

[文章编号] 1007-385X(2004)04-

支气管上皮癌前病变 FHIT 基因稳定性及其蛋白表达

张黎歆, 彭凌, 杜平(解放军 305 医院病理科, 北京 100017)

FHIT 基因位于 3p14.2, 为肿瘤候选抑制基因。FHIT 异常表达广泛存在于肺、食管、胃、乳腺及肾脏等恶性肿瘤组织。实验表明 FHIT 参与细胞凋亡, FHIT 与 p53 的联合基因治疗, 启动两条或更多的凋亡途径, 可抑制肿瘤生长^[1]。近来 FHIT 基因在肺癌前病变发生中的作用引起了特别的关注, 因此我们对支气管上皮癌前病变 FHIT 基因稳定性及其蛋白表达进行检测, 为 FHIT 基因应用于肺癌前病变的早期诊断及预防治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验标本

临床标本来自山西省肿瘤医院、山西医科大学第一医院和第一军医大学南方医院 2000 年 11 月 ~ 2002 年 6 月手术切除的肺大体标本, 包括 230 例鳞状细胞癌(肺癌组)和 130 例肺炎性病变(主要包括肺炎性假瘤, 肺结核, 支气管扩张症, 以下通称为肺炎性病变组), 将 360 例 2360 个蜡块进行切片 HE 染色后, 显微镜下寻找各级增生病变。肺癌组筛选出 82 例, 其中正常上皮(BNE)16 例; 基底细胞增生(BCH)12 例; 鳞状上皮化生(SM)13 例; 轻度-中度不典型增生(MMD)10 例, 重度不典型增生-原位癌(S-C)11 例, 浸润性鳞状细胞癌(SSC)20 例。肺炎组筛选出 57 例, 正常上皮 16 例; 基底细胞增生 14 例; 鳞状上皮化生 16 例; 轻度-中度不典型增生 11 例。以上标本同时用于 FHIT 基因稳定性及其蛋白表达的检测。

1.2 对各级增生病变和癌组织进行微切割

在 Narishige 控制器上将直径 0.5 mm 空心玻璃管制成用于切割和吸取组织细胞的玻璃针, 在 Olympus 显微镜下对不封片 7 μ m 厚的石蜡切片寻找病变组织, 用切割玻璃针将病变组织与周围组织分割开, 再用吸取针吸取组织。采用配制的 DNA 裂解液, 56 $^{\circ}$ C 消化 24 h。采用常规酚/氯仿抽提 DNA; 紫外线分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度。

1.3 引物设计及合成

应用 Primer 5 引物设计软件设计引物: D3S1234, D3S1300, D3S1481, D3S1313 由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.4 PCR 扩增微卫星 DNA 片段、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

反应体积为 50 μ l 含模板 DNA 1 μ l, 10 \times Taq DAN 聚合酶 buffer 5 μ l, 1.5 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L dNTPS, 20 pmol 上、下游引物及 TaqDAN 聚合酶 1 U。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 54 $^{\circ}$ C ~ 60 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 40 次后, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。配制 12% 的变性聚丙烯酰胺凝胶。

1.5 染色及结果判断

银染参照谷志远主编的《现代医学分子生物学》银染法。结果判断: 与同一个体的正常肺组织或淋巴结比较, 若某一等位基因条带消失或相对密度减少 50% 以上, 则可判断为杂合性缺失(loss of heterozygosity, LHO); 如果肿瘤组织中出现正常对照没有的带型, 称为微卫星不稳定(microsatellite instability, MI)^[2]。

1.6 免疫组织化学分析

主要试剂为浓缩型兔抗人 FHIT 多克隆抗体, 抗体稀释度为 1:200。

1.7 统计学分析

用 SPSS10.0 进行 χ^2 检验。

2 结果与讨论

2.1 肺癌组 FHIT 基因 4 个微卫星位点 LOH 和 MI 发生率

微卫星位点 D3S1300 和 D3S1313 的 LOH 发生率均明显大于 MI 发生率, 分别为: 28.0% (23/82) > 9.8% (8/82); 29.3% (24/82) > 4.9% (4/82), P 值分别为 0.016 和 0.010, 差别有统计学意义。D3S1234 和 D3S1481 的 LOH、MI 发生率分别为: 30.5% (25/82) 和 9.8% (8/82), 28.0% (23/82) 和 9.8% (8/82)。 P 值分别为 0.177 和 0.200, 两者差异没有显示出统计学意义。

2.2 肺癌组和肺炎性病变组 FHIT 基因的 LOH 和 MI 发生率(见表 1)

联合检测微卫星位点 D3S1234、D3S1300、D3S1481、D3S1313 的 FHIT 基因阳性率(LOH 和 MI 发生率之和), 肺癌组和肺炎性病变组正常支气管上皮的 FHIT 阳性率分别为 18.8% 和 0.0%, 两者比较 P 值为

表1 肺癌组和肺炎性病变组的 FHIT 基因阳性率(LOH 和 MI 总发生率)比较

分组	n		D3S1234		D3S1300		D3S1481		D3S1313		P1/P2/P3/P4		
	A	B	A(%)	B(%)	A(%)	B(%)	A(%)	B(%)	A(%)	B(%)	A(%)	B(%)	P value
BNE	16	16	2(12.5)	0(0.0)	1(6.3)	0(0.0)	1(6.3)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(18.8)	0(0.0)	0.226
BCH	12	14	4(33.1)	1(7.1)	3(25.0)	1(7.1)	3(25.0)	0(0.0)	2(16.7)	0(0.0)	4(33.3)	1(7.1)	0.148
SM	13	16	4(30.8)	2(12.5)	4(30.8)	2(12.5)	6(46.2)	1(6.3)	4(30.8)	1(6.3)	7(53.8)	2(12.5)	0.041
MMD	10	11	6(60.0)	2(18.2)	3(30.0)	1(9.1)	6(60.0)	1(9.1)	4(40.0)	0(0.0)	7(70.0)	2(18.2)	0.030
S-C	11	-	6(54.5)	-	5(45.5)	-	6(54.5)	-	4(36.4)	-	9(81.8)	-	-
SCC	20	-	11(55.0)	-	7(70.0)	-	9(45.0)	-	14(70.0)	-	17(85.0)	-	-
sum	82	57	33(40.2)	5(8.8)	30(36.6)	4(7.0)	31(37.8)	2(3.5)	28(34.1)*	1(1.8)	47(57.3)	5(8.8)	
χ^2			10.214	3.080	17.415	2.017	11.844	2.458	21.603	2.608	22.235	3.080	
P value			0.069	0.379	0.004	0.569	0.037	0.483	0.001	0.456	0.000	0.379	

A: 肺癌组; B 肺炎性病变组 * : 肺癌组 82 例中, D3S1234, D3S1300, D3S1481, D3S1313 这 4 个位点之间的 LOH/MI 发生率比较 $\chi^2 = 0.679, P = 0.878$, P1/P2/P3/P4: 4 个位点 D3S1234/D3S1300/D3S1481/D3S1313 LOH/MI 发生率

0.226, 差别无统计学意义。肺癌组和肺炎性病变组基底细胞增生的 FHIT 阳性率分别为 33.3% 和 7.1%, 两者比较 P 值为 0.148, 差别无统计学意义。肺癌组和肺炎性病变组鳞状上皮化生的 FHIT 阳性率分别为 53.8% 和 12.5% 两者比较 P 值为 0.041, 差别有统计学意义。肺癌组轻-中度非典型增生的 FHIT 阳性率 70.0%, 与肺炎组轻-中度非典型增生的阳性率 2(18.2%) 比较, P 值为 0.030, 差别有统计学意义。肺癌组各增生病变比较, P 值为 0.000, 有显著性差异。肺炎性病变组各增生病变之间比较, P 值为 0.379, 差异无显著性。

2.3 FHIT 蛋白表达

肺癌组和肺炎性病变组正常支气管上皮的 FHIT 蛋白表达缺失率分别为 18.8% (3/16) 和 0.0% (0/16), 两者比较 P 值为 0.226, 差异没有显示出统计学意义。肺癌组与肺炎性病变组基底细胞增生的 FHIT 蛋白表达缺失率分别为 60% (6/10) 和 0.0% (0/11), 两者比较 P 值为 0.004, 差异有显著性。肺癌组与肺炎性病变组鳞状上皮化生 FHIT 缺失率分别为 60% (6/10) 和 16.7% (2/12), 两者比较 P 值为 0.074, 差异没有显示出统计学意义。肺癌组和肺炎性病变组正常支气管上皮、基底细胞增生和鳞状上皮化生总缺失率比较差异有显著性。

2.4 FHIT 基因稳定性与 FHIT 蛋白表达的关系

FHIT 蛋白表达缺失为 17 例, FHIT 基因 LOH/MI 为 16 例, 其中 15 例同时存在 FHIT 蛋白表达缺失和 FHIT 基因 LOH/MI, 两者间的关系系数 Kappa 值为 0.

883, Kappa 检验 P 值为 0.000, 表明 FHIT 基因 LOH/MI 与 FHIT 蛋白表达缺失间的关系具有统计学意义。

最近的研究表明, 以腺病毒为载体介导的 FHIT 和 p53 基因联合治疗, 可能是非小细胞肺癌或是其它肿瘤有效的治疗方案^[1]。另有报道, 通过 E1A 为载体的 FHIT 转基因治疗, 抑制了裸鼠体内恶性肿瘤细胞的生长, E1A 构建可望成为有价值的基因治疗工具^[2]。FHIT 基因可否用于肺癌前病变的治疗? 首先要弄清 FHIT 基因是否参与肺癌前病变的发生和发展。因此我们收集了临床手术切除的肺大体标本, 分为两组, 一组是肺癌, 另一组是肺炎性病变。在此分组的基础上, 检测 FHIT 基因在两组增生病变中是否存在差异。本实验采用的微卫星位点 D3S1234、D3S1300、D3S1481、D3S1313 位于外显子 4~6 之间, 是该基因频发缺失的集中位点^[3,4]。结果显示 4 个微卫星位点中的 1300 和 1313 2 个位点在各级增生病变中以 LOH 现象为主, MI 发生率较低。1234 和 1481 位点的 LOH 和 MI 比较差异无统计学意义。看来肺癌前病变 FHIT 基因异常不仅限于 LOH, MI 也是该基因异常的普遍现象。肺炎性病变组的 4 个微卫星位点的 FHIT 阳性率在正常上皮、基底细胞增生、鳞状上皮化生、轻-中度非典型增生之间无显著性差异, 而肺癌组中的 4 个微卫星位点的 FHIT LOH/MI 发生率在各级增生病变比较差异有显著性且逐步递增, 提示 FHIT 基因稳定性的改变在预测增生性病变的发展中有重要价值。即 FHIT 越稳定, 该增生病变预期的发展结果为炎性或良性的可能性大, FHIT 越不稳定, 该增生病变为真正癌前病变的可能性

越大。

肺癌组的鳞状上皮化生和轻度-中度非典型增生病变的 FHIT 阳性率(LOH/MI),均明显高于肺炎性病变组相对应的增生病变,具有显著性差异。但是肺癌组的正常支气管上皮和基底细胞增生病变的 FHIT 阳性率,与肺炎性病变组的支气管上皮和基底细胞增生比较差异没有显示出统计学意义,这或许与样本量有一定关系。总体来看肺癌组的支气管上皮增生病变和肺炎性病变组的支气管上皮增生病变确实存在差异。

在肺癌组的各级增生性病变中,从正常支气管上皮、基底细胞增生、鳞状上皮上皮化生到轻度-中度非典型增生病变 LOH/MI 阳性率逐渐增高。重度非典型增生-原位癌和鳞状细胞癌两组间的 FHIT 阳性率接近,分别为 81.8% 和 85.0%。鳞状细胞癌 FHIT 基因阳性检出率与有关文献报道的发生率相近^[5,6]。在肺炎性病变组的各级癌前增生病变的 FHIT 阳性率很少,明显低于肺癌组。表明 FHIT 基因的改变与肺癌发生的早期阶段密切相关。我们在癌旁的 16 例正常支气管上皮检测到 3 例 LOH/MI,癌旁基底细胞增生病变 FHIT 基因阳性率为 33%。而肺炎性病变组正常支气管上皮没有任何位点的丢失现象,基底细胞增生有一例发生 LOH。我们认为形态结构貌似正常的支气管上皮和基底细胞增生却发生了 FHIT 基因的丢失现象,并不能排除癌前病变的可能。因此对形态正常的 FHIT 基因阳性病理随访显得尤为重要。

随后我们应用免疫组织化学方法对两组支气管上皮、基底细胞增生和鳞状上皮化生病变进行了 FHIT 蛋白表达的检测。数据表明肺癌组中基底细胞增生和鳞状上皮化生病变的 FHIT 蛋白表达阴性率明显大于肺炎性病变组中的相应支气管上皮病变。肺癌组 FHIT

蛋白表达总缺失率比肺炎性病变组高 8 倍。在综合分析肺炎性病变和肺癌患者肺组织中的支气管上皮增生性病变的基础上,得出 FHIT 蛋白缺失同 FHIT 基因 LOH/MI 的一致性为 88.3%。通过对 FHIT 蛋白的分组检测比较进一步证实了 FHIT 是参与肺癌发生的早期抑癌基因。肺癌组的增生性病变与肺炎性病变组的增生性病变确实存在差异。传统“肺癌前病变”这一概念已不能完全满足肺癌早期诊断的实际要求。我们的结果提示 FHIT 可作为诊断支气管上皮和各级癌前病变及分析其预后的检测指标,为肺癌前病变的早期基因治疗和设计新药提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Nishizaki M, Sasaki J, Fang B, *et al.* Synergistic tumor suppression by coexpression of FHIT and p53 coincides with FHIT-mediated MDM2 inactivation and p53 stabilization in human non-small cell lung cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(16): 5745-5752.
- [2] Opalka B, Dickopp A, Kirch HC. Apoptotic genes in cancer therapy[J]. *Cells Tissues Organs*, 2002, 172(2): 126-32.
- [3] Chyczewski L, Niklinski J, Chyczewska E, *et al.* Morphological aspects of carcinogenesis in the lung[J]. *Lung Cancer*, 2001, 34 Suppl 2: S 17-25.
- [4] Sozzi G, Pastorino Ugo, Moiraghi L, *et al.* Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions[J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 5032-5037.
- [5] Venmans BJ, van Boxem TJ, Smit EF, *et al.* Outcome of bronchial carcinoma in situ[J]. *Chest*, 2000, 117(6): 1572-1576.
- [6] Pylkkanen L, Wolff H, Stjernvall T, *et al.* Reduced Fhit protein expression and loss of heterozygosity at FHIT gene in tumours from smoking and asbestos-exposed lung cancer patients[J]. *Int J Oncol*, 2002, 20(2): 285-290.

[收稿日期] 2004 - 05 - 10

[修回日期] 2004 - 08 - 20