生率分别为7%(1/14)、12%(2/16)和18%(2/8),明显低于癌性各级增生病变,表明临床病理诊断病变程度相同的癌前病变是不相同的,肺癌前病变确实存在差异。Kohno等[14]通过研究肺鳞状细胞癌和肺腺癌旁的不典型增生病变发现,具有染色体3p、9p的杂合性缺失和p53基因突变是恶性转化前所具有的普遍特征。因此他们设想具有这些基因改变的不典型增生病变可被认为是真正的癌前病变。大量的研究表明肺癌前病变存在多基因的损伤,癌变过程是多步骤、多因素综合作用的结果,不是单个基因而是2~3个以上基因相互协同作用的结果。因此我们通过分析FHIT基因LOH和MI总发生率在2组增生病变中的差异,推断FHIT是肺癌发生过程中的关键基因之一。同时也为临床的早期诊断,确定“真正癌变的癌前病变”提供了实验依据。但是将FHIT基因作为理想的检测指标应用于临床病理诊断,还需要扩大临床例数检测,对炎性增生组的阳性和阴性病例进行长期的随访观察。

在癌性组的各级增生病变中,从正常的支气管上皮、基底细胞增生、鳞状上皮化生到轻-中度不典型增生病变4个微卫星位点的FHIT基因阳性检出率逐渐增高($P < 0.01$),而轻-中度不典型增生与重度-原位癌和鳞癌3组比较无显著性差异($P > 0.05$)。表明FHIT基因的改变与肺癌发生的早期阶段密切相关。鳞状细胞癌FHIT基因阳性检出率为85%,与有关文献报道的发生率相近[15][16]。我们在癌旁的16例正常支气管上皮检测到2例发生D3S1234位点LOH,1例同时出现D3S1300和D3S1481位点MI现象。癌旁基底细胞增生病变的LOH和MI总检出率为33%(4/12)。而16例炎性组正常支气管上皮没有发生任何位点的丢失现象,14例炎性组基底细胞增生病变只1例发生D3S1234和D3S1300位点的LOH。Sozzi等[1]发现鳞状上皮化生病变中Fhit蛋白水平略低于正常上皮(93% vs 100%),认为肺癌前期的Fhit蛋白丢失与p53蛋白过度表达相比,是发生频率更高和更早的独立事件。本研究在癌旁正常支气管上皮和基底细胞增生病变中检测到FHIT基因LOH,比有关报道FHIT基因表达产物异常出现的时相还早,由此我们认为病理常规诊断的“癌前病变”已经不能满足肺癌的早期临床诊断的实际需要。形态结构貌似正常的支气管上皮和基底细胞增生却发生了FHIT基因的丢失现象,并不能排除癌前病变的可能。以往有关实验也曾报道[6],不是所有发生浸润性鳞状细胞癌的病例都经过不典型增生等形态学改变,可以从形态正常的上皮直接发展为浸润癌。因此对形态正常的FHIT基因阳性病例进行随访观察显得尤为重要。

(责任编辑:杨金星)

参考文献:

- [1] Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, et al. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions[J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 5032-7.
- [2] Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, et al. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p alle- le loss and three regions of frequent breakpoints[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(7): 1949-60.
- 谷志远. 现代医学分子生物学[M]. 北京:人民军医出版社, 1998. 445-50.
- [4] Li M, Schoenberg MP, Scicchitano M, et al. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis[J]. *Science*, 1996, 271(2): 659-62.
- [5] Yen HC, Cairns P, Schoenberg MP, et al. Novel suppressor loci on chromosome 14q in primary bladder cancer[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(15): 3246-49.
- [6] Venmans BJ, van Boxem TJ, Smit EF, et al. Outcome of bronchial carcinoma in situ[J]. *Chest*, 2000, 117 (6):1572-6.
- [7] Uematsu K, Yoshimura A, Gemma A, et al. Aberrations in the fragile histidine triad (FHIT) gene in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(23): 8527-33.
- [8] Ohta M, Inoue H, Cottecelli MG, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma -associated t(3;8) breakpoint, is abnormal indigestive tract cancer[J]. *Cell*, 1996, 84: 587-92.
- Tokuchi Y, Ckobayashi Y, Hayashi S, et al. Abnormal FHIT transcripts found in both lung cancer and normal lung tissue[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999, 24(2):105-11.
- [10] Croce CM, Sozzi G, Humbner K. Role of FHIT in human cancer[J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(5): 1618-24.
- [11] Nelson HH, Wiencke JK, Gunn L, et al. Chromosome 3p14 alterations in lung cancer: evidence that FHIT exon deletion is a target of tobacco carcinogens and asbestos[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(9): 1804-7.
- [12] Corbin S, Neilly ME, Espinosa R, et al. Identification of unstable sequences within the common fragile site at 3p14.2: implications for the mechanism of deletions within fragile histidine triad gene/ common fragile site at 3p14.2 in tumors[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(12): 3477-84.
- [13] Garinis GA, Gorgoulis VG, Mariatos G, et al. Association of allelic loss at the FHIT locus and p53 alterations with tumour kinetics and chromosomal instability in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs)[J]. *J Pathol*, 2001, 193(1): 55-65.
- [14] Kohno C. How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis[J]? *Carcinogenesis*, 1999, 20(8):1403-10.

[15] Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, et al. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer[J]. Cell, 1996, 85(1):17-26.

[16] Fong KM, Biesterveld EJ, Virmani A, et al. FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations[J]. Cancer Res, 1997, 57(11): 2256-67.

参考文献:

[1] Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, et al. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions[J]. Cancer Res, 1998, 58: 5032-7.

[2] Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, et al. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p alle- le loss and three regions of frequent breakpoints[J]. Cancer Res, 2000, 60(7): 1949-60.

谷志远. 现代医学分子生物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1998. 445-50.

[4] Li M, Schoenberg MP, Scicchitano M, et al. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis[J]. Science, 1996, 271(2): 659-62.

[5] Yen HC, Cairns P, Schoenberg MP, et al. Novel suppressor loci on chromosome 14q in primary bladder cancer[J]. Cancer Res, 1995, 55(15): 3246-49.

[6] Venmans BJ, van Boxem TJ, Smit EF, et al. Outcome of bronchial carcinoma in situ[J]. Chest, 2000, 117(6):1572-6.

[7] Uematsu K, Yoshimura A, Gemma A, et al. Aberrations in the fragile histidine triad (FHIT) gene in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Cancer Res, 2001, 61(23): 8527-33.

[8] Ohta M, Inoue H, Cottecelli MG, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma -associated t(3;8) breakpoint, is abnormal indigestive tract cancer[J]. Cell, 1996, 84: 587-92.

Tokuchi Y, Ckobayashi Y, Hayashi S, et al. Abnormal FHIT transcripts found in both lung cancer and normal lung tissue[J]. Genes Chromosomes Cancer, 1999, 24(2):105-11.

[10] Croce CM, Sozzi G, Humbner K. Role of FHIT in human cancer[J]. J Clin Oncol, 1999, 17(5): 1618-24.

[11] Nelson HH, Wiencke JK, Gunn L, et al. Chromosome 3p14 alterations in lung cancer: evidence that FHIT exon deletion is a target of tobacco carcinogens and asbestos[J]. Cancer Res, 1998, 58(9): 1804-7.

[12] Corbin S, Neilly ME, Espinosa R, et al. Identification of unstable sequences within the common fragile site at 3p14.2: implications for the mechanism of deletions within fragile histidine triad gene/ common fragile site at 3p14.2 in tumors[J]. Cancer Res, 2002, 62(12): 3477-84.

[13] Garinis GA, Gorgoulis VG, Mariatos G, et al. Association of allelic loss at the FHIT locus and p53 alterations with tumour kinetics and chromosomal instability in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs)[J]. J Pathol, 2001, 193(1): 55-65.

[14] Kohno C. How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis[J]? Carcinogenesis, 1999, 20(8):1403-10.

[15] Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, et al. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer[J]. Cell, 1996, 85(1):17-26.

[16] Fong KM, Biesterveld EJ, Virmani A, et al. FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations[J]. Cancer Res, 1997, 57(11): 2256-67.