

胃癌及癌前病变中微卫星不稳定性的变化

李异玲, 周立平, 王轶淳, 付宝玉

背景资料
MSI是肿瘤常见的遗传学改变之一, 在肿瘤的形成中起重要作用, 目前研究表明, MSI与肿瘤的早期诊断, 浸润, 分期, 转移, 病理类型和预后等有关。

李异玲, 付宝玉, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001
周立平, 中国医科大学附属第一医院检验科 辽宁省沈阳市 110001
王轶淳, 中国医科大学附属第一医院内镜中心 辽宁省沈阳市 110001
辽宁省自然科学基金资助项目, No. 2006225007-4
通讯作者: 李异玲, 110001, 沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院消化内科. lyl-72@163.com
收稿日期: 2007-08-28 修回日期: 2007-12-17

Changes in microsatellite instability in gastric cancer and precancerous lesions

Yi-Ling Li, Li-Ping Zhou, Yi-Chun Wang, Bao-Yu Fu

Yi-Ling Li, Bao-Yu Fu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Li-Ping Zhou, Department of Laboratory, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Yi-Chun Wang, Department of Endoscopy, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of Liaoning, No. 2006225007-4

Correspondence to: Dr. Yi-Ling Li, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. lyl-72@163.com

Received: 2007-08-28 Revised: 2007-12-17

Abstract

AIM: To investigate the changes in microsatellite instability (MSI) in gastric cancer and precancerous lesions.

METHODS: DNA was extracted by the method of saturated sodium chloride. MSI was detected by PCR-SSCP denaturing PAGE and silver staining, microsatellite stability (MSS), low-frequency MSI (MSI-L) and high-frequency MSI (MSI-H) were evaluated following the international MSI workshop-recommended standard.

RESULTS: According to the international MSI workshop recommended standard, the total positive rate of MSI was 13.3% for atrophic gastritis, 16.7% for intestinal metaplasia, 23.3% for atypical hyperplasia, 30% for early stage gastric

cancer, and 40% for advanced stage gastric cancer. There were differences between three kinds of precancerous lesions and gastric cancer (χ^2 was 4.364, 2.522 and 3.089, respectively, $P < 0.05$). There was no difference between early and advanced stage gastric cancer (χ^2 was 0.071). The positive rate of MSI in well-differentiated adenocarcinoma was higher than that in poorly differentiated adenocarcinoma (χ^2 was 4.022, $P < 0.05$).

CONCLUSION: MSI is an early molecular marker in the pathogenesis of gastric cancer. The malignant degree of MSI positive gastric cancer may be low.

Key Words: Gastric cancer; Microsatellite instability; Method of saturated sodium chloride

Li YL, Zhou LP, Wang YC, Fu BY. Changes in microsatellite instability in gastric cancer and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(1): 94-97

摘要

目的: 探讨胃癌及癌前病变中微卫星不稳定性(MSI)的变化。

方法: 饱和氯化钠法提取组织DNA, PCR-SSCP变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测MSI, 根据规定标准来判定microsatellite stable(MSS), low frequency MSI(MSI-L)和high-frequency MSI(MSI-H), 计算总MSI率。

结果: MSI在萎缩性胃炎, 肠上皮化生, 不典型增生, 早期胃癌和进展期胃癌中检出率分别为13.3%、16.7%、23.3%、30%和40%, 三种癌前期病变和早期胃癌之间有显著差异(χ^2 值分别为4.364、2.522、3.089, $P < 0.05$), 早期胃癌与进展期胃癌没有显著差异(χ^2 值为0.071 $P > 0.05$), 高分化腺癌中MSI的阳性率明显高于低分化腺癌(χ^2 值为4.022, $P < 0.05$)。

结论: MSI是胃癌发生中的早期分子标志, 其阳性的胃癌恶性程度相对较低。

关键词: 胃癌; 微卫星不稳定性; 饱和氯化钠法

李异玲, 周立平, 王轶淳, 付宝玉. 胃癌及癌前病变中微卫星不稳定性的变化. 世界华人消化杂志 2008; 16(1): 94-97
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/94.asp>

0 引言

胃癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 居我国消化道恶性肿瘤之首, 其发病率男性为39.2-62.0/10万, 女性为19.1-24.8/10万, 死亡率为17.3/10万, 因此研究其发病机制, 提供有效的早期诊断和治疗策略具有重大意义. 在胃癌的发生中, 从正常胃黏膜上皮转化成癌是一个多步骤的过程, 他涉及到多种癌基因、抑癌基因、端粒及端粒酶、细胞黏附因子和DNA错配修复基因等的异常和积累, 其中错配修复基因功能的失活会导致微卫星小体(MS)重复序列的不稳定, 即微卫星不稳定(MSI). 本研究旨在探讨胃癌及癌前期病变中微卫星不稳定性的变化.

1 材料和方法

1.1 材料 收集中国医科大学2006-2007年胃镜中心活检标本, 萎缩性胃炎、肠上皮化生、不典型增生及对应的正常胃黏膜各30例, 年龄范围38-72(平均年龄58)岁, 男女比例2.21:1(62/28). 收集同期肿瘤外科术后大体标本, 早期胃癌及进展期胃癌各30例, 所有患者术前均未进行化疗或放疗, 年龄范围36-68(平均年龄54)岁, 男女比例2.33:1(63/27). 上述标本均经OCT包埋固定, 立即置于液氮罐中, 并置于-70℃冰箱中永久保存.

1.2 方法

1.2.1 饱和氯化钠法提取组织DNA: 取标本组织10 g捣碎, 加入100 mL/L的SDS 50 μ L, 20 g/L蛋白酶K 5 μ L, TE液(pH8.0)定容至500 μ L, 37℃水浴过夜后, 加入1/3体积饱和氯化钠, 4℃静置10 min, 10 000 g离心10 min, 抽取上清液, 加入等体积氯仿混匀抽提, 10 000 g离心10 min, 取上清液, 加入100 mL醋酸钠(3 mol, pH5.6), 70 μ L异丙醇沉淀, 弃上清, 保留沉淀出的DNA, 用700 mL/L乙醇洗脱两次, 37℃烤箱中干燥10 min根据沉淀的量, 加入TE液100-200 μ L溶解, 置于-20℃冰箱中保存备用.

1.2.2 PCR-SSCP方法检测MSI: 我们选择BAT26, D2S123, D5S346, D17S799和D18S34作为微卫星标志点, 上述引物由北京奥科公司合成, 引物序列见表1. 反应体积为20 μ L, 含引物2 μ mol, 10 \times buffer 2 μ L(含Mg²⁺ 1.5 mmol/L), dNTP 200 mmol/L, Taq DNA聚合酶2单位, 基因组DNA

100 ng. 反应条件为: 95℃预变性5 min, 94℃ 30 s, 56℃ 40 s, 72℃ 30 s, 进行32个循环, 72℃延伸10 min. PCR产物按1:5与变性缓冲液混合(950 mL/L甲酰胺、20 mmol/L EDTA, 2.5 g/L溴酚兰), 97℃变性10 min后立即置于冰水中, 160 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳4 h(丙烯酰胺:甲叉丙烯酰胺 29:1, 含7 mol/L尿素), 电泳后的凝胶置于100 mL/L乙醇中内固定10 min以上, 0.018 mmol/L HNO₃处理20 min, 水洗3次, 每次1 min, 12 mmol/L AgNO₃染色2次, 每次10 min, 水洗2次, 每次1 min, 2.83 mmol/L Na₂CO₃, 0.06 g/L甲醛显影液显影10 min, 100 mL/L乙酸固定10 min以上, 水洗3次, 每次5 min, 玻璃纸封胶, 固定, 干燥.

统计学处理 应用SPSS软件对实验数据进行统计学分析, $P < 0.05$ 为有显著差异.

2 结果

与正常组织相比, 胃癌及癌前期病变组织有额外的DNA等位片段或出现等位片段泳动, 即可判断为MSI. 其中1个位点发生MSI为MSI-L, 2个或2个以上位点发生MSI为MSI-H, 没有MSI发生为MSS. 胃癌及癌前期病变中MSI的检出结果见表2, 若将5个位点综合分析, 其MSI阳性率见表3.

3 讨论

MS是一种散布于人类全基因组中的简单串联的核苷酸重复序列, 多存在于非编码区内, 通常为1-6个碱基对的15-30个重复单位. 微卫星小体有1, 2, 3和4个重复核苷酸序列等多种形式, 常见的有(A)_n和(CA)_n重复. MS约占真核基因组的5%, 人类基因组大约有50 000-100 000个CA/GT重复序列, 发生突变的频率为10⁻³-10⁻⁵.

MSI是肿瘤常见的遗传改变之一, 在肿瘤的形成中起重要作用, 是肿瘤形成的一个机制. 从基因水平看, MS做为基因变异和重排的来源, 可能在肿瘤-基因调控中起重要作用^[1-3]. 目前研究结果表明, MSI与肿瘤的早期诊断、浸润、分期、转移、病理类型和预后等有关. MSI阳性表达见于肺癌, 乳腺癌, 胃癌, 结肠癌, 泌尿系统肿瘤, 白血病, 子宫内膜癌, 卵巢癌和胶质瘤等多种肿瘤中^[4-7]. 由于应用PCR-SSCP技术检测MSI的方法简单, 结果可靠, MSI目前已经成为基因领域预测肿瘤发生, 早期诊断, 判定分期及预后的有效手段. 但由于不同研究选择标志物的数量及位点的不同, MSI-H和MSI-L判定标准的不同, 使得研究结果有很大的差异. 目前国际MSI

创新盘点
本文应用PCR-SSCP方法, 选用同样的微卫星标志物, 同样的判定标准, 探讨胃黏膜癌变过程中MSI的动态变化, 结果表明MSI是胃癌发生中的早期分子标志, 其阳性的胃癌恶性程度相对较低.

应用要点
通过检测MSI, 可以早期诊断胃癌, 判断预后。

表 1 微卫星位点及引物序列

位点	位置	引物序列
BAT26	2p ¹⁶ -2p ¹⁶	p ₁ TGACTACTTTTGACTTCAGCC p ₂ AACCATTC AACATTTTAAACCC
D2S123	2p ²¹ -2p ¹⁶	p ₁ AAACAGGATGCCTGCCTTTA p ₂ GGACTTTCCACCTATGGGAC
D5S346	5q ²¹ -5q ²²	p ₁ ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG p ₂ CAGATAAGACAGTATTACTAGTT
D17S799	17p ^{ter} -17p ^{ter}	p ₁ ATTGCCAGCCGTCAGTT p ₂ GACCAGCATATCATTATAGACAA
D18S34	18q ^{12.2} -18q ^{12.3}	p ₁ CAGAAAATTCTCTCTGGCTA p ₂ CTCATGTTCTCTGGCAAGAAT

表 2 胃癌及癌前期病变中MSI的检出(n = 30)

病变	BAT26	D2S123	D5S346	D17S799	D18S34
萎缩性胃炎	1	1	0	1	2
肠上皮化生	2	0	1	1	2
不典型增生	3	2	1	2	1
早期胃癌	7	6	6	8	7
进展期胃癌	6	8	4	7	9

表 3 胃癌及癌前期病变中MSI的表达(%)

病例	n	MSS	MSI-L	MSI-H	总MSI率
萎缩性胃炎	30	26	10(3/30)	3.3(1/30)	13.3
肠上皮化生	30	25	13.3(4/30)	3.3(1/30)	16.7
不典型增生	30	23	13.3(4/30)	10(3/30)	23.3
早期胃癌	30	19	10(3/30)	26(8/30)	30
进展期胃癌	30	18	10(3/30)	30(9/30)	40
高分化腺癌	32	15	15.6(5/32)	37.5(12/32)	53.1
低分化腺癌	12	8	16.6(2/12)	16.6(2/12)	33.3

工作站推荐一组检测微卫星标志物至少应为5个, 其中有 ≥ 2 个标志物发生MSI时为MSI-H, 1个标志物发生MSI时为MSI-L, 没有MSI发生为MSS^[8]。随着对不同肿瘤标志物选择及判定标准的统一, MSI与肿瘤发生的关系也将进一步明确。目前研究表明, MSI阳性与MSI阴性的肿瘤可能存在不同的机制, 其中胃癌发生MSI变异频率是最高的, 高于其他任何一种散发性癌, 具体原因不清^[9]。关于MSI与胃癌的关系国内外研究的较多, 结果也很不一致。Vauhkonen *et al*^[10]研究认为MSI阳性的胃癌具有低浸润、预后好的特点, 并且在肠型胃癌的阳性率高于弥漫型胃癌。Hasuo *et al*^[11]研究发现早期胃癌行内镜下切除术后, MSI的检测可作为评判肿瘤复发的标志。关于MSI与癌前病变的关系, 国内外相关研究较少。Hamamoto *et al*^[12]通过9个微卫星位点的研究, 结果表明, 胃癌组织中MSI阳性率为46.7%, 癌旁肠化组织MSI阳性率为26.7%。Roa *et al*^[13]研究表明在慢性胃炎无癌变的肠化组织中MSI的表达率为59%, 我们根据国际MSI工作站的推荐选择5个MSI标志物, 根据上述的标准进行判定, 其结果表明, 萎缩性胃炎MSI总的阳性率为13.3%, 其中10%为MSI-L; 肠上皮化生中MSI阳性率为16.7%, 13.3%为MSI-L; 不典型增生组MSI总的

检出率为23.3%, 其中13.3%为MSI-L; 在胃癌患者中, MSI总的阳性率为40%, 10%为MSI-L, 30%为MSI-H。上述研究结果表明: MSI在萎缩性胃炎及肠上皮化生等癌前期病变阶段就开始出现, 并且其在癌前期病变的表达阳性率与胃癌比有显著差异($P<0.05$), 说明MSI是胃癌发生的早期事件之一。关于MSI与胃癌分化的关系, 文献报道不尽一致, Tajima *et al*^[14]研究发现MSI的表达与HGM, MUC6相一致, 在高分化腺癌中的阳性率显著高于低分化腺癌。Mizoshita *et al*^[15]发现低分化腺癌MSI发生率高于高分化腺癌, MSI与胃癌的浸润转移关系密切。本研究结果表明, 高分化腺癌中MSI的阳性率明显高于低分化腺癌($P<0.05$), 提示MSI阳性胃癌恶性程度可能相对较低。

本研究结果提示MSI是胃癌发生过程中常见的改变, 因此检测MSI有可能成为胃癌早期诊断以及判断预后的有效手段。

4 参考文献

- 1 Woerner SM, Kloor M, von Knebel Doeberitz M, Gebert JF. Microsatellite instability in the development of DNA mismatch repair deficient

- tumors. *Cancer Biomark* 2006; 2: 69-86
- 2 Cervantes A, Rodriguez Braun E, Perez Fidalgo A, Chirivella Gonzalez I. Molecular biology of gastric cancer. *Clin Transl Oncol* 2007; 9: 208-215
- 3 Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, Foster N, Sargent DJ, La Plant B, French AJ, Laurie JA, Goldberg RM, Thibodeau SN, Witzig TE. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology* 2006; 131: 729-737
- 4 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
- 5 Rosen DG, Cai KQ, Luthra R, Liu J. Immunohistochemical staining of hMLH1 and hMSH2 reflects microsatellite instability status in ovarian carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19: 1414-1420
- 6 Sawhney MS, Farrar WD, Gudiseva S, Nelson DB, Lederle FA, Rector TS, Bond JH. Microsatellite instability in interval colon cancers. *Gastroenterology* 2006; 131: 1700-1705
- 7 Pizzi C, Di Maio M, Daniele S, Mastranzo P, Spagnoletti I, Limite G, Pettinato G, Monticelli A, Cocozza S, Contegiacomo A. Triplet repeat instability correlates with dinucleotide instability in primary breast cancer. *Oncol Rep* 2007; 17: 193-199
- 8 Ashktorab H, Smoot DT, Farzanmehr H, Fidelia-Lambert M, Momen B, Hyland L, Iacosozi-Dononue C, Carethers JM, Goel A, Boland CR, Giardiello FM. Clinicopathological features and microsatellite instability (MSI) in colorectal cancers from African Americans. *Int J Cancer* 2005; 116: 914-919
- 9 Bacani J, Zwingerman R, Di Nicola N, Spencer S, Wegrynowski T, Mitchell K, Hay K, Redston M, Holowaty E, Huntsman D, Pollett A, Riddell R, Gallinger S. Tumor microsatellite instability in early onset gastric cancer. *J Mol Diagn* 2005; 7: 465-477
- 10 Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 651-674
- 11 Hasuo T, Semba S, Li D, Omori Y, Shirasaka D, Aoyama N, Yokozaki H. Assessment of microsatellite instability status for the prediction of metachronous recurrence after initial endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer. *Br J Cancer* 2007; 96: 89-94
- 12 Hamamoto T, Yokozaki H, Semba S, Yasui W, Yunotani S, Miyazaki K, Tahara E. Altered microsatellites in incomplete-type intestinal metaplasia adjacent to primary gastric cancers. *J Clin Pathol* 1997; 50: 841-846
- 13 Roa JC, Villaseca MA, Roa I, Araya JC. Genetic changes in chronic gastritis: study of microsatellite instability and loss of heterozygosity. *Rev Med Chil* 2003; 131: 1365-1374
- 14 Tajima Y, Yamazaki K, Makino R, Nishino N, Aoki S, Kato M, Morohara K, Kaetsu T, Kusano M. Gastric and intestinal phenotypic marker expression in early differentiated-type tumors of the stomach: clinicopathologic significance and genetic background. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6469-6479
- 15 Mizoshita T, Tsukamoto T, Cao X, Otsuka T, Ito S, Takahashi E, Nakamura S, Nakamura T, Yamamura Y, Tatematsu M. Microsatellite instability is linked to loss of hMLH1 expression in advanced gastric cancers: lack of a relationship with the histological type and phenotype. *Gastric Cancer* 2005; 8: 164-172

同行评价
本文应用方法先进, 科学性强, 结论明确, 对临床工作具有一定参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 2007 年 1 - 12 月份收稿及发稿数字统计结果

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 2007年1-48期共发表文章1120篇, 其中国际文章791篇, 占71%; 国内文章329篇, 占29%。社论63篇, 综述30篇, 专题亮点139篇, 文章663篇(基础研究和临床研究), 病例报告193篇, 读者来信等32篇, 评论性文章占发文总量的21%。2007年1-12月份共收稿2628篇, 其中国内稿件980篇, 占37%; 国外稿件1648篇, 占63%; 退稿1052篇, 退稿率为40%。(常务副主任: 刘晔 2008-01-01)