

张.且有研究表明,肝衰竭大鼠近端小肠肠腔及血液内NO高于对照,并与胃肠平滑肌运动障碍显著相关<sup>[1]</sup>.

有学者将肝硬化大鼠胃肠黏膜制成石蜡及冰冻切片,通过免疫组织化学和一氧化氮组织化学染色等方法进行研究,发现各类NOS(NOS1,神经型、NOS2,诱导型和NOS3,内皮型)在胃肠道黏膜固有层有相似的分布,主要存在于黏膜固有层间质的中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和部分淋巴细胞.另外NOS1还存在于胃肠道壁内肌间神经丛,NOS2存在于黏膜下层血管内皮细胞.肝硬化大鼠胃肠道各段NOS阳性细胞数均明显减少<sup>[2]</sup>.

普通切片制作方法只能从某一断面了解肌间神经丛细胞数量的多少,而运用铺片的制作方法却可以显示整个肠道肌间神经丛细胞的数量、形态及神经纤维结构.本文作者将肝硬化大鼠肠壁纵形平滑肌剥离制成铺片,进行NOS和AChE组织化学染色,并将铺片进行计算机图像分析.结果发现肝硬化大鼠肌间神经丛阳性神经元与对照组比较,均出现结构和染色强度的异常.图像分析发现模型组空肠及结肠肌间神经丛一氧化氮合酶、乙酰胆碱酯酶活性均下降,反映所对应神经元功

能受影响.乙酰胆碱是胃肠副交感神经的主要递质,对胃肠道的运动、排空有重要作用.现在发现一氧化氮是广泛存在于人体内的生物递质,对抑制平滑肌收缩,扩张血管、胃肠道平滑肌的正常活动起调节作用<sup>[3-4]</sup>.本组实验发现二者在肝硬化胃肠道肌间神经丛的异常,为肝硬化患者出现消化道症状可能与胃肠神经系统受损有关提供了一定的实验证据.

#### 4 参考文献

- 1 Wang X, Zhong YX, Zhang ZY, Lu J, Lan M, Miao JY, Guo XG, Shi YQ, Zhao YQ, Ding J, Wu KC, Pan BR, Fan DM. Effect of L-NAME on nitric oxide and gastrointestinal motility alterations in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:328-332
- 2 王新, 闻勤生, 黄裕新. L-NAME对肝硬化大鼠胃肠道中一氧化氮合酶亚型表达的影响. *第四军医大学学报* 2001;22:817-820
- 3 Xu L, Carter EP, Ohara M, Martin PY, Rogachev B, Morris K, Cadnapaphornchai M, Knotek M, Schrier RW. Neuronal nitric oxide synthase and systemic vasodilation in rats with cirrhosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F1110-1115
- 4 Yoneda S, Kadowaki M, Kuramoto H, Fukui H, Takaki M. Enhanced colonic peristalsis by impairment of nitrergic enteric neurons in spontaneously diabetic rats. *Auton Neurosci* 2001;92:65-71

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## BAT-26 预测散发性大肠癌的复制错误

邱福铭, 宋永茂, 黄建, 郑树

邱福铭, 宋永茂, 黄建, 郑树, 浙江大学医学院附属第二医院肿瘤科  
浙江省杭州市 310009  
国家自然科学基金资助项目, No. 39600055  
浙江省教育厅资助项目, No. 20000371  
项目负责人: 黄建, 310009, 浙江省杭州市解放路88号, 浙江大学医学院附属第二医院肿瘤科. hjys@zju.edu.cn  
电话: 0571-87784556 传真: 0571-87784556  
收稿日期: 2004-03-18 接受日期: 2004-04-05

### 摘要

目的: 微卫星不稳定(microsatellite instability MSI)是DNA复制错误(replication error RER<sup>+</sup>)的标记, BAT-26系位于错配修复基因hMSH2中的单腺苷酸重复序列位点,曾被报道无需正常对照就可用于预测散发性大肠癌RER<sup>+</sup>状况,我们选择BAT-26并与其他双核苷酸重复序列位点进行比较加以验证与评价.

方法: 经病理确诊的散发性大肠癌肿瘤组织60例,常规抽提DNA,采用PCR-银染法分析6个(CA)<sub>n</sub>双碱基重复卫星序列和BAT-26位点,并用自动荧光DNA序列分析法检测BAT-26;同时以PCR-SSCP法检测RER<sup>+</sup>病例hMSH2基因5, 7, 8, 12, 13, 15外显子突变; RER<sup>+</sup>判断

依6个(CA)<sub>n</sub>位点中出现2个或以上MSI为标准.

结果: RER<sup>+</sup>散发性大肠癌占18%(11/60), 6例RER<sup>+</sup>肿瘤检出hMSH2基因突变. 含hMSH2基因突变的6例RER<sup>+</sup>病例中有3例BAT-26不稳定(BAT-26<sup>+</sup>), 44例RER<sup>-</sup>散发性大肠癌均为BAT-26<sup>-</sup>. 与(CA)<sub>n</sub>位点结果比较, BAT-26预测RER的阳性符合率为50%, 阴性符合率为100%, BAT-26<sup>+</sup>在预测散发性大肠癌RER<sup>+</sup>特异性为100%, 敏感性为50%. PCR-银染和自动荧光DNA序列分析两种方法检测BAT-26 MSI结果一致.

结论: 单用BAT-26作为预测RER状况的指标尚有缺陷, 需结合其他微卫星位点进行综合分析.

邱福铭, 宋永茂, 黄建, 郑树. BAT-26预测散发性大肠癌的复制错误. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1461-1463

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1461.asp>

### 0 引言

微卫星不稳定(MSI)可表现为RER<sup>+</sup>, 约90%以上遗传

性非息肉性大肠癌(Hereditary non-polyposis colorectal cancer HNPCC)和约 10-15% 散发性大肠癌中存在 RER<sup>+</sup> [1]。BAT-26 是位于错配修复基因 hMSH2 第 5 内含子内的 26 个腺苷酸重复序列, 具有准单态性, 有研究表明绝大部分 RER<sup>+</sup> 原发性大肠癌表现为 BAT-26<sup>+</sup> [2], 我们选择 BAT-26 并与其他双核苷酸重复序列位点进行比较加以验证与评价。

1 材料和方法

1.1 材料 1996/1997年浙江大学医学院附属第二医院肿瘤科收治的经病理确诊的散发性大肠癌患者60例。由于部分样本 DNA 用尽, 对其中 50 例样本包括 6 例 RER<sup>+</sup> 标本分别用 PCR- 银染法、自动荧光 DNA 序列分析法检测 BAT-26 位点。

1.2 方法 新鲜肿瘤组织和相应正常组织采用酚/氯仿抽提法抽提 DNA。PCR- 银染法分析 6 个(CA)<sub>n</sub> 双碱基重复微卫星序列 D2S119, D13S160, D8S282, D3S1293, D2S123, D18S58, 各位点引物和反应条件参见文献[3], 如肿瘤组织相对于正常组织出现额外的条带、等位条带产生迁移率的改变就定义为 MSI, 在 6 个位点中出现 2 个或以上 MSI 即确定为 RER<sup>+</sup>。PCR-SSCP 检测 hMSH2 基因外显子 5, 7, 8, 12, 13, 15 突变, PCR 反应体系和 PCR 反应参数见文献[4]。BAT-26 位点 PCR 引物和反应条件见文献[2], PCR 产物先采用常规的 PCR- 银染法检测确定 MSI, 再用全自动测序仪(ABI 3777 DNA Sequencer)分析: TAMARA 标记引物, 基因扫描分析软件 genescan 分析, 若肿瘤组织出现相应正常组织没有的峰即可确定为 MSI。

2 结果

2.1 散发性大肠癌 RER 状况和 hMSH2 突变 散发性大肠癌 60 例, 采用 6 个双核苷酸重复序列(CA)<sub>n</sub> 位点, 检出 11 例 RER<sup>+</sup> 病例, 阳性率为 18%。其中 6 例 RER<sup>+</sup> 病例均发现有 hMSH2 第 5 外显子突变, 其他外显子未检测到突变。

2.2 BAT-26 不稳定性 分别采用 PCR- 银染法和自动荧光全自动测序仪分析 50 例(6 例 RER<sup>+</sup> 和 44 例 RER<sup>-</sup>) 散发性大肠癌 BAT-26, 均发现仅在相同的 3 例病例出现 BAT-26<sup>+</sup>, 且均为 RER<sup>+</sup> 病例, 其余的 44 例均为 BAT-26<sup>-</sup>。图 1 仅第 6 号肿瘤出现异常条带(箭头所指), 第 6 号肿瘤样本自动荧光 DNA 序列仪分析目的片段长度(113 bp)比正常组织(121.0 bp)缩短了 8 bp (图 2)。

2.3 散发性大肠癌 RER 状况 6 个(CA)<sub>n</sub> 双碱基重复微卫星序列和 BAT-26 对 RER<sup>+</sup> 状况预测的阳性率(RER<sup>+</sup> 病例中各微卫星位点 MSI+ 的比例)和假阳性率(RER<sup>-</sup> 病例中各微卫星位点 MSI+ 的比例)进行比较(表 1), 阳性率超过 50% 的微卫星位点有 D3S1293, D3S1293, BAT-26, 假阳性率为零的微卫星位点有 D13S160, D18S58, BAT-26。在有 hMSH2 基因突变的 RER<sup>+</sup> 散发性大肠癌仅

有 3 例 BAT-26 不稳定(表 2)。与(CA)<sub>n</sub> 位点结果比较, BAT-26 预测 RER 状况的阳性符合率为 50%, 阴性符合率为 100%, BAT-26<sup>+</sup> 在预测散发性大肠癌 RER<sup>+</sup> 特异性为 100%, 敏感性为 50%。

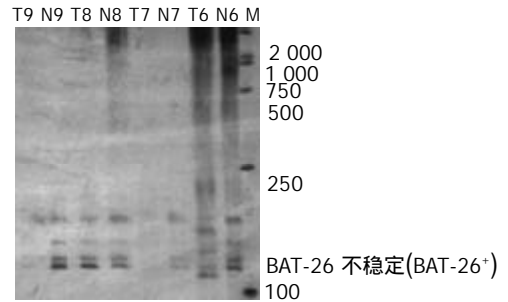


图 1 散发性大肠癌 BAT-26 位点 PCR- 银染法检测结果: 箭头所指第 6 号肿瘤组织标本 BAT-26<sup>+</sup> 条带, 余均为正常条带。M: DNA 标记物; N: 相应正常组织; T: 散发性大肠癌组织。

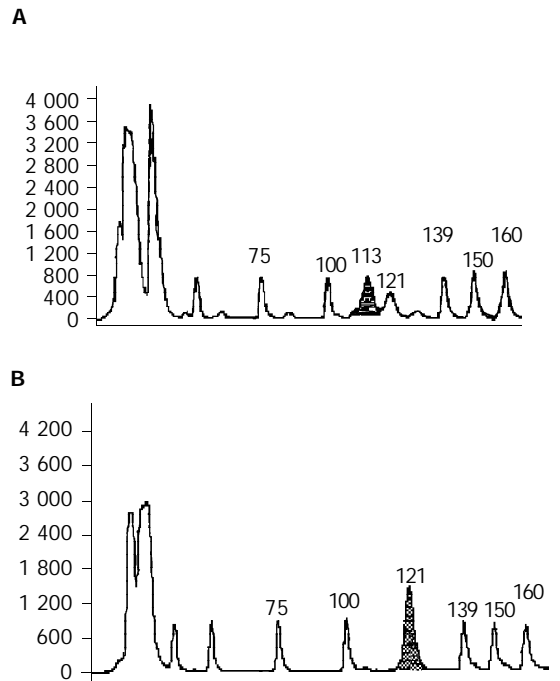


图 2 6 号标本 BAT-26 MSI 的基因扫描结果。A: 图为肿瘤组织和; B: 图为相应正常组织, 横坐标为片段长度, 纵坐标为荧光强度, 箭头所指为缩短 BAT-26 片段。

表 1 7 个不同微卫星位点阳性率预测散发性大肠癌 RER 状况比较

	D2S119	D13S160	D8S282	D3S1293	D2S123	D18S58	BAT26
阳性率%	5/11(45)	4/11(36)	3/11(27)	7/11(64)	6/11(55)	5/11(45)	3/6(50)
假阳性率%	3/49(6.1)	0/49(0)	4/49(8.2)	2/49(4.1)	1/49(2.0)	0/49(0)	0/44(0)

表 2 含 hMSH2 基因突变的 RER<sup>+</sup> 散发性大肠癌中 BAT-26 MSI 状况

NO.	基因突变	BAT-26
5	+	-
6	+	+
17	+	-
28	+	+
29	+	-
48	+	+

### 3 讨论

大肠癌错配修复途径主要涉及绝大部分遗传性肿瘤和少部分散发性肿瘤, 错配修复缺陷即RER<sup>+</sup>大肠癌具有不同于RER<sup>-</sup>肿瘤的诸多临床病理特点, 确定大肠癌RER状况对治疗选择和预后判断有一定指导作用. BAT-26具有准单态性, 一般在正常细胞内其碱基长度变化不超过2个碱基. 在HNPCC相关大肠癌中, Loukola et al<sup>[6]</sup>报告BAT-26预测大肠癌的RER阳性率为55%(27/49); Stone et al<sup>[6]</sup>比较单和双核苷酸重复序列位点预测RER状况, 发现BAT-25、BAT-26敏感性更高; Hoang et al<sup>[2]</sup>研究显示高达97%的RER<sup>+</sup>大肠癌表现为BAT-26<sup>+</sup>(片段大小缩短>2 bp), 提出BAT-26可单独作为预测RER状况的检测指标, 不需设正常对照. 然而, 日本的一项研究发现8例RER<sup>+</sup>大肠癌仅有4例出现BAT-26位点单个碱基的改变, 提示单独应用BAT-26预测RER<sup>+</sup>存在缺陷, 认为需结合其他微卫星位点进行准确检测<sup>[7]</sup>. 迄今, 有关国人的相关研究尚为数不多, 为此我们选择BAT-26并与其他双核苷酸重复序列位点进行比较加以验证与评价.

我们选择了6个(CA)<sub>n</sub>双碱基重复微卫星序列D2S119、D13S160、D8S282、D3S1293、D2S123、D18S58测定散发性大肠癌RER状况, 有11例大肠癌呈RER<sup>+</sup>, 其中6例标本发现有hMSH2基因突变. 同时, PCR-SSCP银染和自动荧光DNA序列仪对上述6例标本分析BAT-26位点, 均证实相同3例病例为BAT-26<sup>+</sup>, 其余无一表现为BAT-26<sup>+</sup>. 由于错配修复基因突变是MSI的分子基础, 如果将hMSH2基因突变作为RER状况的金标准, BAT-26预测的特异性虽为100%, 但敏感性仅有50%, 所选的(CA)<sub>n</sub>微卫星位点如D13S160、D18S58也有类似的特异性和敏感性; 与(CA)<sub>n</sub>位点结果比较, BAT-26预测RER状况的阳性符合率为50%, 阴性符合率为100%, 因此BAT-26单独预测散发性大肠癌RER状况, 由于其敏感性较低, 可在一定程度上造成RER<sup>+</sup>病例的遗漏, 故仍需结合其他位点进行检测来提高准确性. 目前国际上推荐五个微卫星位点也就是Bethesda微卫星标记(BAT-25, BAT-26, D5S346, D2S123,

和D17S250)进行检测<sup>[8]</sup>.

在BAT-26的MSI检测方面, 两种方法检测结果完全符合. 但自动荧光DNA序列仪分析法与PCR-SSCP银染法相比较, 具有明显的特点: 能准确、定量和比较客观地反映MSI, 能达到测定单个碱基改变的精确度<sup>[9]</sup>; 利用不同荧光标记, 两个样本可在同一泳道上同时进行电泳, 从而避免了不同泳道间细微差异可能造成的误差; 此外, 如果选用更多的荧光标记, 在同一泳道上最多可同时进行3对样本电泳, 极大地提高了检测效率. 因此, 自动荧光DNA序列分析法为准确、快速、高通量检测MSI的有效方法.

### 4 参考文献

- 1 房殿春, 周晓东. 胃肠道肿瘤微卫星DNA不稳定性研究进展. 华人消化杂志 1998;6(7特刊):66-68
- 2 Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 300-303
- 3 Huang J, Papadopoulos N, McKinley AJ, Farrington SM, Curtis LJ, Wyllie AH, Zheng S, Willson JK, Markowitz SD, Morin P, Kinzler KW, Vogelstein B, Dunlop MG. APC mutation in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9049-9054
- 4 熊斌, 郑树, 蔡心涵. 散发性大肠癌微卫星不稳定及hMSH2基因突变研究. 中华实验外科杂志 1999;16:206-207
- 5 Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Jarvinen H, Mecklin JP, Launonen V, Aaltonen LA. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res* 2001;61:4545-4549
- 6 Stone JG, Tomlinson IP, Houlston RS. Optimising methods for determining RER status in colorectal cancers. *Cancer Lett* 2000;149:15-20
- 7 Morifuji M, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Sueda T, Yokoyama T. Fluorescent-based BAT-26 analysis for distinct screening of microsatellite instability in colorectal cancers. *Int J Oncol* 2003;22:807-813
- 8 Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-5257
- 9 Toh Y, Oki E, Oda S, Tomoda M, Tomisaki S, Ichiyoshi Y, Ohno S, Sugimachi K. An integrated microsatellite length analysis using an automated fluorescent DNA sequencer. *Cancer Res* 1996;56:2688-2691