

· 基础研究 ·

## 食管鳞状细胞癌 5q23.1-q23.2 杂合性丢失的研究

李小东<sup>1</sup>, 黄晓平<sup>2</sup>, 傅剑华<sup>1</sup>, 徐昕<sup>2</sup>, 蔡岩<sup>2</sup>, 赵春霞<sup>2</sup>, 张兰军<sup>1</sup>, 戎铁华<sup>1</sup>, 王明荣<sup>2</sup>

(1. 中山大学肿瘤医院胸科, 广东 广州 510060;

2. 中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

**摘要:** 【目的】分析食管癌 5 号染色体长臂上 5q23.1-q23.2 区域的杂合性丢失, 为食管癌候选抑癌基因定位缩小范围。【方法】用 PCR 银染技术检测 50 例配对食管鳞状细胞癌标本 6 个微卫星标记的杂合性丢失情况。【结果】在检测的微卫星标记中, D5S471 和 D5S592 杂合性丢失率高达 47% 和 41%。【结论】D5S471 和 D5S592 附近可能存在食管癌的候选抑癌基因。

关键词: 食管肿瘤; 微卫星; 杂合性丢失

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)04-0291-04

## Loss of Heterozygosity on 5q23.1-q23.2 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

LI Xiao-dong<sup>1</sup>, HUANG Xiao-ping<sup>2</sup>, FU Jian-hua<sup>1</sup>, XU Xin<sup>2</sup>, CAI Yan<sup>2</sup>, ZHAO Chun-xia<sup>2</sup>,  
ZHANG Lan-jun<sup>1</sup>, RONG Tie-hua<sup>1</sup>, WANG Ming-rong<sup>2</sup>

(1. Department of Thoracic Surgery, Cancer Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China;

2. National Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute (Hospital), Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

**Abstract:** 【Objective】To analyze microsatellite markers with high frequencies of loss of heterozygosity on 5q23.1-q23.2 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). 【Methods】Polymerase chain reaction (PCR)-based loss of heterozygosity (LOH) analysis was performed in 50 primary ESCC with six microsatellite markers. 【Results】The frequencies of allelic loss of D5S471 and D5S592 were 47% and 41%, respectively. 【Conclusion】There probably existed candidate tumor suppressor gene(s) around D5S592 and D5S471.

**Key words:** esophageal carcinomas; microsatellite; loss of heterozygosity

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(4): 291-294]

食管癌是人类常见的恶性肿瘤之一, 位居肿瘤死因的第 4 位 (全球第 6 位)。比较基因组杂交 (CGH) 的研究结果提示, 食管癌存在非随机的 DNA 拷贝数异常, 染色体扩增的区域包括 1q, 2q, 3q, 5p, 7p, 7q, 8q, 11q, 12p, 12q, 14q, 17q, 20q 和 Xq, 而染色体缺失的区域位于 1p, 3p, 4p, 5q,

8p, 9p, 9q, 11q, 13q, 16p, 17p, 18q, 19p 和 19q<sup>[1]</sup>。上述染色体缺失的区域可能含有食管癌的抑制基因, 通过检测该区域中频繁出现杂合性丢失的位点, 能够为食管癌候选抑癌基因定位缩小范围。目前已经广泛开展了食管癌 3p, 9p, 9q, 13q 和 17p 等多条染色体缺失区域的研究<sup>[2-4]</sup>。虽然多项比较

收稿日期: 2004-01-06

基金项目: 国家杰出青年科学基金 (60125026) 863 计划重大专项基金 (2002BA711A06) 教育部高等学校博士学科点基金 (20010023016) 国家重点基础研究发展规划项目基金 (G1998051205) 资助项目

作者简介: 李小东 (1971-), 男, 重庆忠县人, 博士生, 主治医师; 王明荣, 博士生导师, 通讯作者。E-mail: wangmr@263.net.cn

基因组杂交的研究结果都表明食管癌 5q 存在明显的染色体缺失区域<sup>[5-7]</sup>,然而对食管癌中 5q 的杂合性丢失研究还较少。Hu 等<sup>[8]</sup>对中国食管癌高危人群进行基因组扫描,结果表明 5q 区域微卫星杂合性丢失频率较高的位点主要集中于 5q14-q31。我们最近研究发现食管鳞状细胞癌 5q23.1-q23.2 区域存在一个微小缺失区域,位于 D5S1384 和 D5S1505 之间,大小为 272 kb<sup>[9]</sup>。本研究继续在该区域内选取 6 个微卫星标记进行杂合性丢失研究,希望能更精确地定位该区域可能存在的抑癌基因。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

50 对食管癌配对标本来自中国医学科学院附属肿瘤医院,手术切取患者的食管癌组织和癌旁组织,-70℃冻存,标本进行食管癌病理检查均为原发性食管鳞状细胞癌。其中男性 37 例,女性 13 例,

年龄 44~80 岁。分别记取患者的 T 分期,组织学分级以及有淋巴结转移等临床病理参数。

### 1.2 DNA 提取

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

### 1.3 PCR

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>, 上下游引物各 10 pmol, 0.5 U 的 *Taq* DNA 聚合酶(德国宝灵曼公司),PCR 扩增条件为起始 94℃变性 5 min, 94℃变性 30 s, 52℃~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.com>)获得(表 1),引物序列由上海 Sangon 生物工程公司合成。

表 1 微卫星标记的特征

Table 1 Characteristics of microsatellite markers

Marker	Het	<i>n<sub>a</sub></i>	<i>T</i> (°C)	Size(bp)	Position (Mb)	Site	CA-strand primer	GT-strand primer
D5S404	66	8	59	180-198	116.923	5q23.1	CTGGAGATGTAATGCTGTGC	GATCACCACATTCACCTAAT
D5S639	64	7	57	124-136	117.348	5q23.1	AGTAAAGTGAGTGGAGAGC	GGAGTCCCATGACCTGA
D5S471	75	8	58	236-248	119.125	5q23.2	TTTTACACATTTTCCCAGC	AAAACCTCATTACAAAAACAGGAG
D5S592	75	8	56	145-205	119.178	5q23.2	AGACAGACAGAGAGATTAGA	AGTAAAGTGAGTGGAGAGC
D5S1428	-	-	54	249-250	119.664	5q23.2	CAGTTTCCGGCATAACTTTG	TCAGCCCTCTAGAGATTCCA
D5S503	60	7	52	155-166	120.300	5q23.2	CCAACCTGGGGAACAA	TGGGAAGTGCTGAAA

Het: theoretical heterozygosity; *n<sub>a</sub>*: number of allele; *T*: 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(7 g/L 去离子甲酰胺, 20 mol/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 1 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 1 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 1 个等位基因主带减弱 50% 或 50% 以上,即表明此肿瘤组织在该微

卫星标记处发生了杂合性丢失。微卫星标记发生杂合性丢失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。

### 1.6 统计分析

微卫星标记的杂合性丢失情况与食管癌临床病理参数之间的关系,用卡方检验进行统计分析。如检验所得的 *P* 值 < 0.05,即认为差异有显著的统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 微卫星标记的杂合性丢失结果

我们首先对每个微卫星标记都进行了小样本(16~18 例)的研究,当杂合性丢失(LOH) ≥ 20% 时,则继续扩大样本量检测该微卫星标记杂合性丢

失情况;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 D5S471 和 D5S592 的 LOH ≥ 20%,于是我们将 D5S471 和 D5S592 的样本量扩大至 50 例。D5S471 和 D5S592 的杂合度分别为 34% (17/50) 和 76% (37/50)。D5S471 和 D5S592 的杂合性丢失率分别为 47% (8/17) 和 41% (15/37)(表 2),二者同时存在杂合性丢失的病例数为 4 例。D5S1428 和 D5S503 的杂合度为 0,而 D5S404 和 D5S639 的杂合性丢失率分别为 17% 和 0。典型的 LOH 和杂合子保留图像见图 1 图 2。

表 2 食管鳞状细胞癌 D5S471 和 D5S592 杂合性丢失情况

Table 2 Pattern of D5S471 and D5S592 alteration in esophageal squamous cell carcinomas

Marker	Position(Mb)	n(%)			
		Loss	Retention	×	-
D5S471	119.08	8(47)	9	27	6
D5S592	119.13	15(41)	22	11	2

×: not informative; -: data not available

### 2.2 D5S471、D5S592 杂合性丢失与临床资料的关系

D5S471 和 D5S592 的杂合性丢失与 T 分期、组

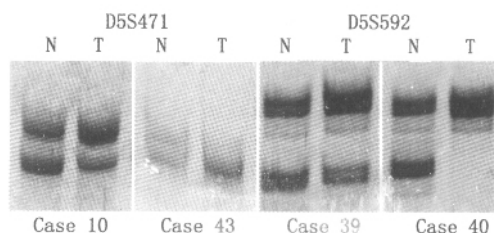


图 1 典型的食管癌杂合性丢失图像

Fig. 1 Representative results of LOH

N: normal tissues; T: tumor tissues

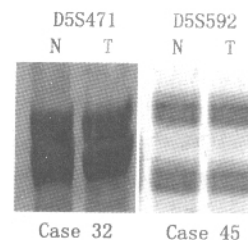


图 2 典型的食管癌杂合子保留图像

Fig. 2 Representative allelic retention

N: normal tissues; T: tumor tissues

织学分级、淋巴结转移、性别均无关系 (P 值均 > 0.05 表 3)。

表 3 D5S471 和 D5S592 的杂合性丢失率与食管癌临床病理参数的关系

Table 3 Frequency of LOH of D5S471 and D5S592 in ESCC with different clinical/pathological parameters

	Allelic loss/informative cases [ n (%) ]									
	T2	T3	G1	G2	G3	LNM(+)	LNM(-)	Female	Male	
D5S471	1/3(33)	5/12(42)	4/4(100)	3/9(33)	1/4(25)	3/8(38)	5/9(56)	2/3(67)	6/14(43)	
D5S592	2/6(33)	11/28(39)	1/5(20)	13/26(50)	1/6(17)	10/24(42)	5/13(39)	4/10(40)	11/27(41)	

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

### 3 讨论

根据比较基因组杂交 (CGH) 的研究结果确定染色体上高频率的缺失片段,能够初步确定肿瘤相关基因(抑癌基因)在染色体上的大致区域。然后利用散布于各条染色体上的分子标记(如微卫星标记),用 PCR 结合电泳技术检测各分子标记的杂合性丢失情况,确定其高发频率区,从而确定肿瘤相关基因的染色体定位。利用这一方法已成功地克隆了几个抑癌基因,如乳腺癌中第一个被证实和克隆的抑癌基因 BRCA1<sup>[10]</sup>。

在对 5q 上肿瘤抑癌基因的寻找过程中,曾有研究提示 APC 和 MCC 可能是食管癌的抑癌基

因。APC 和 MCC 基因均定位于 5q21-22,是已经克隆的大肠癌相关基因。然而对 APC 和 MCC 基因测序结果表明,食管癌中虽然存在突变,但频率很低<sup>[11,12]</sup>。这一现象表明 APC/MCC 可能与食管癌关系并不密切。然而,APC 和 MCC 基因所在的 5q21-q22 区域在食管癌中经常发生丢失<sup>[11]</sup>,提示该区域附近可能存在另外的食管癌抑癌基因。除了 APC 和 MCC 外,还曾有对 MSH3 和 IRF-1 基因的研究报道<sup>[13,14]</sup>。但到目前为止,还没有在 5q 上克隆出食管癌的抑癌基因。我们前面的研究表明,食管癌 5q23.1-q23.2 存在一个微小缺失区<sup>[9]</sup>。本研究继续在该区域内选取 6 个微卫星标记进行杂合性丢失研究,发现 D5S471 和 D5S592 杂合性丢失率高达 47% 和 41%。这两个微卫星标记相距仅

53 kb, 该研究结果提示 D5S471 和 D5S592 附近很可能存在食管癌的候选抑制基因。

本研究同时发现, 除 D5S592 以外, 中国人群该组微卫星标记的杂合度明显低于西方人群, 推测可能与人种的差异有关。

参考文献:

- [1] Yen C C, Chen Y J, Chen J T, *et al.* Comparative genomic hybridization of esophageal squamous cell carcinoma: correlations between chromosomal aberrations and disease progression/prognosis [J]. *Cancer*, 2001, 92(11): 2769-77.
- [2] Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, *et al.* Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR-beta, RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(13): 3724-8.
- [3] Huang X P, Wei F, Liu X Y, *et al.* Allelic loss on 13q in esophageal squamous cell carcinomas from northern China [J]. *Cancer Lett*, 2002, 185(1): 87-94.
- [4] Dolan K, Morris A I, Gosney J R, *et al.* Loss of heterozygosity on chromosome 17p predicts neoplastic progression in Barrett's esophagus [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18(6): 683-9.
- [5] Yen C C, Chen Y J, Lu K H, *et al.* Genotypic analysis of esophageal squamous cell carcinoma by molecular cytogenetics and real-time quantitative polymerase chain reaction [J]. *Int J Oncol*, 2003, 23(4): 871-81.
- [6] 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.
- [7] Kwon M S, Hong S J, Cho H A, *et al.* Extensive and divergent chromosomal losses in squamous and spindle-cell components of esophageal sarcomatoid carcinoma [J]. *Virchows Arch*, 2003, 443(5): 635-42.
- [8] Hu N, Roth M J, Polymeropoulos 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): 217-28.
- [9] Li X D, Huang X P, Zhao C X, *et al.* Identification of a minimal deletion region on Chromosome 5q in Chinese Esophageal Squamous Cell Carcinomas [J]. *Cancer Letters*, 2004 (in press).
- [10] Casey G, Plummer S, Hoeltge G, *et al.* Functional evidence for a breast cancer growth suppressor gene on chromosome 17 [J]. *Hum Mol Genet*, 1993, 2(11): 1921-7.
- [11] Powell S M, Papadopoulos N, Kinzler K W, *et al.* APC gene mutations in the mutation cluster region are rare in esophageal cancers [J]. *Gastroenterology*, 1994, 107(6): 1759-63.
- [12] Aoki T, Mori T, Du X, *et al.* Allelotype study of esophageal carcinoma [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 1994, 10(3): 177-82.
- [13] Dolan K, Garde J, Gosney J, *et al.* Allelotype analysis of oesophageal adenocarcinoma: loss of heterozygosity occurs at multiple sites [J]. *Br J Cancer*, 1998, 78(7): 950-7.
- [14] Peralta R C, Casson A G, Wang R N, *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): 600-5.

(编辑 黄小延)