

用 PCR 技术对原发性肝癌 4 号染色体标记的分析

朱明华

(第四军医大学病理学教研室, 西安 710032)

摘要 应用聚合酶链反应扩增后变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分析了 45 例原发性肝癌第 4 号染色体长臂 10 个微小卫星多态性基因标记, 以探讨等位基因变化与原发性肝癌发生的关系。结果显示, 等位基因的杂合型丢失存在于 45 例中的 12 例肿瘤组织, 10 个基因标志中 7 个出现杂合型丢失, 但丢失的频率较低, 占杂合型的 3.1-12.9%。结果表明, 第 4 号染色体的等位基因改变与原发性肝癌的发生有关, 但特征性不明显, 提示原发性肝癌的发生可能是一个多基因变化、多步骤的过程。

关键词 原发性肝癌, 第 4 号染色体, 聚合酶链反应, 微小卫星多态性

Analysis of Gene Markers on Chromosome 4 in Primary Hepatocellular Carcinoma by Polymerase Chain Reaction

Zhu Minghua

(Department of Pathology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

分子遗传学研究发现, 原发性肝癌 (primary hepatocellular carcinoma, PHC) 的发生与等位基因的变化有关, 限制性内切酶片段长度多态性分析有 20 对染色体出现过不同频率的杂合型丢失 (Loss of heterozygosity, LOH), 其中, 丢失频率较高的有 1、4、5、10、13、16 和 17 号染色体。第 4 号染色体的等位基因丢失与 PHC 的发生被认为具有重要意义。为进一步探讨第 4 号染色体的等位基因变化, 我们应用多聚酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 扩增后变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 检测了位于第 4 号染色体长臂的 10 个微小卫星多态性基因标记, 观察等位基因的变化与 PHC 的关系。

1 材料与 方法

1.1 组织标本

45 例经病理确诊的 PHC 及其癌旁肝组织均为手术切除标本, 贮存于 -80°C 备用。44 例临床曾有乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 感染史, 其中 28 例术前血清学检查具有一项以上 HBV 感染指标阳性。43 例伴有结节性肝硬化。所有病例均来源于西北地区, 属黄曲霉毒素低含量区。

1.2 DNA 提取

每例取 -80°C 保存的癌及癌旁肝组织各 3 克, 研碎, 在核苷酸提取仪 (304 A 型) 上采用蛋白酶 K (Sigma) 消化, 酚-氯仿抽提法提取 DNA。

1.3 PCR

1.3.1 引物 应用 ABI 391 型核苷酸合成仪合成位于第 4 号染色体长臂的 10 个微小卫星多态

性基因标志的引物 (全部由美国 Fox Chase 癌症中心提供)。引物顺序、染色体位点及扩增片段长度见表 1。

1.3.2 PCR 扩增 总反应体积 15 μ l, 模板 DNA 10 ng, 在 PCR 扩增仪 (COY Tempcycler) 中操作。含 10 \times PCR 缓冲液 (100 μ mol/L Tris-HCl, pH8.3, 50mmol/L KCl, 15mmol/L MgCl₂, 0.1% 明胶) 1.5 μ l; (³⁵S) dATP (Dupont) 0.2 μ l (2 μ ci); 10 μ mol/L dNTP; 0.5 μ mol/L 引物。95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟后加入 Taq DNA 聚合酶 1U (Perkin Elmer Cetus) 进入循环。根据不同的引物选择最佳退火 (Annealing) 温度和时间, 40 个循环后 72 $^{\circ}$ C, 10 分钟退火。氯仿抽提 1 次, 留 PCR 产物备用。

1.3.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 制备 6% 含 7mol/L 尿素的聚丙烯酰胺凝胶, 取 10 μ l PCR 产物加入 5 μ l 样本缓冲液, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟后加样电泳。干胶后对柯达 X-线底片放射自显影。

表 1 10 个基因标志的染色体位点, 引物顺序和扩增段长度

基因标志	染色体位点	引物顺序	片段长度	等位基因数
			(优势等位基因)	(杂合型频率)
<i>Mfd 22</i>	D4S171	5'-TGGGTAAGAGTGAGGCTG-3' 5'-GGTCCAGTAAGAGGACAGT-3'	143-161 (153)	9 (0.75)
<i>Mfd 38</i>	D4S175	5'-ATCTCTGTCCCTCCCTGTT-3' 5'-CTTATTGGCCTTGAAGGTAG-3'	112-135 (126)	9 (0.82)
<i>Mfd 59</i>	D4S174	5'-GCCATGCGATACGCT-3' 5'-CTTCCTGTGGGTGC-3'	175-195 (185)	11 (0.86)
<i>Mfd 83</i>	D4S179	5'-GATCTCATGTGCTCAGTTA-3' 5'-CCAAAAAGTGCAAATTTAGAGT-3'	220-222 (220)	2 (0.23)
<i>Mfd 138</i>	D4S191	5'-AATAGGGAGCAATAAGGTGT-3' 5'-TTTTATTATGTTTGCTGCTC-3'	89-96 (90)	6 (0.67)
<i>Mfd 142</i>	D4S193	5'-ACAACCCATTTGTGAAGAC-3' 5'-TTTATAGAAAATTTAGCATGGA-3'	101-111 (103)	6 (0.69)
<i>FABP</i>	4q28-31	5'-AACTCAGAACAGTGCCTGAC-3' 5'-ATTTCCCTCAAGGCTGCAGGT-3'	200-210 (200)	8 (0.69)
<i>PYX 9-10</i>	D4S231	5'-AGATGAGTATGTTATTATACC-3' 5'-TGCTAGAGTCCCTAGTG-3'	157-169 (163)	7 (0.71)
<i>HOX 7</i>	4q	5'-TTAGATTGTCATCAGTCCTC-3' 5'-GGGCATGTTGATGTCTGCTGAC-3'	169-175 (169)	4 (0.62)
<i>J-Chain</i>	4q	5'-GAGCCAAGTATCTACCAGCTTCTA-3' 5'-CAAATCAGACATCTGACACTT-3'	400-600 (400)	5 (0.79)

2 结果与讨论

10 个微小卫星多态性基因标记, 经 PCR 扩增后电泳分析, 45 例中的 12 例肿瘤组织出现变化, 其中 7 例具有一个基因标记的等位基因丢失, 5 例同时具有二个基因标记的等位基因丢失。这些改变涉及 10 个基因标记中的 7 个, 其杂合型丢失频率见表 2。等位基因丢失可表现为全片段丢失或部分丢失, 其中, 病例 5 的 FABP 位点基因片段出现重排, 其片段较癌旁组织为大 (图 1, A-E)。

PHC 的分子遗传学研究是近年来发展较快的领域之一, 限制性内切酶片段长度多态性分析发现, 有 20 对染色体存在等位基因的杂合型丢失⁽²⁻⁴⁾。Buetow 等⁽¹⁾和 Zhang 等⁽⁴⁾认为, 在第 4 号染色体长臂可能存在一个与 PHC 发生有关的肿瘤抑制基因。而 Walker 等和 Fujimori 等则认为^(2,3), PHC 等位基因丢失主要位于第 17 号染色体, 而第 4 号染色体的改变不明显。我们曾对本组病例应用 21 个具有多态性的基因探针进行限制性酶片段长度多态性分析, 其中 6 个基因

位于第 4 号染色体, 仅 4 例肿瘤组织出现等位基因的丢失 (另文发表)。

表 2 原发性肝细胞癌等位基因丢失的基因位点和频率

基因标志	检测例数	杂合型例数	肿瘤组织丢失 (%)
<i>Mfd 22</i>	45	31	4(12.9)
<i>Mfd 38</i>	45	31	2(6.5)
<i>Mfd 59</i>	45	32	1(3.1)
<i>Mfd 83</i>	45	21	2(9.5)
<i>Mfd 138</i>	45	30	2(6.6)
<i>Mfd 142</i>	45	29	0
<i>FABP</i>	45	29	3(10.3)
<i>PYX 9-10</i>	45	27	0
<i>HOX 7</i>	45	28	3(10.7)
<i>J-Chain</i>	45	20	0

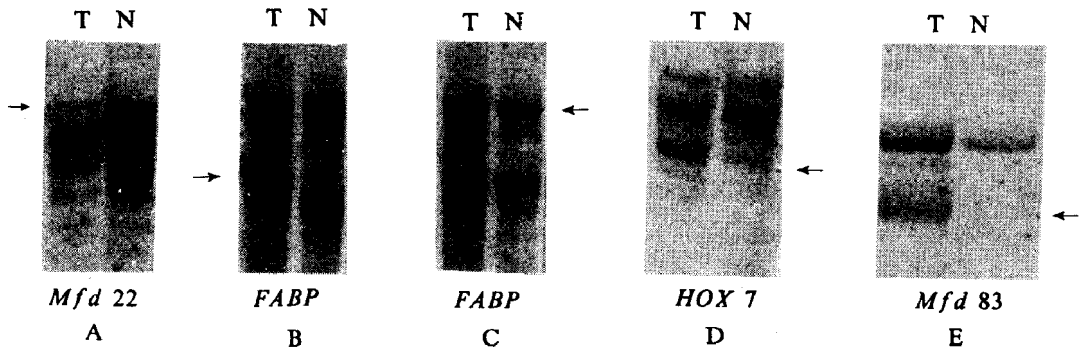


图 1 放射自显影显示杂合型等位基因丢失

T: 肿瘤; N: 同一例癌周组织。箭头示等位基因部分或全部丢失, B 为病例 5 肿瘤组织一个等位基因大小出现改变, 提示该片段出现重排。

为进一步探讨第 4 号染色体基因变化与 PHC 的关系, 本文应用了 10 个位于第 4 号染色体长臂的微小卫星多态性基因标记, 经 PCR 扩增后变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分析其等位基因的杂合型丢失, 结果, 7 个基因标志出现变化, 分布于 45 例中的 12 例肿瘤组织, 其中 5 例同时有二个基因位点丢失。等位基因杂合型丢失的频率较低, 占杂合型的 3.1-12.9%。本文所用的 10 个微小卫星多态性基因标记, 在原发性肝癌中无明确特征性改变, 但仍一定程度上显示了第 4 号染色体等位基因丢失与原发性肝癌的关系。结果提示, PHC 的发生机制可能涉及到多基因变化, 是一个复杂的多步骤的分子生物学变化过程。不同的致癌因素 (HBV, 黄曲霉毒素等), 不同的研究人群之间在分子遗传学水平上的变化可能存在一定的差异。

参考文献

- (1) Buetow K H, et al, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86(21): 8852-8856.
- (2) Fujimori M, et al, 1991. Cancer Res., 51(1): 89-93.
- (3) Walker G J, et al, 1991. Cancer Res., 51(16): 4367-4370.
- (4) Zhang W, et al, 1990. Jpn. J. Cancer Res., 81(1): 108-110.

本文于 1992 年 9 月 28 日收到。