

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2001.01.04

人非小细胞肺癌中FHIT 等位基因 缺失和突变的研究

周清华 陈军 覃扬 孙芝琳 刘伦旭 孙泽芳 车国卫 李璐 秦建军 宫友陵

【摘要】 目的 探讨 FHIT 等位基因缺失、突变在肺癌发生、发展中的作用。方法 应用 PCR-SSCP 和 DNA 序列分析方法对 35 例人非小细胞肺癌和 4 个肺癌细胞株中 FHIT 基因的 4 个外显子(外显子 3、4、5、8)和微卫星 D3S1300、D3S1312、D3S1313 进行研究,并以远癌肺组织和 10 例肺良性病变组织做对照。结果 在 35 例肺癌中,22 例肺癌发生了一个或两个以上的 FHIT 等位基因缺失,缺失率为 62.86%(22/35)。在鳞癌中, FHIT 等位基因缺失率(88.24%,15/17)明显高于腺癌(38.89%,7/18)($P < 0.01$);在吸烟患者中(76.19%,16/21)亦明显高于不吸烟患者(42.86%,6/14)($P < 0.05$)。而 FHIT 等位基因缺失与肺癌的细胞分化程度、P-TNM 分期、原发肿瘤大小、部位、患者性别、年龄及有无转移均无明显关系($P > 0.05$)。Lewis 肺癌、A549 细胞株亦有 FHIT 基因部分缺失。4 例肺癌组织具有微卫星灶 D3S1312 点突变,经 DNA 序列分析显示均为 D3S1312 微卫星灶基因的 87 位点密码子发生了 C→T 点突变。结论 FHIT 基因异常主要以等位基因的缺失为主,而点突变发生率较低。FHIT 等位基因缺失主要发生在肺鳞癌和吸烟患者中,且 FHIT 基因可能为烟草致肺癌的靶基因,其等位基因缺失可能是肺癌的早期分子事件。

【关键词】 肺肿瘤 FHIT 基因 杂合性缺失

【中图分类号】 R734.2;Q754

A study on the allelic deletion and mutation of FHIT gene in human non-small cell lung cancer ZHOU Qinghua, CHEN Jun, QIN Yang, SUN Zhilin, LIU Lunxu, SUN Zefang, CHE Guowei, LI Lu, Qin Jianjun, GONG Youling. Department of Thoracocardiac Surgery, The First University Hospital, West China University of Medical Sciences, Chengdu, Sichuan 610041, P. R. China

【Abstract】 Objective To explore the role of the allelic deletion and mutation of FHIT gene on the carcinogenesis and development of lung cancer. **Methods** The allelic alterations of FHIT gene and microsatellites D3S1300, D3S1312, D3S1313 were detected in 35 cancer samples of NSCLC, their corresponding normal tissues, and 4 lung cancer cell lines, and 10 lung tissues of benign pulmonary lesions as control by PCR-SSCP and DNA sequence. **Results** Loss of heterozygosity (LOH) affecting at least one locus of FHIT gene was observed in 22 out of 35 tumors, with a LOH rate of 62.86%. LOH of FHIT gene in squamous cell carcinoma (88.24%) was significantly higher than that in adenocarcinoma (38.89%) ($P < 0.01$). The LOH rate of FHIT gene in smoking patients (76.19%) was also significantly higher than that in non-smoking patients (42.86%) ($P < 0.05$). No significant relationship was found among the LOH of FHIT and cell differentiation, P-TNM stages, size of primary tumor, location of cancer and age of the patients ($P > 0.05$). LOH of FHIT was also detected in Lewis lung cancer and A549 cell lines. Mutation of microsatellite D3S1312 was observed in 4 lung cancer tissues. DNA sequence showed that C→T mutation occurred in the 87 codon of microsatellite D3S1312. **Conclusion** The alteration of FHIT gene is mainly allelic loss and the frequency of allelic mutation is rare. FHIT gene alterations preferentially occur in squamous cell carcinoma patients and smokers, and FHIT gene may be a candidate molecular target of carcinogenesis in tobacco smoker. Allelic deletion of FHIT gene might be an early molecular event in smoking-related lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms FHIT gene LOH

This work was supported by a grant from the National Natural Scientific Foundation of China (To ZHOU Qinghua) (No. 39870299) and a grant from the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (to ZHOU Qinghua) (No. 9849).

肺癌为我国发病率和死亡率增长最快的恶性肿瘤之一,而肺癌的发生与烟草是有直接关系的。最近克隆出的包含人类基因组最常见的易脆位点 FRA3B 的 FHIT 基因被认为是一个拟定的抑癌基因^[1],文献报道 FHIT 基因转录的异常与肺癌和头颈部等肿瘤有关^[2]。

本研究受国家自然科学基金(39870299)、国家教委博士点基金(9849)资助

作者单位 610041 成都,华西医科大学附属第一医院胸心外科(周清华、陈军、刘伦旭、车国卫、李璐、秦建军、宫友陵);华西医科大学生化教研室(覃扬、孙芝琳、孙泽芳)

FHIT 基因异常是将易脆位点的不稳定性与肿瘤发生联系起来的第一个分子事件,我们以前的研究已发现肺癌中存在 FHIT 基因的转录表达异常^[3]。为了进一步从 DNA 水平研究 FHIT 基因异常与肺癌发生的关系,我们应用 PCR-SSCP 方法检测了不同肺组织和人肺癌细胞株中 FHIT 基因的外显子 3、4、5、8 和微卫星 D3S1300,并分析了其与肺癌患者临床病理生理特征的关系,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 组织标本和细胞株 人肺组织标本来源于华西医科大学附属第一医院胸心外科 1999 年 4 月 ~ 1999 年 7 月间手术的患者。肺组织离体后立即放入液氮保存。共收集 35 例肺癌标本,年龄 25 ~ 80 岁,平均 59 岁 ± 4 岁。男性 28 例,女性 7 例。鳞癌 17 例(低分化 9 例,中高分化 8 例;I ~ II 期 12 例,III ~ IV 期 5 例);

腺癌 18 例(低分化 9 例,中高分化 9 例;I ~ II 期 7 例,III ~ IV 期 11 例)。其中伴有淋巴结或/和不同肺叶及远处转移者 12 例,不伴有转移者 23 例。每个肺癌病例取癌灶和远离癌灶肺组织,如有清扫下的肿大淋巴结亦收集在内。另收集 10 例肺良性病变肺组织标本,年龄 35 ~ 64 岁,平均 49 岁 ± 3 岁;男性 6 例,女性 4 例,肺结核瘤 5 例,肺炎性假瘤 5 例。所有病例均有病理学证据,病理分期采用国际抗癌联盟(UICC)1997 年修订的分期标准。A549、SPCA-1、PLA-810D 和 Lewis 肺癌株均为我室冻存细胞株。

1.2 DNA 的制备 用传统方法提取肺组织 DNA,0.8% 琼脂糖电泳鉴定,紫外分光光度仪测定 OD 值,计算出 DNA 含量。取 200 ng 作为 PCR 模板。

1.3 引物设计 共检测 5 对 FHIT 等位基因,引物序列见表 1,参照 Ohta 等方案设计,由北京赛百盛生物工程公司合成。

表 1 PCR 引物序列

Tab 1 Primer sequence

Primer pairs		Sequenc(5'-3')	Expected size(bp)	Anneal temperatur(℃)
Exon 3	F	AGGGTAATACTAGCTGCTTT	286	62
	R	TGACTTTAGCCAGTGGCA		
Exon 4	F	TTGTAACCTAGAGCCATCTGG	223	62
	R	GGATACTCACAGCAGGTCAA		
Exon 5	F	ATGGCATCCTCTCTGCAA	300	62
	R	TTCATTTGGCTGGTATAGG		
Exon 8	F	GGAGTAATTGGGCTTCAT	200	63
	R	AGGTTGATGTCATCCCAC		
D3S1300	F	ACAAAGGAACGTCATGTGGTAGG	155	62
	R	GCTGTTTATTCTTCGTGGAATGCC		
D3S1312	F	TGGGTCTCGCCTCCAATGGCG	310	62
	R	GCTGTCGAGGCCACCAGCATG		
D3S1313	F	TACTTTCCTTCAGATCCTTGG	266	56
	R	AACTAGGGGCCATGAATAAG		

1.4 PCR 扩增 PCR 反应体系为:1 × 缓冲液,1 mmol/L dNTPs,1.5 mmol/L MgCl₂,1.8 U Taq 酶和 0.4 μmol/L 的引物,加消毒 dH₂O 至 30 μl。循环参数为 94℃ 预变性 5 分钟,94℃ 变性 45 秒,62 ~ 63℃ 退火 45 秒,72℃ 延伸 1 分钟,共 30 个循环,最后一个循环在 72℃ 延伸 7 分钟。PCR 结束后取 PCR 产物 10 μl 用 2% 琼脂糖电泳鉴定,其余的于 4℃ 保存备用。

1.5 PCR 产物的 SSCP 分析 PCR-SSCP 是根据 Peng^[4]设计的高分辨率、低背景银染方法进行的。取

5 μl PCR 产物,加 3 倍体积的 SSCP 变性液(98% 甲酰胺 10 mmol/L NaOH,20 mmol/L EDTA,0.05% 溴酚兰,0.05% 二甲苯腈),95℃ 变性 5 分钟后,立即于冰浴中骤冷,再于 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(120 V,4℃ 电泳 12 ~ 16 小时)。电泳结束后进行银染。凝胶置玻璃纸内,室温干燥保存,分析结果并拍照。

1.6 点突变的 PCR 产物的克隆和测序 对 SSCP 检测到有点突变的样品,进行回收、纯化,以 PGEM[®]-T 为载体进行克隆,并通过氧化钙法转化于宿主菌 JM109

进行扩增后,提取质粒 DNA,进行序列分析。

1.7 统计学处理 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物的鉴定 图 1 所示为 FHIT 基因的 4 个外显子 PCR 产物扩增电泳图,PCR 产物大小均与理论值相符。远癌肺组织和 10 例肺良性病变组织扩增均获得成功,而肿瘤组织出现了外显子 3、4、5 和微卫星 D3S1300、D3S1312 的等位基因杂合性缺失。Lewis 肺癌和 A549 细胞株亦有 FHIT 基因缺失(图 2)。

2.2 PCR-SSCP 银染分析(图 3、4) 本组所有病例的 FHIT 基因 4 个外显子和两个微卫星灶的 PCR-SSCP 分析均未发现迁移率的改变,即没有检测到点突变。在四个外显子的单链 DNA 构象中,见外显子 3 均为三条带,有异于常规,因 DNA 为双链,经变性处理后一般单链为两条带,但外显子 3 完全缺失。有 4 例肺癌组织具有微卫星灶 D3S1312 点突变。

2.3 DNA 序列分析 对 4 例具有微卫星灶 D3S1312

点突变的样品,进行 DNA 序列分析,发现均为 D3S1312 微卫星灶基因的 87 位密码子发生了 C→T 点突变。

2.4 NSCLC 组织中 FHIT 等位基因杂合缺失情况 35 例肺癌患者,有 22 例患者的肿瘤组织存在一个或多个 FHIT 等位基因的杂合缺失,缺失率为 62.86%(22/35)。其中,微卫星 D3S1300 等位基因缺失率最高,为 40%(14/35);4 个外显子中以外显子 5 缺失最常见(20%,7/35),依次为外显子 3(11.43%,4/35)和外显子 4(8.57%,3/35),外显子 8 在本组病例中未检测到等位基因的改变。

2.5 FHIT 等位基因杂合缺失与肺癌患者临床病理和生理特征之间的关系(表 2) FHIT 等位基因杂合缺失在吸烟患者中(76.19%,16/21)明显高于不吸烟患者(42.86%,6/14)($P < 0.05$);在鳞癌中(88.24%,15/17)亦显著高于腺癌(38.89%,7/18)($P < 0.01$)。而 FHIT 等位基因的缺失与肺癌患者性别、年龄、原发肿瘤大小、部位、P-TNM 分期以及有无转移等均无明显关系($P > 0.05$)。

表 2 FHIT 等位基因缺失与肺癌患者临床和病理生理特征的关系

Tab 2 The relationship between the allelic deletion of FHIT and their clinical and pathophysiological characteristics of 35 patients with lung cancer

Characteristics	n	FHIT		Statistical significance
		Alteration (n = 22)	Normal (n = 13)	
Age(year)		59 ± 3	58 ± 2	Ns
Sex				Ns
Female	7	5	2	
Male	28	17	11	
Smoking				$P < 0.05$
Yes	21	16	5	
No	14	6	8	
Tumor size(cm)		5.2 ± 3	5.1 ± 3	Ns
Localization				Ns
Center	10	7	3	
Peripheral	25	15	10	
Histological classification				$P < 0.01$
Squamous cell carcinoma	17	15	2	
Adenocarcinoma	18	7	11	
Cell differentiation				Ns
Poor	18	11	7	
Moderate-well	17	11	6	
Stage				Ns
I - II	19	14	5	
III - IV	16	8	8	
Metastasis				Ns
With	12	6	6	
Without	23	16	7	

Ns :Not significant

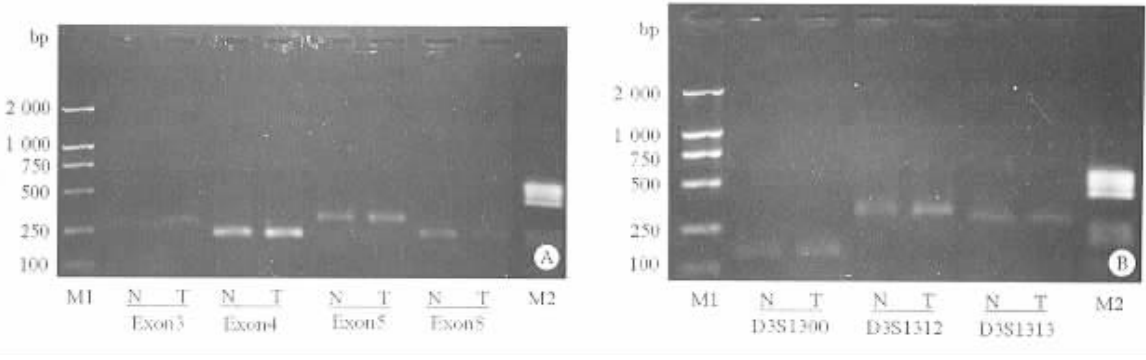


图 1 FHIT 基因外显子 3、4、5、8 和微卫星灶的 PCR 扩增产物琼脂糖电泳图

Fig 1 Agarose electrophoresis of PCR products of exon(A) 3, 4, 5, 8 and three microsatellite markers (B) of FHIT gene
M1 :DL2000 DNA marker ; M2 :PBR322/HaeIII marker ; T :Tumor ; N :Corresponding normal tissue

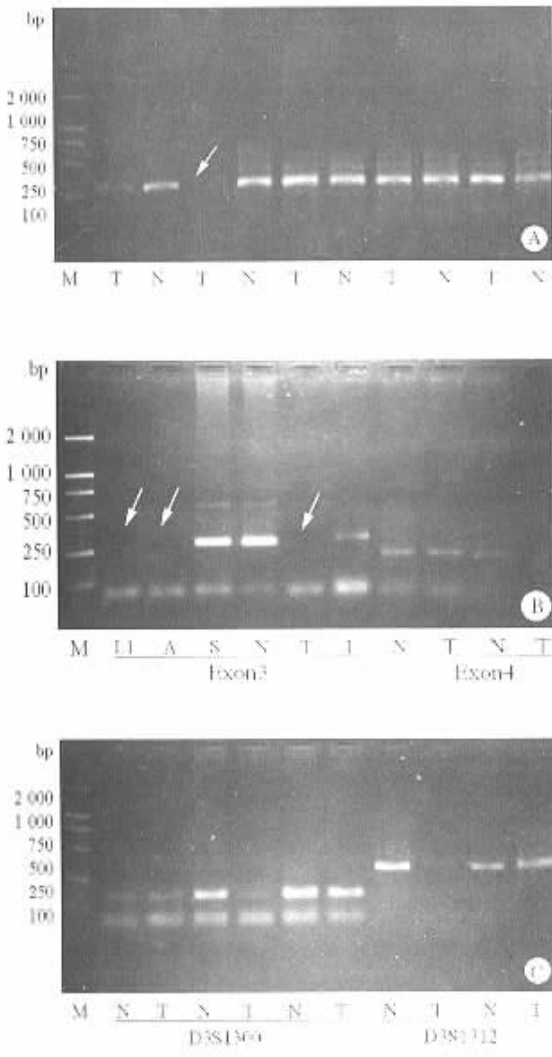


图 2 FHIT 基因外显子和微卫星灶 PCR 扩增产物缺失电泳图

Fig 2 Alterations of PCR amplified products of FHIT exon 3, 4, 5 and microsatellite marker D3S1300, D3S1312. A : Deletion of exon 3 (arrows) ; B : Deletion of exon 4 (arrows) ; C : Deletion of microsatellite marker D3S1300, D3S1312. T : Tumor ; N : Corresponding normal tissue ; L : Corresponding lymph node tissue ; M : DL2000 DNA marker ; L1 : Lewis ; A : A549 ; S : SPAC-1

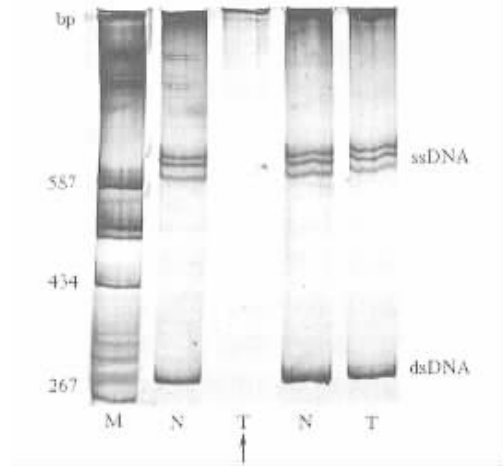


图 3 FHIT 基因外显子 3 的 SSCP 分析

Fig 3 SSCP analysis of FHIT exon 3. The arrow indicated a deletion of exon 3 of 41T. T : Tumor tissue ; N : Corresponding normal tissue ; M : PBR322/HaeIII Marker ; ssDNA : Single-stranded DNA ; dsDNA : Double-stranded DNA

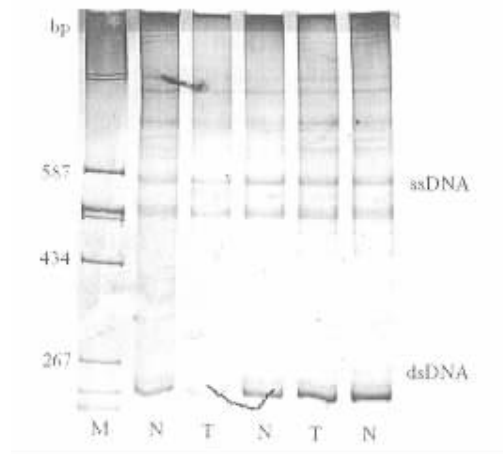


图 4 FHIT 基因外显子 4 的 SSCP 分析

Fig 4 SSCP analysis of FHIT exon 4. T : Tumor tissue ; N : Corresponding normal tissue ; M : PBR322/HaeIII Marker ; ssDNA : Single-stranded DNA ; dsDNA : Double-stranded DNA

3 讨论

肿瘤的发生与细胞的增殖及分化失常有密切关系。细胞在正常情况下受许多信息调控,处于增殖与抑制的动态平衡状态,而调控失去平衡则引起不正常增殖。癌基因和抑癌基因直接参与肿瘤的发生,它们的产物对细胞的增殖分别起着正、负调节作用。这两类基因的异常均可导致细胞癌变^[5],其中抑癌基因的作用尤为突出。抑癌基因的失活常包括一个等位基因的突变、缺失和染色体的重排。自1982年 Whang 等^[6]报道16株 SCLC 细胞株中均存在3p的部分缺失以来,一系列的研究均提示在肺癌中存在3p的缺失,且最常见的缺失区域为3p12-14、3p21和3p24-25。FHIT 基因定位于3p14.2区,目前被认为是一个拟定的抑癌基因,它的失活对肺癌的发生至关重要。

本研究应用 PCR 方法检测到35例 NSCLC 组织中有22例存在 FHIT 一个或多个等位基因的杂合缺失,缺失率为62.86%,而远癌肺组织和肺良性病变组织均无缺失,提示 NSCLC 的发生、发展与 FHIT 等位基因的缺失有密切关系。FHIT 等位基因缺失在鳞癌中显著高于腺癌,吸烟患者中高于不吸烟患者,这就进一步表明 FHIT 基因的异常主要发生在肺鳞癌和吸烟患者中,且 FHIT 基因可能是烟草致肺癌的靶基因,这一点与1997年 Sozzi 等^[7]报道吸烟患者中80%存在 FHIT 基因的一个或多个微卫星灶缺失,而不吸烟组仅有23%,以及1998年 Tomizawa 等^[8]报道在鳞癌中有86%存在 FHIT 蛋白表达降低,而腺癌仅有10%的结果是一致的。

从本研究的结果亦可可以看出, FHIT 等位基因的缺失虽与临床分期无明显关系,但在 I + II 期缺失率为73.67%,高于 III + IV 期50%,且从临床资料中可以看出, I + II 期 FHIT 等位基因异常主要表现为微卫星 D3S1300 的杂合缺失,这就提示了 FHIT 等位基因的异常可能发生在肺癌的早期,尤其是微卫星灶 D3S1300 的异常,从而表明 FHIT 等位基因缺失和微卫星灶 D3S1300 异常是肺癌的早期分子事件。

在检测的5对等位基因中,以微卫星 D3S1300 的杂合缺失率最高,4个外显子中又以外显子5的变化

为主,其次为外显子3、4。SSCP 分析未检测到 FHIT 等位基因的点突变。这可能主要与 FHIT 基因结构的特性有关,因 FHIT 基因包含位于外显子3、4之间的(3;8)易位断裂点^[9]和包括外显子5及其附近的微卫星 D3S1300 在内的人类基因组最常见的脆性部位 FRA3B^[10]。这些结构上的特性可能决定了外显子5及其附近的等位基因变化在 FHIT 基因中是最常见的,且也决定了 FHIT 基因的异常主要以等位基因的杂合缺失为主,而点突变发生率较低,这也是 FHIT 基因作为拟定抑癌基因与 p53、Rb 等基因的不同之处,后者的变化主要以等位基因的点突变为主。在本组病例中未检测到外显子8的杂合缺失,这与文献报道不完全一致,其原因还需作进一步研究。

参 考 文 献

- Ohta M, Inoue H, Coticelli MG, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma associated (3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancer. *Cell*, 1996, 84(2):587-597.
- 陈军,周清华. FHIT 基因与肺癌. *中国肺癌杂志*, 2000, 3(1):71-74.
- 陈军,周清华,王允,等. 人非小细胞肺癌中 FHIT 基因转录本异常的研究. *中国肺癌杂志*, 2000, 3(4):241-244.
- Peng H, Du M, Ji J, et al. High-resolution SSCP analysis using polyacrylamide agarose composite gel and a background-free silver staining method. *Biotechniques*, 1995, 19(3):410-414.
- Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 1991, 64(2):235-248.
- Whang Peng J, Bunn PA, Kao Shan, et al. A nonrandom chromosomal abnormality, del 3p(14-23), in human small cell lung cancer (SCLC). *Cancer Genet Cytogenet*, 1982, 6(2):119-134.
- Sozzi G, Sard L, De Gregorio L, et al. Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung cancer. *Cancer Res*, 1997, 57(11):5207-5212.
- Tomizawa Y, Nakajima T, Kohno T, et al. Clinicopathological significance of FHIT protein expression in stage I non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res*, 1998, 58(23):5478-5483.
- Cohen AJ, Li FP, Berg S, et al. Hereditary renal cell carcinoma associated with achromosomal translocation. *N Eng J Med*, 1979, 30(11):592-595.
- Glover TW, Berger C, Coyle J, et al. DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum Genet*, 1984, 67(2):136-142.

(收稿 2000-11-10 修回 2000-12-08)
(本文编辑 李蓓兰)