

# 食管鳞癌 3p14.2-14.1 上缺失区的检测

甘望农,刘复兴

## Detection of LOH on 3 p14.2-14.1 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Gan Wangnong, Liu Fuxing

Department of Pathology, College of Basic Medicine, Hubei College of Science & Technology, Xianning 437100, China

Corresponding Author: Liu Fuxing, E-mail: liufx650@126.com

**Abstract: Objective** To search for small overlap missing area on the third chromosome short arm in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) so as to provide the experimental basis for screening tumor ESCC related suppressor genes. **Methods** Microsatellite analysis method was used to detect the heterozygosity lost (LOH) of ESCC and normal tissue adjacent to the cancer. **Results** Five microsatellite markers distributing on 3 p21.1-p13 area showed high frequency change, chain analysis indicated that there was a small overlap missing area in 3 p14.2-p14.1, identified as the markers D3S2452, D3S3040 and D3S1766, encompassing approximately 283 kb long. **Conclusion** There might be some new tumor suppressor genes in 3p14.2-p14.1 area. It could be valuable to further investigation for the related genes of ESCC in the area.

**Key words:** Esophageal squamous cell carcinoma; Chromosome; Deletion; Microsatellite; Loss of Heterozygosity

**摘要:目的** 寻找食管鳞癌(ESCC)的3号染色体短臂(3p)上微小重叠缺失区,为筛选与ESCC发病相关的肿瘤抑制基因提供实验依据。**方法** 采用微卫星分析方法检测食管鳞癌及其配对的癌旁正常组织杂合性丢失情况。**结果** 食管癌中5个分布在3p21.1-p13区域的微卫星标志出现高频改变,连锁分析发现这一区域存在一个微小重叠缺失区,该区分布在3p14.2-p14.1,介于D3S2452、D3S3040和D3S1766之间,大小约283 kb。**结论** 在3p14.2-p14.1区域可能存在一些新的肿瘤抑制基因,可进一步在此区域作ESCC相关基因研究。

**关键词:** 食管鳞癌;染色体;缺失;微卫星;杂合性丢失

**中图分类号:** R73-37; R735.1 **文献标识码:** A

## 0 引言

原发性食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)存在多种遗传改变,包括癌基因(如MYC、EGF-R和Cyclin D)的扩增<sup>[1-2]</sup>和肿瘤抑制基因(如TP53、Rb及APC)<sup>[3]</sup>的丢失。肿瘤抑制基因的寻找与鉴定有助于人们对食管癌变过程中的分子事件的理解,并可成为寻找新的遗传易感性检测标志和肿瘤早期检查的基础。研究显示ESCC及其癌前病变3号染色体短臂(3p)上的多个遗传性标志常存在高频等位基因丢失<sup>[4]</sup>。3p上四个

高频丢失区可能包含潜在肿瘤抑制基因,它们横跨四个染色体区域(3p12、3p14.2、3p21.3和3p25)<sup>[5]</sup>。食管癌FHIT基因出现异常转录和等位缺失<sup>[5]</sup>。Kuroki等<sup>[6]</sup>报道,食管鳞癌中存在VHL、RAR-beta、RASSF1A和FHIT基因的等位缺失和启动子的甲基化。目前尚未在3p上鉴定出其他的与ESCC相关的肿瘤抑制基因。

为寻找新的缺失区域,以进一步筛选与ESCC相关的肿瘤抑制基因,本研究对60例食管鳞癌中5个位于3p14.2-p13上的微卫星标志的杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH)情况进行了检测。

## 1 资料与方法

### 1.1 标本来源

60例新鲜食管癌组织及其配对的癌旁组织均为术前未接受过任何化疗的手术切除标本,分别切取癌组织及癌旁正常黏膜组织后各自置于-70℃冰箱中冻存备用。所有病例临床及病理参数见表1。

收稿日期:2012-07-03;修回日期:2012-08-02

基金项目:湖北省科技厅面上项目资助课题(2006ABA331);教育厅重点资助项目(D200528005);卫生厅指导资助项目(2005Jx2c41)

作者单位:437100 湖北咸宁,湖北科技学院基础医学院病理教研室

通信作者:刘复兴, E-mail: liufx6505@126.com

作者简介:甘望农(1968-)女,本科,编辑,主要从事分子生物学及妇科肿瘤临床的研究

表 1 60 例食管鳞癌基本病理资料情况

Table 1 Basic pathological data of 60 esophageal squamous cell carcinomas

Case No	Age/gender	Stage	Grade	LNM	Case No	Age/gender	Stage	Grade	LNM	Case No	Age/gender	Stage	Grade	LNM
1	78/M	T3	G2	0/15	21	65/F	T2	G2	1/4	41	55/F	T2	G2	1/17
2	65/M	T2	G3	2/32	22	57/M	T3	G2	6/22	42	47/M	T1	G3	0/33
3	62/M	T3	G1	1/36	23	80/M	T3	G3	3/7	43	49/F	T1	G3	0/4
4	52/M	T3	G1	3/24	24	70/M	T3	G3	4/24	44	56/M	T3	G3	1/20
5	62/M	T3	G1	1/19	25	60/M	T3	G3	9/22	45	62/F	T3	G2	1/26
6	67/M	T3	G1	0/28	26	58/M	T3	G1	0/19	46	47/M	T3	G2	0/16
7	49/F	T3	G2	3/16	27	53/M	T3	G2	0/8	47	55/M	T3	G2	0/20
8	56/M	T2	G2	1/29	28	67/M	T3	G2	12/29	48	55/M	T3	G2	1/5
9	62/M	T3	G2	1/27	29	47/F	T2	G2	0/12	49	69/M	T3	G3	3/12
10	62/M	T3	G2	2/10	30	53/M	T3	G2	10/15	50	71/F	T3	G2	4/16
11	65/M	T2	G1	0/22	31	44/M	T3	G3	4/27	51	72/F	T3	G2	15/39
12	62/M	T2	G1	0/29	32	78/M	T2	G1	0/25	52	60/F	T3	G2	2/11
13	66/M	T4	G3	9/13	33	68/F	T2	G3	2/12	53	55/M	T3	G2	20/41
14	63/M	T4	G2	6/29	34	67/M	T3	G2	0/18	54	49/M	T3	G1	0/8
15	56/M	T2	G2	0/23	35	70/F	T2	G2	6/25	55	44/M	T3	G3	4/27
16	54/F	T3	G2	2/16	36	68/F	T3	G2	7/20	56	51/F	T3	G2	17/29
17	58/M	T3	G2	0/17	37	65/M	T3	G2	0/1	57	68/M	T3	G1	4/24
18	72/F	T3	G2	0/17	38	67/M	T3	G1	1/27	58	48/M	T3	G3	5/27
19	61/M	T3	G2	0/35	39	58/F	T3	G2	0/1	59	75/M	T3	G1	4/24
20	63/F	T3	G2	2/40	40	69/M	T3	G2	3/27	60	58/M	T3	G3	1/33

Notes: LNM; lymph node metastasis

### 1.2 DNA 提取

上述配对组织用溶于 1% SDS(十二烷基硫酸钠)的 50 μg/ml 蛋白酶 K 在 48℃ 消化 14 h, 酚/氯仿抽提两次。所提取的 DNA 用两倍体积的 75% 乙醇和十分之一体积的 3M 乙酸钠(pH7.0)沉淀。为确保所用 DNA 标本的完整性, 全部标本均经琼脂糖凝胶电泳分析以排除降解标本。

### 1.3 微卫星分析

5 个分布在 3p21. 1-3p13 的微卫星标志资料, 包括杂合率及 PCR 引物序列等见表 2。寡核苷酸引物序列从基因数据库(genome data base, GDB)获取。基因组 DNA 的 PCR 采用 20 μl 反应体系, 包括 40 ng DNA 模板, 2 μl 10×PCR 缓冲液(100 mM Tris-HCL, pH8.3; 500 mM KCL), 0.125 mM 三磷酸脱氧核苷酸(dNTP), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μM 引物, 0.5 μl 去甲酰胺和 1 u Taq DNA 聚合酶。PCR 反应程序为: 首先预变性 94℃ 5 min; 再进行 35 个循环, 每循环包括 94℃ 30 s; 53℃~62℃ (D3S1540) 30 s, 72℃ 30 s; 最后 72℃ 再延伸 5 min。取 2 μl PCR 产物混以等体积的上样缓冲液(98% 去甲酰胺, 20 mM EDTA, 0.05% 溴酚兰和 0.05% 二甲苯青), 95℃ 变性 10 min, 立即冰浴, 然后上样于 7% 的尿素-聚丙烯酰胺凝胶(含 64% 去甲酰胺和 7M 尿素), 60 W 恒功率电泳 1.5 h (D3S1234) 或 3.5 h (D3S1540)。冰乙酸固定后硝酸银染色观察结果。

杂合性丢失的判定: 与正常对照组织相比, 肿瘤组织如在某一位点的一个等位基因电泳条带消失或

减弱 50% 以上时读作 LOH。每一个微卫星位点的肿瘤组织杂合性丢失例数除以同一位点的信息个体例数即为该位点的杂合性丢失频率。

表 2 5 个被测微卫星标志特征

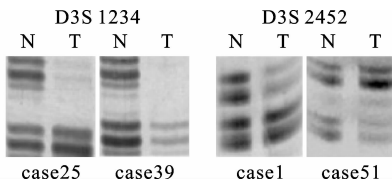
Table 2 Characteristics of 5 tested microsatellite markers

Marker	LOH(kb)	Site	Primer sequences	Het	Size (bp)
D3S2452	58674	3p14.2	GCTTGAGATAGCAGATCGT	0.643	150-166
D3S2452	58674	3p14.2	TATAAGATTAGTCAGGGCTCCG		
D3S3040	58957	3p14.2	AAGGCCTTCAGACTCAACCT	0.607	213
D3S3040	58957	3p14.2	TTAATCTGGGCTCTCCAGAG		
D3S1766	58957	3p14.2	ACCACATGAGCCAAITCTGT	0.727	208-232
D3S1766	58957	3p14.2	ACCCAATTATGGTGTGTGTTACC		
D3S1540	59502	3p14.2	CACCTTTGTACACACGCA	0.693	92-100
D3S1540	59502	3p14.2	TGTTTGGATTGGCATTCTT		
D3S1234	60082	3p14.2	CCTGTGAGACAAAGCAAGAC	0.730	99-125
D3S1234	60082	3p14.2	GACATTAGGCACAGGGCTAA		

Notes: LOH; loss of heterozygosity; Het; theoretical heterozygosity

## 2 结果

在 3p21. 1-p13 区域内所选取 5 个微卫星标志, 在 ESCC 中存在高频杂合性丢失, 该 5 个微卫星标志显示了与西方人群相应高的杂合度, 见图 1。在位点 D3S1234 杂合性丢失 (LOH) 频率最低为 57.89%, 而在 D3S2452 杂合性丢失频率最高 (77.78%)。5 个微卫星标志在 80% (49 例) 以上的癌症患者中出现 LOH。



Representative results of LOH;N:normal tissues;T:tumor tissues

图 1 PCR-变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测食管鳞癌 LOH  
Figure1 LOH of ESCC tested by PCR

本研究结果显示出一个新的重叠缺失区,它定位在 3p14.2-p14.1,由 D3S2452、D3S3040 和 D3S1766 界定,约 283 kb 大小。此区段 60 例被检标本有高达 25 例(41.67%)发生重叠的 LOH。所有 5 个位点在 57% 以上的病例出现 LOH,见表 3。

表 3 60 例食管鳞癌 3p 改变(LOH)

Table 3 Pattern of 3p alterations in 60 esophageal squamous cell carcinomas

Makers	D3S2452	D3S3040	D3S1766	D3S1540	D3S1234	Makers	D3S2452	D3S3040	D3S1766	D3S1540	D3S1234
Position (Kb)	58674	58957	58957	59502	60082	Position (Kb)	58674	58957	58957	59502	60082
1	●	●	●	×	●	33	●	×	×	●	●
2	●	●	●	×	●	34	×	●	●	●	×
3	●	●	●	×	●	35	×	○	○	○	●
4	×	×	×	○	×	36	●	○	○	●	×
5	MSI	●	●	●	●	37	×	×	×	●	●
6	×	○	○	○	○	38	●	●	●	×	×
7	●	●	●	○	×	39	-	×	×	-	●
8	○	×	×	●	○	40	○	○	○	○	×
9	●	●	●	●	●	41	●	MSI	MSI	●	×
10	○	●	●	○	×	42	MSI	×	×	MSI	MSI
11	×	×	×	×	○	43	●	●	●	●	×
12	○	○	○	○	○	44	×	●	●	-	●
13	×	×	×	○	●	45	●	×	×	-	●
14	●	×	×	●	×	46	×	●	●	-	○
15	×	×	×	●	×	47	○	○	○	-	○
16	○	○	○	●	○	48	●	○	○	-	×
17	MSI	×	×	●	○	49	●	○	○	-	●
18	●	●	●	×	×	50	MSI	○	○	-	●
19	●	●	●	●	○	51	●	●	●	●	○
20	●	●	●	●	×	52	×	×	×	●	●
21	×	×	×	●	×	53	●	×	×	●	×
22	●	●	●	●	×	54	○	×	×	○	●
23	●	●	●	×	○	55	●	●	●	●	●
24	×	×	×	×	○	56	●	○	○	●	●
25	●	●	●	○	●	57	●	○	○	×	●
26	×	●	●	●	×	58	×	●	●	×	○
27	MSI	×	×	●	MSI	59	●	●	●	-	○
28	×	×	×	●	×	60	×	×	×	×	×
29	○	×	×	○	○	tHet (%)	64.29	60.71	72.73	72.73	69.52
30	×	●	●	●	○	pHet (%)	61.02	61.67	61.67	76.47	63.33
31	●	●	●	●	●	LOH <sup>#</sup>	28/36/59	25/37/60	25/37/60	28/39/51	22/38/60
32	●	×	×	●	●	LOH(%)	77.78	67.57	67.57	71.79	57.89

Notes: ●: allelic loss; ○: allelic retention; ×: noninformative; -: data not available; MSI: microsatellite instability; tHet: theoretical heterozygosity; pHet: practical heterozygosity; # : number of cases with allelic loss/number of informative cases/total number of cases

### 3 讨论

食管癌是一系列遗传性改变积累的结果,这些改变包括一系列癌基因激活和抑癌基因的灭活,从而影响到正常细胞生长的调控并导致正常细胞转化为肿瘤细胞<sup>[6]</sup>。染色体上高频 LOH 丢失区的检测有助于发现相应区域内潜在肿瘤抑制基因或 DNA 修复基因。据报道在许多人类肿瘤包括食管鳞癌中存在 3p 的高频缺失<sup>[6-7]</sup>。为了寻找有候选肿瘤抑制基因潜在的染色体区域,我们对分布在 3p21.1-p13 区域的多个微卫星标志进行过 LOH 分析<sup>[5]</sup>。本研究继续选取该区域内 5 个微卫星标志分析 60 例 ESCC 患者 LOH 情况。结果显示所有 5 个微卫星位点均出现高频(从 57.89% 到 77.78%)杂合性丢失。表明食管鳞癌中这一区域的 LOH 是频发事件。

鉴于上述结果,我们确定 ESCC 中 3p14.2-p14.1 上存在一个新的短重叠缺失区域。该区域约 283 kb 大小,由 D3S2452、D3S3040 和 D3S1766 界定,其 LOH 峰值(77.78%)在位点 D3S2452 处。此区域内有 25 例 ESCC 出现相邻 8 个标志的重叠缺失,每一标志至少 57% 的肿瘤显示 LOH。肿瘤抑制基因 FHIT 定位于这一缺失区内,距 D3S2452 位点端粒侧 1.039 Mb 处。我们以前报道过 75% 的食管鳞癌中存在 FHIT 基因 mRNA 表达下调,且常伴有其侧旁微卫星标志的 LOH<sup>[5]</sup>。此区域还有 FAM3D(定位在 D3S2452 中心粒侧 46.2 kb 处)和 ADAMTS9(位于 D3S2452 和 D3S3644 之间)等基因。FAM3D 是细胞分裂素样基因家族的成员,在胎盘组织中高表达<sup>[8-9]</sup>。ADAMTS9 基因是 ADAM-TS/metallospodin 基因家族成员之一,其产物是一个分解素样和带 1 型血栓素基因 9 的金属蛋白酶(disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9)<sup>[10-13]</sup>。FAM3D 和 ADAMTS9 是否是食管癌变过程中相关的候选肿瘤抑制基因、这一重叠缺失区是否存在其他尚未确定的肿瘤抑制基因值得进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Lu SH, Hsieh LL, Luo FC, et al. Amplification of the EGF receptor and c-myc genes in human esophageal cancers[J]. *Int J*

*Cancer*, 1998, 42(4):502-5.

- [2] Mandard AM, Hainaut P, Hollstein M. Genetic steps in development of squamous cell carcinoma of the esophagus[J]. *Mutat Res*, 2000, 462(2-3):335-42.
- [3] Liu FX, Huang XP, Xu X, et al. Alterations of MLH1 and microsatellite instability in esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Yi Chuan Xue Bao*, 2005, 32(3):234-42.
- [4] Wei F, Ni J, Wu SS, et al. Cytogenetic studies of esophageal squamous cell carcinomas in northern Chinese population by comparative genomic hybridization[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2002, 138(1):38-43.
- [5] Liu FX, Huang XP, Zhao CX, et al. Allelic loss and down-regulation of FHIT gene expression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Ai Zheng*, 2004, 23(9):992-8. [刘复兴, 黄晓平, 赵春霞, 等. 食管鳞癌 FHIT 基因等位缺失及其表达下调[J]. *癌症*, 2004, 23(9):992-8.]
- [6] Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, et al. Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR-beta, RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(13):3724-8.
- [7] Zhang CT, Lu R, Lin YL, et al. The significance of fragile histidine triad protein as a molecular prognostic marker of bladder urothelial carcinoma[J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(2):507-16.
- [8] Shimada M, Miyagawa T, Kawashima M, et al. An approach based on a genome-wide association study reveals candidate loci for narcolepsy[J]. *Hum Genet*, 2010, 128(4):433-41.
- [9] Guo J, Cheng H, Zhao S, et al. GG; a domain involved in phage LTF apparatus and implicated in human MEB and non-syndromic hearing loss diseases[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(2):581-4.
- [10] Prasad SS, Russell M, Nowakowska M, et al. Gene expression analysis to identify molecular correlates of pre- and post-conditioning derived neuroprotection[J]. *J Mol Neurosci*, 2012, 47(2):322-39.
- [11] Yoshina S, Sakaki K, Yonezumi-Hayashi A, et al. Identification of a novel ADAMTS9/GON-1 function for protein transport from the ER to the Golgi[J]. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(9):1728-41.
- [12] Cooke JN, Ng MC, Palmer ND, et al. Genetic risk assessment of type 2 diabetes-associated polymorphisms in African Americans[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(2):287-92.
- [13] Bret C, Hose D, Reme T, et al. Gene expression profile of ADAMs and ADAMTSs metalloproteinases in normal and malignant plasma cells and in the bone marrow environment[J]. *Exp Hematol*, 2011, 39(5):546-57.

[编辑:周永红;校对:杨 卉]