

· 论 著 ·

膀胱癌及其正常组织染色体缺失研究及其临床意义

赵友光¹, 李莹², 杨劲³, 李杰⁴, 陈志文^{4△}

(1. 成都军区总医院泌尿外科, 成都 610083; 2. 成都军区总医院心血管内科, 成都 610083; 3. 第三军医大学基础部生化与分子生物学教研室, 重庆 400038; 4. 第三军医大学西南医院泌尿外科研究所, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨膀胱癌患者 9 号染色体及 p53 等位基因的杂合性缺失(LOH)与膀胱移行细胞癌(TCC)形成、进展之间的关系及其在早期诊断膀胱癌及复发检测中的价值。方法 选取 9、17 号染色体的 5 个微卫星位点 D9S283、D9S303、D9S304、D9S1751 和 TP53, 采用特异引物进行 PCR 扩增及变性聚丙烯酰胺凝胶电泳-硝酸银染色方法对 40 例 TCC 患者手术切除的癌组织及癌旁正常组织进行微卫星分析。结果 40 例癌组织中, 36 例(90%) 分别有 1~5 个微卫星位点发生 LOH, 其中微卫星改变发生最高的位点是 TP53, 发生率为 62.5%, 其次为 D9S283, 发生率为 42.5%。结论 9、17 号染色体上的 5 个微卫星位点 LOH 参与了膀胱癌的发生, 通过检测这 5 个位点的 LOH, 可以为膀胱癌的早期诊断提供一定的线索。

关键词:膀胱肿瘤; 等位基因; 基因, p53; 聚合酶链反应

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.09.009

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)09-0853-03

Allelic loss of heterozygosity in normal urothelium of patients with bladder cancer

Zhao Youguang¹, Li Ying², Yang Jing³, Li Jie⁴, Chen Zhiwen^{4△}

(1. Department of Urology, General Hospital of Chengdu Command of PLA, Chengdu, Sichuan 610083, China;

2. Department of Cardiology, General Hospital of Chengdu Command of PLA, Chengdu, Sichuan 610083, China;

3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

4. Institute of Urology of Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between loss of heterozygosity(LOH) of allele loci on chromosomes 9 and P53 in Chinese and development of transitional cell carcinoma(TCC) of urinary bladder. **Methods** LOH was studied in the tumor tissues of 40 patients, with their normal tumor-adjacent bladder tissues as control, by means of PCR amplification of 5 polymorphic microsatellite DNA loci D9S283, D9S303, D9S304, and D9S1751 on chromosome 9 and TP53. Following silver staining, 8% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis was performed. **Results** 36(90%) TCCs showed LOH at one or more loci, and 26 TCCs showed LOH at 2 loci. There was no significant difference between superficial TCC and invasive TCC at these loci. **Conclusion** LOH on chromosome 9 might be an early event of the genesis of TCC of bladder, and LOH on p53 might be related with progression of TCC. Racial difference may contribute to different LOH on chromosome 9 and p53 between Chinese people and others. The combination of markers D9S283, D9S303, D9S304, D9S1751 and TP53 enable us to detect 36 out 40 of bladder cancers(90%); This panel might be chosen for microsatellite analysis in bladder cancer of Chinese.

Key words: urinary bladder neoplasms; allele; gene, p53; polymerase chain reaction

微卫星广泛存在于基因组之中, 由 1~6 个核苷酸组成串联核苷酸序列, 其不稳定性和杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)是肿瘤细胞染色体畸变的常见现象, 近年来已成为肿瘤研究的一大热点^[1]。研究肿瘤中微卫星变异, 对从分子生物学水平探索肿瘤的发生与染色体变异具有重要意义^[2], 并可为肿瘤的早期诊断提供有价值的线索。以往的研究表明人类 9、17 号染色体与膀胱癌的发生以及转移有着密切的关系, 因此研究其上的微卫星位点 D9S283、D9S303、D9S304、D9S1751 以及 TP53, 对揭示膀胱癌的发生以及指导膀胱癌的早期诊断具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集第三军医大学西南医院泌尿外科 2006 年 3 月至 2008 年 7 月收治的 40 例患者, 其中男 32 例, 女 8 例; 年龄 40~85 岁, 平均 65.28 岁; 均经病理证实为膀胱移行细胞癌(TCC)。按照 1998 年 WHO 膀胱肿瘤组织学分类第 2 版标准对膀胱癌进行分级和分期, I 级 12 例, II 级 18 例, III 级

10 例; 临床分期 Tis₁ 18 例, T₂₋₄ 22 例。新鲜标本取自根治性膀胱癌手术标本术后 30 min 内, 分离肿瘤与周围正常组织后立即放入液氮速冻保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 抽提 新鲜冷冻组织使用北京天根生化科技有限公司组织基因组 DNA 提取试剂盒抽提基因组 DNA。测定 DNA 样品在 260 nm/280 nm 处的光吸收度, OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 之比大于 1.75 为合格。

1.2.2 PCR 扩增 根据文献^[3-4]选取 9 号染色体上 4 个位点和 p53 位点, 从 GenBank 中查得 5 个微卫星位点的引物序列(表 1), 由 Invitrogen 生物技术有限公司合成。PCR 反应体系: 新鲜标本取 200 ng DNA 为模板, 200 μmol/L dNTP(A、T、C、G 等比例)1 μmol/L 引物, 5 μL 10×buffer, 2 U Taq 酶, 补充双蒸水(ddH₂O)至总体积为 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 1 min, 60~62 °C 退火 1 min(不同引物退火温度不同), 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 而后 72 °C 保

△ 通讯作者, Tel:(023)68772710; E-mail:chenzwxn@163.com。

表 1 5 个微卫星位点的引物序列

位点	引物序列	退火温度(°C)*	扩增片段(bp)
D9S283	s:TGC TGG ATT TCA GGT AGG G	62	approx. 179
	a:ATG GTT ATG CGG GTG TAT TTC TC		
D9S303	s:CAA CAA AGC AAG ATC CCT TC	61	approx. 163
	a:TAG GTA CTT GGA AAC TCT TGG C		
D9S304	s:GTG CAC CTC TAC ACC CAG AC	61	approx. 165
	a:TGT GCC CAC ACA CAT CTA TC		
D9S1751	s:TTG TTG ATT CTG CCT TCA AAG TCT	60	approx. 150
	a:CGT TAA GTC CTC TAT TAC ACA GAG		
TP53	s:AGG AGG TTG CAG TAA GCG GA	61	approx. 150
	a:AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG		

*:退火温度=4(C+G)+2(A+T)-5。

持 10 min 延伸,4 °C 保存。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察扩增条带的效果。LOH 判断标准^[5]:将肿瘤样本与自身正常组织对照,若肿瘤组织较正常对照组织出现某一基因条带消失或密度减少 50% 以上,判断为 LOH。

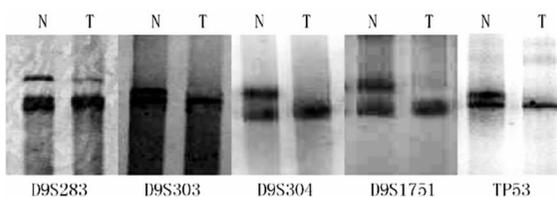
1.2.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 配制 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺为 19:1),调节电压 400 V 预电泳 30 min,取上述 PCR 产物 10 μL 与 2× 变性上样缓冲液(含溴酚蓝与去离子甲酰胺)10 μL 混合,95 °C 变性 5 min,立即冰浴 5 min。加样 10 μL 于 Bio-Rad 垂直电泳仪中,室温下电泳(400 V, 2.5~3.5 h),电泳结束后小心去除胶板等待硝酸银染色。

1.2.4 硝酸银染色 用 10% 冰乙酸溶液摇床固定 30 min,去离子水冲洗 2 次,1 g/L 的硝酸银溶液中浸泡 30 min 染色,去离子水清洗 2 次,每次小于 30 s,最后用 30 g/L 碳酸钠、37% 的甲醛与 2 mg/L 硫代硫酸钠预冰的混合液显影,至目的条带清晰后加入 10% 冰乙酸溶液终止,去离子水清洗并照相分析。

1.3 统计学处理 用同一引物在同样条件下对肿瘤和正常组织基因组 DNA 进行 PCR 扩增,在同等条件下进行上样、电泳和硝酸银染色后比较结果。各参数之间的差异比较采用 χ^2 检验及 Fisher 概率确切法,统计分析用 SPSS13.0 软件进行,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 等位基因 LOH 定量分析 40 例患者均为 TCC,肿瘤组织及其正常组织特定等位基因位点 LOH 示例见图 1。5 个位点至少有 1 个位点发生 LOH 占 90.0% (36/40),2 个位点以上(含 2 个)同时发生 LOH 为 65.0% (26/40),发生 LOH 较多的位点是 D9S283 和 D9S304,发生在 9 号染色体的 LOH 合计为 72.5%,而 TP53 出现 LOH 为 62.5%。



T:膀胱癌组织;N:配对癌旁正常组织。

图 1 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后硝酸银染色的 LOH

2.2 膀胱癌等位基因 LOH 与其临床病理学特征的相关性分

析 经 Fisher 确切概率法双侧检验得 TCC 的 LOH 发生率与患者的性别、年龄、病理类型及是否转移无相关性($P > 0.05$)。

3 讨论

分子生物学研究表明,肿瘤是一种多阶梯的基因病,由癌基因、抑癌基因和 DNA 修复基因改变引起。最近研究发现,肿瘤的发生不仅与癌基因的激活、抑癌基因的失活有关,还与基因的甲基化、微卫星基因异常改变、端粒的异常表达有关,因此有些学者据此提出了拟基因(pseudogene)的概念,它们参与了癌基因与抑癌基因改变的过程,与肿瘤的发生有密切关系。

微卫星变异与 DNA 的错配修复有关,LOH 多发生在抑癌基因附近,是识别和检测抑癌基因的标志,所以微卫星改变成为了研究肿瘤发展的热点。同时,由于微卫星改变发生在肿瘤早期,通过检测不同位点的微卫星改变,有可能为肿瘤的早期诊断提供重要线索。

膀胱癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发生率占我国癌症患者的第 8 位,其中 90% 以上的膀胱肿瘤是 TCC^[5-6],但是其发病机制仍未得到公认的结论。近年来随着研究的深入,人们已经发现绝大多数人类肿瘤都存在非随机性的染色体片段丢失,这些非随机的片段丢失表明这些区域内可能包含有与肿瘤的发生、进展有重大关系的基因存在。人们通过检测肿瘤组织和其相应的正常组织基因组染色体上特定的多态微卫星标记,分析其 LOH 情况,若在染色体某一位点处频发 LOH,已成为研究肿瘤发生机制的一个突破口^[7]。这对从分子遗传学水平探索肿瘤的发病机制及其相关因素提供了契机,并且 LOH 研究将对肿瘤早期诊断判断预后及疗效有着重要的意义。

本研究选择 5 个微卫星位点分析了 40 例 TCC,发现男女性间 LOH 改变的阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示 LOH 的分布不是随机出现的,而是膀胱癌的普遍现象。本研究所选择的 5 个微卫星位点等位基因 LOH 改变大于或等于 1 个以上者 36 例,检出率是 90.0%;≥2 个以上者 26 例,检出率是 65.0%,LOH 位点附近可能存在癌基因的突变或抑癌基因的失活,临床治疗后可能预后较差,复发风险较高;9 号染色体上 LOH 的发生率为 72.5%,与文献^[8]报道膀胱癌与 9 号染色体 LOH 关系密切相一致。本研究还发现 5 个等位基因位点 LOH 改变与 TCC 的分期、分级无关($P > 0.05$),说明 TCC 中等位基因的 LOH 与肿瘤的浸润深度及恶性程度无关。由此可知,膀胱肿瘤组织中存在较高频率的 LOH 改变。这与

Knobloch 等^[9]的研究相符,但与 Berger 等^[10]的报道不符,可见 LOH 在膀胱肿瘤方面的研究还存在一定分歧。这更说明同一肿瘤的 LOH 研究受遗传因素的影响,而且选择种族、地区、染色体、等位基因位点和(或)数量的不同,结果也可能截然不同。等位基因缺失是肿瘤发生过程中的重要事件,同时这些遗传变化将在以后的分子演变过程中得以保留^[11]。因此猜测在膀胱癌进展的不同时期,可在染色体 9p 区及 p53 区检测到高度保守的等位基因缺失模式,这将有助于了解膀胱癌发生的分子机制。

肿瘤组织中等位基因 LOH 是一种常见现象^[12],TCC 癌变过程中伴有明显的 LOH 改变,本研究选择的 5 个位点诊断组合阳性率较高,技术成熟,简便经济,较适合膀胱肿瘤的早期临床诊断和术后监测,从而可做到对肿瘤的早发现、早治疗和术后复发监测,对膀胱肿瘤患者术后生活质量提高有着积极作用^[13]。但国内许多研究人员也发现^[14],国外报道的等位基因标记组合的敏感性^[15]与我国人群差异较大,考虑与人种、病因学差异有关。临床工作中应注意到国人与其他民族的这种差异,采用多个分布于不同染色体的等位基因位点组合筛选、检测,对膀胱肿瘤患者的普查是一种方便、有效、快速、无创的检测方法,并且可以对膀胱肿瘤术后随访患者进行膀胱冲洗液尿脱落细胞 LOH 的监测,结合膀胱镜检,可能对及时发现复发患者有较大帮助。

参考文献:

[1] Wong KK, Tsang YT, Chang YM, et al. Genomewide allelic imbalance analysis of pediatric gliomas by single nucleotide polymorphic allele array[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(23):11172-11180.

[2] Sourvinos G, Kazanis I, Delakas D, et al. Genetic detection of bladder cancer by microsatellite analysis of p16, RB1 and p53 TSG[J]. *Urology*, 2001, 165(1):249-252.

[3] Stoehra R, Zietz S, Burger M. Deletions of Chromosomes 9 and 8p in Histologically Normal Urothelium of Patients with Bladder Cancer[J]. *Eur Urol*, 2007, 47(6):58-63.

[4] Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, et al. FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder[J]. *Cancer Res*,

2003, 63(24):8108-8112.

[5] Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis[J]. *Cancer*, 1997, 80(8 Suppl):S1529-1537.

[6] Frost P, Levin B. Clinical implications of metastatic process[J]. *Lancet*, 1992, 339(20):1458-1461.

[7] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2):10-30.

[8] Habuchi T, Yoshida O, Knowles MA. A novel candidate tumour suppressor locus at 9q32-33 in bladder cancer: localization of the candidate region within a single 8 402 kb YAC[J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(6):913-919.

[9] Knobloch R, Hegele A, Brandt H, et al. Serum DNA and urine DNA alterations of urinary transitional cell bladder carcinoma detected by fluorescent microsatellite analysis[J]. *Int J Cancer*, 2001, 94(1):67-72.

[10] Berger AP, Parson W, Stenzl A, et al. Microsatellite alterations in human bladder Cancer: detection of tumor cells in urine sediment and tumor tissue[J]. *Eur Urol*, 2002, 41(5):532-539.

[11] Brunelli M, Gobbo S, Cossu-Rocca P, et al. Chromosomal gains in the sarcomatoid transformation of chromophobe renal cell carcinoma[J]. *ModPathol*, 2008, 20(4):303-309.

[12] Nagano Y, Kimdo H, Zhang L, et al. Allelic alterations in pancreatic endocrine tumors identified by genome-wide single nucleotide polymorphism analysis[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2007, 14(8):483-486.

[13] 杨明莹, 贺加, 王剑松, 等. 膀胱肿瘤患者术后生活质量调查评估[J]. *重庆医学*, 2009, 38(9):1108-1110.

[14] 邱林, 丛笑, 谭一韦, 等. 尿脱落细胞卫星 DNA 改变在膀胱癌早期诊断中的应用[J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 22(6):483-486.

[15] Czerniak B, Li L, Chaturvedi V, et al. Genetic modeline of human urinary bladder carcinogenesis[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, 27(4):392-402.

(收稿日期:2010-08-10 修回日期:2010-09-17)

(上接第 852 页)

[8] Szelestei T, Bahring S, Kovacs T, et al. Association of a uteroglobin polymorphism with IgA nephropathy[J]. *Am J Kidney Dis*, 2000, 36(3):468-473.

[9] Narita I, Saito N, Goto S, et al. Role of uteroglobin G38A polymorphism in the progression of IgA nephropathy in Japanese patients[J]. *Kidney Int*, 2002, 61(5):1853-1858.

[10] Kim YS, Kang D, Kwon DY, et al. Uteroglobin gene polymorphisms affect the progression of immunoglobulin: a nephropathy by modulating the level of uteroglobin ex-

pression[J]. *Pharmacogenetics*, 2001, 11(4):299-305.

[11] Gharavi AG, Yan Y, Scolar I F, et al. IgA nephropathy, the most common cause of glomerulonephritis, is linked to 6q22-23[J]. *Nat Genet*, 2000, 26(3):354-357.

[12] Menegatti E, Nardacchione A, Alpa M, et al. Polymorphism of the uteroglobin gene in systemic lupus erythematosus and IgA nephropathy[J]. *Lab Invest*, 2002, 82(5):543-546.

(收稿日期:2010-08-26 修回日期:2010-12-09)