

口腔鳞癌组织 hMSH2 外显子 突变筛选的初步研究

程 斌 夏鸿彬 李春阳 洪 筠 杨灵澜

摘要 目的:探讨错配修复基因 hMSH2 在口腔鳞癌发生发展中的作用。方法:应用 PCR-SSCP 法检测 30 例口腔粘膜鳞状细胞癌组织标本中 hMSH2 外显子 5、6、7、8、9、12 的突变情况。结果:在 30 例口腔鳞癌中,hMSH2 六个外显子 PCR 均扩增到目的 DNA 片段;SSCP 检测未检出 hMSH2 六个外显子发生突变。结论:口腔鳞癌 hMSH2 外显子结构改变模式与遗传性肿瘤不同;错配修复基因在口腔鳞癌发生发展中的作用值得探讨。

关键词 口腔鳞状细胞癌 错配修复基因 hMSH2 突变

The Detection of Exon Mutation of hMSH2 in Tissues of Oral Squamous Cell Carcinoma

Cheng Bin, Xia Hongbin, Li Chunyang, et al

Guanghua College of Stomatology, Sun Yat-Sen University

Abstract

Objective: The purpose of this study was to detect the exon mutation of mismatch repair gene hMSH2 in tissues of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and investigate the role of hMSH2 in the pathogenesis of OSCC. **Methods:** The mutations of hMSH2 exon 5, 6, 7, 8, 9 and 12 in the tissues of 30 human OSCC cases were analyzed using PCR-SSCP. **Results:** The six exons of hMSH2 were amplified successfully by using PCR technique, while no mutations in these exons were identified by using PCR-SSCP. **Conclusion:** The structure changes of hMSH2 exons in OSCC may be different from that in hereditary non-polyposis colorectal carcinoma (HNPCC); the role of hMSH2 in carcinogenesis of OSCC needs to be evaluated further.

Key words: oral squamous cell carcinoma mismatch repair hMsh2 mutation

目前研究^{1,2}表明,癌基因、抑癌基因、DNA 修复基因这 3 类基因在肿瘤发生发展中起重要的作用。错配修复基因结构和功能的异常是遗传性非息肉性结直肠癌 (hereditary non-polyposis colorectal carcinoma, HNPCC) 的主要发病机制。据报道³,在 HNPCC 错配修复基因的突变中,50% ~ 60% 为 hMSH2 外显子突变;hMSH2 基因 16 个外显子均发现病理性突变,但主要集中于外显子 12、7、6、5。目前错配修复基因在非遗传性肿瘤发生发展中的作用尚无明确的结论。本研究拟检测口腔鳞癌组织中 hMSH2 基因外显子 5、6、7、8、9、12 的突变,初步探讨 hMSH2 在口腔鳞癌发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 标本收集和基因组 DNA 提取

收集 30 例经病理确诊为口腔粘膜鳞状细胞癌组织标本,30 例中男性 26 例,平均年龄 53.8 岁;女性 4 例,平均年龄 55 岁。其中 19 例为中山大学光华口腔医院 1996 年至 2000 年存档石蜡标本,11 例为 2001 年 3 月至 8 月期间手术切除后液氮保存标本;以 2 例液氮保存的整形手术后正常口腔粘膜组织作为对照。每例石蜡标本连续切片,取 3 ~ 5 张 5 μm 切片于消毒 1.5 ml EP 管内;冷冻标本每例取约 100 mg,分别用经典的酚/氯仿提取法提取组织基因组 DNA。

1.2 PCR 扩增

根据 Genbank (ACCESSION 11430758) hMSH2 基因序列和有关文献的引物序列⁴,应用 Primer 5.0 软件设计 hMSH2 外显子 5、6、7、8、9、12 的引物,由大连宝生公司合成。引物序列如下。

Exon5 240 bp 5-CCAGTGGTATAGAAATCTTCG3

本课题为国家自然科学基金(编号 39700159)和广东省卫生厅基金(编号 A1998231)资助项目
作者单位:510060 中山大学光华口腔医学院

		5 - CCAATCAACATTTTAAACCC - 3
Exon6	251 bp	5 - GTTTTACTAATGAGCTTGCC - 3 5 - GTGGIATAATCATGTGGG - 3
Exon7	326 bp	5 - GACTTACGTGCTTAGTTG - 3 5 - GIATATATTGIATGAGTTGAA GG - 3
Exon8	222 bp	5 - GATTTGIATTTCTGIAAAATGAGATC - 3 5 - GGCCTTTGCTTTTTAAAAATAAC - 3
Exon9	217 bp	5 - GICTTTACCCATTATTATAGG - 3 5 - GTATAGACAAAA GAATTATTC - 3
Exon12	327 bp	5 - ATTACAGIATTCCTGTGTAC - 3 5 - CGTTACCCCAACAAA GC - 3

PCR 总反应体积 25 μ l, 其中基因组 DNA 25 ng, 引物 0.8 μ mol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l, MgCl₂ 1.5 或 2.0 mmol/L, Taq 酶 1.25 U。PCR 循环参数为: 95 预变性 5 min, 94 变性 30 s, 55 复性 30 s, 72 延伸 30 s, 35 个循环; 72 保温 7 min, 4 保存。扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检查。

1.3 SSCP

取 1 μ l PCR 产物加变性液 100 μ l 水浴变性 5 min, 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上样, 200 V 恒压电泳 15 ~ 21 h。电泳结束后凝胶 10% 乙醇浸泡 20 min, 1% 硝酸浸泡 5 min, 0.2% 硝酸银浸泡 20 min, 双蒸水充分淋洗, 以 0.25 mol/L Na₂CO₃ 溶液与 0.019% 甲醛配成的显色液显色, 10% 乙酸浸泡 10 min。

2 结 果

各标本基因组 DNA 的 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 值为 1.70 ~ 1.80, 表明所提取的 DNA 可用于 PCR 反应。

各标本的 hMSH2 外显子 5、6、7、8、9、12 PCR 反应均扩增到目的 DNA 片段; SSCP 银染检测结果均未发现异常泳动带型, 表明 30 例口腔鳞癌组织中 hMSH2 外显子 5、6、7、8、9、12 均未出现突变, 结果见图 1、2。

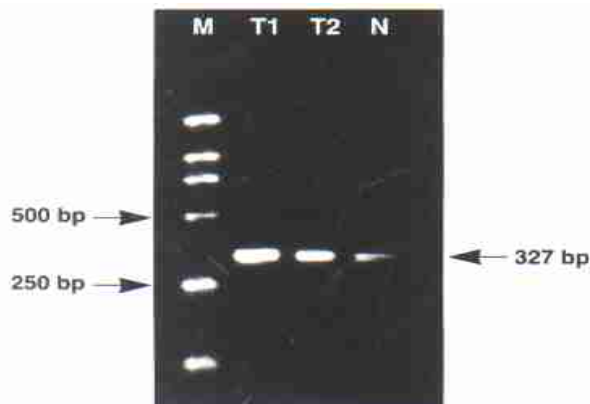


图1 口腔鳞癌组织 hMSH2 外显子 12 PCR 扩增电泳结果
M: DNA 分子标记物 DL2000, T1、T2: 口腔鳞癌组织, N: 正常口腔粘膜

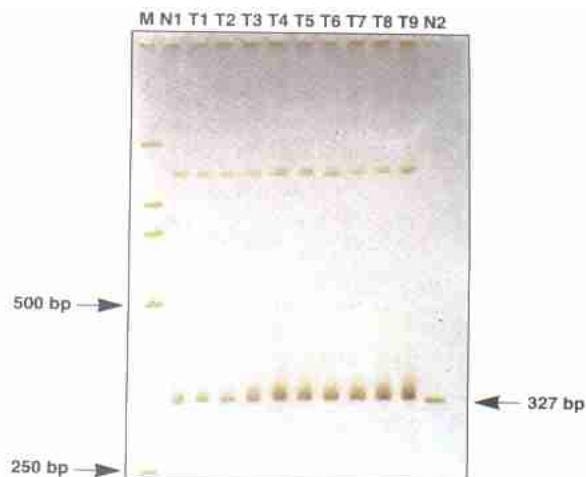


图2 口腔鳞癌组织 hMSH2 外显子 12 PCR 扩增产物 SSCP 银染结果
M: DNA 分子标记物 DL 2000, N1: 正常口腔粘膜, 未变性产物, 指示正常双链位置, T1 ~ T9: 口腔鳞癌组织, 变性产物, N2: 正常口腔粘膜, 变性产物, 指示正常单链位置

3 讨 论

研究表明, 错配修复基因的缺陷是 HNPCC 发病的遗传学基础, 并与 HNPCC 患者的化疗效果和预后相关。但错配修复基因在非遗传性肿瘤中的作用仍无明确的结论。与 HNPCC 相比, 散发性结肠癌中错配修复基因异常主要是 hMLH1, hMSH2 等位基因缺失、外显子突变等异常的发生率远低于 hMLH1, 而且只发生在微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 阳性肿瘤患者^{5,6}。散发性膀胱癌、子宫内膜癌、胃癌等肿瘤的相关研究也有类似的发现⁷⁻¹⁰。

研究^{11,12} 发现, 7% ~ 30% 的口腔粘膜癌前损害和鳞癌出现微卫星不稳定性, 提示在口腔鳞癌发生发展过程中, 可能发生 DNA 损伤修复缺陷。但目前有关口腔鳞癌与 hMSH2 等突变的关系报道很少。本研究初步观察到, 30 例口腔鳞癌样本 hMSH2 外显子 5、6、7、8、9、12 未发生突变。Wang 等¹³ 在 57 例头颈部鳞癌患者中也未发现 hMSH2 和 hMLH1 外显子的突变, 并与 MIS 状态无关。由此可见, 本研究与其它研究结果均说明, 口腔鳞癌等非遗传性肿瘤的 hMSH2 外显子突变热点、突变率等基因结构异常模式与 HNPCC 有明显的差异; 在非遗传性肿瘤中进行 hMSH3、hMSH6 等其他错配修复基因、hMSH2 其他外显子的相关研究, 以及 hMSH2 的转录、hMSH2 蛋白组学的研究十分必要。

参考文献

- 1 Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, et al. Human DNA repair genes. *Science*, 2001, 29(5507): 1284 ~ 1294
- 2 Yu Z, Chen J, Ford BN, et al. Human DNA repair systems: an review. *Environ Mol Mutagen*, 1999, 33(1): 3 ~ 20
- 3 Peltomaki P, Vasen HFA. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. *Gastroenterology*, 1997, 113(4): 1146 ~ 1158
- 4 Kolodner RD, Hall NR, Lipford J, et al. Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muri-Torre kindreds for msh2 mutations. *Genomics*, 1994, 24(3): 516 ~ 526
- 5 Shitoh K, Konishi F, Miyaki M, et al. Pathogenesis of non-familial colorectal carcinomas with high microsatellite instability. *J Clin Pathol*, 2000, 53(11): 841 ~ 845
- 6 Abe Y, Masuda H. Genetic alterations of sporadic colorectal cancer with high-level microsatellite instability, especially characteristics of primary multiple colorectal cancers. *J Surg Oncol*, 2000, 74(4): 249 ~ 256
- 7 杨志波, 刘倩, 任常山. 膀胱癌微卫星不稳定及 hMSH2 基因突变研究. *中国医科大学学报*, 1999, 28(6): 415 ~ 416
- 8 Ohwada M, Suzuki M, Saga Y, et al. Mutational analysis of

transforming growth factor beta receptor type and DNA mismatch repair genes in sporadic endometrial carcinomas with microsatellite instability. *Oncol Rep*, 2000, 7(4): 789 ~ 792

- 9 Sud R, Wells D, Talbot IC, et al. Genetic alterations in gastric cancers from British patients. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001, 126(2): 111 ~ 119
- 10 Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer*, 2000, 87(2): 200 ~ 203
- 11 HL-Naggar AK, Hurr K, Huff V, et al. Microsatellite instability in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Am J Pathol*, 1996, 148(6): 2067 ~ 2072
- 12 Field JK, Kiaris H, Howard P, et al. Microsatellite instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer*, 1995, 71(5): 1065 ~ 1069
- 13 Wang Y, Irish J, MacMillan C, et al. High frequency of microsatellite instability in young patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma: lack of involvement of the mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2. *Int J Cancer*, 2001, 93(3): 353 ~ 360

(2001-12-29 收稿)

(本文编辑 刘怡)

(上接第 140 页)

癌血管生成, 导致肿瘤组织缺乏必要的血供和营养, 而使肿瘤生长受到明显抑制。

此外, 本研究中还首次在光镜下观察到, E₁₁ 给药后颊癌组织同时还存在血栓形成及血管壁崩解破坏等血管系统结构受破坏的改变。与此相对应, 血管系统的超微结构也存在着异常改变, 如血管内皮细胞肿胀变性、血管壁受破坏而呈绒毛状突起及血栓形成等。究其原因, 这是由于 VEGF 除可促进肿瘤的血管生成, 且还有维持肿瘤血管的形态和结构的作用⁷, 所以当抗人 VEGF 单抗阻断 VEGF 作用后, 肿瘤血管系统缺乏 VEGF 重要的维持作用, 导致其形态和结构受到明显破坏。这一发现提示抗人 VEGF 单抗不仅可以抑制肿瘤新生血管的增生, 而且可以破坏肿瘤原有血管系统的结构。这对于抗人 VEGF 单抗的广泛应用具有重要的指导意义。因此, 本研究结果为开展应用该单抗进行以血管为靶的导向疗法来治疗口腔颌面部乃至其它部位的癌瘤提供了重要的理论依据。

参考文献

- 1 Antoso A, Del-Porto F, Di MC, et al. Vascular endothelial

growth factor: a key mediator of neoangiogenesis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 1997, 1(1-3): 17 ~ 25

- 2 Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 1997, 18(1): 4 ~ 25
- 3 杨西川, 王大章, 李虹, 等. 抗人血管内皮生长因子合成肽的 MAbs 杂交瘤细胞株的建立. *细胞与分子免疫学杂志*, 1998, 14(3): 208
- 4 房思炼, 王大章, 杨西川, 等. 抗人血管内皮生长因子单克隆抗体抑制人颊癌生长的实验研究. *华西口腔医学杂志*, 2002, 20(2): 89 ~ 91
- 5 Kim KJ, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature*, 1993, 362(6423): 841 ~ 844
- 6 Borgstrom P, Hillan KJ, Sriramarao P, et al. Complete inhibition of angiogenesis and growth factor neutralizing antibodies. Novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Res*, 1996, 56: 4032 ~ 4039
- 7 Potgens A. Analysis of the tumor vasculature and metastatic behavior xenografts of human melanoma cell lines transfected with vascular permeability factor. *Am J Pathol*, 1995, 146: 197 ~ 209

(2001-08-18 收稿)

(本文编辑 刘怡)