

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

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 例遥将 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基底细胞增生轻度鳞状上皮化生轻度轻 - 中度不典型增生重度不典型增生 - 原位癌

将筛选出的病变分为 2 大组癌旁增生病变组 非癌增生病变组遥形态学分组由 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 0.5mm 空心玻璃管拉制成用于切割和吸取组织细胞的玻璃针袁在 Olympus 显微镜日本对不封片 7 厚的石蜡切片寻找病变组织袁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遥采用配制的 DNA 裂解液 56 益消化 3 h 后袁 0 益煮沸 8~10min 袁灭活蛋白酶 K 离心取上清袁酚氯仿抽提 无水乙醇沉淀 DNA 室温干燥 50 滋 TE 溶解沉淀遥经紫外分光光度计 260nm 定量后 -20 益储存备用

1.3 引物设计及合成

引物序列由 GenBank 提供袁由上海博亚生物技术有限公司合成袁 1

表 1 PCR 中引物的序列

Tab.1 Sequences of the primers used in PCR

Locus	Primersequence	Productsize(bp)	Annealingtemperature(益)
p1(D3S1234)	5'-CCTGTGAGACAAAGCAAGAC-3'	99-100	60
	5'-GACATTAGGCACAGGGCTAA-3'		
p2(D3S1300)	5'-GCCAATTCCTCCAGATG-3'	237	56
	5'-AGCTCACATTCTAGTCAGCCT-3'		
P3(D3S1481)	5'-GATGCATATTGTTAGTCC-3'	92	54
	5'-ATTATACCTCTTTGTAGC-3'		
P4(D3S1313)	5'CTTGACCCAATTTGCAAC-3'	205	54
	5'CTTCAACAGGGAAGACTAGGG3-3'		

1.4 PCR 扩增

反应容积为 50 滋袁含模板 DNA 1 滋 0.1 伊 TaqDNA 聚合酶缓冲液 5 滋 0.5 mmol/L MgCl₂ 0.5 mmol/L dNTPS 0.1 pmol 上下游引物及 TaqDNA 聚合酶 1 U 反应条件 4 益 5min 袁 4 益 1min 袁 90 益 40s 袁 2 益 1min 袁循环 40 次后袁 2 益 7min 遥

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 0% 的丙烯酰胺 伊 BE 0% 过硫酸胺 袁 EMED 袁 8mmol/L 尿素 袁加双蒸水 遥凝胶并插好梳子 袁特胶凝固移去样品梳后袁加入 1 伊 BE 1000ml 于上下两电泳槽里袁用 1 伊 BE 冲洗加样孔 袁样品点样 0.5 滋 PCR 产物加等体积的变性上样液 袁 20V 电压下进行电泳 袁指示剂迁移到合适的位置停止电泳 遥

1.6 染色及结果判断

银染参照文献咱替银染法 将凝胶置于固定液中摇动 30min 袁剥出固定液 袁加入双蒸水漂洗 5min 遥然后用新鲜配制的硝酸银染色液染色 30min 袁漂洗后

加入显色液直到条带清楚为止遥结果判断若同一个体的正常肺组织或淋巴结比较袁若某一等位基因的主要条带消失或相对密度减少 50% 以上袁则可判断为 LOH 阳性 袁如果肿瘤组织中出现正常对照没有的带型袁称为微卫星不稳定 袁 microsatellite instability, MI 遥

1.7 统计学处理

应用 SPSS 10.0 软件进行 字检验遥

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 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 遥非癌增生病变组分为 4 个级别 正常上皮 基底细胞增生 轻度 - 中度不典型增生 遥

2.2 癌性增生病变组和非癌增生病变组

FHIT 基因 D3S1234 尧 3S1300 尧 3S1481 尧 3S1313 微卫星位点的 LOH 和 MI 结果遥

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尧3S1300尧3S1481尧3S1313 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 <0.01 在癌性增生病变组 个位

点的 FHIT 阳性率比较 分别为 41%(33/82)尧7%(30/82)尧8%(31/82)尧4 (28/82) 袁无显著性差异 >0.05 另外癌性增生组 玉~芋级病变 FHIT 阳性率比较 玉~域~芋 存在显著性差异 <0.01 郁~遇级病变比较 无显著性差异 >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
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
玉	16	16	6(2)	0	6(1)	0	6(1)	0	0	0	0	0	19(3)	0	P<0.01
域	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
芋	13	16	31(4)	12(2)	31(4)	12(2)	46(6)	6(1)	31(4)	6(1)	8(1)	6(1)	54(7)*	12(2)	P<0.01
郁	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
吁	11		55(6)		45(5)		55(6)		36(4)		18(2)		81(9)		
	20		55(11)		70(14)		45(9)		70(14)		20(4)		85(17)		
TotalNo	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; *P<0.01 vs frequency of LOH and MI (FHIT) in cancerous lesions of grades 玉, 域 and 芋; *P>0.05 vs frequency of LOH and MI (FHIT) in cancerous lesions of grades 郁, 吁 and 遇

3 讨论

临床资料表明 袁在肺癌前病变只有 11% 的中度不典型增生 尧9%~46% 的重度不典型增生和原位癌向浸润癌发展 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 袁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 尧 p25 尧 p14.2 区域 袁其中 FHIT 基因的改变是目前已知在肺癌前病变发生最早 尧频率最高的基因事件 袁 Ohta 等 袁于 1996 年通过定位克隆的方法分离鉴定 袁 FHIT 基因是一种候选抑癌基因 袁位于人染色体 3p14.2 位点 袁该基因在多种肿瘤组织和细胞系如消化道癌 尧肝癌 尧乳腺癌 尧头颈癌和肺癌中都广泛地存在同源缺失 袁由于该基因的广泛性表达及其在肿瘤中普遍高频缺失 袁推测 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 袁也有研究对它在肿瘤中的作用提出一些质疑 袁人为 FHIT 的改变是非肿瘤特异性的 袁总之 袁目前对 FHIT 基因是否为一抑癌基因仍有一些争议 袁因此我们收集手术切除的肺大体标本 尧分为鳞状细胞癌切除标本和炎性切除标本 2 组 袁分别寻找各级增生病变 袁在此分组设计的基础上 袁确定 FHIT 基因在 2 组增生病变中是否存在差异 袁试图为临床病理诊断 袁真正癌变的癌前病变 袁及对癌前病变风险性进行预测 袁提供 FHIT 能否作为分子标记物的可靠实验依据 袁

迄今为止的研究表明 袁肿瘤中 FHIT 基因罕见点突变 袁而主要表现为一个或数个外显子缺失 袁本实验采用的微卫星位点 D3S1234 尧 3S1300 尧 3S1481 尧

D3S1313 位于外显子 4~6 之间 袁是该基因频发缺失的集中位点 袁我们的结果显示 4 个微卫星位点在各级增生病变以 LOH 现象为主 袁 MI 的发生率较低 袁表明 LOH 是肺癌前病变 FHIT 基因功能失活的主要方式 袁癌旁各级增生病变的 4 个微卫星位点的 LOH 和 MI 总发生率 袁 FHIT 阳性率 袁均明显高于相对应的炎性各级增生病变 袁具有显著性差异 <0.01 袁 4 个微卫星位点的 FHIT 阳性率间比较无明显差别 >0.05 袁但联合应用 4 个微卫星位点检测出的阳性率 袁比单个位点的阳性率有明显提高 袁其中癌旁基底细胞增生病变的 FHIT 阳性率为 33% (4/12) 尧鳞状上皮化生为 54% (7/13) 尧轻 - 中度不典型增生为 70% (7/10) 袁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) 尧 2% (2/16) 和 18% (2/8) 袁明显低于癌性各级增生病变 袁表明临床病理诊断病变程度相同的癌前病变是不相同的 袁肺癌前病变确实存在差异 袁 Kohno 等 袁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 袁具有染色体 3p 尧 p 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 袁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 袁大量的研究表明肺癌前病变存在多基因的损伤 袁癌变过程是多步骤 尧多因素综合作用的结果 袁不是单个基因而是 2~3 个以上基因相互协同作用的结果 袁因此我们通过分析 FHIT 基因 LOH 和 MI 总发生率在 2 组增生病变中的差异 袁推断 FHIT 是肺癌发生过程中的关键基因之一 袁同时也为临床的早期诊断 袁确定 袁真正癌变的癌前病变 袁提供了实验依据 袁但是将 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到鳞状上皮化生到轻-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 <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 >0.05 说明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4例炎性组基底细胞增生病变只1例发生D3S1234和D3S1300位点的LOHozzi等发现鳞状上皮化生病变中Fhit蛋白水平略低于正常上皮3% 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

参考文献

- 咱暂 SozziG, PastorinoU, MoiraghiL, et al. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions 咱暂 Cancer Res, 1998, 58:5032-7.
- 咱暂 WistubaII, BehrensC, VirmaniAK, et al. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allel loss and three regions of frequent breakpoints 咱暂 Cancer Res,

2000,60(7):1949-60.

- 咱暂 谷志远. 现代医学分子生物学咱暂北京人民军医出版社, 1998. 445-50.
- 咱暂 LiM, SchoenbergMP, ScicchitanoM, et al. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis 咱暂 Science, 1996, 271(2):659-62.
- 咱暂 YenHC, CairnsP, SchoenbergMP, et al. Novel suppressor locus on chromosome 14q in primary bladder cancer 咱暂 Cancer Res, 1995, 55(15):3246-49.
- 咱暂 VenmansBJ, vanBoxemTJ, SmitEF, et al. Outcome of bronchial carcinoma in situ 咱暂 Chest, 2000, 117(6):1572-6.
- 咱暂 UematsuK, YoshimuraA, GemmaA, et al. Aberrations in the fragile histidine triad (FHIT) gene in idiopathic pulmonary fibrosis 咱暂 Cancer Res, 2001, 61(23):8527-33.
- 咱暂 OhtaM, InoueH, CottecelliMG, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is an abnormal lung digestive tract cancer 咱暂 Cell, 1996, 84:587-92.
- 咱暂 TokuchiY, CkobayashiY, HayashiS, et al. Abnormal FHIT transcripts found in both lung cancer and normal lung tissue 咱暂 Genes Chromosomes Cancer, 1999, 24(2):105-11.
- 咱暂 CroceCM, SozziG, HumbnerK. Role of FHIT in human cancer 咱暂 J Clin Oncol, 1999, 17(5):1618-24.
- 咱暂 NelsonHH, WienckeJK, GunnL, et al. Chromosome 3p14 alterations in lung cancer: evidence that FHIT exon deletion is a target of tobacco carcinogens and asbestos 咱暂 Cancer Res, 1998, 58(9):1804-7.
- 咱暂 CorbinS, NeillyME, EspinosaR, 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 咱暂 Cancer Res, 2002, 62(12):3477-84.
- 咱暂 GarinisGA, GorgoulisVG, MariatosG, 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) 咱暂 Pathol, 2001, 193(1):55-65.
- 咱暂 KohnoC. How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis 咱暂 Carcinogenesis, 1999, 20(8):1403-10.
- 咱暂 SozziG, VeroneseML, NegriniM, et al. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer 咱暂 Cell, 1996, 85(1):17-26.
- 咱暂 FongKM, BiesterveldEJ, VirmaniA, et al. FHIT and FRA3B 3p14.2 allelic loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations 咱暂 Cancer Res, 1997, 57(11):2256-67.

责任编辑 隋金星