

肝细胞癌基因组 5q13.2 与 8p23.1 位点的杂合性缺失分析

赵 璋¹, 张 宁¹, 龙 江², 张 蓓¹, 何肖敏¹, 黄 坚¹

(1. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050;

2. 首都医科大学附属北京佑安医院, 北京 100069)

摘 要: [目的] 分析肝细胞癌(HCC)中 5q13.2 和 8p23.1 位点的杂合性缺失(LOH)情况, 以探索新的抑癌基因。[方法] 应用聚合酶链反应—非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法对 83 例 HCC 患者基因组 DNA 中的 5q13.2 和 8p23.1 位点的 LOH 进行检测, 并将其与临床参数进行关联分析。[结果] 83 例 HCC 患者基因组中, 36.1%(30 例)存在 5q13.2 位点 LOH, 在该位点存在 *OCLN*, *SMN2*, *SERF1A*, *SMN1*, *NAIP* 和 *GTF2H2* 基因; 8p23.1 的 D8S503 和 D8S1130 位点分别存在 68.4% 和 61.3% 的 LOH。[结论] HCC 患者基因组中存在较高频率的 5q13.2 和 8p23.1 位点 LOH, 这些位点中可能存在与 HCC 发生密切相关的基因。

关键词: 杂合性缺失; 肝细胞癌; 基因

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)01-0034-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.01.B008

Loss of Heterozygosity in Two Distinct Regions, 5q13.2 and 8p23.1 in Hepatocellular Carcinoma

ZHAO Zhang¹, ZHANG Ning¹, LONG Jiang², et al.

(1. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. Beijing You-An Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the frequency of loss of heterozygosity (LOH) at 5q13.2 and 8p23.1 in hepatocellular carcinoma (HCC), and to explore possible tumor suppressor genes in the loci. [Methods] The frequency of LOH at 5q13.2 and 8p23.1 were analyzed in 83 cases with HCC by polymerase chain reaction-polyacrylamide gel electrophoresis. Correlation analysis were performed between the frequency of LOH and clinicopathological characteristics of HCC. [Results] Thirty of 83 HCC cases were identified with LOH(36.1%) at 5q13.2, where a series of functional genes were harbored such as *OCLN*, *SMN2*, *SERF1A*, *SMN1*, *NAIP* and *GTF2H2*. The frequencies of LOH at D8S1130 and D8S503 in 8p23.1 were 61.29% and 68.4% respectively. [Conclusion] In the genome of HCC, there are high frequency of LOH at 5q13.2 and 8p23.1, where critical genes associated with the development of HCC may harbor.

Subject words: loss of heterozygosity; hepatocellular carcinoma; gene

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,但其发生、发展及转移的内在分子机理仍未得到很好的阐明,一直是肿瘤研究领域的热点^[1]。众所周知,绝大多数(90%)HCC 都是在慢性肝病/肝硬化的背景上发展起来的,一般

都是一个渐进的过程。而肝硬化异型增生结节为 HCC 的癌前病变,其直径多为 1~1.5cm,可单发或多发^[2]。由肝硬化异型增生结节发展为 HCC 的分子机制目前并不是很明确,近年来肿瘤分子遗传学研究表明癌的发生涉及多个因素参与,其中原癌基因的激活和抑癌基因的失活起了相当关键的作用,而抑癌基因作用机制的研究越来越受到人们的重视,染色体杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH)等遗传变异正是引起抑癌基因失活的可能机制^[3,4]。

基金项目: 王宝恩肝纤维化基金(20100013);北京市自然科学基金(7132058)

通讯作者: 黄坚, 研究员, 博士;首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心, 肝硬化转化医学北京市重点实验室, 北京市西城区永安路 95 号(100050); E-mail: hjlq123@yeah.net

收稿日期: 2014-03-11; **修回日期:** 2014-07-19

近年来通过比较基因组学方法在 HCC 中发现较高频率的非随机基因组扩增和缺失,同时,很多研究发现 HCC 基因组 1p、4q、6q、8p、13q、16q 和 17p 位点存在较高频率的 LOH,提示这些基因组位点有多种癌基因和抑癌基因的存在^[5]。

我们的前期研究通过采用微阵列比较基因组杂交技术从全基因组范围分析了肝硬化异型增生细胞的基因组失衡,筛选出部分基因组位点的扩增和缺失,其中 5q13.2 和 8p23.1 位点的缺失出现比较频繁。本研究拟通过检测该两个位点在 HCC 患者基因组中的缺失情况,分析其是否有可能参与 HCC 的发生过程及其中可能存在的抑癌基因。

1 资料与方法

1.1 研究对象及标本来源

以 2011 年 5 月至 2013 年 4 月就诊于首都医科大学附属北京友谊医院和北京佑安医院的 83 例 HCC 为病例组,其中男性 72 例,女性 11 例,年龄范围 22~80 岁,平均年龄 52.1 岁(Table 1),采用来自首都医科大学附属北京友谊医院的 50 例正常体检人群血液标本作为对照。病例标本均为福尔马林固定石蜡包埋组织,均经 HE 染色组织病理学鉴定,肿瘤按 AJCC 标准分为 TNM 分期 I 期(早期)以及其

他分期(非早期)。

1.2 主要试剂

石蜡包埋基因组 DNA 提取试剂盒以及血液基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司,GoTaq 热启动 DNA 聚合酶、dNTP 混合物、GoTaq 无色混合 Mix 均购自 Promega 公司,5q13.2、8p23.1 位点 LOH 检测特异性 PCR 引物由北京迪纳兴科生物科技有限公司合成,其中 5q13.2 的 PCR 引物序列第 1 对(5q1)为:5'-TAACCTAGGCGTGGGATAGG-3' (正向),5'-AAGTGAAAGCCAGCCACAAC-3' (反向);第 2 对(5q2)5'-AGCAAAGCACACCTTGAATG-3' (正向),5'-ATGAATACAGCCAGGGCAAC-3' (反向);管家基因 *GADPH* 的引物序列 5'-AACGTGTCAGTG-GTGGACCTG-3' (正向),5'-AGTGGGTGTCGCT-GTTGAAGT-3' (反向)。8p 的 D8S503 位点 PCR 引物序列:5'-GGTTACGAGTTTTGTCCTTTG-3' (正向),5'-GAAACAAACCAATGTAGGAGTG-3' (反向);D8S1130 的 PCR 引物序列 5'-GAAGATTTGGCTCT-GTTGGA-3' (正向),5'-TGTCTTACTGCTATAGCTT-3' (反向)。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取

根据 HE 染色病理切片,由北京友谊医院病理科资深病理医生确定肿瘤细胞范围。从石蜡组织切片中分别分离 HCC 细胞,按照丙酮提取方法,将分离的组织放入 500μl 二甲苯中脱蜡 15min,离心 14 000r/min,15min,弃上清;加入 500μl 无水乙醇,离心 14 000r/min,10min,弃上清。无水乙醇挥发后加入丙酮 50μl,离心弃上清;加入 30~50μl 蛋白酶 K 混合液,混匀,55℃水浴 3h,之后水浴 99℃10min 灭活蛋白酶,即为提取的 DNA,超微量分析仪定量后保存在-20℃冰箱备用。血液标本按照血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书方法提取基因组 DNA,超微量分析仪定量后保存在-20℃冰箱备用。

1.3.2 5q13.2 位点缺失的检测

采用 20μlPCR 反应体系,取 Go-Taq 无色混合 Mix 10μl,5q 上下游引物各 0.4μl,管家基因 *GADPH* 上下游

Table 1 Clinicopathological characteristics of patients with HCC

Characteristics	Cases available for LOH analysis of microsatellite loci[n(%)]		
	5q13.2	8p23.1 (D8S503)	8p23.1 (D8S1130)
Case number	83	38	31
Mean age (range)(years old)	52.1 (30~80)	52.8 (29~78)	54.1 (29~78)
Gender			
Male	72 (86.7)	35 (92.1)	27 (87.1)
Female	11 (13.3)	3 (7.9)	4 (12.9)
Tumor stage(TNM)			
Stage I	47 (56.6)	23 (60.5)	16 (51.6)
>Stage I	36 (43.4)	15 (39.5)	15 (48.4)
HBV infection*			
Positive	70 (84.3)	32 (84.2)	26 (83.9)
Negative	9 (10.8)	4 (10.5)	3 (9.7)
Differentiation			
Well	13 (15.7)	7 (18.4)	4 (12.9)
Moderate	43 (51.8)	19 (50.0)	16 (51.6)
Poor	27 (32.5)	12 (31.6)	11 (35.5)

Note:*, 4 of the 5q13.2 and 2 of the 8p23.1 samples infected with HCV were not included.

引物各 0.4μl,模板 DNA2μl,去离子水 6.4μl。PCR 反应条件:95℃预变性 5min; 然后 95℃变性 60s,5q 的两对引物分别于 61℃和 55℃退火 60s,72℃延伸 70s,共扩增 30 个循环;最后 72℃延伸 5min。PCR 完毕,在 20μlPCR 反应产物中加入 6×loading buffer 4μl,混匀,取其中 10μl 用于 8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,8%非变性聚丙烯酰胺凝胶的配置:30%聚丙烯酰胺 4ml,10×TBE 1.5ml,10%过硫酸胺 (APS) 250μl,TEMED(灌胶前加入)12.5μl,ddH₂O 为 9.5ml,共计 15ml。电泳电压 120V,时间 45min,然后采用电泳凝胶成像仪照相后,使用 Gel-Pro analyzer 4.0 系统进行分析扫描。

LOH 判断标准参照顾建人等的方法^[6],以管家基因 *GADPH*(106bp)作为对照, $R_{\text{癌}}/R_{\text{癌旁}} \leq 2/3$ 定义为存在 LOH,其中 $R_{\text{癌}}$ 为肝癌组织 5q13.2 信号值/*GADPH* 信号值, $R_{\text{癌旁}}$ 为对应癌旁组织 5q13.2 信号值/*GADPH* 信号值。如无相对应的癌旁组织,取 5 例典型癌旁组织的平均值计算。

1.3.3 8p 位点 LOH 的检测

采用 25μlPCR 反应体系,5×Colorless GoTaq Flexi Buffer 5μl,25mmol/L MgCl₂ 2μl,200μmol/L dNTP 0.5μl,5u/μl GoTaq Hot Start Polymerase 0.15μl,8p 上下游引物各 0.4μl,模板 DNA 2μl(浓度约 100ng/μl),去离子水 14.55μl。PCR 反应条件:95℃预变性 5min; 然后 95℃变性 60s,8p 的两对引物分别于 59℃和 53℃退火 60s,72℃延伸 70s,共扩增 30 个循环;最后 72℃延伸 5min。PCR 完毕,在 20μlPCR 反应产物中加入 6×loading buffer 4μl,混匀,取其中 10μl 用于 8%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳电压 120V,时间 45min,采用电泳凝胶成像分析系统照相后,使用 Gel-Pro analyzer 4.0 系统进行分析扫描。

参照 Tomlinson 等的判断标准,当正常组织 DNA 扩增产物凝胶条带有 2 条带以上者判断为杂合性,为有意义信息个体;若仅有 1 条带判断为纯合性个体,为无意义信息个体。肿瘤标本中的一条带减弱 50%以上或消失,判断为 LOH^[3]。假如一个肿瘤 DNA 位点 LOH 缺失率>30%,则提示有抑癌基因的存在,可认为此位点与肿瘤有相关

性。对出现 LOH 阳性结果者均再次重复验证。即 T₁:T₂/P₁:P₂ 小于 0.5 或大于 2.0 判断为 LOH。其中 T₁ 与 T₂ 分别代表肿瘤组织的两个条带,P₁ 与 P₂ 分别代表癌旁组织相关的两个条带。

1.4 统计学处理

应用 SAS9.2 软件进行统计学分析,统计方法为 χ^2 检验、连续校正卡方检验或 Fisher 精确概率法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 5q13.2 位点的 LOH 及其与临床参数的相关性分析

由于所检测的 5q13.2 位点(68941167-70587321)目前尚无微卫星标记,本研究以管家基因作为对照,通过设计两对引物检测 5q13.2 位点中 *GTF2H2* 基因两端的序列来进行 5q13.2 位点的 LOH 研究^[7]。在 83 例 HCC 患者中,有 30 例(36.1%)的患者存在 5q13.2 位点的 LOH(Figure 1)。此外,在 50 例正常体检人群中未发现 5q13.2 位点的缺失。HCC 患者与正常体检者的 5q13.2 区域缺失频率差异有统计学意义(Table 2)。

对 HCC 样本进行 5q13.2 位点的缺失与临床参数的相关性分析,结果显示 5q13.2 位点的缺失与肿瘤的分期,HBV 感染和肿瘤细胞的分化程度均无关(Table 3)。

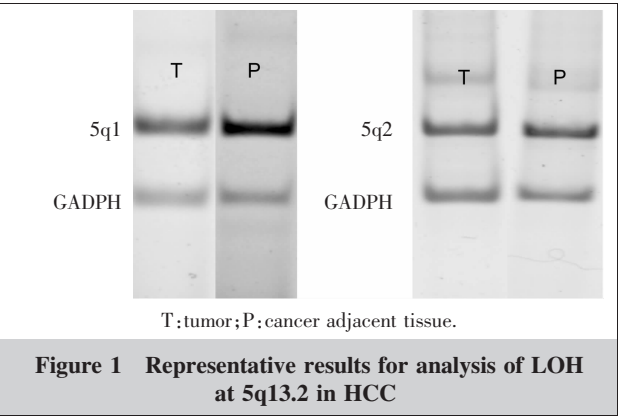


Table 2 Comparison of frequency of LOH at 5q13.2 in HCC and healthy controls

Groups	N	LOH	Without LOH	Frequency of LOH(%)	χ^2	P
HCC	83	30	53	36.1	21.01	<0.001
Healthy control	50	0	50	0		
Total	133	30	103			

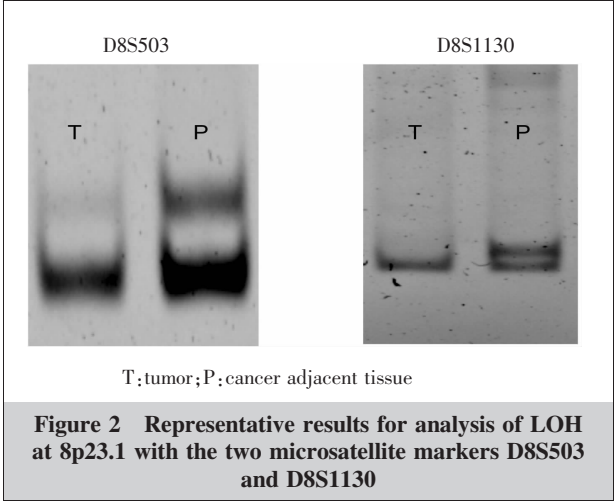
Table 3 Association between the frequency of LOH at 5q13.2 and clinical parameters of HCC

Characteristics	N	LOH		χ^2	P
		Case number	Frequency(%)		
TNM stage					
Stage I	47	17	36.2	0.05	0.823
>Stage I	36	13	36.1		
HBV infection*				-	0.289**
Negative	9	5	55.6		
Positive	70	25	35.7		
Differentiation				0.13	0.718
Well+Moderate	56	19	33.9		
Poor	27	11	40.7		

Note: *: 4 HCC cases with HCV positive were not included; **: Fisher's exact test.

2.2 8p23.1 位点的 LOH 及其与临床参数相关性分析

8p23.1 位点的 LOH 检测结果显示, 在 83 例 HCC 患者中, 两个微卫星标记 D8S503 和 D8S1130 分别有 38 例和 31 例为信息有意义的结果(informative cases), 对于 D8S503 (136bp), 38 例 HCC 中有 26 例患者存在基因组的 LOH (68.4%), 对于 D8S1130(145bp), 31 例 HCC 中有 19 例患者存在基因组的 LOH(61.3%)(Figure 2)。



对 HCC 样本进行 D8S503 和 D8S1130 的 LOH 与临床参数的相关性分析, 结果显示 8p23.1 位点两个微卫星标记的缺失与肿瘤的分期, HBV 感染和肿瘤细胞的分化程度均无关(Table 4, 5)。

3 讨 论

多个研究表明, 肝癌的发生、发展与多染色体的

缺失有关, 在染色体 1p、1q、4q、6q、8p、9p、10q、13q、14q、16q、17p 和 22q 等区域可能存在多个与 HCC 有关的肿瘤抑制基因^[3]。例如, 以前研究描述了在 4q26 位点的基因 *PRDM5* 的缺失是引起包括 HCC 在内的多种肿瘤发生的抑癌基因, 它编码的蛋白属于 PR 结构域蛋白家族。在 13q33.3-q34 区域存在抑癌基因 *P33ING1*, 该基因的过度表达抑制细胞周期的连续性, 该基因的抑制作用可通过增强 Ras/Raf 通路实现。在 16q22.1 位点的钙黏附蛋白(*CDH1*)的表达降低通过甲基化机制实现, 在 HCC 中还未发现有关该基因的体细胞突变。频繁的 17p 的缺失影响在 17p13.1 的抑癌基因 *tp53*, *tp53* 在包括 HCC 在内的多种恶性肿瘤中频繁失活^[5]。

我们前期研究通过对肝硬化异型增生细胞, 即所谓 HCC 癌前病变细胞的基因组 DNA 进行了 Ar-

Table 4 Association between the frequency of LOH at 8p23.1 (D8S503) and clinical parameters of HCC

Characteristics	N	LOH		P**
		Case number	Frequency(%)	
TNM stage				
Stage I	23	16	69.6	1.000
>Stage I	15	10	66.7	
HBV infection*				1.000
Negative	4	3	75.0	
Positive	32	22	68.8	
Differentiation				0.461
Well+Moderate	26	19	73.1	
Poor	12	7	58.3	

Note: *: 2 HCC cases with HCV positive were not included; **: Fisher's exact test.

Table 5 Association between the frequency of LOH at 8p23.1 (D8S1130) and clinical parameters of HCC

Characteristics	N	LOH		P**
		Case number	Frequency(%)	
TNM stage				
Stage I	16	9	56.3	0.715
>Stage I	15	10	66.7	
HBV infection*				0.269
Negative	3	3	100.0	
Positive	26	15	57.7	
Differentiation				1.000
Well+Moderate	20	12	60.0	
Poor	11	7	63.6	

Note: *: 2 HCC cases with HCV positive were not included; **: Fisher's exact test.

ray CGH 的检测,发现 5q13.2 和 8p23.1 位点的缺失出现频率较高,通过本研究在 HCC 中得到验证,说明这两个位点的缺失可能与肝硬化进展为 HCC 有关联,在这两个位点中可能存在肿瘤抑制基因。

5q 的改变与多种疾病的发生相关,例如骨髓异常综合征就与 5q 的缺失有密切关系^[9]。5q 位点的 LOH 也是比较常见的与消化道肿瘤相关的染色体改变,目前已经明确的与结直肠癌发生相关的 *APC* 基因定位于 5q21 上^[10]。非肝硬化引起的肝细胞癌的发生与 5q35 末端的突变有关^[11]。5q13.2 位点的片段缺失在其他肿瘤中有报道^[12],但在 HCC 中未见报道。5q13.2 位点包含了 *OCLN*、*SMN2*、*SERF1A*、*SMN1*、*NAIP* 和 *GTF2H2* 基因的部分或全部片段^[13]。其中 *GTF2H2* 基因属于雌激素信号通路基因,与乳腺癌的发生有关^[14],5q13.2 位点的其他已知基因与肿瘤的关系研究较少,是否还存在其他未知的肿瘤相关基因有待进一步研究。

有关 8p23 位点的 LOH 已有很多研究。8p 位点的染色体畸变在众多人类肿瘤频率是最高的,已在 8p 位点发现一些抑癌基因^[8],如 8p23 的 *PINX1*、8p22 的 *FGL1* 以及 8p22-p21.3 区域的 *DLC1* 等。与其他研究类似,本研究发现在 HCC 中存在较高频率的 8p23.1 的 LOH。8p23.1 位点及其附近的区域中存在 *ANGPT2*、*AGPAT5*、*LOC648814*、*DEFB 137*、*DEFB 136*、*LONRF1* 和 *FLJ36980* 等基因。通过对这些基因的研究,在 HCC 中没有明显的分子改变,显示这些基因与肿瘤的发生没有太密切的关系^[7],因此 8p23.1 位点缺失与肿瘤的关系有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Niketeghad F, Decker H J, Caselmann WH, et al. Frequent genomic imbalances suggest commonly altered tumour genes in human hepatocarcinogenesis [J]. Br J Cancer, 2001, 85(5): 697-704.
- [2] Di Tommaso L, Sangiovanni A, Borzio M, et al. Advanced precancerous lesions in the liver [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterology, 2013, 27(2): 269-284.
- [3] Zhou HL, Gong L, Zhang W, et al. Loss of heterozygosity on chromosomes 8 and 16 in primary hepatocellular carcinoma[J]. Modern Oncology, 2012, 20(6): 1134-1138.[周后龙, 巩丽, 张伟, 等. 原发性肝癌 8 号和 16 号染色体杂合子丢失的研究[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(6): 1134-1138.]
- [4] Gong L, Wei LX, Ren P, et al. Dysplastic nodules with glypican-3 positive immunostaining: a risk for early hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87120.
- [5] Lau SH, Guan XY. Cytogenetic and molecular genetic alterations in hepatocellular carcinoma [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2005, 26 (6): 659-665.
- [6] Sun FY, Wan DF, Qin WX. Determination of gene deletion in tumor tissue by semi-quantitative polymerase chain reaction[J]. Tumor, 2000, 20(2): 135-137.[孙奋勇, 万大方, 覃文新. 基因组半定量 PCR 方法检测肿瘤组织的基因缺失[J]. 肿瘤, 2000, 20(2): 135-137.]
- [7] Huang J, Grotzer MA, Watanabe T, et al. Mutations in the Nijmegen breakage syndrome gene in medulloblastomas[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(13): 4053-4058.
- [8] Lu T, Hano H, Meng C, et al. Frequent loss of heterozygosity in two distinct regions, 8p23.1 and 8p22, in hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13 (7): 1090-1097.
- [9] Gaballa MR, Besa EC. Myelodysplastic syndromes with 5q deletion: patho-physiology and role of lenalidomide[J]. Ann Hematol, 2014, 93: 723-733.
- [10] Zhang F, Zhou CZ, Ling Y, et al. Allelic analysis on chromosome 5 in sporadic colorectal cancer patients [J]. Chinese Journal of Oncology, 2002, 24(5): 458-460.[张放, 周崇治, 凌云, 等. 散发性结直肠癌患者 5 号染色体杂合缺失分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(5): 458-460.]
- [11] Ding SF, Habib NA, Dooley J, et al. Loss of constitutional heterozygosity on chromosome 5q in hepatocellular carcinoma without cirrhosis[J]. Br J Cancer, 1991, 64: 1083-1108.
- [12] Johannsdottir HK, Jonsson G, Johannesdottir G, et al. Chromosome 5 imbalance mapping in breast tumors from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and sporadic breast tumors[J]. Int J Cancer, 119(2006): 1052-1060.
- [13] Chen CP, Lin CJ, Chen CY, et al. Maternal transmission of interstitial microdeletion in 5q13.2 detected during prenatal diagnosis of coarctation of the aorta[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2013, 52: 303-305.
- [14] Markaverich BM, Shoulars K, Rodriquez MA. Luteolin regulation of estrogen signaling and cell cycle pathway genes in mcf-7 human breast cancer cells[J]. Int J Biomed Sci, 2011, 7(2): 101-111.