

· 论 著 ·

胃癌染色体 7q31.1 杂合性缺失的精细作图及其相关基因探讨*

唐运莲, 苏琦, 程爱兰, 王丽江, 张杨, 胡果宇, 甘润良[△]

(南华大学肿瘤研究所, 湖南衡阳 421001)

摘要:目的 显微切割胃癌细胞检测染色体 7q31.1 区域的杂合性缺失(LOH), 绘制胃癌 7q31.1 区域等位基因缺失图谱, 确定其常见最小缺失区域, 揭示胃癌细胞的分子遗传学改变, 分析 7q31.1 杂合性缺失与胃癌临床病理特征的关系。方法 在胃癌组织石蜡切片上行显微切割获得胃癌细胞。采用 Chelex-100 方法分别抽提切割的胃癌细胞和相应正常对照细胞的 DNA。利用高密度微卫星标志结合 PCR 技术, 检测胃癌染色体 7q31.1 杂合性缺失, 绘制胃癌染色体 7q31.1 等位基因的缺失图谱, 确定其常见最小缺失区域。结果 胃癌染色体 7q31.1 至少有一个位点存在杂合性缺失者 21 例, 占 70.0% (21/30); D7S2459、D7S523、D7S2502、D7S486、D7S480、D7S650、D7S2486 各位点杂合性缺失频率分别为 10.0%、6.7%、23.3%、43.3%、26.7%、26.7%、20.0%; 缺失图谱分析显示常见最小缺失区域位于 D7S2502~D7S480 之间。统计学分析表明这一区带微卫星位点的等位基因缺失阳性率与患者年龄、性别、原发灶位置、病理分期、分化程度以及淋巴结转移不相关 ($P>0.05$)。结论 胃癌染色体 7q31.1 常见最小缺失区域在 D7S2502~D7S480 之间, 在 D7S486 附近可能存在与胃癌相关的抑癌基因。

关键词: 胃癌; 显微切割; 染色体 7q31.1; 杂合性缺失; 微卫星标志

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.002

中图分类号: R735.2; R730.23

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)20-2700-04

Refined mapping of the loss of heterozygosity on chromosome 7q31.1 and identification of candidate genes in gastric cancer*

TANG Yun-lian, SU Qi, CHENG Ai-lan, et al.

(Cancer Research Institute, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective Through analyzing loss of heterozygosity(LOH) on chromosome 7q31.1 in human gastric carcinoma with microdissection, to construct allelic loss mappings and define the minimally lost regions(MLR) on chromosome 7q31.1, further explore the molecular genetics alteration during the malignant progression of human gastric mucosa and to analyze the relationships between LOH of chromosome 7q31.1 and clinicopathological parameters. **Methods** The gastric cancer cells were microdissected from paraffin sections. Sufficient and qualified DNA of microdissected cells and corresponding paired normal tissues were extracted by Chelex-100 method. Seven high dense microsatellite markers were used, combined with polymerase chain reaction(PCR), to detect the frequencies of LOH of every selected microsatellite site on chromosome 7q31.1 in gastric carcinoma, then to map detailed allelic losses and define the minimally lost regions on chromosome 7q31.1. **Results** Frequency of LOH on chromosome 7q31.1 in gastric carcinoma tissues achieved 70.0% (21/30); seven microsatellite markers' frequencies of LOH were D7S2459 10.0%, D7S523 6.7%, D7S2502 23.3%, D7S486 43.3%, D7S480 26.7%, D7S650 26.7%, D7S2486 20.0% respectively. Through analyzing allelic loss mapping on chromosome 7q31.1, we had found that the MLR was between D7S2502 and D7S480. However there was no statistically significant correlation between the LOH at these loci and the clinical parameters such as age, sex, early or advanced stage, differentiation degree, primary position of gastric carcinomas, and lymphnode metastasis respectively ($P>0.05$). **Conclusion** The MLR on chromosome 7q31.1 in gastric carcinoma is at the region from D7S2502 to D7S480, which suggest that the region probably harbors a candidate tumor suppressor gene associated with human gastric carcinoma.

Key words: gastric cancer; microdissection; chromosome 7q31.1; loss of heterozygosity; microsatellite marker

肿瘤的发生、发展与染色体基因的改变有密切的关系, 高频杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)是人类恶性肿瘤的发生和发展密切相关的抑癌基因(TSG)存在的标志, 而 LOH 是导致 TSG 失活的重要机制之一^[1-2]。近年来, 染色体 7q LOH 越来越受到研究者的关注, 发现 7q31.1 区域 LOH 在多种人类肿瘤, 如卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌等中频繁出现^[3-5], 提示该区域可能存在与人类肿瘤发生、发展相关的 TSG。本课题选择覆盖染色体 7q31.1 上的 7 个高密度微卫星位点, 并

结合 PCR 技术, 检测胃癌染色体 7q31.1 区域的 LOH, 进一步研究胃癌的分子遗传学改变。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 胃癌配对标本 标本来自南华大学附属第一医院, 收集 2002 年 1 月至 2003 年 12 月的胃癌及相应配对的正常胃黏膜石蜡包埋标本 30 例。所有胃癌病例均经病理学检查确

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772116); 湖南省重点学科建设资助项目(2006-180); 湖南省教育厅课题资助项目(09C833); 南华大学博士启动基金资助项目(2007XQD25)。 [△] 通讯作者, 电话: 0734-8282923; E-mail: gan998@yahoo.com。

表 1 7q31.1 区域微卫星位点引物序列

位点	CA 链引物	GT 链引物	片段大小(bp)	杂合度
D7S2459	aagaagtgcattgagactcc	ccgccttagtaaaaccc	140~152	0.76
D7S523	ctgattcatagcaacttg	aaaacatttcattaccactg	224~240	0.79
D7S2502	ccagtggttttagtcattgttttg	catgtatgctcatggttgga	247~263	0.79
D7S486	aaaggccaatggatataccc	gcccagggtgattgatagtc	133~146	0.80
D7S480	cttggggactgaaccatctt	agctaccatagggctggagg	189~206	0.86
D7S650	aggctgcttagccaatac	ccactggataagtacatcagaaa	265~289	0.84
D7S2486	ttctcatggaacagcctg	aatactggnaagataaactgaat	196~236	0.90

诊。胃窦部 12 例,胃体部 14 例,胃底或贲门部 4 例;高分化腺癌 5 例,低分化腺癌 15 例,黏液癌 6 例,印戒细胞癌 4 例;早期胃癌 2 例,进展期胃癌 28 例;有淋巴结转移 11 例,无淋巴结转移 19 例。胃癌患者中,男 21 例,女 9 例,<50 岁 10 例,≥50 岁 20 例,平均年龄 51.6 岁。

1.1.2 试剂 蛋白酶 K 购于 Merck 公司(上海生物工程);Chelex-100 购于 Bio-Rad Laboratory。

1.1.3 引物 选择设计在 7q31.1 区域的微卫星多态性位点引物 7 对,共覆盖染色体 7q 区域的遗传距离为 9.3 cm。引物由大连宝生物工程公司合成(表 1)。

1.2 实验方法

1.2.1 石蜡切片预处理 将石蜡标本做成 10 μm×10 的连续切片。为避免交叉污染,切不同病例的蜡块时,用二甲苯擦洗刀片两遍。第 1 张与最后 1 张行 HE 染色作为对照片,中间其余切片经常规切片脱蜡后,快速伊红染色,室温晾干备用。

1.2.2 显微切割 参照对照片,用 Olympus 光学显微镜,在 10 倍物镜下持自制好的切割工具在癌细胞巢、不典型增生病灶周围刻化、切挖直至其与周围组织分离^[6]。再将“细针”的尖端蘸一下中性树胶,使其具有黏性,然后将该“细针”渐渐接近被切割的细胞,小心让其表面的胶与被切割的细胞接触,一旦二者接触即抽回“细针”,针尖端黏取的细胞就随之与载玻片分离,紧接着将其移入洁净的 1.5 mL EP 管中,用于 DNA 提取。

1.2.3 DNA 提取 EP 管中,切割下来的细胞经二甲苯脱蜡 2 次,每次 30 min,经无水乙醇然后水化 2 次,每次 30 min。采用 Chelex-100 法 7~8 抽提石蜡组织 DNA,测定 OD 值大于 1.60 符合实验要求。用 200 μL 的 5% Chelex 提取液[5% Chelex、0.2% SDS、10 mM Tris(pH 8.0)、0.5 mM EDTA (pH 8.0)]悬浮沉淀,加入 5 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K 消化,55 °C 水浴振荡至溶液变澄清。98 °C 加热 10 min,离心取上清液,4 °C 储存备用。

1.2.4 胃癌染色体 7q31.1 等位基因 LOH 检测和分析

1.2.4.1 微卫星位点 PCR 扩增 PCR 反应体系为 25 μL,10 × PCR 反应缓冲液 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL,10 mmol/L dNTP 0.5 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL,模板 2 μL,5 μnit/μL Taq 聚合酶 0.25 μL,余下由灭菌去离子水补足。反应参数为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 1 min,54~60.5 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。5% Chelex 提取液作空白对照,新鲜胃癌组织提取 DNA 作阳性对照。

1.2.4.2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 配制 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶(40% 聚丙烯酰胺母液 20 mL,尿素 48 g,5×TBE 20

mL,加水至 100 mL),每次取 10 mL,再加入 10% 过硫酸铵 50 μL,TEMED 5 μL,立即灌胶,1 h 左右自然凝固,固定在垂直电泳槽上,冲洗清除加样孔中凝胶碎胶,电泳液 1×TBE,120 V,预电泳 15 min。取 PCR 产物 10 μL 加 2×甲酰胺上样缓冲液 5 μL,99 °C 变性 6 min,冰水骤冷,上样。电泳条件:120 V 恒压,室温下电泳 2 h。

1.2.4.3 硝酸银染色 电泳完毕,取下聚丙烯酰胺凝胶用蒸馏水漂洗干净 → 10% 乙醇固定 5 min → 1% 硝酸氧化 5 min → 0.012 mol/L AgNO₃ 染色 30 min → 0.28 mol/L Na₂CO₃ (含 0.019% 甲醛)显色 → 10% 冰乙酸终止 2 min → 清水浸泡,照相。

1.2.4.4 LOH 的判断 正常组织的等位基因 PCR 扩增产物为杂合子时,可提供信息进行 LOH 分析,肿瘤或癌前病变组织的一对等位基因 PCR 扩增产物缺少 1 条或其中 1 条的相对密度经凝胶图像分析系统测定减少 50% 者认为是 LOH。所有阳性和可疑病例重复实验 3 次。

1.3 统计学方法 SPSS10.0 统计软件进行分析。用四格表确切概率法判断等位基因缺失与肿瘤及癌前病变各临床病理特征的相关性,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 胃癌染色体 7q31.1 上 7 个微卫星位点 PCR 扩增和 LOH 结果 用显微切割的方法从石蜡切片中挑取胃癌细胞行染色体 LOH 的分析,微卫星位点 PCR 扩增产物均经 1.0% 琼脂糖电泳检测(图 1)。各位点 PCR 扩增产物行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色检测 LOH,肿瘤组织的一对等位基因 PCR 扩增产物缺少 1 条或其中 1 条的相对密度经凝胶图像分析系统测定减少 50%,证明是 LOH(彩插 I 图 2)。

2.2 胃癌染色体 7q31.1 LOH 频率与分布图谱 结果显示,30 例胃癌病例中 21 例至少 1 个位点存在等位基因的缺失(70.0%)。各位点的等位基因缺失频率分别为: D7S2459 10.0%(3/30),D7S523 6.7%(2/30),D7S2502 23.3%(7/30),D7S486 43.3%(13/30),D7S480 26.7%(8/30),D7S650 26.7%(8/30),D7S2486 20.0%(6/30),其中缺失频率最高的微卫星位点是 D7S486。21 例 LOH 中,病例 3、7、8、10、13、17、19、20、22、27、29 等 11 例表现为连续性片段缺失,其中病例 3 在检测的 7 个位点中有 6 个位点存在缺失。病例 3、8、19、22、29 在 D7S2502 和 D7S486 两个相邻位点同时存在 LOH,说明这两个位点为这些病例的共同缺失区域。病例 3、7、10、13、22、27 在 D7S486 和 D7S480 两个相邻位点同时存在缺失,表明这两个位点则是这些病例的共同缺失区域。值得注意的是,病例 3、22 在位点 D7S2502、D7S486 和 D7S480 等 3 个相邻的位

点均表现为连续性片段缺失(图 3)。根据这 3 个位点都具有较高频率的等位基因缺失,推测胃癌染色体 7q31.1 区域附近常见最小缺失区域位于 D7S2502~D7S480 之间,大约 3.4 cm 遗传距离(图 4)。

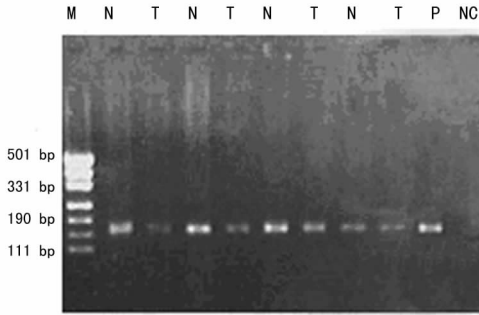
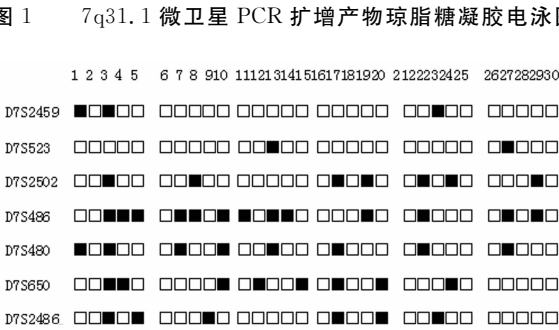


图 1 7q31.1 微卫星 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图



■:代表 LOH;□:代表无 LOH。

图 3 胃癌染色体 7q31.1 等位基因缺失图谱

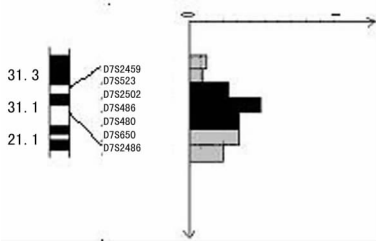


图 4 染色体 7q31.1 区域核型图和各位点 LOH 频率

表 2 不同年龄、性别胃癌患者 7q31.1 区域 LOH 的比较

年龄与性别	n	LOH (+)	LOH (-)	P
年龄				
<50	10	8	2	0.344
≥50	20	13	7	
性别				
男	21	17	4	0.061
女	9	4	5	

2.3 胃癌染色体 7q31.1 LOH 与患者年龄、性别的相关性

30 例胃癌患者中,两年龄组 7q31.1 LOH 阳性率差异无统计学意义(P>0.05)。虽然男性阳性率较女性高,但差异无统计学意义(P>0.05),见表 2。

2.4 胃癌 7q31.1 LOH 与部位、分化程度、病理分期及转移的关系 见表 3。

表 3 胃癌 7q31.1 区域 LOH 与部位、分化程度、病理分期和转移的关系

临床病理特征	n	LOH(+)	LOH(-)	P
部位				
胃窦	12	8	4	0.299~0.489*
胃体	14	11	3	0.528#
胃底	4	2	2	
分化程度				
高分化	5	3	2	0.662*
低分化	15	11	4	
粘液癌	6	5	1	
印戒细胞癌	4	2	2	
病理分期				
早期	2	1	1	0.517*
进展期	28	20	8	
淋巴结转移				
有	11	10	1	0.065*
无	19	11	8	

*:四格表确切概率法;#:胃窦与胃体、胃底/贲门比较。

3 讨 论

现已证明,绝大多数人类肿瘤都存在非随机的染色体片段缺失,通过分析染色体某区域的微卫星位点 LOH 图谱,确定其常见最小缺失区域,用所获得的资料作为定位克隆的线索,进而获得目的基因的策略是一项较为成熟的 TSG 克隆和分析方法,利用该技术策略已成功分离到 APC、p53、Rb、DCC 等 TSG。这些 TSG 活化与胃癌的发生、发展有关[7-9]。

在本研究中,分析了 30 例胃癌标本在 7q31.1 区域的等位基因缺失情况,发现至少有一个位点有 LOH 者占 70.0%,常见最小缺失区域位于 D7S2502~D7S480 之间,本实验结果显示胃癌组织 LOH 频率最高的位点是 D7S486 (43.3%, 13/30)。经分析认为染色体 7q31.1 区域还存在一个与胃癌密切相关的 TSG,定位于位点 D7S486,它与位于位点 D7S522 的肿瘤抑制基因 caveolin-1[10-12]可能不是同一基因。这个结论与 Zenklusen[13]的研究结果相符,认为染色体 7q31.1 区域存在阿非迪霉素诱导的脆性位点 Fra7G,定位于该位点的基因就是与多种上皮来源的肿瘤相关的 TSG,其最小共同缺失区域大约 1.5 Mb 大小,并且界定于微卫星位点 D7S486 和 D7S655 之间,所以有理由推测位点 D7S486 上存在一个与胃癌相关的 TSG[13]。这为寻找可能存在的 TSG 奠定了基础。

肿瘤的发生、发展是多基因和多步骤异常改变的结果。同一肿瘤的发生、发展可以有不同的遗传学改变;而同一遗传学改变亦可以对不同肿瘤的发生、发展起作用,其作用的重要性可以有所不同。在以往的研究中,发现原发性胃癌的发生、发展涉及众多染色体的增加或缺失。而随着人类基因组信息的不断获得,染色体 7q,尤其是 7q31.1 区域已经成为众多类型肿瘤,包括头颈鳞癌、结肠癌、前列腺癌、乳腺癌、肾癌、胰腺癌、胃癌等研究 LOH 的热点[14]。

将胃癌染色体 7q31.1 LOH 结果与患者各临床病理特征进行统计学分析,表明 7q31.1 LOH 与患者年龄、性别、肿瘤原发灶部位、肿瘤细胞分化程度、肿瘤临床分期和淋巴结转移没有显著相关性(P>0.05),这与李锦添等[15]的报道不一致,可

能因为样本数太少;其中,LOH 与 4 种病理类型均无关,提示存在于位点 D7S486 上的 TSG 可能是一作用非常广谱的胃癌相关 TSG,与胃癌各种组织类型的发生均有关联。

参考文献:

[1] 于颖彦,计骏,陆云,等. 胃癌 5 号染色体短臂杂合性缺失的精细作图及其相关基因探讨[J]. 中华肿瘤杂志,2006,28(2):84.

[2] 郭涛,孙敬武. 喉癌前病变及喉鳞状细胞癌微卫星杂合性缺失的变化及其意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2007,21(18):831.

[3] Zenklusen JC, Weitzel JN, Ball HG, et al. Allelic loss at 7q31.1 in human primary ovarian carcinomas suggests the existence of a tumor suppressor gene[J]. *Oncogene*, 1995,11(2):359.

[4] Achille A, Biasi MO, Zamboni G, et al. Chromosome 7q allelic losses in pancreatic carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1996,56(16):3808.

[5] Kawana Y, Ichikawa T, Suzuki H, et al. Loss of heterozygosity at 7q31.1 and 12p13-12 in advanced prostate cancer[J]. *Prostate*, 2002,53(1):60.

[6] 王丽江,甘润良,黄幼生,等. 应用自制显微切割工具切割石蜡组织行 PCR-银染[J]. 诊断病理学杂志,2004,11(5):360.

[7] Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue[J]. *Nucleic Acids Res*, 1999,27(16):12.

[8] 王丽江,甘润良,唐运莲,等. 石蜡组织提取 DNA 四种方法的比较[J]. 诊断病理学杂志,2004,11(1):57.

[9] 房殿春. 重视胃癌基因不稳定的研究[J]. 重庆医学,2003,32(9):1121.

[10] 葛相栓,吴正祥. 抑癌基因 PTEN 在肿瘤发生发展中的作用[J]. 安徽医药,2007,11(11):963.

[11] Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers[J]. *FEBS Lett*, 1998,436(3):403.

[12] Shatz M, Liscovitch M. Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer[J]. *Int J Radiat Biol*, 2008,84(3):177.

[13] Zenklusen JC, Hodges LC, LaCava M, et al. Definitive functional evidence for a tumor suppressor gene on human chromosome 7q31.1 neighboring the Fra7G site[J]. *Oncogene*, 2000,19(13):1729.

[14] Weng DS, Li JT, Mai SJ, 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.

[15] 李锦添,买世娟,冯炳健,等. 胃癌 7 号染色体杂合性缺失[J]. 中国肿瘤临床,2004,31(1):4.

(收稿日期:2010-05-29 修回日期:2010-06-30)

(上接第 2699 页)

[3] 覃玉桃,王仁生. Fas/FasL 系统与肿瘤免疫逃逸[J]. 广西医学,2002,24(5):663.

[4] Kusuha M, Matsue K, Edelbaum D, et al. Killing of naive T cells by CD95L-transfected dendritic cells; in vivo study using killer DC-DC hybrids and CD4⁺ T cells from D011.10 mice[J]. *Eur J Immunol*, 2002,32(4):1035.

[5] Matsue H, Matsue K, Walters M, et al. Induction of antigen-specific immunosuppression by CD95L cDNA-transfected 'killer' dendritic cells[J]. *Nat Med*, 1999,5(8):930.

[6] 刘安民,钟志光,邓跃飞,等. Fas 系统在星形细胞瘤的表达及其与细胞凋亡的关系[J]. 广东医学,2000,21(9):735.

[7] Min WP, Gorczynski R, Huang XY, et al. Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival[J]. *J Immunol*, 2000,164(1):161.

[8] Chuang YH, Suen JL, Chiang BL. Fas-ligand-expressing adenovirus-transfected dendritic cells decrease allergen-specific T cells and airway inflammation in a murine mod-

el of asthma[J]. *J Mol Med*, 2006,84(7):595.

[9] 林霞,邢英梅. 变应原皮试在哮喘诊断中的应用[J]. 海南医学,2003,14(4):19.

[10] Jacquet A, Magi M, Haumont M, et al. Absence of immunoglobulin E synthesis and airway eosinophilia by vaccination with plasmid DNA encoding ProDer p1[J]. *Clin Exp Allergy*, 2003,33:218.

[11] Li GP, Liu ZG, Qiu J, et al. DNA vaccine encoding Der p2 allergen generates immunologic protection in recombinant Der p2 allergen-induced allergic airway inflammation mice model[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2005,118(7):534.

[12] 晏霆,朱满洲. 基因治疗与基因载体[J]. 安徽医药,2002,6(4):72.

[13] 李朵璐,阚全程,余祖江. 丙型肝炎病毒 IRES 基因 T 载体克隆及序列分析[J]. 医药论坛杂志,2009,30(23):4.

[14] M'hadheb-Gharbi MB, Kean KM, Gharbi J. Molecular analysis of the role of IRES stem-loop V in replicative capacities and translation efficiencies of Cocksackievirus B3 mutants[J]. *Mol Biol Rep*, 2009,36(2):255.

(收稿日期:2010-02-16 修回日期:2010-03-25)