

毛细管电泳法检测肝细胞癌微卫星不稳定性的影响因素

冼志红, 丛文铭, 张树辉

冼志红, 丛文铭, 张树辉, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院病理科 上海市 200438

冼志红, 女, 1973-03-01 生, 江苏省盱眙县人, 汉族, 2001-07 大学本科毕业, 主管技师。

国家自然科学基金资助项目, No. 30370645

上海市卫生系统百名优秀跨世纪学科带头人培养计划资助项目, No. 98BR007

项目负责人: 丛文铭, 200438, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院病理科, wmcong@smmu.edu.cn

电话: 021-25070860 传真: 021-25070854

收稿日期: 2004-03-19 接受日期: 2004-04-20

Microsatellite instability genotyping in hepatocellular carcinoma by capillary electrophoresis system and its effective factors

Zhi-Hong Xian, Wen-Ming Cong, Shu-Hui Zhang

Zhi-Hong Xian, Wen-Ming Cong, Shu-Hui Zhang, Department of Pathology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30370645; and the Hundred Leading Scientists Program of the Public Health Sector of Shanghai, No. 98BR007

Correspondence to: Wen-Ming Cong, Department of Pathology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China. wmcong@smmu.edu.cn

Received: 2004-03-19 Accepted: 2004-04-20

Abstract

AIM: To search for a large-scale automated microsatellite instability genotyping method for genomic scanning in liver neoplasms.

METHODS: Fluorescent PCR products of 6 microsatellite polymorphic markers in 56 cases of hepatocellular carcinoma were separated on the MegaBACE-500 capillary array electrophoresis (CAE) instrument and analyzed with MegaBACE Genetic Profiler software. The effects of different reaction residues concentration in PCR reactive system on genotyping were investigated.

RESULTS: Genotyping of forty-eight specimens was achieved in parallel by using PCR and capillary electrophoresis system after one cycle. The genotyping profiles included heterozygosity, homozygosity, loss of heterozygosity, microsatellite instability and allelic imbalance, in which the phenotypes of microsatellite instability had a lot of characteristics. MSI was found in 18 of 56 HCC (32.1%) at one or several loci. Ten of 56 (18.2%) HCCs had MSI-H. The concentration of reaction residues (including dNTP, primers, and salt ion) in PCR system effected badly on scoring errors in allele size, which might result in misleading conclusions. The concentration of PCR reaction products affected little on scoring errors, and about 50 ng/ μ L was suitable for analysis.

CONCLUSION: The frequency of microsatellite instability is very low in HCC and it is an uncommon event during hepatocarcinogenesis. MegaBACE-500 CAE instrument and MegaBACE Genetic Profiler software is a high-throughput, accurate and reliable method for genomic scanning, but products and salt ion concentration in PCR reactive system is one of the key factors altering genotyping results.

Xian ZH, Cong WM, Zhang SH. Microsatellite instability genotyping in hepatocellular carcinoma by capillary electrophoresis system and its effective factors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(8):1781-1784

摘要

目的: 探索适用于肝癌大规模基因组扫描的自动化微卫星不稳定性基因分型实验方法。

方法: 应用6对高度多态性微卫星标记物对56例肝细胞癌基因组进行PCR扩增, 产物通过MegaBACE 500毛细管电泳测序仪进行电泳, 采用Genetic Profiler软件进行基因分型, 摸索不同PCR条件以及PCR体系残留混合物对分型结果的影响。

结果: 通过1次PCR和电泳能得到48个样品的分型结果, 常见的等位基因表型包括杂合子、纯合子、杂合子丢失、微卫星不稳定性及等位基因失衡等几种模式, 其中微卫星不稳定性基因表型呈多种特征; MSI的频率为32.1%(18/56), 10例(18.2%)出现高频MSI; PCR反应体系残留混合物(dNTP、引物和盐离子的浓度等)对基因分型的结果有明显不利影响, 可使等位基因片段大小分析结果错误导致结论错误; 样品浓度对分析结果影响较小, 在50 mg/L时比较合适。

结论: 少数肝细胞癌存在MSI, 表明其在HCC发生中作用较小。应用MegaBACE 500毛细管电泳测序仪和Genetic Profiler分析软件进行微卫星基因组扫描效率高, 结果可靠, 但测序体系中必须维持最佳盐离子的浓度和样品浓度。

冼志红, 丛文铭, 张树辉. 毛细管电泳法检测肝细胞癌微卫星不稳定性的影响因素. *世界华人消化杂志* 2004;12(8):1781-1784

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1781.asp>

0 引言

微卫星是指广泛分布于原核及有核细胞生物组的、由1-6个核苷酸组成的、具有高度多态性的简单串联重复序列。通常情况下, 体细胞中小卫星DNA基因的突变频率为 5×10^{-2} , 而微卫星的DNA的突变频率为 10^{-5} - 10^{-7} 。因此, 微卫星DNA的稳定性可作为衡量细胞基因

组整体稳定性的良好标记,并广泛用于肿瘤、高血压病、糖尿病和精神分裂症的全基因组扫描研究^[1-2]。毛细管电泳技术已是一项成熟的技术,与传统平板胶电泳相比,具有操作简便、分辨率和自动化程度高,使得大规模、高通量的全基因组扫描得以实现,在基因组研究中已成为一种趋势。我们在使用 MegaBACE 500 型毛细管电泳测序仪进行肝癌微卫星不稳定性(MSI)研究工作中,对影响基因表型结果的一些技术因素进行了分析和改进,取得了较好的效果。

1 材料和方法

1.1 材料 随机收集第二军医大学东方肝胆外科医院 2001-10/2002-04 间 HCC 新鲜切除标本 56 例,液氮冻存。男 43 例,女 13 例;年龄 29-78(平均 51.2 岁);血清 AFP $\geq 20 \mu\text{g/L}$ 的 36 例,HBsAg(+)39 例;肿瘤直径 1-16(平均 5.9 cm);按照 WHO(2000 年)分级,高分化 20 例,中分化 28 例,低分化 8 例;有肝内转移(包括门脉分支或胆管内癌栓、卫星灶和肝内转移灶)45 例;伴有肝硬化 47 例,其余 9 例均伴有不同程度的慢性肝炎改变。部分标本因纤维结缔组织较多,采用 40 g/L 中性缓冲甲醛液固定,石蜡包埋切片微切割技术分离癌组织和周围非癌肝组织。所有组织按标准法提取 DNA^[5],终浓度 50 mg/L。6 对微卫星多态引物来自文献[3],由上海生工生物有限公司合成,上游引物 3' 端标记荧光染料 Fam(表 1)。

表 1 微卫星引物及特征

基因座	序列	长度(bp)	杂合率
BAT25	TCGCCTCCAAGAATGTAAGT TCTGCATTTTAACTATGGCTC	120	-
BAT26	TGACTACTTTTGACTTCAGCC AACCATTCAACATTTTAAACCC	116	-
D2S123	AAACAGGATGCCTGCCCTTTA GGACTTTCCACCTATGGGAC	197-227	0.76
D5S346	ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT	96-122	0.75
D13S170	GATAAACACATAGGCACATGG CCTGCAGAATTGTGAGTAATG	113-137	0.9
D17S250	GGAAGAATCAAATAGACAAT GCTGGCCATATATATATTTAAACC	151-169	0.81

1.2 方法

1.2.1 PCR 反应 反应在 96 孔微量板中进行,总反应体积 10 μL , 10 \times PCR 缓冲液 1 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 0.6-1.2 μL , 10 mmol/L dNTP 0.1-0.2 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 的方法,反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 12 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 每个循环降低 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 15 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$

60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。由于微卫星 PCR 反应体系中 dNTP 和 Mg²⁺ 的浓度不同与标准 PCR 浓度,因此我们应用 1.5-3.0 mmol/L MgCl₂, 0.1-0.2 mmol/L dNTP 分别进行 PCR 扩增,并观察对纯化后等位基因分型有无影响。

1.2.2 PCR 反应产物的去离子及变性 用 70 mL/L 的酒精将 PCR 产物洗 2 次。具体方法如下: 将 4 倍产物体积的 70% 酒精加入产物,静置 15 min,离心 30 min 后,甩干酒精。然后用 40 μL 水溶解析出 DNA 片段。取 2 μL 去离子的 DNA 产物与 0.25 μL ET400-R Size Standard 以及 2.75 μL Loading solution (amersham pharmacia biotech) 充分混匀, 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性 1 min, 冰中骤冷。为了探讨 PCR 反应体系残留混合物和样品浓度对等位基因分型有否影响,我们对未纯化和纯化 PCR 产物进行倍比稀释(1:1-1:128),观察对毛细管电泳图形和等位基因分型的影响。

1.2.3 MegaBACE 500 测序仪毛细管电泳及基因分型 毛细管灌胶、预电泳和上样均按测序仪控制软件提示进行。上样结束后,测序仪自动进行电泳和数据收集。当电泳结束后自动生成 48 个原始的样品数据文件。在 Genetic Profiler 软件下进行基因分型。为明确分析结果的可靠性和可重复性,我们分别在不同时间对同一样品进行 2 次电泳,观察对等位基因分型的影响。

1.2.4 微卫星不稳定性的判断^[4-8] 癌周肝组织在同一基因座上有两个等位基因片段时为杂合子信息病例(图 1A),仅有一个等位基因片段时为纯合子(图 1B)无信息病例予以剔除。与癌周肝组织相比, HCC 丢失其中一个等位基因判为杂合性缺失(图 1C)^[4], 1 个或 2 个等位基因片段的大小发生改变、或出现额外片段时判为 MSI, $\geq 30\%$ 的基因座同时存在 MSI 判为高频 MSI(图 1D)^[5-6], HCC 的等位基因片段的强度(峰值)发生明显相对改变判为等位基因失衡(图 1E)^[7-8]。对差异结果重复检测 1 次。

2 结果

2.1 常见微卫星不稳定性基因表型模式 HCC 和癌周组织呈现多种等位基因表型,包括杂合子、纯合子、杂合子丢失、MSI 和等位基因失衡等几种模式,其中 MSI 基因表型呈多种特征,常见的几种曲线峰图见图 1D, 1F-1H。根据上述几种表型特征,我们发现 56 例 HCC 发生 MSI 的总频率为 32.1% ($n=18$), 10 例(18.2%)出现高频 MSI (≥ 2 个基因座同时存在 MSI)。6 个基因座 MSI 的频率为 BAT-26(9/37, 24.3%), D13S170(7/32, 21.9%), D5S346 8/41(19.5%), D2S123 7/36(19.4%), D17S250 5/33(15.2%) 和 BAT25(6/45, 13.3%)。血清 HBsAg 阳性患者 MSI 频率显著高于 HBsAg 阴性者($P<0.01$),而与血清 AFP、肿瘤大小、细胞分化和转移等临床病理学参数无明显关系。

2.2 去离子处理和样品浓度对电泳结果的影响 PCR 产物乙醇纯化前,引物峰(噪峰)高,而样品峰(信号)相

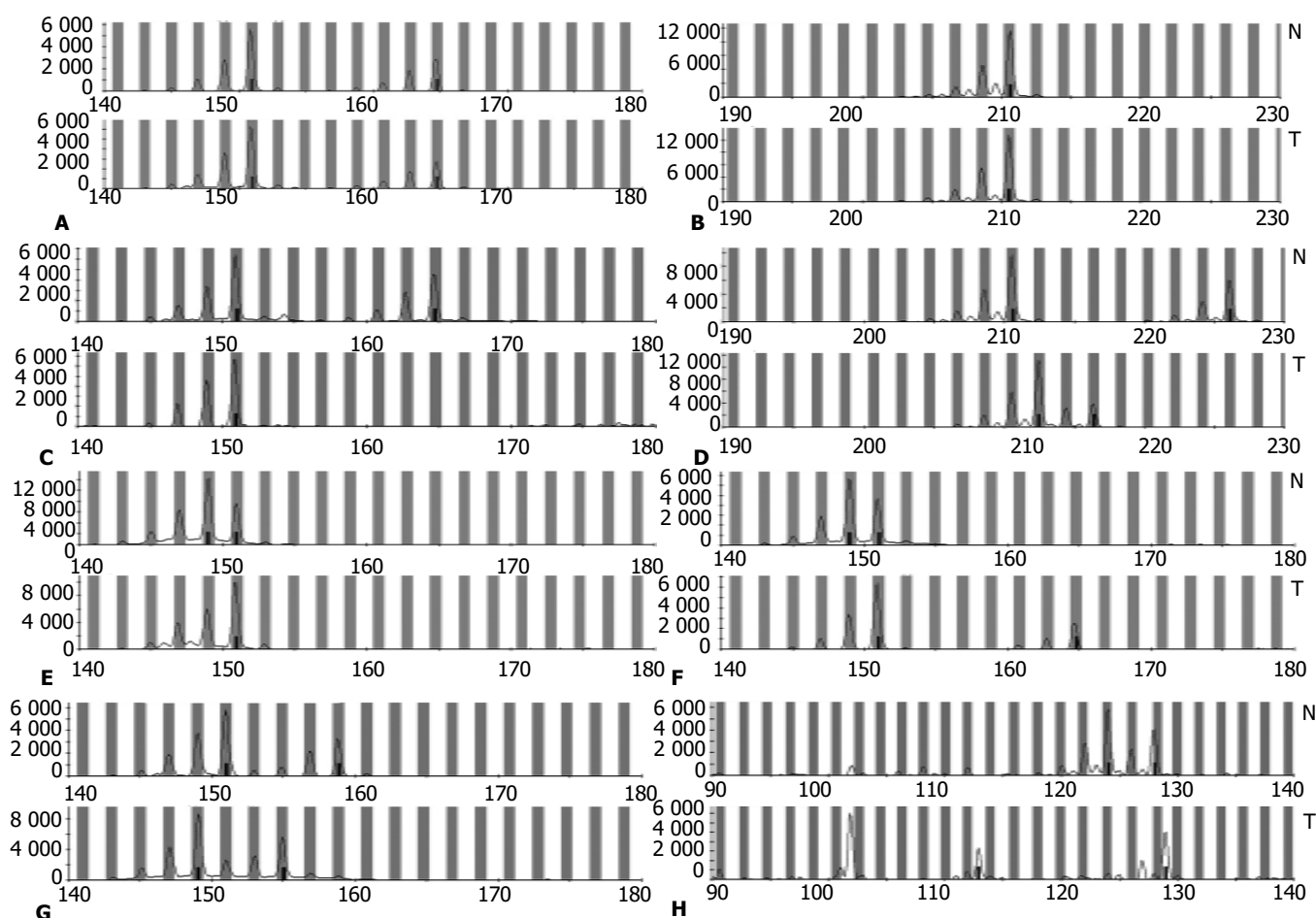


图1 HCC 微卫星不稳定性. A: 杂合子; B: 纯合子; C: 杂合子缺失; D: 微卫星不稳定性, 带移位; E: 等位基因失衡; F: 微卫星不稳定性, 带移位; G: 微卫星不稳定性, 带移位; H: 微卫星不稳定性, 带移位、额外片段; N: 癌周肝组织; T: 癌组织.

对较低; 纯化后, 引物峰较低, 而样品峰相对较高; 不同稀释浓度均不能改变纯化前后引物/样品峰(信号/噪峰)的比例, 纯化前的样品电泳速度明显快于纯化后的样品. 不同的稀释浓度对未纯化PCR产物的等位基因分型有明显影响, 表现为同一等位基因片段的大小不一致, 其分析评分(score)也较低, 达不到有效等位基因分型最低评分标准(score=2.5); 纯化后 PCR 产物等位基因分型一致, 且评分较高, 1:2-1:64 稀释的产物同一等位基因片段的大小一致, 不稀释和稀释128倍时的信号也能被检测到, 稀释8-16倍时(50 mg/L)最合适, 评分均在2.5以上, 表明盐离子对电泳有明显影响, 不同的稀释浓度对结果评分的影响较小.

2.3 Mg^{++} 和dNTP浓度对等位基因分型结果的影响 1.5-3.0 mmol/L $MgCl_2$, 0.1-0.2 mmol/L dNTP 对纯化后 PCR 产物等位基因分型无明显影响, 对分析 score 的影响也较低, 表明在标准微卫星 PCR 反应体系范围内, 均可获得理想的等位基因表型^[9]. 反应体系中用 1.5 mmol/L $MgCl_2$ 和 0.1 mmol/L dNTP 时评分最高.

2.4 电泳结果的可重复性 在不同时间对同一样品进行2次电泳. 其同一个等位基因大小的计算结果的最大偏差为0.2 bp, 表明应用毛细管电泳测序仪进行微卫星等位基因分型结果具有较高的稳定性和可重复性.

3 讨论

MSI 参与肿瘤发生、发展的机制尚不清楚, 推测是由于错配修复(MMR)基因的突变及功能异常, 使基因组的复制错误不能得以及时修复, 复制错误频率发生不断积累, 从而使细胞基因组微卫星 DNA 序列发生改变, 或造成某些抑癌基因失活或癌基因激活而导致细胞的异常转化和恶性增生. 有关 MSI 在 HCC 中的作用报道不一, Salvucci *et al*^[10]报道欧洲 HCC 患者中至少1个微卫星基因座存在 MSI 的阳性率为63%. 对我国上海、启东地区、广西、台湾和韩国、日本等地肝癌患者的研究却发现, 原发性肝癌 MSI 的阳性率不足8%^[11]. 我们最近的研究结果^[12]显示, 32.1%的 HCC 至少有1个基因座存在 MSI, 2个以上基因座出现 MSI 的有9例(16.1%), 其中以 BAT-26 和 D13S170 最高; HBsAg 阳性者 MSI 发生频率显著高于 HBsAg 阴性者, Dore *et al*^[7]也发现20%的病毒性肝炎和肝硬化的组织中存在 MSI, 这提示在中国和东南亚国家, MSI 在 HBsAg 阳性相关 HCC 发生中的作用要比想象的高; 有4例 HCC 同时检出 LOH, MSI, 提示仅在个别 HCC 中同时存在 LOH 和 MSI 两种通路. 本研究结果显示, 32.1%的 HCC 至少有一个基因座存在 MSI, 18.2%出现高频 MSI(≥ 2 个基因座同时存在 MSI); 以 BAT-26 (9/37, 24.3%)和 D13S170 (7/32, 21.9%)最高. 因此作者认为, 造成上述结果较大差异的

原因除与肝癌发生的地域分布、种族差异等因素有关外,还与研究者所选用的微卫星基因座的种类、数目、研究方法和对MSI阳性的判断标准不同有关,同时HCC自身是否存在独特的MSI热点也需进一步加以研究。

毛细管电泳采用电进样方法将DNA注入毛细管。样品中的盐浓度、dNTP和引物等小分子物质将对进样和电泳产生很大影响。PCR扩增产物中所含的盐浓度很高,样品未脱盐时,样品峰无法显示或峰较低,背景噪峰杂,信号/噪峰低,有时即使出现明确的信号峰,但由于噪峰杂无法获得满意的结果而导致失败。我们采用酒精纯化PCR产物,有效地减少了盐离子,获得了满意结分的等位基因表型,而不去离子的样本所测得的等位基因表型不稳定,结分也较低,因此结果也不可靠。此外,盐离子的存在还会使电泳中毛细管内通过的电流较高,产生盐离子结晶堵塞和损伤毛细管。各类DNA分析系统都只能对荧光强度在一定范围的信号进行有效的检测。PCR扩增时,由于每对引物标记的荧光强度不同、扩增效率也不同,容易造成PCR产物中不同DNA片段的荧光信号强度参差不齐,从而影响自动分型数据的准确性、甚至造成不必要的数据丢失。我们对PCR产物进行了对比稀释,发现在稀释4-64倍时都得到了理想的检测结果,不稀释和稀释128倍时的信号也能被检测到,经测定样品浓度在50 mg/L(稀释8-16倍)时比较合适,说明MegaBACE 500毛细管电泳所需DNA的量非常少,而且可检测的荧光信号强弱的范围相当大,技术特点较为明显。

为确认分析结果的可靠性,我们分别在不同时间对同一样品进行2次电泳。其同一个等位基因大小的计算结果的最大偏差为0.2 bp,48个样品在同一基因座进行2次电泳后的任一等位基因的大小计算结果偏差均小于0.2 bp(未进行人工校正前)。Genetic Profiler软件根据一定的算法自动地进行基因分型,并对每个分型结果的可靠性进行评估。分值越高则越可靠。>2.5的自动分型结果100%正确,可以不检查;<2.5的部分不正确,0表示无信号。据我们的样本结果分析,<2.5的结果一般占检测样本的15%左右,其原因之一与同一基因座的两个等位基因大小相近,使得其荧光信号重叠有关。

总之,MegaBACE 500分析仪具有高效率、高通量、自动化、程序化等特点,能自动灌胶、上样、电泳和收集数据。与传统的板式凝胶电泳比较,省去了烦琐的

操作步骤,不仅节省了人力,提高了效率,而且也避免了在操作中的人为差错,保证了电泳条件的稳定性和可重复性。此外,Genetic Profiler软件也有强大的分析能力,根据设定的参数和算法完成一次电泳样本的自动分型只要1-2 min,而且保证了结果的客观性,尤其适合大样本的研究^[13-14]。

4 参考文献

- 1 Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002;31:339-346
- 2 Feitelson MA, Sun B, Satioglu Tufan NL, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002;21:2593-2604
- 3 Berg KD, Glaser CL, Thompson RE, Hamilton SR, Griffin CA, Eshleman JR. Detection of microsatellite instability by fluorescence multiplex polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2000;2:20-28
- 4 Tomlinson IP, Lambros MB, Roylance RR. Loss of heterozygosity analysis: practically and conceptually flawed? *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:349-353
- 5 Bocker T, Diermann J, Friedl W, Gebert J, Holinski-Feder E, Karner-Hanusch J, von Knebel-Doeberitz M, Koelble K, Moeslein G, Schackert HK, Wirtz HC, Fishel R, Ruschoff J. Microsatellite instability analysis: a multicenter study for reliability and quality control. *Cancer Res* 1997;57:4739-4743
- 6 Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997;57:4749-4756
- 7 Dore MP, Realdi G, Mura D, Onida A, Massarelli G, Dettori G, Graham DY, Sepulveda AR. Genomic instability in chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32:698-703
- 8 Medintz IL, Lee CC, Wong WW, Pirkola K, Sidransky D, Mathies RA. Loss of heterozygosity assay for molecular detection of cancer using energy-transfer primers and capillary array electrophoresis. *Genome Res* 2000;10:1211-1218
- 9 Koreth J, O'Leary JJ, O'D McGee J. Microsatellites and PCR genomic analysis. *J Pathol* 1996;178:239-248
- 10 Salvucci M, Lemoine A, Saffroy R, Azoulay D, Lepere B, Gaillard S, Bismuth H, Reynes M, Debucre B. Microsatellite instability in European hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999;18:181-187
- 11 Sheu JC, Lin YW, Chou HC, Huang GT, Lee HS, Lin YH, Huang SY, Chen CH, Wang JT, Lee PH, Lin JT, Lu FJ, Chen DS. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Br J Cancer* 1999;80:468-476
- 12 张树辉, 丛文铭, 冼志红, 吴孟超. 肝细胞癌微卫星变异的研究. *第二军医大学学报* 2003;24:364-368
- 13 Delmotte F, Leterme N, Simon JC. Microsatellite allele sizing: difference between automated capillary electrophoresis and manual technique. *Biotechniques* 2001;31:810
- 14 Wedemayer GJ, Medintz I, Wong WW, Scherer JR, Mathies RA. Conversion of capillary electrophoresis microchip genotyping data for analysis with Genetic Profiler software. *Biotechniques* 2001;30:122-128