

· 论 著 ·

FHIT 基因的 MSI、LOH 及甲基化修饰与胃癌关系的研究*

胡宏波¹, 贾安平², 刘振鹏², 郑玲¹, 梁秀兰², 冯金¹, 詹前美¹

(广西壮族自治区柳州市柳铁中心医院:1. 检验科;2. 消化内科, 广西柳州 545007)

摘要:目的 检测胃癌脆性组氨酸三联体(FHIT)基因的微卫星不稳定(MSI)、杂合性缺失(LOH)以及甲基化状态,探讨 FHIT 基因在胃癌发生、发展中的作用。方法 采用 D3S1300 作为微卫星标记,应用聚合酶链反应(PCR)以及非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)检测胃癌组织和正常胃黏膜 FHIT 基因 MSI 和 LOH;应用甲基化特异性 PCR(MSP)检测胃癌组织和正常胃黏膜 FHIT 基因的甲基化状态。结果 胃癌组织中 FHIT 基因 D3S1300 位点 MSI 和 LOH 发生率分别为 23.7% 和 28.8%,MSI 和 LOH 存在明显正相关($P < 0.05$, $r = 0.76$);胃癌组织中 FHIT 基因甲基化阳性率为 51.4%,FHIT 基因 MSI、LOH 与甲基化均与胃癌患者的年龄、性别、Lauren 分型、Borrmann 分型、淋巴结转移以及 TNM 分期无关($P > 0.05$),但 LOH 与浸润程度有关($P < 0.05$),胃癌 FHIT 基因甲基化与 MSI 和 LOH 均不存在明显正相关($P > 0.05$, $r = 0.12$ 和 0.13)。结论 FHIT 基因 MSI、LOH 及甲基化修饰在胃癌发生、发展中均起重要作用。

关键词:胃癌;脆性组氨酸三联体基因;微卫星不稳定;杂合性缺失;甲基化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.17.008

中图分类号:R735.2;R730.231

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)17-2258-04

Study on microsatellite instability, LOHs of heterozygosity and methylation of FHIT gene in gastric cancer*

HU Hong-bo¹, JIA An-ping², LIU Zhen-peng², et al.

(1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Gastroenterology, Central Hospital of Liuzhou Railroad, Liuzhou 545007, China)

Abstract: Objective To investigate microsatellite instabilities (MSI), LOHs of heterozygosity (LOH) and aberrant methylation of fragile histidine triad (FHIT) gene and to elucidate the role of FHIT gene on tumorigenesis and progression of gastric carcinoma (GC). **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify microsatellite loci D3S1300 in matched normal and cancer tissues from 74 patients with primary GC. MSI and LOH were analyzed by native polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE). Methylation of FHIT gene was detected with methylation specific PCR (MSP). **Results** The incidences of MSI and LOH were 23.7% and 28.8% respectively, at FHIT gene D3S1300 locus. There was positive correlation between LOH and MSI ($P < 0.05$, $r = 0.76$). Methylation analysis showed hypermethylation of FHIT gene in 51.4% cancer tissues. MSI, LOH and methylation expression of FHIT gene in GC were irrelevant to age and gender of patients and Lauren's classification, Borrmann's classification, lymphatic metastasis and TNM staging of tumor ($P > 0.05$), but LOH was cLOHely related to the depth of tumor invasion ($P < 0.05$). There was not positive correlation between methylation and the former two, namely MSI and LOH ($P > 0.05$, $r = 0.12$ and 0.13 , respectively). **Conclusion** MSI, LOH and methylation of FHIT gene may play critical roles in the pathogenesis and progression of GC.

Key words: gastric carcinoma; fragile histidine triad gene; MSI; LOH; methylation

脆性组氨酸三联体(fragile histidine triad, FHIT)基因是抑癌基因,位于人类染色体 3p14.2 上,其 cDNA 由 10 个外显子组成,外显子 5~9 组成一长约 500 bp 的开放性阅读框,编码一个由 147 个氨基酸组成的相对分子质量为 16.8 kd 的蛋白质。该基因表达蛋白参与一系列的细胞进程,包括对细胞周期调控、细胞凋亡和微管活动的调节以及二腺苷三磷酸(AP3A)的水解等^[1]。该基因内含 FRA3B 脆性位点,易断裂,断裂后使该基因失活,引起细胞异常增生,最终导致肿瘤的发生。本研究对胃癌 FHIT 基因遗传学和表观遗传学的改变进行检测,探讨 FHIT 基因的正常改变在胃癌的发生和发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2006 年 1 月至 2009 年 10 月本院内镜中心胃镜检查并经病理证实为胃癌的患者 74 例,男 46 例,女 28 例,

年龄 36~87 岁,平均 58.5 岁;所有患者均取病变组织和正常胃黏膜组织各一份,样本离体后 30 min 内均迅速放置于 -80 °C 冰箱中。临床病理学分期采用国际抗癌联盟 1997 修订的 TNM 分期标准,其中 I 期 19 例,II 期 13 例,III 期 22 例,IV 期 20 例。Lauren 分型:肠型 28 例,弥漫型 33 例,混合型 13 例。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 参照大连 TaKaRa 公司试剂盒说明书进行,提取产物用美国 Bio-Rad 公司 SmartSpec plus 核酸测定仪检测 DNA 的浓度和纯度,如 OD260/OD280 在 1.6~1.8 则置于 -20 °C 的冰箱备用。

1.2.2 FHIT 基因微卫星不稳定(MSI)和杂合性缺失(LOH)分析 利用聚合酶链反应(PCR)扩增微卫星标记 D3S1300, D3S1300 引物和扩增参数见表 1。PCR 反应体系的构成: Taq 酶 0.5 μL,模板 DNA 2.5 ng,上游引物(20 μmol/L) 1 μL,下

* 基金项目:广西壮族自治区卫生厅科研基金资助项目(Z2008335, Z2009225)。

表 1 FHIT 基因引物和扩增参数

引物名称	引物序列	退火温度(℃)	产物长度(bp)
D3S1300	5'- AGCTCACATTCTAGTCAGCCT-3', 5'- GCCAATTCCCCAGATG -3'	58	217~241
FHIT-M	5'-TTGGGGCGCGGGTTTGGGTTTTTACGC-3', 5'- CGTAAACGACGCCGACCCCACTA -3'	64	74
FHIT-U	5'-TTGGGGTGTGGGTTTGGGTTTTTATG-3', 5'-CATAAACAACACCAACCCCACTA-3'	64	74

表 2 FHIT 基因 MSI 和 LOH 及甲基化修饰与胃癌临床指标的关系

临床指标	n	MSI 和 LOH 分析				甲基化分析		
		信息个体数	MSI[n(%)]	P	LOH[n(%)]	P	阳性个体[n(%)]	P
性别								
男	46	36	9(25.0)	0.77	11(30.6)	0.71	25(54.3)	0.51
女	28	23	5(27.1)		6(26.1)		13(46.4)	
年龄(岁)								
≥45	52	40	8(20.0)	0.33	12(30.0)	0.77	26(50.0)	0.72
<45	22	19	6(31.6)		5(26.3)		12(54.5)	
Lauren 分型								
肠型	28	21	6(28.6)	0.60	7(33.3)	0.81	15(53.6)	0.59
弥漫型	33	28	5(17.9)		7(25.0)		15(45.5)	
混合型	13	10	3(30.0)		3(30.0)		8(61.5)	
Borrmann 分型								
I + II	25	18	5(27.8)	0.91	7(38.9)	0.26	13(52.0)	0.94
III + IV	49	41	12(29.3)		10(24.4)		25(51.0)	
浸润程度								
T1+T2	47	38	7(18.4)	0.20	6(15.8)	0.00	25(53.2)	0.68
T3+T4	27	21	7(33.3)		11(52.4)		13(48.1)	
淋巴结转移								
有	49	39	8(20.5)	0.42	9(23.1)	0.16	27(55.1)	0.41
无	25	20	6(30.0)		8(40.0)		11(44.0)	
TNM 分期								
I + II	32	25	6(24.0)	0.97	6(24.0)	0.48	14(43.8)	0.25
III + IV	42	34	8(33.5)		11(32.4)		24(57.1)	

游引物 (20 μmol/L) 1 μL, GC Buffer I 25 uL, dNTP (含 Mg²⁺) 8 μL, 灭菌蒸馏水加至 50 μL。PCR 产物行 3% 琼脂糖电泳 (80 V, 120 min), 结果经美国 Bio-Rad 公司 Gel DocT-MXR 凝胶成像系统进行分析。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native-PAGE) 采用美国 Bio-Rad 公司 Mini P-4 垂直凝胶电泳系统。配制 8% 聚丙烯酰胺凝胶: 30% 的丙烯酰胺 4 mL、5 × TBE 3 mL、10% 过硫酸胺 0.11 mL、TEMED 10 μL, 加 ddH₂O 至总体积 15 mL。灌胶并插好梳子, 待胶凝固移去样品梳后, 加入 1 × TBE 于上下两电泳槽内, 用 1 × TBE 冲洗加样孔, 样品点样 (10 μL 扩增产物与 2 μL 6 × DNA Loading Buffer 混合), 60 V 电压进行电泳, 观察溴酚蓝完全泳出凝胶时结束。将凝胶小心剥入 0.5 μg/mL EB 溶液中, 室温染色 30 min, 用 ddH₂O 冲洗凝胶 2 次, 将凝胶移至 Bio-Rad 凝胶成像

仪下照相, 保存。结果判断: 选择基因组 DNA 等位片段表现为杂合子者进行 LOH 分析, 纯合子则为无信息个体。与正常胃黏膜组织相比, 癌组织 PCR 扩增产物出现等位基因条带的增多或位置的移动判定为 MSI, 条带消失或相对密度减少 50% 以上判定为 LOH。

1.2.3 甲基化特异性 PCR(MSP-PCR) 甲基化修饰参照美国 Epigentek 公司产品说明书进行; 将已修饰的 DNA 分别用甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物进行 PCR 扩增。FHIT 基因引物设计参考文献 [2], 引物和扩增参数见表 1。PCR 反应体系构成、产物电泳及成像同 1.2.2。将经电泳鉴定存在单一明亮目的条带的未纯化 PCR 产物各取 50 μL, 即 FHIT-M 和 FHIT-U 为引物的 PCR 产物各 1 管, 送广西医科大学医学科学实验中心进行序列测定。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计分析软件进行 χ^2 检验或者 Fisher 精确检验,相关性分析采用 Spearman 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FHIT 基因 MSI 和 LOH 74 例胃癌患者中,59 例为提供信息的杂合子个体,其中 MSI 有 14 例,占 23.7%;LOH 的有 17 例,占 28.8%,二者总和为 31 例,占 52.5%(图 1)。FHIT 基因 MSI 和 LOH 均与胃癌患者年龄、性别、Lauren 分型、Borrmann 分型、淋巴结转移以及 TNM 分期无关($P > 0.05$),但 LOH 与浸润程度存在正相关($P < 0.05$),见表 2。

2.2 FHIT 基因的甲基化特异性 PCR(MSP)扩增结果 FHIT 基因行 MSP 扩增后,产物经琼脂糖凝胶电泳得到约 79 bp 特征性片段,与预期的 FHIT-M 和 FHIT-U 为引物的目的片段大小相符,见图 2。

2.3 FHIT 基因的 MSP 扩增后的测序结果 甲基化片段所有 CpG 位点保持不变,非甲基化片段所有 C 变成 T。两结果对比证实,有 CpG 二核苷酸存在于序列中则为甲基化的 CpG,而在对应位置为 TpG 则为非甲基化的 CpG。

2.4 FHIT 基因甲基化状态 正常胃黏膜组织均为 FHIT 基因非甲基化,74 例胃癌组织中 FHIT 基因甲基化阳性为 38 例,检出率为 51.4%,其中完全甲基化 9 例。FHIT 基因甲基化率在正常胃黏膜组织和胃癌组织中差异有统计学意义($P < 0.05$)。FHIT 基因甲基化与胃癌患者年龄、性别、Lauren 分型、Borrmann 分型、浸润程度、淋巴结转移以及 TNM 分期无关($P > 0.05$),见表 2。

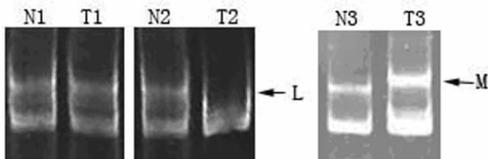


图 1 D3S1300 位点 MSI 和 LOH
N:配对正常胃组织;T:胃癌组织;L:等位基因条带的 LOH;M: MSI 等位基因条带的位置改变。

图 1 D3S1300 位点 MSI 和 LOH

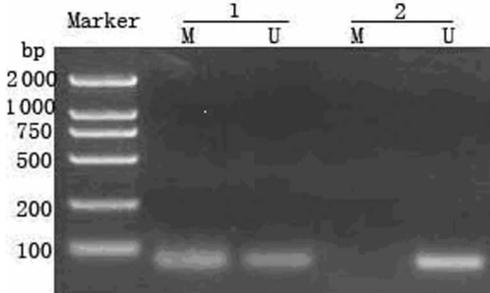


图 2 胃癌组织 FHIT 基因的 MSP 分析
1:胃癌组织(部分甲基化);2:配对正常胃组织;M:甲基化特异性扩增;U:非甲基化特异性扩增。

图 2 胃癌组织 FHIT 基因的 MSP 分析

2.5 胃癌 FHIT 基因甲基化与 MSI 和 LOH 之间的关系 59 例杂合子中共有 27 例发生甲基化,27 例甲基化样品中 8 例 MSI 和 9 例 LOH,32 例未甲基化样品中 6 例 MSI 和 7 例 LOH,甲基化与 MSI 和 LOH 均不存在明显相关性($P > 0.05$, $r = 0.12$ 和 0.13)。

3 讨论

DNA 错配修复系统(MMR)是指存在人类细胞中的一种修复 DNA 碱基错配的保障体系,其主要功能是修复 DNA 复

制过程中产生的单碱基错配和 2 个以上的插入/缺失(IDLs)错配。当 MMR 出现不稳定性变化或功能缺陷时,与其连锁或相关的微卫星位点易发生 MSI 导致 DNA 序列的微妙变化和(或)LOH 导致的染色体不稳定性,在胃癌组织中存在高频率的 MSI 和 LOH,FHIT 基因所在的染色体 3p14.2 区域的遗传改变频繁表达于胃癌和其他肿瘤^[3]。有研究表明,FHIT 基因启动子区 CpG 岛异常甲基化可导致表观遗传学沉默(epigenetic silencing),也是其主要失活方式之一,从而直接参与胃癌的发生^[4]。

微卫星是具有高度多态性的短串联重复核苷酸序列,与同一个体正常组织相比,MSI 是指在肿瘤组织基因组中微卫星简单重复序列的增加或丢失;LOH 则是肿瘤组织的某个等位基因消失。有研究表明,抑癌基因 MSI 与 LOH 在肿瘤的多步骤发生过程中起着重要的作用^[5]。作为 FHIT 基因的分子标志,微卫星标记 D3S1300 被认为是检测 FHIT 基因 MSI 和 LOH 的候选位点。Huiping 等^[6]的研究显示,FHIT 基因该位点 MSI 发生率为 27.1%(13/48);Lee 等^[7]报道 FHIT 基因该位点 LOH 发生率为 21.2%(7/33);肖玉平等^[8]检测了 38 例胃癌组织 FHIT 基因表达,结果在 D3S1300 位点 MSI 发生率为 36.8%(14/38),LOH 发生率为 26.3%(10/38)。本研究显示,59 例胃癌在 D3S1300 位点的 MSI 发生率 23.7%(14/59),LOH 发生率为 28.8%(17/59),MSI 发生率与肖玉平等的研究结果有一定差异,但其 LOH 发生率及其他学者的研究结果较为接近。有学者对胃癌发生机制的研究时提出 MSI 和 LOH 是胃癌发生早期事件^[9-10];Castagnaro 等^[11]对 FHIT 基因与肿瘤的关系研究中发现,FHIT 基因 MSI 多发生在预后较好的临床早期癌组织中,并认为 MSI 可作为早期分子诊断的标志。本文对 FHIT 基因的研究结果显示,MSI 和 LOH 与胃癌患者年龄、性别、Lauren 分型、Borrmann 分型、淋巴结转移以及 TNM 分期无关,亦提示 FHIT 基因 MSI 可能用于胃癌的早期诊断;但随着胃癌逐渐向胃壁深部的浸润,FHIT 基因 LOH 发生率增加,提示 D3S1300 位点 LOH 多发生于胃癌晚期,并有促进浸润和远处转移的作用。因此,FHIT 基因 LOH 检测可作为胃癌恶性程度、转移和预后判断的重要指标。

由 FHIT 基因启动子区高甲基化导致的表达静默被认为是引起胃癌发生的分子机制之一,并且已经在胃癌组织中得到了证实^[4]。本研究的 MSP 结果显示,FHIT 基因在正常胃黏膜组织均未出现甲基化阳性片段,但在 74 例胃癌组织中有 38 例发生甲基化,甲基化率为 51.4%,与 Leal 等^[12]的研究结果 53.9% 比较接近,但与文献^[13-14]报道的 FHIT 基因 62% 和 40% 有一定差异,其原因可能与患者的遗传背景和实验方法的差异有关。甲基化与胃癌患者年龄、性别、Lauren 分型、Borrmann 分型、浸润程度、淋巴结转移以及 TNM 分期无关,提示 FHIT 基因甲基化可能是胃癌发生的早期事件。本研究还对胃癌 FHIT 基因甲基化和 MSI 及 LOH 进行相关性分析,结果显示甲基化与后两者之间均无明显相关性,提示甲基化与后两者可能是通过不同的途径对胃癌的发生、发展起作用,而相互之间并无明显影响。

总之,FHIT 基因失活机制除了以上三个方面,还可能涉及其他方面:染色体不稳定、基因转录异常致蛋白表达降低或缺失、纯合缺失、基因突变、表观遗传学的其他改变(如组蛋白乙酰化)等,FHIT 基因结构或表达过程中的变化势必引起其功能的改变。因此进一步研究 FHIT 基因在胃癌组织中的其他变化,对确定 FHIT 基因与胃癌发生、发展的关系有着重要

的意义。

参考文献:

- [1] Pecherzewska R, Nawrot B. FHIT-tumor suppressor protein involved in induction of apoptosis and cell cycle regulation[J]. *Postepy Biochem*, 2009, 55(1):66.
- [2] Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Maitra A, et al. 5' CpG Island Methylation of the FHIT Gene Is Correlated with Loss of Gene Expression in Lung and Breast Cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61:3581.
- [3] 张生军, 张才全. FHIT 基因结构、功能及其应用研究进展[J]. *重庆医学*, 2004, 33(9):1411.
- [4] Leal MF, Lima EM, Silva PN, et al. Promoter hypermethylation of CDH1, FHIT, MTAP and PLAGL1 in gastric adenocarcinoma in individuals from Northern Brazil[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(18):2568.
- [5] Fukushima T, Takenoshita S. Colorectal carcinogenesis[J]. *Fukushima J Med Sci*, 2001, 47(1):1.
- [6] Huiping C, Kristjansdottir S, Bergthorsson JT, et al. High frequency of LOH, MSI and abnormal expression of FHIT in gastric cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38(5):728.
- [7] Lee SH, Kim WH, Kim HK, et al. Altered expression of the fragile histidine triad gene in primary gastric adenocarcinomas[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284(3):850.

- [8] 肖玉平, 韩坤波, 李锦毅, 等. 胃癌 FHIT 基因杂合性缺失及微卫星不稳定性的研究[J]. *中国医科大学学报*, 2006, 35(2):122.
- [9] Lee CL, Hsieh KS, Chen YL, et al. Identification of candidate genes for congenital ventricular septal defects with HSA22q11 loss of heterozygosity[J]. *Rev Esp Cardiol*, 2009, 62(3):263.
- [10] Perez RO, Jacob CE, D'Ottaviano FL, et al. Microsatellite instability in solitary and sporadic gastric cancer[J]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*, 2004, 59(5):279.
- [11] Castagnaro A, Marangio E, Verduri A, et al. Microsatellite analysis of induced sputum DNA in patients with lung cancer in heavy smokers and in healthy subjects[J]. *Exp Lung Res*, 2007, 33(6):289.
- [12] Leal MF, Lima EM, Silva PN, et al. Promoter hypermethylation of CDH1, FHIT, MTAP and PLAGL1 in gastric adenocarcinoma in individuals from Northern Brazil[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(18):2568.
- [13] Roa JC, Anabalón L, Roa I, et al. Promoter methylation profile in gastric cancer[J]. *Rev Med Chil*, 2005, 133(8):874.
- [14] 戴观荣, 景洪标, 邓鉴文, 等. FHIT 基因在胃癌中的异常甲基化及其表达[J]. *第二军医大学学报*, 2005, 26(11):1304.

(收稿日期:2009-11-27 修回日期:2010-02-14)

(上接第 2257 页)

关系,本研究在体外研究了肺腺癌细胞中 ERK 信号通路与 MMP-9 蛋白表达的关系。Western blot 检测显示,PD98059 以浓度依赖方式降低肺腺癌 SPC-A-1 细胞 MMP-9 蛋白表达,表明肺腺癌细胞 MMP-9 蛋白表达可能通过 ERK 信号通路来调控。

综上所述,ERK 信号通路通过上调 MMP-9 的表达促进肺腺癌的恶性进展及侵袭、转移,但其确切机制有待进一步研究。本试验结果可为 ERK 信号通路作为肺腺癌治疗的靶点提供理论依据。

参考文献:

- [1] 王吉耀. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:119.
- [2] 黎联,梅同华,周向东,等. 基质金属蛋白酶 26 蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达及其意义[J]. *癌症*, 2009, 28(1):76.
- [3] Nagakawa Y, Aoki T, Kasuya K, et al. Histologic features of venous invasion, expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9, and the relation with liver metastasis in pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2002, 24(2):169.
- [4] 孔灵玲,王学春,崔文,等. 宫颈鳞癌组织中基质金属蛋白酶 9 表达的意义[J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(3):242.

- [5] 张尧,吴小候,孙先禹,等. 肾细胞癌 MMP-9、VEGF 的表达及其临床意义[J]. *重庆医学*, 2007, 36(13):1298.
- [6] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. *Science*, 2002, 298(5600):1911.
- [7] Ling H, Zhang LY, Su Q, et al. Erk is involved in the differentiation induced by diallyl disulfide in the human gastric cancer cell line MGC803[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2006, 11(3):408.
- [8] Santibdiez JF, Guerero J, Quintanilla M, et al. Transforming growth factor-beta1 modulates matrix metalloproteinase-9 production through the Ras/MAPK signaling pathway in transformed keratinocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(2):267.
- [9] Chung TW, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERKs and PI-3K/AKT pathways: Involvement of invasive potential[J]. *FASEB J*, 2004, 18(10):1123.
- [10] Bartsch JE, Staten ED, Appert HE. Matrix metalloproteinase expression in breast cancer[J]. *J Surg Res*, 2003, 110(2):383.

(收稿日期:2009-09-29 修回日期:2010-02-20)