

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)03-0225-05

小肝细胞癌患者染色体 1p36 杂合性缺失的特点

董 辉, 丛文铭*, 冼志红, 吴伟清, 王艳华, 吴孟超(第二军医大学 东方肝胆外科医院 病理科, 上海 200438)

[摘 要] **目的:** 探讨人类染色体 1p36 等位基因杂合性缺失在小肝细胞癌(small hepatocellular carcinoma, sHCC)发生发展中的作用及其与临床病理表现的关系。**方法:** 采用 PCR-非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色技术, 对 140 例信息性 sHCC 中 1p36 上 9 个多态性微卫星标志位点的杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)进行检测。**结果:** 本组 140 例 sHCCs 发生 LOH 的总频率为 65% (91/140), LOH 以 D1S507 最高, 为 40. 8% (31/76); 在肿瘤直径 ≤ 1 cm 的 HCC 中, D1S507 和 D1S2893 位点的 LOH 发生率显著高于直径 > 1 cm 组($P < 0.05$); 在 Edmondson 分级 \geq III 级的 HCC 中, D1S468、D1S2694 和 D1S243 位点 LOH 发生率明显高于 \leq II 级的 HCC($P < 0.05$); 包膜完整 HCC 中 D1S243 和 RIZ 位点的 LOH 发生率明显低于有包膜突破的 HCC($P < 0.05$); 女性患者中 RIZ 位点 LOH 发生率明显高于男性患者($P < 0.05$)。**结论:** sHCC 在人染色体 1p36 上存在多个 LOH 位点, 并与临床病理学参数之间有一定的相关性, 提示这些缺失区可能存在候选肿瘤抑制基因, 并与 sHCC 的发展和演进过程有关。

[关键词] 肝细胞癌; 杂合子缺失; DNA, 微卫星; 等位基因

[中图分类号] R730.231 **[文献标志码]** A

Loss of heterozygosity at chromosomal 1p36 in small hepatocellular carcinoma patients

DONG Hui, CONG Wen-ming*, XIAN Zhi-hong, WU Wei-qing, WANG Yan-hua, WU Meng-chao(Department of Pathology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate loss of heterozygosity (LOH) on the chromosomal region 1p36 in small hepatocellular carcinoma (sHCC) and discuss the association between microsatellite alterations and clinicopathological parameters of sHCC. **Methods:** The PCR-SSCP based microsatellite polymorphism analysis technique was performed on 140 informative cases of sHCC by using a panel of 9 polymorphic microsatellite markers in 1p36. **Results:** Ninety-one of informative 140 cases (65%) showed LOH on at least one locus. LOH was found most frequently at D1S507 (40. 8% , 31/76). LOH on D1S507, D1S2893 was more frequent in tumors less than 1 cm in size ($P < 0.05$). Similarly, LOH on D1S468, D1S2694 and D1S243 was frequently detected in cases with Edmondson grade higher than III ($P < 0.05$). LOH on D1S243, RIZ occurred more frequently in cases with absent or partially encapsulated tumor than in those with intact tumor capsule ($P < 0.05$). LOH frequency on RIZ was significantly higher in female patients than in male ($P < 0.05$). **Conclusion:** High frequent LOH on chromosome 1p is a common molecular event in sHCC. LOH at some particular loci is associated with certain clinicopathological parameters of sHCC, suggesting that some putative tumor suppressor genes may exist in these regions, which may play a role in the development and progression of sHCC.

[Key words] hepatocellular carcinoma; loss of heterozygosity; DNA; microsatellite; alleles gene

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(3): 225-229]

原发性肝癌是世界上发病率和病死率分别居第 5 位和第 3 位的恶性肿瘤^[1], 其中主要为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)。据 WHO 于 2005 年的统计, 全世界每年新增肝癌患者 62 万, 每年约 59 万人死于肝癌; 在我国每年有 20 ~ 30 万人死于肝癌^[2]。分子遗传学研究发现, 恶性肿瘤的发生与原癌基因活化和肿瘤抑制基因(tumor suppressor genes, TSGs)失活有关。检测杂合性缺失(loss of

heterozygosity, LOH)是定位和克隆新的 TSG 的基本手段。目前对小肝癌(small hepatocellular carcinoma, sHCC)患者染色体 1p 的 LOH 发生频率及其与

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30370645)。Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30370645)

[作者简介] 董辉(1976 -), 女, 辽宁省鞍山市人, 博士, 主要从事肝胆肿瘤分子病理学方面的研究

* Corresponding author. E-mail: wmcong@smmu.edu.cn

临床病理学参数间的关系少有报道。本研究分析了140例sHCC患者染色体1p36上9个微卫星位点的变异特点及其临床病理学意义,为探索sHCC的发生、发展机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

152例sHCC标本及相应非肿瘤肝组织取自第二军医大学东方肝胆外科医院病理科存档蜡块,其中有140例为各微卫星位点的信息性病例,男性119例,女性21例,年龄范围26~78岁,平均年龄为(49.3±9.9)岁。肿瘤直径为0.8~3.0 cm,其余12例非信息性病例则不包括在本研究内。

1.2 显微组织切割和DNA抽提

取石蜡包埋组织块,做8 μm连续组织切片,脱蜡至水,其中1张切片做H-E染色,用于作显微切割肿瘤组织对照。在体视显微镜下定位,用锐利刀片分别准确剔取肿瘤组织和癌旁肝组织,注意尽量减少肿瘤组织内间质成分。将剔取组织分别置于含100 μg/ml蛋白酶K的Eppendorf管内,于55℃温育过夜,然后按常规酚/氯仿法提取肿瘤及正常肝组织基因组DNA。

1.3 微卫星引物的合成

1号染色体短臂上9个微卫星位点引物的序列设计资料引自Genbank(表1),各多态位点引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 PCR扩增基因组DNA

总反应体积10 μl,10×PCR缓冲液1 μl,25 mmol/L MgCl₂ 0.6 μl,10 mmol/L dNTP 0.2 μl,上、下游引物各5 pmol,基因组DNA 50 ng,AmpliTaq Gold DNA聚合酶0.5 U。PCR反应采用Touchdown方法,在Biometra热循环仪上进行,反应条件:94℃ 12 min;94℃ 30 s,63℃ 60 s,每个循环降低0.5℃,72℃ 90 s,15个循环;94℃ 30 s,56℃ 60 s,72℃ 90 s,25个循环;72℃ 10 min。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测等位基因LOH

配制12%聚丙烯酰胺凝胶(30% Ar-Bis 4 ml, H₂O 4 ml, 5×TBE 2 ml,10% AP 70 μl,TEMED 3.5 μl)并灌胶,加1×TBE缓冲液于电泳槽中,取10 μl PCR反应产物加6×上样缓冲液,加热95℃ 5 min,冰上淬冷3 min,依据各位点片段大小100 V恒压电泳90~170 min不等。电泳后取下凝胶,固定液(10%乙醇+5%冰乙酸)固定10 min,0.2%硝酸银染色20 min,显色液(0.75 mol/L NaOH+40%甲醛)显色10 min,固定液终止显色。

表1 微卫星引物及其特征

Tab. 1 Primers and characteristics of microsatellite markers

Locus	Location	Primer sequences	Size (bp)
D1S243	1p36.3	CACACAGGCTCACATGCC GCTCCAGCGTCATGGACT	142~170
D1S468	1p36.3	AATTAACCGTTTTGGTCTT GCGACACACTTCCC	173~191
D1S2893	1p36.2	AAAACATCAACTCTCCCCTG CTCAAACCCCAATAAGCCTT	201~223
D1S2694	1p36.2	AGGTCCAAGAAGCGGAG TCACGGGTATTAAAGTGG	241~255
D1S434	1p36.2	AGCTAATTTACATTACCCAAAAAGA GCAGGTGGCACAGTGA	240~252
RIZ	1p36.2	GGTGAAAACGTAAATTCGAAACTG CAGAGCATAGTTGTCATTTGTCT	207
D1S507	1p36.1	AGGGGATCTTGGCACTTGG CTCTAGGGTTCTCGAAAATGCTG	183~203
D1S199	1p36.1	GGTGACAGACTGAGACCCTG CAAAGACCATGTGTCTCCGTA	94~116
D1S234	1p36.1	GCCCAGGAGGTTGAGG AAGGCAGGCTTGAATTACAG	268~294

1.6 凝胶电泳结果判读标准

将肿瘤组织DNA的PCR产物与相应正常肝组织DNA的PCR产物杂合性条带作比较,若肿瘤杂合性条带损失50%以上则判定为LOH。

1.7 统计学处理

应用Stata软件对微卫星位点LOH与其临床病理参数的关系进行Fisher确切概率检验或 χ^2 检验。

2 结果

2.1 sHCC微卫星变异的发生情况

在140例信息性sHCC病例中,于1p36处9个微卫星位点发生LOH的总频率为65%(91/140,图1),其中39例(42.9%)在一个位点发生LOH,28例(30.8%)在2个位点发生LOH,24例(26.4%)在3个或3个以上位点发生LOH,LOH发生率以D1S507(40.8%,31/76)为最高。各基因位点发生LOH的频率见图2。

2.2 sHCC微卫星LOH与sHCC临床病理学特征的关系

sHCC微卫星1p LOH及其与临床病理学特性的关系见表2。某些特定位点的LOH与sHCC临床病理学特征的相关性有统计学意义,具体如下:在

D1S507, D1S2893 位点,肿瘤直径 ≤ 1 cm 者 LOH 显著高于直径 > 1 cm 组;在 D1S468、D1S2694、D1S243 位点,Edmondson 分级 \geq III 级者 LOH 明显高于 \leq II 级者;此外,D1S468 位点,有癌栓者 LOH 发生率稍高于无癌栓者($P=0.051$);在 D1S243 和 RIZ 位点,包膜完整者 LOH 明显低于包膜突破者;在 RIZ 位点,女性患者 LOH 发生率高于男性($P < 0.05$)。

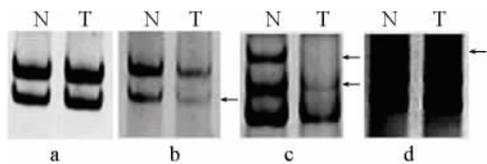


图1 部分病例微卫星位点的 LOH 电泳结果

Fig. 1 Electrophoretogram of LOH on some microsatellite loci in certain cases

a: Heterozygosity; b, c, d: Loss of heterozygosity. The arrows indicate LOH. N: Non-tumor liver tissue, T: Tumor tissue

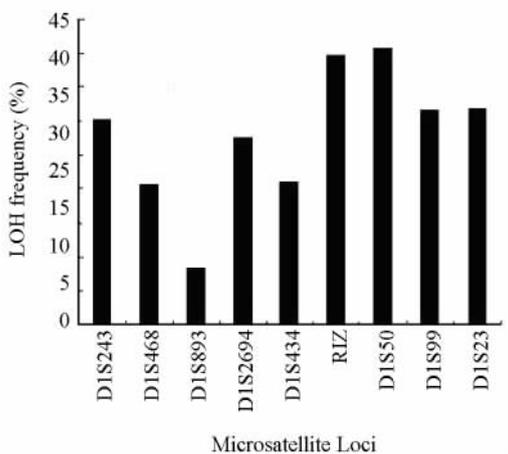


图2 sHCC 患者 1p36 各微卫星位点 LOH 的频率

Fig. 2 LOH frequency of each microsatellite locus on 1p36 in sHCC patients

3 讨论

肿瘤的发生和发展是组织细胞多基因、多阶段、多步骤变异的结果,对于某一个体患者而言,肿瘤的恶性演进涉及到一组而非单一基因的改变,累积的基因损伤将表现为特定的肿瘤基因型,呈现出肿瘤病理类型相关性。基因组微卫星多态性提供了大量高频的信息性位点,加之石蜡组织显微切割方法的应用,使得应用少量组织抽提 DNA 样本就能对肿瘤抑癌基因的 LOH 进行快速筛选,为探讨 HCC 早期进展过程中不同阶段的分子标记提供了可能^[3]。

在人类染色体中,人们之所以关注 1 号染色体,

是因为该染色体是人类 23 对染色体中最长的 1 条,特别是其短臂末端 1p36 区域内集中了许多与细胞生长调控以及增殖分化密切相关的重要基因,也往往是肿瘤相关基因存在的位置,因而一直是研究的热点。已有研究^[48]显示,人类肿瘤常发生 1p36 区域缺失(LOH),提示该区域存在重要的肿瘤抑制基因,如目前已发现在脑膜瘤、宫颈癌、结肠癌、乳腺癌、胆管癌以及 HCC 中均出现 1p36 微卫星变异,但对其在早期 sHCC 中的变异情况及其与临床病理学特征的关系少有报道^[9]。有鉴于此,本研究集中对 sHCC 的 1p36 上 9 个微卫星位点 LOH 进行研究。

本研究中,sHCC 的 1p36 杂合性缺失率为 65% (91/140),低于邵建永等^[10]报道的 84.2% (32/38)。推测 2 组结果存在差异的可能原因与所选择的检测位点不同及所选病例的差别等因素有关。后者检测的 38 例 HCC 中未按瘤体大小分组,而本组 140 例信息性 sHCC 直径均在 3cm 以下;此外,2 组研究所检测的微卫星位点中仅有两个相同,而不同位点的微卫星标志物会有不同的 LOH 频率。sHCC 在 1p36 的高 LOH 频率提示该区域存在多个与 HCC 发生相关的肿瘤抑制基因。

sHCC 各基因座 LOH 发生率以 D1S507 (40.8%, 31/76)最高,在此位点附近的已知基因包括 KIAA1026 和 IBD7,前者编码蛋白为 kazrin,是桥粒的组成部分,在分化的角质化细胞之间或核内可见,可能参与紧密连接和桥粒间的相互作用^[11];后者为炎症性肠病的相关基因,编码蛋白可能在某种炎症性肠病中发挥作用^[12],这两个基因与 HCC 发生发展之间有何关系尚未见报道,值得进一步研究。

p73 基因定位于 1p36 上 D1S468 位点^[13],D1S468 位点的 LOH 可能引起其附近基因的功能或表达改变。Aoki 等^[14]认为 p73 的 LOH 与染色体 1p 的 LOH 显著相关。p73 在 DNA 结合区具有顺式激活作用的寡核苷酸结构域与 p53 相似^[15],p73 某些功能也与 p53 相同,包括在体外过度表达时可以诱发细胞凋亡、上调参与细胞周期调控的 p53 的效应基因如 p21 基因等。在乳腺癌和成神经细胞瘤等肿瘤中,p73 基因的 LOH 与肿瘤的分级相关,在早期肿瘤的 LOH 率显著低于进展期肿瘤^[16-17]。本研究中 D1S468 的 LOH 频率为 20.8%,在 Edmondson \geq III 级组与 Edmondson \leq II 级组之间 LOH 发生率差异($P=0.029$)有统计学意义;有癌栓组 LOH 发生率有高于无癌栓组的趋势,但没有统计学意义。此结果提示 p73 基因可能在 HCC 发生发展过程中起重要作用,并且与肿瘤分级和血管侵犯相关,可以作

为评价 sHCC 生物学行为的辅助指标之一。从而可以针对此基因设计新的基因治疗方案,代偿突变基因的功能,减少其播散和转移,改善预后^[14]。Sunamura等^[18]就应用选择性复制的溶瘤腺病毒,以

基因组不稳定的肿瘤抑制基因 *TP53* 为靶点治疗胰腺癌,并在实验动物中明显降低了肿瘤的腹腔内播散。

表 2 1p36 9 个位点 LOH 与 sHCC 临床病理学特征的关系

Tab. 2 Correlation between sHCC clinicopathological features and LOH at 9 loci on chromosome 1p36

Clinical parameters	D1S243	D1S468	D1S2893	D1S2694	RIZ	D1S507	D1S199	D1S434	D1S234
Gender									
Male	24/79	15/63	5/67	24/79	20/60*	25/62	19/54	12/51	18/52
Female	4/13	1/14	2/16	2/15	9/13	6/14	0/6	1/12	4/15
Age(t/a)									
< 50	19/50	11/43	4/45	12/47	12/38	16/36	10/32	6/32	11/34
≥ 50	9/42	5/34	3/38	14/47	17/35	15/40	9/28	7/31	11/33
AFP(ρ _B /μg · L ⁻¹)									
< 25	8/41	3/30	0/35	10/43	8/32	12/36	7/23	4/28	7/30
> 25, < 1000	17/38	11/36	5/39	14/42	15/29	14/29	9/26	7/29	13/30
≥ 1000	3/13	2/11	2/9	2/9	6/12	5/11	3/11	2/6	2/7
Tumor size(l/cm)									
≤ 1	5/10	2/9	3/7 [△]	2/10	2/6	3/9 [△]	3/5	2/3	3/5
> 1, ≤ 2	18/58	11/47	4/51	21/62	23/52	23/42	13/38	9/42	15/43
> 2, ≤ 3	5/24	3/21	0/25	3/22	4/15	5/25	3/17	2/18	4/19
Edmondson grade									
I, II	7/39 [▲]	3/33 [▲]	1/33	6/38 [▲]	14/34	8/29	5/19	6/30	6/28
III, IV	21/53	13/44	6/50	20/56	15/39	23/47	14/41	7/33	16/39
Tumor capsule									
Intact	10/49 [□]	7/46	3/44	12/48	13/43 [□]	16/39	11/23 [□]	8/39	11/37
Absent/not intact	18/43	9/31	4/39	14/46	16/30	15/37	8/37	5/24	11/30
Thrombosis									
Present	12/27	6/15	3/23	9/27	9/18	9/18	6/27	2/8	8/17
Absent	16/65	10/62	4/60	12/67	20/55	22/58	13/33	11/54	13/49
HBsAg									
Positive	26/79	14/67	6/70	21/78	22/60	23/60	15/48	10/51	19/56
Negative	2/13	1/9	1/13	4/15	7/13	8/16	4/12	3/10	2/10

* P < 0.05 vs female; [△]P < 0.05 vs tumor size > 1cm; [▲]P < 0.05 vs Edmondson grade III, IV; [□]P < 0.05 vs tumor capsule absent/not intact

1p 最短重叠区域位于 D1S2893-D1S450 (1p36. 32-p36. 22, 5.1 Mb) 之间, 本研究中 D1S2893 位点 LOH 在肿瘤直径 < 1cm 患者组为

42. 9%, 在肿瘤直径 > 1 cm 组为 7. 8%, 两者差别有统计学意义(P < 0. 05), 说明此位点附近可能存在新的候选肿瘤抑制基因, 参与肝细胞癌的启动, 而在

肿瘤的进展期则相对稳定。

在肿瘤分化分级方面,除了 D1S468 外, D1S243 和 D1S2694 两个位点的 LOH 在 I ~ II 级和 III ~ IV 级两组 sHCC 之间也表现出统计学差异。目前已知 D1S243 处存在 CCV(cataract, congenital, volkmann type)基因,是一种先天性白内障致病基因; D1S2694 位点存在 CAMTA1(calmodulin binding transcription activator 1)基因,有研究^[19]表明,在成神经细胞瘤细胞中 CAMTA1 的编码蛋白在细胞周期 S 和 M 期表达,在分裂后期下降,提示其可能参与细胞周期调控和诱导细胞分化。Henrich 等^[20]发现成神经细胞瘤中 CAMTA1 的低表达与预后呈显著相关,但这两个基因与 HCC 发生之间有无关系尚不清楚。本研究初步显示 D1S2694 的 LOH 与 sHCC 分级有关,是否提示 CAMTA1 可能与 sHCC 由高分化向低分化演变有关尚需进一步研究。此外, D1S243 和 RIZ 的 LOH 发生率在包膜不完整组中明显高于包膜完整者,提示这些位点的候选肿瘤抑制基因可能在 HCC 的侵袭和转移过程中发挥重要作用。本研究提出了与 sHCC 早期进展过程相关的某些特定微卫星位点,可作为评估 sHCC 生物学行为特征的分子参考标志,有必要对这些位点附近可能存在的候选肿瘤抑制基因做进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Zender L, Xue W, Cordon-Cardo C, *et al.* Generation and analysis of genetically defined liver carcinomas derived from bipotential liver progenitors[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005, 70: 251-261.
- [2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002[J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2):74-108.
- [3] 丛文铭, Finkelstein SD, Demetris AJ, 等. 显微切割法对肝细胞癌抑癌基因杂合性缺失的研究[J]. *肿瘤*, 2003, 23(01): 19-21.
- [4] Piaskowski S, Rieske P, Szybka M, *et al.* GADD45A and EPB41 as tumor suppressor genes in meningioma pathogenesis[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2005, 162(1): 63-67.
- [5] Cheung TH, Chung TK, Poon CS, *et al.* Allelic loss on chromosome 1 is associated with tumor progression of cervical carcinoma [J]. *Cancer*, 1999, 86(7):1294-1298.
- [6] Limpiboon T, Tapdara S, Jearanaikoon P, *et al.* Prognostic significance of microsatellite alterations at 1p36 in cholangiocarcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(27):4377-4382.
- [7] Nishimura T, Nishida N, Itoh T, *et al.* Discrete breakpoint mapping and shortest region of overlap of chromosome arm 1q gain and 1p loss in human hepatocellular carcinoma detected by semiquantitative microsatellite analysis[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005, 42(1): 34-43.
- [8] Bieche I, Khodja A, Lidereau R. Deletion mapping of chromosomal region 1p32-pter in primary breast cancer[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999, 24(3):255-263.
- [9] Sun M, Eshleman JR, Ferrell LD, *et al.* An early lesion in hepatic carcinogenesis: loss of heterozygosity in human cirrhotic livers and dysplastic nodules at the 1p36-p34 region[J]. *Hepatology*, 2001, 33(6): 1415-1424.
- [10] 邵建永, 李晓明, 刘宗石, 等. 原发性肝细胞癌 1 号染色体杂合子丢失的初步研究[J]. *中华病理学杂志*, 1999, 28(01): 28-30.
- [11] Groot KR, Sevilla LM, Nishi K, *et al.* Kazrin, a novel periplakin-interacting protein associated with desmosomes and the keratinocyte plasma membrane[J]. *J Cell Biol*, 2004, 166(5): 653-659.
- [12] Crawford NP, Colliver DW, Funke AA, *et al.* Characterization of genotype-phenotype relationships and stratification by the CARD15 variant genotype for inflammatory bowel disease susceptibility loci using multiple short tandem repeat genetic markers[J]. *Hum Mutat*, 2005, 25(2):156-166.
- [13] Perri P, Praml C, Savelyeva L, *et al.* Fine mapping of distal 1p loci reveals TP73 at D1S468[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1999, 84(1-2):111-114.
- [14] Aoki T, Miyamoto A, Marubashi S, *et al.* Clinical value of alterations in p73 gene, related to p53 at 1p36, in human hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(2): 441-446.
- [15] Thanos CD, Bowie JU. p53 Family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins[J]. *Protein Sci*, 1999, 8(8): 1708-1710.
- [16] Ichimiya S, Nimura Y, Kageyama H, *et al.* p73 at chromosome 1p36.3 is lost in advanced stage neuroblastoma but its mutation is infrequent[J]. *Oncogene*, 1999, 18(4):1061-1066.
- [17] Dominguez G, Silva J, Silva JM, *et al.* Clinicopathological characteristics of breast carcinomas with allelic loss in the p73 region[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2000, 63(1):17-22.
- [18] Sunamura M, Oonuma M, Motoi F, *et al.* Gene therapy for pancreatic cancer targeting the genomic alterations of tumor suppressor genes using replication-selective oncolytic adenovirus[J]. *Hum Cell*, 2002, 15(3):138-150.
- [19] Nakatani K, Nishioka J, Itakura T, *et al.* Cell cycle-dependent transcriptional regulation of calmodulin-binding transcription activator 1 in neuroblastoma cells[J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(6): 1407-1412.
- [20] Henrich KO, Fischer M, Mertens D, *et al.* Reduced expression of CAMTA1 correlates with adverse outcome in neuroblastoma patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(1): 131-138.

[收稿日期] 2006 - 12 - 28

[修回日期] 2007 - 04 - 25

[本文编辑] 韩 丹