

①

19号染色体微卫星杂合性缺失与原发胃癌的临床关系

蒋明¹,徐龙¹,赵毅¹,方红辉²,陈朝晖³,高原¹

(1. 广东省深圳市第七人民医院检验科,广东深圳 518081; 2. 广东省深圳市人民医院检验科,广东深圳 518000; 3. 中南大学湘雅医院中心实验室,长沙 410008)

[摘要] 目的:研究19号染色体短臂微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)及杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)与胃癌临床病理特征之间的关系,探讨19号染色体短臂微卫星MSI和LOH的主要临床意义。方法:采用PCR-SSLP-银染方法扩增79例原发性胃癌及正常组织标本中19号染色体短臂不同位置的7个点,PCR产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,运用Genescan软件和Genotyper软件分析MSI和LOH,然后进一步分析微卫星LOH与原发胃癌的临床关系。结果:79例胃癌患者中,至少有1种微卫星发生LOH,其频率为31.18%(27/79),在所有微卫星中,D19S591和D19S565的LOH发生率分别为60.32%(38/63)和48.15%(26/54),高于其他微卫星的LOH。LOH高频率与原发胃癌的临床分期及远处转移相关,且随着恶性程度增加LOH频率也增加($P < 0.05$),而MSI与胃癌临床病理之间相关性不大。结论:19p高频率的LOH与原发胃癌的临床分期和远处转移相关,且LOH高频率提示在该区域可能存在肿瘤抑癌基因,其与胃癌的发生及进展相关。

[关键词] 原发性胃癌; 杂合性缺失; 微卫星不稳定性; 19p

[中图分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2007)03-0455-05

Identification of some macrosatellite sites of chromosome 19 in primary gastric carcinoma with loss of heterozygosity

JIANG Ming¹, XU Long¹, ZHAO Yi¹,

FANG Hong-hui², CHEN Zhao-hui³, GAO Yuan¹

(1. Department of Laboratory Tests, Seventh People's Hospital of Shenzhen, Guangdong Shenzhen 518081;

2. Department of Laboratory Tests, People's Hospital of Shenzhen, Guangdong Shenzhen 518000;

3. Laboratory Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the possible correlation between the microsatellite DNA instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) on the short arm of chromosome 19 (19p) and the clinical significance in patients with primary gastric carcinoma, and to explore the importance of MSI and LOH in primary gastric carcinoma. **Methods** PCR-SSLP-silver stain method was used to detect 7 loci MSI and LOH in 79 primary gastric carcinomas and paired normal control tissues. The PCR products were separated by electrophoresis on polyacrylamide gel. Genescan and genotype softwares were used to analyze MSI and LOH. **Results** LOH with at least one marker on 19p occurred in 31.18% (27/79) tumors. Among them, LOH at D19S591 and D19S565 was 60.32% (38/63) and 48.15% (26/54), respectively. The high incidence of LOH was related to depth of invasion and distant metastases of primary gastric carcinoma ($P < 0.05$), and there was no significance

①收稿日期(Date of reception) 2006-12-26

作者简介(Biography) 蒋明(1966-),女,江苏苏州人,副主任技师,主要从事感染与免疫学研究。

通讯作者(Corresponding author) 蒋明, E-mail: jm196601@126.com

基金项目(Foundation item) 深圳市科技局立项课题(200405276) The work was supported by Shenzhen Bureau of Science technology (200405276)

between MSI and primary gastric carcinoma. **Conclusion** LOH is related to depth of invasion and distant metastases of primary gastric carcinoma. The high incidence of LOH suggests that there might be putative tumor gene in these LOH sites.

Key words: primary gastric carcinoma; loss of heterozygosity; microsatellite instability; 19p
[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2007, 32(3):0455-05]

遗传不稳定性主要表现为微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 和杂合性缺失 (loss of heterozygosity, LOH), 是肿瘤发生过程中一个重要机制和标志。近期的研究表明, 在胃癌组织中存在高频率的微卫星不稳定性和杂合性缺失^[1-2], 本实验选用 19p 上 7 个 MSI 标记, 应用 PCR-SSLP-银染的方法, 对胃癌组织中 19p 的 MSI 和 LOH 发生频率进行分析, 并研究其与临床病理特征之间的相关性, 特别是 19p 缺失关键区域的情况, 为预测肿瘤发病风险、早期诊断和治疗、预后监测积累相关资料, 以及为鉴定可能存在的胃癌相关抑制基因提供线索。

1 材料与方法

1.1 标本资料 收集我院、深圳市人民医院及中南大学湘雅医院 2004 年 3 月至 2006 年 3 月间的手术切除的胃癌组织及癌旁正常组织标本共 79 例, 男性患者 64 例, 女性患者 15 例, 其中管状腺癌 14 例, 低分化腺癌 19 例, 印戒细胞癌 25 例, 未分化腺癌 21 例, 患者最小年龄 24, 最大年龄 69 (平均中位年龄 53.7) 岁。标本在手术切除后 30 min 内采集, 保存于液氮中备用。所有标本均经病理科病理诊断证实。

1.2 基因组 DNA 提取 应用哺乳动物基因组 DNA 提取试剂盒 (GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits, Sigma 公司) 提取胃癌组织及对应正常组织基因组 DNA, 按试剂盒操作说明进行, 紫外分光光度计检测提取 DNA 的浓度和纯度, -70℃ 保存备用。

1.3 微卫星位点的选取和 PCR 扩增 选取 19p 上的 7 对微卫星位点 (D19S424, D19S209, D19S894, D19S591, D19S565, D19S883 和 D19S886), 引物由上海博亚生物技术有限公司合成 (表 1)。PCR 总反应体积为 50 μL, 反应条件: 95℃ 3 min, 然后 94℃ 30 s, 57℃ 90 s, 68℃ min, 35 个循环, 最后 72℃ 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 19p 不同微卫星 PCR 扩增引物

Table 1 Primer sequences of MSIs at 19p different locations

MSI	引物序列	扩增片段大小(bp)
D19S424	5'-AGCTGGTATCTTGAGGGAG-3' 5'-TAGGCCACATGGAGGAGT-3'	141 ~ 161
D19S209	5'-TTCATTACAAAATCNAATGCG-3' 5'-CTGGAGAGCATAGACGNAGA-3'	260 ~ 272
D19S894	5'-TTACTFGCCCCAGGAAGC-3' 5'-GTTAAGCCATAAACATGGAATGACC-3'	144 ~ 168
D19S591	5'-TTCCAGCCTAGGTAGCAGTG-3' 5'-GCAACTGAGGAAATGCATCT-3'	96 ~ 112
D19S565	5'-GTGATTGCACCACGGG-3' 5'-TCAAGTCATTGGGTTGGC-3'	168 ~ 202
D19S883	5'-AAGCCACTGTACTCCAGCC-3' 5'-CTGCCAGACTCACCATTG-3'	158 ~ 170
D19S886	5'-TGGATCTACTCCGGC-3' 5'-ATTTTACTGGCTGGCACTTG-3'	134 ~ 158

1.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 PCR 产物经 95℃ 加热变性 min, 上样于 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶 (含 7 mol/L 尿素) 1 × TBE, 室温恒压 500 V, 功率 45 W, 电泳 3.5 h 左右。然后凝胶经固定 (10% 乙醇 + 0.5% 乙酸, 10 min), 染色 (0.2% AgNO₃, 8 min), 显色 (1.5% NaOH + 0.4% 甲醛) 至清晰后, 保存备用。

1.5 结果分析 用 Genescan 3.0 和 Genotyper 2.0 软件自动获取图像数据并分析^[3]。将肿瘤组织与其相应非瘤组织基因组 DNA 的 PCR 扩增结果同时比较, 若肿瘤的某一位点电泳条带增加、等位带位移或带的密度增加, 记为 MSI; 若等位基因条带消失或相对密度减少 50% 以上, 则记为 LOH。阳性者经再次 PCR 扩增证实, 同一标本的癌组织及相应正常组织的基因组 DNA 均成功扩增, 并呈杂合状态者, 为信息个体^[4]。

1.6 统计学处理 样品在不同分类中的表达率采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义^[5]。

2 结 果

各样品基因组 DNA 经 PCR 扩增后,均获得满意的片段。经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,特异性好(图 1),可以进行 SSLP 分析。

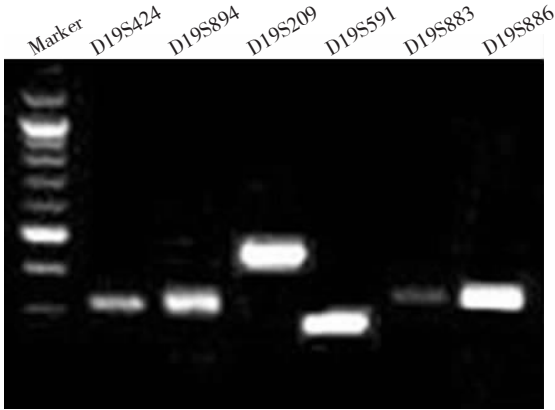


图 1 PCR 扩增 19p 不同微卫星不稳定性位点凝胶电泳结果
Fig. 1 PCR products of the sequences of MSIs at 19p different sites

2.1 原发性胃癌中 MSI 与 LOH 分析 19p 中的 7 个微卫星的 LOH 和 MSI 频率检测结果如表 2 所示,不同的位点其 LOH 频率不同,平均频率为 52.52%,至少有 1 个微卫星发生 LOH,其频率为 31.18% (27/79)。其中 D19S591 位点 LOH 发生频率最高,为 60.32% (38/63) (图 2A),其次是 D19S565,LOH 频率为 48.15%。在 79 例原发性胃癌中,MSI 的发生率平均为 35.33%,其中 D19S591 位点的 MSI 频率最高,为 46.03% (29/63) (图 2B),电泳发现有 23 (29.11%) 例原发性胃癌组织 2 个或者 3 个以上的微卫星。

表 2 7 个微卫星在原发性胃癌中的 MSI 和 LOH 的百分比

Table 2 Percent of 7 MSI and LOH at primary gastric carcinoma

MSM	n	AIT 例数(%)	MSI 例数(%)	LOH 例数(%)
D19S424	79	34(43.03)	10(29.41)	13(38.24)
D19S209	79	28(35.44)	7(25.00)	5(17.86)
D19S894	79	31(39.24)	6(19.35)	7(22.58)
D19S591	79	63(79.75)	29(46.03)	38(60.32)
D19S565	79	54(68.35)	23(42.59)	26(48.15)
D19S883	79	32(40.51)	12(37.50)	11(34.38)
D19S886	79	46(58.23)	14(30.43)	13(28.26)

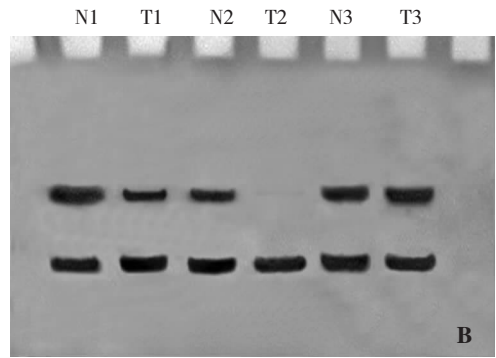
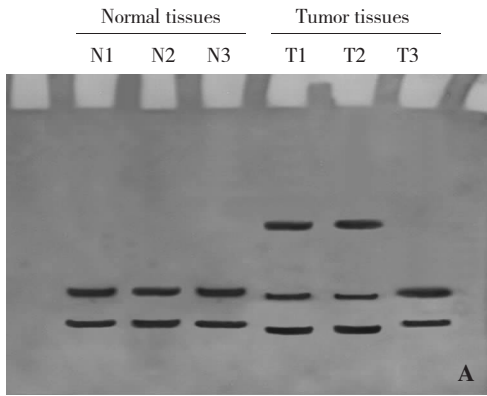


图 2 D19S591PCR 产物聚丙烯凝胶电泳结果

Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of D19S591 locus at tumor tissue A:MSI was positive as an added allele band(T1 and T2) or bands mobilized (T3);B: LOH was positive as bands decreased(T1 and T3) or lacked an allele band in tumor tissue(T2)

表 3 19p 微卫星不稳定性和杂合性丢失与原发胃癌的临床关系

Table 3 Relation between frequencies and clinicopathology of MSI and LOH in primary gastric carcinomas

临床资料	n	MSI 频率(%)	χ^2	P	LOH 频率(%)	χ^2	P
性别							
男	64	26.56(17/64)	0.10	>0.05	32.81(21/64)	0.28	>0.05
女	15	26.67(4/15)			40.00(6/15)		
年龄							
≤53	37	24.32(9/37)	0.18	>0.05	29.73(11/37)	0.61	>0.05
>53	42	28.57(12/42)			38.10(16/42)		
临床分期							
I - II	23	13.04(3/23)	4.48	>0.05	17.40(4/23)	6.46	<0.05
III	31	25.81(8/31)			32.26(10/31)		
IV	25	40.00(10/25)			52.00(13/25)		

续表

	临床资料	<i>n</i>	MSI 频率(%)	χ^2	<i>P</i>	LOH 频率(%)	χ^2	<i>P</i>
TNM 分期	T1-2	27	18.52(5/27)	1.37	>0.05	29.63(8/27)	0.38	>0.05
	T3-4	52	30.77(16/52)			36.54(19/52)		
淋巴结转移	+	57	28.07(16/57)	0.23	>0.05	38.60(22/57)	1.78	>0.05
	-	22	22.73(5/22)			22.73(5/22)		
远处转移	+	21	28.57(6/21)	0.06	>0.05	57.14(12/21)	6.71	<0.05
	-	58	25.86(15/58)			25.86(15/58)		
组织病理类型	管状腺癌	19	15.79(3/19)	5.24	>0.05	26.32(5/19)	4.15	>0.05
	低分化腺癌	25	24.00(6/25)			32.00(8/25)		
	印戒细胞癌	21	23.81(5/21)			28.57(6/21)		
	未分化腺癌	14	50.00(7/14)			57.14(8/14)		

2.2 胃癌患者 MSI 和 LOH 频率与临床病理特征的关系 如表 3 所示,本组病例中 MSI 阳性个体与阴性个体之间并没有差异,但发现与临床分期相关,随着临床分期增加,MSI 的发生率也随之增加。本组病例中 LOH 阳性个体与阴性个体在性别、年龄病理组织类型等方面没有差别 ($P > 0.05$),而发现 LOH 与原发胃癌的临床分期和其远处转移显著性相关 ($P < 0.05$),LOH 在不同临床分期之间也存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

微卫星是指基因组中具有高度多态性的简单重复序列,MSI 是指由于 DNA 复制错误引起的简单重复序列的增加或丢失,是遗传不稳定性的一种形式。LOH 即 1 个位点上 2 个多态性的等位基因中的 1 个出现表达下降或缺失。杂合性缺失在肿瘤细胞中是一种非常常见的 DNA 变异,是肿瘤细胞中染色体缺失的结果,提示所检查 DNA 多态标记附近存在抑癌基因。因此,肿瘤组织 LOH 分析为定位和发现抑癌基因的有效手段。

大量细胞遗传学研究报告,原发性胃癌在 1q, 2q, 6q, 7q, 8q, 17q 和 20q 存在高频率的基因扩增,而在 1p, 1q, 2p, 3p, 4q, 5q, 6p, 7q, 9p, 11p, 11q, 12q, 15q, 17p, 17q, 18q, 19p, 和 21q 出现基因缺失^[6-9]。已有研究表明,19p 号染色体上存在多个与肿瘤发生密切相关的基因^[8-9],19p 的 LOH 在胃癌患者及其他多种恶性肿瘤中均有发生,发现并确定了多个候选肿瘤抑制基因存在的关键区域^[10-13]。本研究选取了 19 号染色体短臂中的 D19S424, D19S209, D19S894, D19S591, D19S565, D19S883 和 D19S886 等 7 个微卫星点,间距 10cM,同时检测了胃癌患者 MSI 和 LOH,平均 MSI 频率为 35.33%,LOH 频率为

52.52%, D19S591 区和 D19S565 区的 MSI 和 LOH 明显高于其它 5 个微卫星点,其中 D19S591 区的 MSI 和 LOH 分别为 60.32% 和 46.03%,表现出 MSI 和 LOH 频发的趋势,表明我国胃癌人群在 19p 上有较高的突变频率。

作者进行统计学分析发现,选取的 19p 上的 7 个微卫星的 MSI 和 LOH 虽然与年龄、性别、组织分化程度、肿瘤大小以及淋巴结转移等临床指标无明显相关,但 19p 的 LOH 与胃癌患者的临床分期和远处转移显著相关,有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时,胃癌临床分期为 I-II 时的 LOH 频率为 17.40%,III 为 32.26%,而到了临床 IV 时,LOH 频率达到了 52.00%,且各个分期之间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),提示 LOH 与原发胃癌的临床分期相关,且随着临床分期越来越高,其 LOH 频率变化越大,提示在 19 号染色体短臂上存在与胃癌转移相关的基因。

胃癌中发现的这些常见扩增和缺失区存在与胃癌发生相关的癌基因和肿瘤抑制基因,故有必要对其在胃癌中 DNA 水平存在状况、表达情况、功能等进行进一步研究。为寻找胃癌相关基因提供线索,这些区域也是进一步克隆人类胃癌相关基因的候选染色体区域。

参考文献:

- [1] 王琦,程慧,白静,等.原发性胃癌中 19 部分微卫星多态位点杂合性缺失分析[J].中华医学遗传学杂志,2001,18(6):459-461.
WANG Qi, CHEN Hui, BAI Jing, et al. Analysis of loss of heterozygosity on 19p in primary gastric cancer [J]. Chin J Med Genet, 2001, 18(6): 459-461.
- [2] Guan X Y, Fu S B, Xia J, et al. Recurrent chromosome changes in 62 primary gastric carcinomas detected by comparative genomic hybridization [J]. Cancer Genet Cytogenet,

- 2000, 123(1):27-34.
- [3] Miyai K, Furugen Y, Matsumoto T, et al. Loss of heterozygosity analysis in uterine cervical adenocarcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 94(1):115-120.
- [4] CHEN Xue-rong, ZHANG Wei-zhong, LIN Xing-qiu, et al. Genetic instability of BRCA1 gene at locus D17S855 is related to clinicopathological behaviors of gastric cancer from Chinese population [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(26):4246-4249.
- [5] Weng D S, Li J T, Mai S J, et al. Identification of a new target region on the long arm of chromosome 7 in gastric carcinoma by loss of heterozygosity [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(15):2437-2440.
- [6] El-Rifai W, Harper J C, Cummings O W, et al. Consistent genetic alterations in xenografts of proximal stomach and gastroesophageal junction adenocarcinomas [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(1):34-37.
- [7] Yustein A S, Harper J C, Petroni G R, et al. Allelotype of gastric adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(7):1437-1441.
- [8] Nishizuka S, Tamura G, Terashima M, et al. Loss of heterozygosity during the development and progression of differentiated adenocarcinoma of the stomach [J]. *J Pathol*, 1998, 185(1):38-43.
- [9] Sugai T, Habano W, Uesugi N, et al. Three independent genetic profiles based on mucin expression in early differentiated-type gastric cancers--a new concept of genetic carcinogenesis of early differentiated-type adenocarcinomas [J]. *Mod Pathol*, 2004, 17(10):1223-1234.
- [10] Brunaud L, Zarnegar R, Wada N, et al. Chromosomal aberrations by comparative genomic hybridization in thyroid tumors in patients with familial nonmedullary thyroid cancer [J]. *Thyroid*, 2003, 13(7):621-629.
- [11] Yanaihara N, Okamoto A, Matsufuji S. A commonly deleted region in ovarian cancer on chromosome 19p13.3, not including the OAZ1 gene [J]. *Int J Oncol*, 2003, 23(3):567-575.
- [12] Chan K Y, Wong N, Lai P B, et al. Transcriptional profiling on chromosome 19p indicated frequent downregulation of ACP5 expression in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2005, 114(6):902-908.
- [13] Miller B J, Wang D, Krahe R, et al. Pooled analysis of loss of heterozygosity in breast cancer: a genome scan provides comparative evidence for multiple tumor suppressors and identifies novel candidate regions [J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 73(4):748-767.

(本文编辑 傅希文)