

河南食管癌高发区食管癌和癌旁正常组织中 FHIT 蛋白及其 mRNA 的表达

李吉学, 李燕杰, 秦艳茹, 安继业, 王启鸣, 余炜伟, 王立东

李吉学, 李燕杰, 余炜伟, 王立东, 郑州大学医学实验中心
河南省郑州市 450052
秦艳茹, 郑州大学第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052
安继业, 郑州大学第三附属医院儿科 河南省郑州市 450052
王启鸣, 河南省肿瘤医院内二科 河南省郑州市 450052
李吉学, 男, 1970-04-18 生, 河南省新乡市人, 汉族. 2003 年郑州大学博士, 讲师. 主要从事肿瘤防治研究.
通讯作者: 王立东, 450052, 河南省郑州市大学北路 40 号, 郑州大学医学实验中心. wangld0823@sina.com
电话: 0371-66912911
收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

FHIT mRNA and protein expression in esophageal carcinoma and matched adjacent normal esophageal tissues at high-incidence area in Henan Province

Ji-Xue Li, Yan-Jie Li, Yan-Ru Qin, Ji-Ye An, Qi-Ming Wang, Wei-Wei Yu, Li-Dong Wang

Ji-Xue Li, Yan-Jie Li, Wei-Wei Yu, Li-Dong Wang, Medical Experiment Center of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Yan-Ru Qin, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Ji-Ye An, Department of Paediatrics, the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Qi-Ming Wang, the Second Department of Internal Medicine, Henan Tumor Hospital, Zhengzhou 450008, Henan Province, China
Correspondence to: Li-Dong Wang, Medical Experiment Center of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. wangld0823@sina.com
Received: 2005-04-04 Accepted: 2005-04-09

Abstract

AIM: To investigate the mRNA and protein expression of fragile histidine triad (FHIT) in human esophageal carcinoma and adjacent normal tissues in high-risk area in Linzhou city, Henan province.

METHODS: The expression of FHIT mRNA was detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in 16 cases of esophageal squamous cancer and matched adjacent cancer tissues, and the expression of FHIT protein was determined by immunohistochemistry in 42 cases.

RESULTS: The expression of FHIT protein was found absent in 57.1% (24/42) of tumor samples and weak in 42.9% (18/42), which was significantly higher than that in cancer-adjacent tissues (95.2%, 40/42) ($P < 0.05$). FHIT mRNA

expression in cancer tissues (4/16, 25%) was markedly lower than that in cancer-adjacent tissues (12/16, 75%) ($P < 0.05$).

CONCLUSION: FHIT protein may be the important tumor suppressor protein carcinogenesis and progression of esophageal carcinoma. Its lower or absent expression may increase the incidence of esophageal carcinoma in the high-risk area.

Key Words: Esophageal carcinoma; Fragile histidine triad; Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; Immunohistochemistry

Li JX, Li YJ, Qin YR, An JY, Wang QM, Yu WW, Wang LD. FHIT mRNA and protein expression in esophageal carcinoma and matched adjacent normal esophageal tissues at high-incidence area in Henan Province. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(12):1417-1420

摘要

目的: 检测食管癌高发区河南省林州市食管鳞癌及相应癌旁正常上皮组织的脆性组氨酸三联体(fragile histidine triad, FHIT)蛋白和 mRNA 表达情况, 从而探讨 FHIT 与该地区食管癌发生发展的关系。

方法: 采用卵白素-生物素-辣根过氧化物酶复合物(ABC)免疫组织化学染色法检测了 42 对食管癌高发区河南省林州市手术标本的癌组织和癌旁组织中 FHIT 蛋白表达水平. 采用反转录 PCR 方法检测了 16 对食管癌和癌旁正常组织中 FHIT 基因 mRNA 表达状况。

结果: FHIT 蛋白在食管癌组织中缺失表达(24/42, 57.1%)或弱表达(18/42, 42.9%), 与癌旁正常上皮组织中 FHIT 蛋白情况(40/42, 95.2%)差异显著($P < 0.05$). 低分化癌组织中 FHIT 蛋白阴性表达率为(13/15, 87%), 分化癌组织阴性表达率为(11/27, 41%), 二者有显著性差异($P < 0.05$). 癌组织 FHIT mRNA 表达阳性率(4/16, 25%)显著低于癌旁组织(12/16, 75%) ($P < 0.05$).

结论: FHIT 基因可能在该地区食管癌的发生发展过程中起重要作用, 是重要的抑癌蛋白, 其表达减弱或缺失增加了食管癌的易感性。

关键词: 食管癌; 脆性组氨酸三联体; 逆转录聚合酶连反应; 免疫组化

李吉学, 李燕杰, 秦艳茹, 安继业, 王启鸣, 余炜伟, 王立东. 河南食管癌高发区食管癌和癌旁正常组织中 FHIT 蛋白及其 mRNA 的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(12):1417-1420
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1417.asp>

0 引言

食管癌的发病具有显著性地域性差距^[1], 河南北部太行山区的林州市是世界上食管癌发病率和死亡率最高的地区之一^[2-3]. 此流行病特征提示该地区食管癌患者具有较高的易感性. 而位于染色体3p14.2的脆性组氨酸三联体(fragile histidine triad, FHIT)基因跨越人类染色体脆性部位FRA3B^[4-5], 很可能是外源致癌物的目标. 其发生改变可能使个体更易发生肿瘤. 人们对其深入探讨, 发现该蛋白在多种肿瘤发生过程中发生广泛的缺失和失活^[6-7], 在消化道肿瘤亦发现FHIT基因表达异常^[8-9]. 而在食管癌高发区河南林州市食管癌患者中FHIT蛋白的表达情况尚未见研究报告. 为研究FHIT在河南食管癌高发区患者的表达情况, 我们采用免疫组织化学技术和反转录聚合酶链反应, 检测食管癌及相应癌旁组织的FHIT蛋白和mRNA表达情况, 从而探讨FHIT与该地区食管癌发生发展的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 食管癌手术切除标本均来自食管癌高发区河南省林州市医院, 所有患者术前均未接受放疗和化疗. 手术新鲜标本在现场经简单处理后, 迅速放入液氮中冷冻, 后转入实验室-70℃冰箱保存. 在癌肿组织和癌旁目测形态正常组织分别取1-3块组织, 每个病例根据病理结果分别选择正常上皮和癌组织为一对样品, 共选取42对样品. 男29例, 女13例, 年龄50-65(57.5±7.5)岁. 均为鳞状细胞癌, 其中高分化27例, 低分化15例. 经850 mL/L乙醇固定, 常规脱水后石蜡包埋, 连续切片, 每张片厚5 μm, 室温存放待用. 取1张进行HE染色, 用于组织病理学诊断, 其他用于免疫组织化学染色. 用于RT-PCR的样品是部分免疫组织化学中使用的标本, 共有16对, 取样方法与免疫组化取样方法类似.

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 兔抗人FHIT多克隆抗体(Rabbit anti-FHIT)购自北京中山生物技术公司. 免疫组织化学所用染色试剂盒为Vector公司生产的ABC试剂盒, 实验步骤按说明书进行. 用本实验室以往阳性片作阳性对照, 用磷酸盐缓冲液代替一抗, 作为阴性对照.

1.2.2 判断标准 胞质着黄色者为FHIT蛋白阳性染色. 先按染色强度计分:0分为无色, 1分为浅黄色, 2分为棕黄色, 3分为棕褐色;再按阳性细胞所占百分比计

分:0分为阳性细胞数≤5%, 1分为阳性细胞数≤20%, 2分为阳性细胞数20%-70%, 3分为阳性细胞数≥70%. 染色强度与阳性细胞百分比的乘积位于0-3分为缺失表达, 3-6分为弱表达, 此两种表达均为异常表达, 6-9分的为正常表达.

1.2.3 RT-PCR 用Promega公司SV Total RNA Isolation System试剂盒提取RNA, 用Promega公司ImProm-II™ Reverse Transcription System试剂盒进行反转录, 方法按手册建议进行, 反转录得到的cDNA通过PCR扩增β-actin进行品质检验. PCR引物由宝生物工程(大连)有限公司合成, β-actin Forward primer:5'-GCT CTC TTC CAA CCT TCC TT-3', β-actin Reverse primer:5'-TGG AAG GTG GAC AGC GAG GC-3'. 扩增片段为281 bp. FHIT Forward primer:5'-CTG CTC TGTC CGG TCA CA-3', FHIT Reverse primer:5'-TTC AGA AGA CTG CTA CCT CTT-3'. 扩增片段为335 bp. 5 MU/L Taq DNA Polymerase, 10× Buffer, 25 mmol/L MgCl₂, 2.5 mmol/L dNTP(each)购自宝生物工程(大连)有限公司, 体系为纯水16.5 μL, 10× Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L Mg²⁺ 1.5 μL, 2.5 mmol/L(each) dNTP 2.0 μL, 引物各1.0 μL, Taq DNA Polymerase 0.5 μL, Template DNA 1 μL. 总体积为25 μL. PCR反应条件为95℃预变性5 min, 94℃ 1 min, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35个循环, 最后72℃延伸10 min. 产物经20 g/L的普通琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色, 通过凝胶成像系统(英国UVI公司)分析电泳结果.

统计学处理 采用临床标本的配对资料进行χ²检验, P<0.05为相差有显著性意义.

2 结果

2.1 FHIT蛋白在食管癌旁正常上皮和食管癌组织中的表达情况 FHIT蛋白在食管癌旁正常上皮中呈正常表达, 正常上皮细胞排列规则整齐, 胞质染色均匀清晰, 胞核未见染色. 在高分化癌组织区域随癌细胞生长呈不规则表达, 染色阳性细胞集中在分化程度较高角化珠附近, 在邻近组织无表达, 差异明显. 癌细胞阳性染色区细胞排列杂乱, 染色不均一. 在低分化癌组织中细胞染色变浅或缺如, 染色不均匀, 阳性细胞数少或消失. 42例正常食管上皮组织中40例FHIT蛋白表达正常(95.2%), 而在42例癌组织中FHIT未见正常表达, 仅见表达缺失(24/42, 57.1%)及弱表达(18/42, 42.9%), 癌旁正常上皮组织阴性表达为1例, 阳性1例, 强阳性40例;癌组织阴性表达为24例, 阳性18例(表1). 二者有显著性差异(P<0.05). 将癌组织分化程度分为高分化与低分化两种类型, 考察癌组织分

化程度与癌组织中免疫阳性表达发现, 低分化癌组织中 FHIT 蛋白阴性表达率为 87% (13/15), 分化癌组织阴性表达率为 41% (11/27). 经统计分析分化与低分化的 FHIT 表达情况, 发现有 0 个格子 (0.0%) 的期望频数小于 5, 最小期望频数为 6.43, $n = 42 > 40$, Pearson 卡方值 = 8.305, $df = 1$, $P = 0.004 < 0.05$. 二者有显著性差异 (表 1). 在 16 例正常食管上皮组织中, 12 例 mRNA (75%) 表达正常. 其 mRNA 仅有 4 例 (25%) 表达正常.

表 1 食管癌组织 FHIT 蛋白表达

组织类型	组织例数 <i>n</i>	FHIT 蛋白 表达缺失 <i>n</i> (%)	FHIT 蛋白 表弱达 <i>n</i> (%)	FHIT 蛋白 正常表达 <i>n</i> (%)
正常食管上皮	42	1(2.4)	1(2.4)	40(95.2)
癌组织	42	24(57.1)	18(42.9)	0(0)
高分化	27	11(26.2)	16(38.1)	0(0)
低分化	15	13(30.9)	2(4.8)	0(0)

2.2 RT-PCR 结果 FHIT 基因在癌组织中表达降低, 在癌旁正常上皮组织中表达增高. 在癌组织呈阴性的为 12 例, 占 75%, 在癌旁组织中检出呈阴性的为 4 例, 占 25% (图 1). 经统计分析软件处理, $n = 32 < 40$, 费歇尔 (Fisher) 精确检验得 $P = 0.012 < 0.05$, 故认为癌和癌旁正常上皮组织中的 FHIT mRNA 表达存在显著性差异 (表 2).

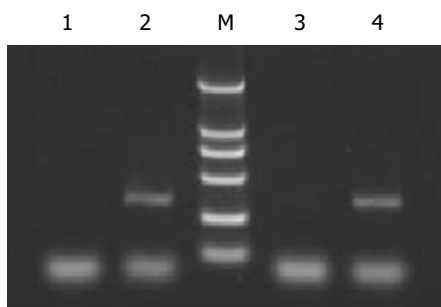


图 1 FHIT 基因 RT-PCR 结果. 1、2 和 3、4 分别代表同一个体的癌和癌旁组织, M 为分子量标准 DL2000, 条带大小为 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp, 目标条带为 335 bp.

表 2 食管癌及癌旁组织中 FHIT mRNA 检测结果

组织类型	组织例数	FHITmRNA 表达阴性 <i>n</i> (%)	FHITmRNA 表达阳性 <i>n</i> (%)
癌组织	16	12(75)	4(25)
癌旁正常组织	16	4(25)	12(75)

3 讨论

食管癌是危害居民生命健康的主要恶性肿瘤之一, 尤以我国环太行山地区发病率为高, 其中河南林州市的食管癌发病率居世界首位^[10]. 近年来, 研究者对

该地区居民患食管癌的高易感性内在机制及食管癌的发病机理进行了研究, 发现食管癌是一个多阶段演进性过程, 由多种高危因素和基因改变共同作用的结果.

FHIT 基因位于人类 3 号染色体 3p14.2, cDNA 全长约 1.1 kb, 含 10 个外显子^[5]. 在正常情况下, FHIT 存在于大多数正常组织中. 多种肿瘤组织中 FHIT 表达存在频繁地降低或丢失^[8, 11], 提示 FHIT 基因为多种肿瘤的候选抑制基因.

我们对食管癌高发区林州市的食管癌组织及癌旁正常组织的研究发现, FHIT 蛋白在全部 42 例食管癌组织中呈缺失表达或弱表达, 而其癌旁正常上皮组织中 40 例均为正常表达. 癌组织 FHIT mRNA 表达阳性率显著低于癌旁组织. 该地区的食管癌 FHIT 异常表达检出率远高于河北磁县^[12]的检出率 (20.3%). 癌组织中与不同分化程度食管癌中 FHIT 蛋白表达不同, 随分化从高到低, FHIT 表达逐渐降低. 而赵坡 *et al*^[13]报道 FHIT 蛋白表达在不同分级食管癌组织未见差异, 此不一致结果可能与地区性差异有关, 提示林县地区食管癌有其独特的分子学变化, 在该地区食管癌发生发展过程中, FHIT 蛋白可能是重要的抑癌蛋白, 其表达减弱或缺失增加了食管癌的易感性.

该地区食管癌组织中 FHIT 蛋白表达的高异常率发生原因都有那些? 基因异常转录、纯合性缺失、杂合缺失及 CpG 岛异常甲基化等会导致其蛋白的异常表达^[14-16]. 李卫东 *et al*曾报道山西阳泉和北京地区食管癌组织 FHIT 的基因的 5' 2UTR 和第 5 外显子的改变是 FHIT 基因丢失的两个“热点”区域^[17]. 河南林州市食管癌组织 FHIT 基因的变化及其热点尚需进一步检测.

另外 FHIT 基因的 5' 端为核转录因子 E2F 的结合位点, 从而受到 E2F 的转录调控^[18]. 以往对食管癌高发区河南省林州市食管癌变过程的分子变化研究发现 E2F 所属的 p53-Rb 系统发生异常比率很高, 受其转录调控的 FHIT 有可能受其影响从而不能正常转录表达, 造成表达异常. 提示我们深入研究 p53-Rb 系统与 FHIT 表达异常的关系可能将有助于揭示食管癌发展过程中的分子发病机理.

4 参考文献

- Mason MJ, Bailar JC 3rd, Eisenberg H. Geographic variation in the incidence of esophageal cancer. *J Chronic Dis* 1964;17: 667-676
- Miller RW. Cancer epidemics in the People's Republic of China. *J Natl Cancer Inst* 1978;60:1195-1203
- Cheng SJ, Sala M, Li MH, Chouroulinkov I. Esophageal cancer in Linxian county, China: a possible etiology and mechanism (initiation and promotion). *Carcinog Compr Surv* 1982;7:167-174
- Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996;84:587-597

- 5 Zimonjic DB, Druck T, Ohta M, Kastury K, Croce CM, Popescu NC, Huebner K. Positions of chromosome 3p14. 2 fragile sites (FRA3B) within the FHIT gene. *Cancer Res* 1997; 57:1166-1170
- 6 Andachi H, Yashima K, Koda M, Kawaguchi K, Kitamura A, Hosoda A, Kishimoto Y, Shiota G, Ito H, Makino M, Kaibara N, Kawasaki H, Murawaki Y. Reduced Fhit expression is associated with mismatch repair deficiency in human advanced colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2002;87:441-445
- 7 Noguchi T, Takeno S, Kimura Y, Uchida Y, Daa T, Yokoyama S, Gabbert HE, Mueller W. FHIT expression and hypermethylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2003;11: 441-447
- 8 Stec-Michalska K, Antoszczyk S, Klupinska G, Nawrot B. Loss of FHIT expression in gastric mucosa of patients with family histories of gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2005;11:17-21
- 9 Kitamura A, Yashima K, Okamoto E, Andachi H, Hosoda A, Kishimoto Y, Shiota G, Ito H, Kaibara N, Kawasaki H. Reduced Fhit expression occurs in the early stage of esophageal tumorigenesis: no correlation with p53 expression and apoptosis. *Oncology* 2001;61:205-211
- 10 Lu JB, Yang WX, Liu JM, Li YS, Qin YM. Trends in morbidity and mortality for oesophageal cancer in Linxian County, 1959-1983. *Int J Cancer* 1985;36:643-645
- 11 Liu FX, Huang XP, Zhao CX, Xu X, Han YL, Cai Y, Wu RL, Wu M, Zhan QM, Wang MR. Allelic loss and down-regulation of FHIT gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Ai Zheng* 2004;23:992-998
- 12 Liu YL, Li XM, Jin GL, Yan X, Yang JZ, Wang JL, Li YH, Wang FR, Zhang XH. HPV detection and FHIT expression in esophageal squamous carcinoma from high incidence area in Cixian County. *Ai Zheng* 2003;22:492-495
- 13 赵坡, 吕亚莉, 钟梅, 李志军. 食管癌FHIT蛋白表达丢失的临床病理研究. *肿瘤防治研究* 2002;29:463-464
- 14 Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Mori M, Croce CM. Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR-beta, RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:3724-3728
- 15 Han SY, Iliopoulos D, Druck T, Guler G, Grubbs CJ, Pereira M, Zhang Z, You M, Lubet RA, Fong LY, Huebner K. CpG methylation in the Fhit regulatory region: relation to Fhit expression in murine tumors. *Oncogene* 2004;23:3990-3998
- 16 Hussain A, Gutierrez MI, Timson G, Siraj AK, Deambrogi C, Al-Rasheed M, Gaidano G, Magrath I, Bhatia K. Frequent silencing of fragile histidine triad gene (FHIT) in Burkitt's lymphoma is associated with aberrant hypermethylation. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;41:321-329
- 17 李卫东, 王秀琴, 程贵余, 郭慧琴, 王兴元, 李伟, 张春林, 张睿, 吴旻. 脆性组氨酸三联体基因与食管癌遗传易感性的关系初探. *中华肿瘤杂志* 1998;20:258-261
- 18 Ishii H, Mimori K, Vecchione A, Sutheesophon K, Fujiwara T, Mori M, Furukawa Y. Effect of exogenous E2F-1 on the expression of common chromosome fragile site genes, FHIT and WWOX. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:1088-1093

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界胃肠病学杂志(英文版)》第二次荣获 我国期刊界的最高政府奖项—国家期刊奖百种重点期刊

本刊讯 由中华人民共和国新闻出版总署举办的第三届国家期刊奖评选结果已经揭晓, 由世界胃肠病学杂志社出版的《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊之后, 第二次获得此项殊荣。

第三届国家期刊奖颁奖大会于2005-02-28在北京举行. 中共中央宣传部、国家新闻出版总署和国家科技部有关方面负责同志出席了颁奖大会. 新闻出版总署署长暨第三届国家期刊奖评委会主任石宗源同志在颁奖大会上做了“坚持正确导向, 促进期刊繁荣”的重要讲话. 国家期刊奖是经中共中央宣传部批准, 由国家新闻出版总署于1999年开始主办的我国期刊界的最高政府奖项, 每两年评选一次, 至今已举办了三届。

第三届国家期刊奖评选活动于2004-08开始. 所有参评期刊经过评选工作办公室的参评资格、学术质量、出版规范、编校质量和广告内容审查后, 由专家组和评选工作委员会进行了认真、严格的评选, 于2004-12-21产生初评入围期刊名单, 并在《中国新闻出版报》等新闻媒体上进行了为期一个月的公示, 接受全社会的监督, 最终从推荐参评的976种期刊中评出获本届国家期刊奖百种重点期刊科技类期刊100种。

获第三届国家期刊奖百种重点期刊的期刊是我国9000余种期刊的优秀代表, 反映了我国期刊业近年来坚持正确舆论导向、促进期刊事业繁荣发展所取得的最新成果。(世界胃肠病学杂志社 2005-03-10)