

## 中国南方食管鳞癌 D5S107 和 D5S408 杂合性丢失 与微卫星不稳定性

李小东<sup>1</sup>, 林鹏<sup>1</sup>, 龙浩<sup>1</sup>, 胡祎<sup>1</sup>, 甘德秀<sup>2</sup>, 张旭<sup>1</sup>, 温浙盛<sup>1</sup>, 戎铁华<sup>1</sup>  
(1. 中山大学肿瘤防治中心胸科//华南肿瘤学国家重点实验室, 广东广州 510060; 2. 中山大学公共卫生学院, 广东广州 510089)

**摘要:**【目的】研究中国南方食管癌高发地区(潮汕地区)食管鳞癌 5 号染色体长臂(5q)部分微卫星标记的杂合性丢失(LOH)和微卫星不稳定(MSI),为食管鳞癌相关抑癌基因的定位提供依据。【方法】采用 PCR 银染技术,检测 58 例配对食管鳞状细胞癌标本多个微卫星标记(D5S107;SHGS31088;D5S816;D5S625 和 D5S408)的杂合性丢失和微卫星不稳定。【结果】SHGS31088, D5S816 和 D5S625 杂合性丢失率和微卫星不稳定都较低;而 D5S107 和 D5S408 的杂合性丢失率分别为 48.5% 和 34.3%, 微卫星不稳定率分别为 9.1% 和 5.7%。【结论】中国南方食管鳞癌 D5S107 和 D5S408 的杂合性丢失率较高,提示在 D5S107 和 D5S408 附近可能存在食管癌相关基因。5q 区域 5 个微卫星标记的微卫星不稳定发生率都较低,提示微卫星不稳定在中国南方食管癌发生过程中可能不占主导地位。

**关键词:**食管肿瘤;杂合性丢失;微卫星不稳定; D5S107; D5S408

中图分类号:R735.1

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2008)02-0135-04

### Loss of Heterozygosity and Microsatellite Instability of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in South China

LI Xiao-dong<sup>1</sup>, LIN Peng<sup>1</sup>, LONG Hao<sup>1</sup>, HU Yi<sup>1</sup>, GAN De-xiu<sup>2</sup>, ZHANG Xu<sup>1</sup>, WEN Zhe-sheng<sup>1</sup>, RONG Tie-hua<sup>1</sup>  
(1. Thoracic Department of Cancer Center; 2. School of Public Health, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:**【Objective】To study the loss of heterozygosity (LOH) and microsatellite instability (MSI) with some microsatellite markers on 5q of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in high incidence area of South China (Chaoshan area). It will provide scientific basis for looking for the position(s) of candidate tumor suppressor gene(s) on 5q in ESCC.【Methods】Polymerase chain reaction (PCR) based on LOH and MSI was performed in 58 primary ESCC with 5 microsatellite markers (D5S107, SHGS31088, D5S816, D5S625, and D5S408).【Results】Both of the frequencies of LOH and MSI were low at SHGS31088, D5S816, and D5S625. The frequencies of LOH at D5S107 and D5S408 were 48.5% and 34.3%, respectively. The frequencies of MSI at D5S107 and D5S408 were 9.1% and 5.7%, respectively.【Conclusions】According to the high frequencies of LOH at D5S107 and D5S408, there probably existed tumor suppressor gene (s) around D5S107 and D5S408 in ESCC of South China. On the other hand, the frequencies of MSI at 5 microsatellite markers on 5q were very low, indicating MSI might not be the most important reason for the occurrence in ESCC of South China.

**Key words:** esophageal carcinoma; loss of heterozygosity; microsatellite instability; D5S107; D5S408

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2008, 29(2): 135-138]

食管癌是一种常见的恶性肿瘤,其男性和女性发病率分别为 10.7/10 万和 5.7/10 万,位居我国城市恶性肿瘤的第 5 位和第 8 位,农村恶性肿瘤的第 3 位和第 6 位<sup>[1]</sup>;在全球范围,食管癌位居恶

性肿瘤的第 7 位<sup>[2]</sup>。多项研究结果表明,5q 区域存在染色体片段的缺失,提示在该区域存在食管癌相关的抑癌基因<sup>[3-5]</sup>。我们在前期研究中,也发现了一个微小缺失区域,位于 5q23.1-q23.2,该区域附

收稿日期:2007-06-30

基金项目:国家自然科学基金(30600731);广东省自然科学基金(04009346);中山大学“985”二期工程基金

作者简介:李小东(1971-),男,重庆忠县人,博士,副教授,主要从事胸部肿瘤的临床与基础研究, E-mail:xdguangzhou@126.com

近可能存在一个或多个食管癌相关基因<sup>[6]</sup>。为了更进一步筛选食管癌相关基因,我们选取中国南方食管癌高发地区(潮汕地区)的食管鳞癌,在 5q 区域选择多个微卫星标记进行杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH)和微卫星不稳定研究(microsatellite instability, MSI),为该区域食管癌抑癌基因的筛选打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本研究所用 58 例食管鳞癌及配对正常组织均取自 2004-2006 年间在中山大学肿瘤医院胸科接受治疗的来自潮汕地区食管癌患者的手术切除标本。在被纳入研究的患者接受食管癌切除手术后,分别采取新鲜肿瘤组织及相距 5 cm 的正常食管黏膜组织,约 1 cm × 1 cm × 0.5 cm 大小,置-72℃冰箱冻存。所有患者均经过明确的组

织病理诊断证实为食管鳞癌,并且有完整的临床病理资料。其中男性 45 例,女性 13 例,年龄 42~79 岁。分别记取患者的病理分期,组织学分级以及有无淋巴结转移等临床病理参数。

### 1.2 组织基因组 DNA 提取

常规加蛋白酶 K 消化,等体积酚-氯仿抽提,溶于 50 μL TE,4℃保存备用。

### 1.3 PCR 检测

20 μL PCR 反应体系中加入 PCR 模板(基因组 DNA)50 ng, dTNT 混合物(1.25 mmol/L dGTP, dATP, dTTP, dCTP),10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3),1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,500 mmol/L KCl,上下游引物各 10 pmol,0.5 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 扩增条件为起始 94℃变性 5 min,94℃变性 30 s,56~62℃退火 30 s,72℃60 s 反应 30 个循环,最后 72℃延伸 5 min,4℃保存。微卫星多态标记资料通过基因数据库(GDB:<http://www.gdb.org>)获得(表 1),引物由上海 Sangon 生物工程公司合成。

表 1 微卫星的特征

Table 1 Characteristics of microsatellite markers

| Marker    | $E_h/\%$ | $n_a$ | $t/^\circ\text{C}$ | Size(bp)      | Position(Mb) | Site   | CA-strand primer           | GT-strand primer        |
|-----------|----------|-------|--------------------|---------------|--------------|--------|----------------------------|-------------------------|
| D5S107    | 80.5     | 10    | 56                 | 0.133-0.155   | 79.50        | 5q14.2 | GATCCACTTTAACCCTAAATAC     | GGCATCAACTTGAACAGCAT    |
| SHGC31088 | -        | -     | 62                 | 0.126         | 80.17        | 5q14   | ATGTGACACACCTTTATTCTCTCTG  | CAGGGACAGCTACACAGAAGC   |
| D5S816    | 82.6     | 7     | 59                 | 0.225-0.257   | 135.33       | 5q31   | TTGCCACTGAAAATCATATCC      | TCTACTGGCATCCCTGATG     |
| D5S625    | 74       | 8     | 58                 | 0.224-0.238   | 166.20       | 5q35.2 | ATGATTCTGGGGATGTGTCTGTCTG  | ATGCTGGGATTATAGCCCTGTC  |
| D5S408    | 75       | 7     | 60                 | 0.2470-0.2650 | 180.05       | 5q35   | AAAAGATAAACACAACCTTCCAACCC | CTTCTTTCTTTGCTCAGTCTTCC |

$E_h$ : theoretical heterozygosity;  $n_a$ : number of allele;  $t/^\circ\text{C}$ : temperature of annealing; -: no information available

### 1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

取 2 μL PCR 反应产物与 3 μL 加样缓冲液(97 g/L 去离子甲酰胺,20 mmol/L EDTA,0.05 g/L 溴酚蓝,0.05 g/L 二甲苯青蓝 FF)混合,混合物 95℃变性 10 min 后立即置于冰上,上样于 70 g/L 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(含 8 mmol/L 尿素)电泳,硝酸银染色,观察结果。

### 1.5 杂合性丢失评价

如果某个体在某个微卫星标记的一对 PCR 产物长度相同,则记为纯合子。某个微卫星标记出现长度不同的一对 PCR 产物,在变性聚丙烯酰胺凝胶上可以分离开来,该个体对于该微卫星标记而言即为信息个体。患有肿瘤的信息个体,与配对的正常 DNA 相比,只要肿瘤 DNA 的一个等位基因主带减弱 50%或 50%以上,即表明此肿瘤组织染色体在该标记处发生了杂合性丢失<sup>[8]</sup>。

微卫星标记发生杂合性的肿瘤例数除以该标记的信息个体例数,记为该标记的杂合性丢失频率。微卫星不稳定是指肿瘤组织 DNA 中出现正常组织 DNA 中不存在的额外条带(或等位基因)。微卫星标记发生微卫星不稳定的肿瘤例数除以该标记的信息个体例数,记为该标记的微卫星不稳定频率。

### 1.6 统计分析

微卫星标记的杂合性丢失情况以及微卫星不稳定与食管癌临床病理参数之间的关系,采用 SPSS10.0 统计软件中的卡方检验进行统计分析。如  $P < 0.05$  即认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 微卫星标记的 LOH 和 MSI 结果

我们首先对每个微卫星标记都进行了小样本(20 例)的研究,当 LOH > 20%时,则继续扩大样本量检测该微卫星标记 LOH 和 MSI 情况;当 LOH < 20%时,即放弃该微卫星标记的继续分析。在小样本研究中,只有 D5S107 和 D5S408 微卫星标记的杂合性丢失率超过 20%(SHGS31088, D5S816, D5S625 分别为 0,0,12.5%), 于是将 D5S107 和

D5S408 的样本量扩大至 58 例, 结果表明 D5S107 和 D5S408 的杂合度分别为 56.9% (33/58) 和 60.3% (35/58), 杂合性丢失率分别为 48.5% 和 34.3%, 微卫星不稳定性率分别为 9.1% (3/33) 和 5.7% (2/35; 表 2), 二者同时存在杂合性丢失的病例数为 3 例。典型的 LOH、杂合子保留和微卫星不稳定图像见图 1。

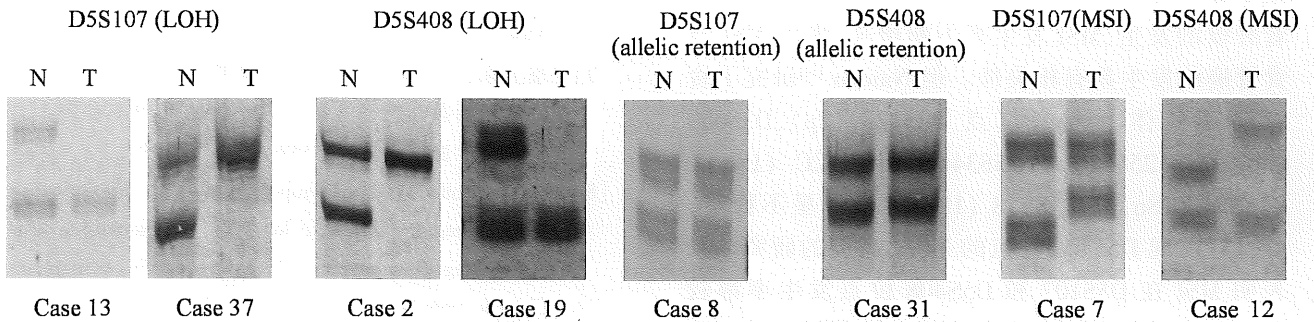


图 1 典型的食管癌杂合性丢失、杂合子保留和微卫星不稳定图像

Fig.1 Representative result of LOH, allelic retention, and MSI

N: normal tissues; T: tumor tissues

表 2 食管鳞状细胞癌 D5S107 和 D5S408 杂合性丢失情况  
Table 2 Pattern of D5S107 and D5S408 alteration in ESCC

| Marker | Position(Mb) | Loss | Retention | X  | - |
|--------|--------------|------|-----------|----|---|
| D5S107 | 79.50        | 16   | 17        | 21 | 4 |
| D5S408 | 180.05       | 12   | 23        | 20 | 3 |

X: not informative; -: data not available

### 2.2 杂合性丢失与临床资料的关系

D5S107 和 D5S408 的杂合性丢失与 T 分期、组织学分级、淋巴结转移、性别均无关系(精确概率法, P 均 > 0.05; 表 3)。

表 3 D5S107 和 D5S408 杂合性丢失率与食管癌临床病理参数之间的关系

Table 3 Frequency of LOH of D5S107 and D5S408 in ESCC with different clinical/pathologic parameters

|        | Allelic loss/informative cases |       |     |       |     |        |        |        |       |
|--------|--------------------------------|-------|-----|-------|-----|--------|--------|--------|-------|
|        | T2                             | T3    | G1  | G2    | G3  | LNM(+) | LNM(-) | Female | Male  |
| D5S107 | 2/4                            | 12/27 | 4/6 | 11/23 | 1/4 | 11/24  | 5/9    | 3/7    | 13/26 |
| D5S408 | 1/5                            | 10/28 | 3/6 | 8/24  | 1/5 | 8/21   | 4/14   | 2/7    | 10/28 |

ESCC: esophageal squamous cell carcinoma; LOH: loss of heterozygosity

### 3 讨论

食管癌 5q 区域一直是食管癌抑癌基因研究

的热点区域, 关于杂合性丢失和微卫星不稳定的研究比较多。Hu 等<sup>[8]</sup>曾在 5q 上共选择了 13 个微卫星位点开展杂合性丢失研究, 结果发现 D5S2501, D5S408, D5S816 等多个微卫星位点杂合性丢失率超过 60%。Peralta 等<sup>[9]</sup>对 70 例食管癌患者选择了 24 个多态位点进行杂合性丢失研究, 结果也表明 D5S667 等多个微卫星位点的杂合性丢失率较高。An 等<sup>[10]</sup>在对中国北方河南地区 32 例食管癌进行杂合性丢失的研究中也发现, D5S82 和 D5S346 的杂合性丢失率较高, 分别为 40% 和 56%。本课题组也在 5q23.1-23.2 选取多个微卫星位点开展杂合性研究, 发现 D5S471 和 D5S592 杂合性丢失率高达 47% 和 41%<sup>[11]</sup>。在上述研究结果的基础上, 为进一步寻找食管癌相关抑癌基因, 我们继续选取 5q 区域的部分微卫星位点开展研究, 结果发现 D5S107 和 D5S408 的杂合性丢失率较高, 提示在 D5S107 和 D5S408 附近可能存在食管癌相关基因。

MSI 作为判定肿瘤遗传不稳定的一个敏感检测指标, 也与肿瘤的发生密切相关。颜坤等<sup>[12]</sup>应用 PCR 单链构象多态性 (PCR-SSCP) 技术检测微卫星 DNA 不稳定性, 45 例食管癌组织中 MSI 有 10 例, 检出率 22.2%; 同时发现 MSI 与临床分期、病理分级、淋巴结转移、浸润深度等无显著性差异,

提示 MSI 可能是食管癌发生过程中的早期分子事件,在部分食管癌发生过程中起一定的作用。Lu 等<sup>[13]</sup>对食管低度不典型增生、高度不典型增生和食管癌选用 10 个微卫星标记 D3S4513、D5S2501、D8S1106、D9S118、D9S910、D13S1493、D13S894、D13S796、D15S655 和 D17S1303 开展 MSI 的检测,其中包括 5q 区域的 D5S2501,发现 MSI 的发生率分别为 22%、33%和 59%。该研究结果表明随着肿瘤的发生,MSI 发生率不断增高,提示 MSI 与食管癌的发生具有相关性。但 Naidoo<sup>[14]</sup>研究了食管癌染色体上多个位点 D2S123 (2p)、D3S659 (3p)、D3S1255 (3p)、D5S346 (5q)、DCC (18q)、D18S34 (18q)和 D18S58 (18q)的微卫星不稳定,但没有发现 D5S346 位点的 MSI。我们的研究结果表明 MSI 在 D5S107 和 D5S408 位点发生率都较低,与中国北方河南地区的研究结果相反,而与 Naidoo 的研究结果类似。这可能与入种、肿瘤的 TNM 分期差异有关,更与所选取的不同的微卫星标记有关。

本研究结果表明,中国南方食管癌患者 D5S107 和 D5S408 的杂合性丢失率分别为 48.5%和 34.3%,提示在 D5S107 和 D5S408 附近可能存在食管癌相关基因。5q 区域多个微卫星标记的微卫星不稳定发生率都较低,提示微卫星不稳定在中国南方食管癌发生过程中可能不占主导地位。

#### 参考文献:

- [1] 全国肿瘤防治研究办公室,卫生部卫生统计信息中心. 中国试点市县恶性肿瘤的发病和死亡第二卷(1993-1997) [M]. 北京:中国医药科技出版社,2002: 23-27.
- [2] Sarah III, Taylor M, Sherry B, et al. Cancer statistics, 1999 [J]. CA Cancer J Clin, 1999, 49(1):8-31.
- [3] Shiomi H, Sugihara H, Kamitani S, et al. Cytogenetic heterogeneity and progression of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2003, 147 (1): 50-61.
- [4] van Dekken H, Wink JC, Vissers KJ, et al. Genomic analysis of early adenocarcinoma of the esophagus or gastroesophageal junction: Tumor progression is associated with alteration of 1q and 8p sequences [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2006, 45(5):516-525.
- [5] Su M, Chin SF, Li XY, et al. Comparative genomic hybridization of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma cell lines [J]. Dis Esophagus, 2006,19(1):10-14.
- [6] Li XD, Huang XP, Zhao CX, et al. Identification of a minimal deletion region on chromosome 5q in Chinese esophageal squamous cell carcinomas [J]. Cancer Lett, 2004,215(2):221-228.
- [7] 李卫东,王亮,王秀琴,等.食管癌组织染色体位点特异性的杂合性丢失和微卫星 DNA 序列不稳定 [J]. 中华医学遗传学杂志,1996,13(4):194-197.
- [8] Hu N, Roth MJ, Polymeropolous M, et al. Identification of novel regions of allelic loss from a genomewide scan of esophageal squamous-cell carcinoma in a high-risk Chinese population [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2000,27(3):217-228.
- [9] Peralta RC, Casson AG, Wang RN, et al. Distinct regions of frequent loss of heterozygosity of chromosome 5p and 5q in human esophageal cancer [J]. Int J Cancer,1998, 78(5):600-605.
- [10] An JY, Fan ZM, Gao SS, et al. Loss of heterozygosity in multistage carcinogenesis of esophageal carcinoma at high-incidence area in Henan Province, China[J]. World J Gastroenterol,2005,11(14):2055-2060.
- [11] 李小东,黄晓平,傅剑华,等.食管鳞状细胞癌 5q23.1-23.2 杂合性丢失的研究 [J]. 中山大学学报:医学科学版,2004,25(4):291-294.
- [12] 颜坤,王明荣,房殿春,等.食管癌微卫星 DNA 不稳定性及其与临床病理的关系研究[J].第三军医大学学报,2004, 26(17):1570-1572.
- [13] Lu N, Hu N, Li WJ, et al. Microsatellite alterations in esophageal dysplasia and squamous cell carcinoma from laser capture microdissected endoscopic biopsies [J]. Cancer Lett, 2003,189(2):137-145.
- [14] Naidoo R, Ramburan A, Reddi A, et al. Aberrations in the mismatch repair genes and the clinical impact on oesophageal squamous carcinomas from a high incidence area in South Africa [J]. J Clin Pathol, 2005, 58(3):281-284.

(编辑 刘清海)