

自发性破裂肝癌组织 CD16 突变结构基因检测

王 伟¹ 项和平¹ 朱立新² 耿小平³

摘要 目的 检测肝癌自发性破裂中 CD16 结构基因突变,从分子水平更深入地探讨肝癌自发性破裂的机制。方法 收集肝癌自发性破裂及非破裂患者各 22 例资料。患者肝癌组织中 CD16 结构基因 S1、EC1 和 EC2 DNA 突变情况应用 PCR 法及基因测序技术进行检测。结果 EC1 内第 1483 位、1533 位及 1605 位出现 G/A、G/A 及 A/G 等错义突变,EC2 内在第 5223 位及 5277 位出现 T/C 及 T/G 等错义突变。Y5223H 及 Y5277F 两个错义位点突变率(54.54% vs 0)在两组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。非破裂组 EC1 及 EC2 总的突变发生频率显著低于破裂组($P < 0.05$)。结论 FcγRⅢA 结构基因突变表面与肝癌巨噬细胞受体 CD16 合成下降有关,是肝癌自发性破裂的可能机制。

关键词 肝细胞肝癌;自发性;破裂;基因突变;机制

中图分类号 R 394.112

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)06-0825-04

肝癌自发性破裂是一种危及生命的急性腹腔内出血性并发症。有学者认为肝癌自发性破裂主要病

因系肿瘤自身体积过大及出血坏死^[1-2],尽管这种观点有一定临床基础并被广泛接受,但一些小肝癌($\phi < 3$ cm)也时有破裂的现象,无法用上述机理完美解释^[3]。故该课题组试图从肝癌血管损伤的角度解释肝癌自发性破裂现象,研究^[4]显示肝癌组织内血管损伤是肿瘤自发性破裂的可能机制,而且血管损伤是由于自发性破裂肝癌组织中功能受损的巨噬细胞不能及时有效地清除血管内的抗原抗体复合物,最终引起该复合物沉积在血管壁所致。并由此提出肝癌血管免疫性受损机制假说^[2-4]。进一步研究^[5]显示肝癌破裂患者中介导巨噬细胞吞噬功能的表面受体 CD16 表达下调。该研究假设 CD16 结构基因突变是其表达下调的可能原因,采用对其结构基因测序的方法试图找出二者之间的内在联系。

1 材料和方法

1.1 病例资料 选择 2013 年 1 月~2014 年 6 月在安徽医科大学第二附属医院自发性肝癌破裂患者 22 例,排除外伤因素所致肝癌破裂;选取性别、年龄、肿瘤大小、凝血酶原时间(prothrombin time,PT)和门静脉癌栓等 5 个临床指标进行混杂因素控制;选取同期手术治疗的非破裂肝癌 22 例作为对照。见表 1。

2015-03-14 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:KJ2008A155)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院¹ 急诊外科,³ 普通外科,合肥 230601

安徽医科大学第一附属医院² 中心实验室,合肥 230001

作者简介:王 伟,男,主治医师;

项和平,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

wwok68@hotmail.com

logic features. **Methods** The study comprised tumor sections from 151 gastric cancer patients treated with curative resection, 74 matched lymph nodes, and 20 cases of adjacent normal tissues controls, which were evaluated for PD-L1 and PD-1 protein expression by immunohistochemistry. **Results** PD-L1 and PD-1 expression were increased in cancers compared to adjacent normal tissues, with positive rate of 60.93% and 38.41%, respectively. Meanwhile, expressions of PD-L1 and PD-1 were highly correlated between the primary tumors and metastatic nodes, with concordance rates of 82.43% and 87.84% for PD-L1 and PD-1, respectively. PD-L1 expression in gastric carcinoma was not correlated with PD-1 expression in lymphocyte. Expression of PD-L1 was significantly correlated with some clinicopathologic features including stage, depth of invasion, lymph node metastasis and vascular metastasis ($P < 0.05$), but not PD-1. **Conclusion** PD-L1 and PD-1 are overexpressed in gastric cancer tissues. PD-L1 expression plays a critical role in the pathogenesis of human gastric cancer, suggesting that it might be used as a new biomarker to predict the disease progression and prognosis.

Key words gastric cancer; PD-L1; PD-1; immune evasion

表1 一般临床资料

项目	破裂组(n=22)	非破裂组(n=22)	P 值
年龄(岁 $\bar{x} \pm s$)	56.18 ± 18.45	55.82 ± 14.36	0.953
性别(男/女 n)	18/4	18/4	—
肝硬化(%)	63.64	72.73	1.000
PT(s $\bar{x} \pm s$)	14.56 ± 2.11	14.07 ± 1.22	0.360
HBsAg 阳性率(%)	90.91	72.73	0.586
AFP 阳性率(%)	36.36	63.64	0.201
门静脉癌栓(%)	18.18	18.18	—
肿瘤包膜完整(%)	72.73	81.82	1.000
肿瘤大小(cm $\bar{x} \pm s$)	7.95 ± 3.68	7.18 ± 2.92	0.592

1.2 实验方法 包括基因组 DNA 提取、PCR、基因测序。见表 2。

表2 引物序列及 PCR 反应条件

基因	引物序列	扩增片段长度(bp)	退火温度(℃)
S1	F:5'-AAAGGAAATGCTGGGTGACAG-3' R:5'-CGTGGGAGTCTCATTCGTAGC-3'	263	59
EC1	F:5'-GCCTGCTCCTCTCCCTGTCC-3' R:5'-GGACCTTTTGTTCACCCCTTTA-3'	361	60
EC2	F:5'-GGGCTTGGGCTGTCTGTGT-3' R:5'-ACCAGGAGGAACACATATGA-3'	414	61
PinX2	F:5'-GTGGTATTTTCCGGGTATC-3' R:5'-GCATAAGTTTCTCCAGTCTC-3'	262	56

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行分析。数据除特殊提及外均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,分类变量表达为绝对数值(百分数)的形式。连续变量之间的比较采用非参数检验的 Mann-Whitney U 检验法,分类变量采取 χ^2 检验及 t 检验。Fisher 检验无统计值。

2 结果

2.1 CD16 外显子普通 PCR 及双重 PCR 结果 3 个外显子 S1、EC1 及 EC2 的片段长度分别为 263、361、414 bp,PCR 扩增条带单一清晰,同时为了保证实验可靠性,加入 PinX2 作为参照进行双重 PCR,同样能扩增 3 个外显子。证实 CD16 结构基因无移码、插入及缺失突变。见图 1。

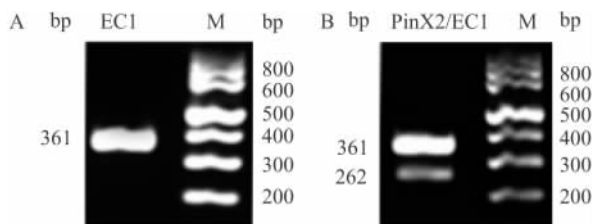


图1 CD16 外显子 EC1 及 PinX2 与 EC1 双重 PCR
M:Marker; A:EC1 片段 361bp;B:PinX2 片段 262 bp

2.2 利用基因测序技术检测 CD16 外显子 S1、EC1 及 EC2 的 DNA 突变情况 G/A 同义突变位于 S1 内第 233 位编码子;G/C、C/T、G/A、G/A 及 A/G 等杂合突变分别位于 EC1 内第 1397 位、1403 位、1483 位、1533 位及 1605 位,其中前两位为同义突变,后 3 个位点为错义突变,分别对应天冬酰胺/丝氨酸(Asn/Ser)、天冬酰胺/天冬氨酸(Asn/Asp)及缬氨酸/异亮氨酸(Val/Ile)改变;G/A、T/C、T/C 及 T/G 等杂合突变分别位于 EC2 内第 5191 位、5223 位、5249 位及 5277 位,其中第 5223 位及 5277 位为错义突变,分别对应酪氨酸/组氨酸(Tyr/His)及酪氨酸/苯丙氨酸(Tyr/Phe)改变,其余 2 个位点为同义突变。Y5191H 及 Y5277F 位点突变率两组差异有统计学意义($P < 0.05$),另外几个错义突变位点突变率差异无统计学意义。见表 3 图 2、3。

破裂组共有 18 例标本 EC1 发生不同频次的突变,总突变率为 81.81% (18/22)。剩余 4 个标本全是无突变的野生型。而非破裂组 EC1 中仅有 8 个标本检测到突变,总突变率为 36.36% (8/22)。非破裂组总突变率显著低于破裂组($Z = -2.369$, $P < 0.05$),见表 4。

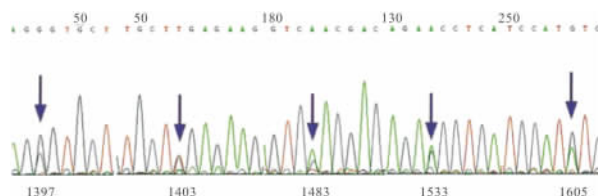


图2 1397G/C、1403C/T、1483G/A、1533G/A 及 1605A/G 杂合突变

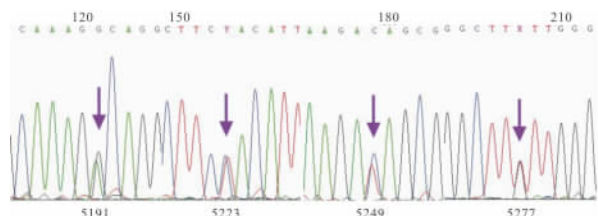


图3 5191G/A、5223T/C、5249T/C 及 5277T/G 杂合突变

表4 破裂组和非破裂组外显子 EC1 总突变位点频数分布比较(n)

EC1 突变位点 点数(n)	破裂组 (n)	非破裂组 (n)	统计值
5	2	0	$Z = -2.369$ $P = 0.023$
4	2	0	
3	6	2	
2	6	4	
1	2	2	
0	4	14	

表3 破裂组和非破裂组患者 FcγRⅢA 基因突变位点频率比较(n)

突变位点	破裂组(n=22)	非破裂(n=22)	核苷酸变	氨基酸改变	P 值
SI					
233	4(18.18)	0(0.00)	G/A	—	0.476
EC1					
1397	8(36.36)	2(9.09)	G/C	—	0.311
1403	10(45.45)	4(18.18)	C/T	—	0.361
1483	10(45.45)	2(9.09)	G/A	Asn/Ser(N1483S)	0.149
1533	10(45.45)	6(27.27)	G/A	Asn/Asp(N1533D)	0.659
1605	12(54.54)	2(9.09)	A/G	Val/Ile(V1605I)	0.063
EC2					
5191	12(54.54)	0(0.00)	G/A	—	0.012
5223	12(54.54)	0(0.00)	T/C	Tyr/His(Y5223H)	0.012
5249	12(54.54)	0(0.00)	T/C	—	0.012
5277	12(54.54)	0(0.00)	T/G	Tyr/Phe(Y5277F)	0.012

3 讨论

肝癌是一种多基因病,其发生发展是遗传素质及环境因素相互作用的结果,但肝癌自发性破裂与基因突变的相关性研究鲜见报道。通过 PubMed 中“SNP”比对,本研究显示杂合突变位点均为单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphisms, SNP)位点;同时非破裂组中 EC1 外显子总的突变发生频率明显低于破裂组,均提示基因突变与肝癌自发性破裂有相关性。尽管未发现致病性点突变位点,但仍有理由推测肝癌自发性破裂患者 CD16 基因可能存在尚未发现的致病性点突变。因为一些突变热点正是致病性点突变所在位置,而这些 DNA 序列段发生突变的频率远远高于基因组的平均数^[6-8]。比如目前发现的世界不同种族人群中的 β-地中海贫血突变已超过 200 种,而这些突变却集中在一个不到 2 kb 的 β-珠蛋白基因上^[8]。

CD16 是 FC 受体的一种,即 FcγRⅢ。其结构基因的多态性是目前研究的热点,某些临床疾病如大 B 淋巴细胞瘤等的发生与一些多态性位点具有明显相关性^[9-11],而其中编码 2 个细胞膜外区 Ig-C2 样结构域的 EC1 及 EC2 外显子被广泛研究^[12-15]。3 个密码子 158、230 和 559 的突变:F158V、L230H 和 G559T 等被认为与冠状动脉疾病及自身免疫性疾病等多种疾病有关^[13-15]。L230H 多态性在复发性病毒感染患者中被 Vires et al^[12]发现是导致自然杀伤细胞表面 FcγRⅢ基因中 EC1 改变,进而引起自然杀伤细胞功能受损的可能机制。而溃疡性结肠炎患者 CD16 外显子 EC2 中存在 G559T 突变位点^[13]。

F158V 与更多疾病的发病存在关联。Gavasso et al^[14]在对挪威国内冠状动脉疾病进行研究中发现 F158V 等位基因存在变异现象。而携带有纯合子 FcγRⅢ A-158V 的英国人更容易罹患类风湿关节炎,特别是结节性关节炎^[15]。在国内的研究中同样发现类似现象,姜福琼等^[16]发现云南汉族人群中 SLE 患者及狼疮肾炎患者的 FcγRⅢ A-F/F 基因型和 FcγRⅢ A-F 等位基因的发生频率显著升高,提示携带有 FcγRⅢ A-F 基因的患者更易罹患 SLE。因此 FcγRⅢ A 基因多态性能影响单核吞噬细胞表面受体 CD16 的表达以及 CD16 分子亲和力的改变,表现为巨噬细胞发挥调理吞噬作用时对病原体或抗原抗体复合物的识别及清除能力下降。

本研究首次对自发性破裂肝癌组织中巨噬细胞表面 CD16 分子结构基因的突变进行研究,研究显示 5 个密码子的 SNP 位点杂合突变,同时发现破裂组 5223T/C 及 5277T/G 这 2 个位点突变率明显升高。因此推测肝脏巨噬细胞清除抗原抗体复合物功能的下降的可能机制是由于 5223 位点 T/C 及 5277 位点 T/G 多态性引起 EC2 编码蛋白结构及其完整性异常,最终导致 CD16 分子表达或其亲和力下降。

综上所述,通过本研究表明 FcγRⅢ A 基因突变是自发性破裂肝癌组织中吞噬细胞表面受体 CD16 表达量明显下降可能因素之一,而发现的 5 个杂合突变位点是否引起 CD16 mRNA 转录下降及 mRNA 逆转录为 cDNA 是否同样会出现这些突变还有待进一步证实。同时因为样本量较小,目前不能确定发现的 5 个 SNP 位点是否可以成为肝癌自发性破裂的分子学标记。因此需要在扩大样本量的基础上对

这 5 个等位基因分布频率与肝癌自发性破裂的相关性进行研究。

参考文献

- [1] Kanematsu M ,Imaeda T ,Yamawaki Y ,et al. Rupture of hepatocellular carcinoma: predictive value of CT findings [J]. *AJR Am J Roentgenol* ,1992 ,158(6) :1247 -50.
- [2] Zhu L X ,Wang G S ,Fan S T. Spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma [J]. *Br J Surg* ,1996 ,83(5) :602 -7.
- [3] Poon R T ,Ng I O ,Lau C ,et al. Serum vascular endothelial growth factor predicts venous invasion in hepatocellular carcinoma: a prospective study [J]. *Ann Surg* 2001 ,233(2) :227 -35
- [4] Zhu L X ,Geng X P ,Fan S T. Spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma and vascular injury [J]. *Arch Surg* ,2001 ,136(6) :682 -7.
- [5] 吕成超 ,朱立新 ,耿小平. 巨噬细胞吞噬功能受损对肝癌自发性破裂的影响 [J]. *中华实验外科杂志* 2006 ,26(3) :271 -3.
- [6] Mancini D ,Singh S ,Ainsworth P ,et al. Constitutively methylated CpG dinucleotides as mutation hot spots in the retinoblastoma gene (RB1) [J]. *Am J Hum Genet* ,1997 ,61(1) :80 -7.
- [7] Michaelson J J ,Shi Y ,Gujral M ,et al. Whole-genome sequencing in autism identifies hot spots for de novo germline mutation [J]. *Cell* ,2012 ,151(7) :1431 -42.
- [8] Fettah A ,Bayram C ,Yarali N ,et al. Beta-globin gene mutations in Turkish children with Beta-thalassemia: results from a single center study [J]. *Mediterr J Hematol Infect Dis* ,2013 ,5(1) :e2013055.
- [9] Ferrara C ,Stuart F ,Sondermann P ,et al. The carbohydrate at Fc-gammaRIIIa Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms [J]. *J Biol Chem* ,2006 ,281(8) :5032 -6.
- [10] Kim D H ,Jung H D ,Kim J G ,et al. FCGR3A gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Blood* ,2006 ,108(8) :2720 -5.
- [11] Hatjiharissi E ,Xu L ,Santos D D ,et al. Increased natural killer cell expression of CD16 ,augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the FcγRIIIa-158V/V and V/V polymorphism [J]. *Blood* ,2007 ,110(7) :2561 -4.
- [12] de Vries E ,Koene H R ,Vossen J M ,et al. Identification of an unusual Fcγ receptor IIIa (CD16) on natural killer cells in a patient with recurrent infections [J]. *Blood* ,1996 ,88(8) :3022 -7.
- [13] Latiano A ,Palmieri O ,Valvano M R ,et al. Evaluating the role of the genetic variations of PTPN22 ,NFKB1 ,and FcGR11A genes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis [J]. *Inflamm Bowel Dis* ,2007 ,13(10) :1212 -9.
- [14] Gavasso S ,Nygård O ,Pedersen E R ,et al. Fcγ receptor IIIA polymorphism as a risk-factor for coronary artery disease [J]. *Atherosclerosis* ,2005 ,180(2) :277 -82.
- [15] Morgan A W ,Keyte V H ,Babbage S J ,et al. FcγRIIIA-158V and rheumatoid arthritis: a confirmation study [J]. *Rheumatology* ,2003 ,42(4) :528 -33.

Detection of the mutated structural gene of CD16 in ruptured HCC

Wang Wei¹ , Xiang Heping¹ , Zhu Lixin² , et al

(¹Dept of Emergency Surgery ,The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University;

²Dept of Central Laboratory ,The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230001)

Abstract Objective To explore the mechanism of spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma (HCC) at the molecular level by detecting the mutation of CD16 structure gene. **Methods** In this study ,22 specimens including 11 ruptured HCC and 11 non-ruptured HCC respectively were selected. The mutations of three exons including S1 , EC1 and EC2 , on genomic DNA of FcγR III A , were investigated by PCR and gene sequencing technologies. **Results** Some heterozygous mutations were found in every exon of EC1 ,EC2 between the two groups ,and it was significant on the differences of Y5223H and Y5277F mutations between the two groups (54.54% vs 0) ($P < 0.05$). The whole frequencies in exon EC1 were higher in ruptured HCC ($P < 0.05$). **Conclusion** FcγR III A structural gene mutations are related with liver macrophage surface receptor CD16 decreased synthesis ,and thus become possible mechanism of spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma.

Key words hepatocellular carcinoma ;rupture ;spontaneous ;mutation ;mechanism