

# 新疆维吾尔族 MT1XT20 基因与微卫星不稳定结直肠癌相关性研究

吴 静<sup>1,2</sup> 龚旭晨<sup>1</sup> 孔长青<sup>2</sup> 赵宗峰<sup>3</sup>

**摘要** 检测临床手术切除 43 例新疆维吾尔族结直肠癌患者癌组织及相应癌旁正常组织中微卫星不稳定 (MSI) 状态,探讨 MT1XT20 基因与新疆维吾尔族 MSI 结直肠癌发生的关系。通过聚合酶链反应-单链构象多态性 (PCR-SSCP) 技术对新疆维吾尔族 MT1XT20 基因与 MSI 结直肠癌检测及分析。在 43 例新疆维吾尔族患者中 24 例癌组织发生微卫星改变,总检出率为 55.81%;8 例发生一个微卫星位点改变,两个以上位点改变的有 16 例,癌旁正常组织中未检测到微卫星改变。在 MT1XT20 位点上存在较高频率的微卫星改变,提示可能存在 MT1XT20 基因与新疆维吾尔族 MSI 结直肠癌发病密切相关,为 MSI 结直肠癌的早期诊断提供了有意义的检测指标。

**关键词** 结直肠癌;微卫星不稳定;MT1XT20 基因

中图分类号 R 394-33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0867-03

微卫星是广泛存在于原核生物及真核生物基因组中具有高度多态性的短的串联重复核苷酸序列。微卫星不稳定 (microsatellite instability, MSI) 是错配

修复基因突变的表型,85% 以上的遗传性非息肉性结直肠癌 (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC) 和 10% ~ 15% 散发性结直肠癌表现为 MSI。相关研究<sup>[1]</sup>表明,MSI 结直肠癌患者的临床表现、对化疗药物的敏感性以及预后与微卫星稳定 (microsatellite stability, MSS) 结直肠癌不同。Nakanishi et al<sup>[2]</sup>认为检测结直肠癌患者的 MSI 状态不仅可以作为 HNPCC 初筛指标,同时可以为 MSI 结直肠癌提供临床治疗及预后决策。Morandi et al<sup>[3]</sup>认为 MT1XT20 序列中 MSI 结直肠癌有较高的相关性和特异性。维吾尔族作为中国新疆地区少数民族的重要组成部分,通过该研究来观察 MT1XT20 序列与新疆维吾尔族人群 MSI 结直肠癌的相关性。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集 43 例经过随访后符合 HNPCC 诊断标准 (Amsterdam 标准 II) 的先证者,其中男 18 例,女 25 例;年龄 24 ~ 75 岁,中位年龄 49.5 岁;升结肠癌 4 例,横结肠癌 2 例,乙状结肠癌 3 例,直肠癌 34 例;患者均于手术后立即切取新鲜的癌组织和癌旁正常黏膜组织 (距离肿瘤组织约 > 1 cm,以下简称癌旁正常组织)。本研究所取标本均经新疆维吾尔自治区人民医院病理科病理诊断证实。

**1.2 实验步骤** MT1XT20、BAT-26、BAT-25、D2S123、D5S346 和 D17S250 采用聚合酶链反应-

2015-03-02 接收

基金项目:新疆维吾尔自治区人民医院院内基金 (编号:20130315)

作者单位:安徽医科大学新疆临床学院 (新疆维吾尔自治区人民医院)<sup>1</sup> 肛肠外科、<sup>2</sup> 肝胆血管外科、<sup>3</sup> 临床试验中心,乌鲁木齐 830001

作者简介:吴 静,男,硕士研究生;

孔长青,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: kongcq@sohu.com

via lower partial median sternotomy and median sternotomy approaches. All patients were divided into lower partial median sternotomy group (group A) and midian sternotomy group (group B). Age, gender, body weight, left ventricular ejection fraction and cardiothoracic ratio were similar between the two groups. There was no death case in the two groups. In ASD repair operation time, mechanical ventilation time, chest drainage within 24 h after operation and length of incision were significantly lower in the group A than in group B ( $P < 0.05$ ). Cardiopulmonary bypass time and postoperative hospital stay time were similar between the two groups. In VSD repair operation time, chest drainage within 24 h after operation and length of incision were significantly lower in the group A than in group B ( $P < 0.05$ ). Cardiopulmonary bypass time, mechanical ventilation time and postoperative hospital stay time were similar between the two groups. All patients had NYHA class I heart function during 2 ~ 36 months follow-up. There was no sternal malformation in group A, and 6 cases of chicken breast in group B. Pediatric congenital open heart operation via lower partial median sternotomy is not only effective and safe, but also has cosmetic and minimally invasive results.

**Key words** congenital heart disease; lower median sternotomy; minimally invasive

单链构象多态性 (PCR-SSCP) 分析, ① 各基因组 DNA 抽取: 以上海天根 KG203 试剂盒抽取基因组 DNA; ② 设计并合成 MT1XT20、BAT-26、BAT-25、D2S123、D5S346 和 D17S250 PCR 反应引物, 引物序列见表 1; ③ 银染 PCR-SSCP 检测 MT1XT20、BAT-26、BAT-25、D2S123、D5S346 和 D17S250 变异。PCR 扩增 MT1XT20、BAT-26、BAT-25、D2S123、D5S346 和 D17S250 序列, 取 5  $\mu$ l PCR 产物与 1  $\mu$ l 上海天根 6  $\times$  Loading Buffer 混匀后, 上样于 2% 琼脂糖凝胶, 200 V 电泳, 上海 TANON 600 紫外线凝胶成像仪下观察结果并拍照。④ 鉴定 PCR 产物在 100 ~ 200 bp 运用 PCR-SSCP 技术进行检测, 癌组织及相应癌旁正常组织配对加样于 20% 聚丙烯酰胺凝胶上垂直电泳, 银染、显色、固定和终止。拍照记录观察结果。

表 1 引物序列

微卫星位点	引物序列 (5'-3')	染色体位置	产物片段大小 (bp)
BAT-26	F: TGACTACTTTTCTGCTCAGCC R: AACCAATCAACATTTTAAACCC	2p16-18/hMSH2	116
BAT-25	F: TCGCCTCCAAGAATGTTAGT R: TCTGCATTTTAACTATGGCTC	4q12/C-kit	120
D2S123	F: AAACAGGATGCCTGCCTTTA R: GGACTTTCCACCTATGGGAC	2p16-17/hMSH2	190 ~ 225
D5S346	F: ACTCACTCTAGTGATAATCGGG R: AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT	5q21-q22/APC	96 ~ 120
D17S250	F: GGAAGAATCAAAATAGACAAT R: GCTGGCCATATATATTTTAAACC	17q11-q12/BRCA1	151 ~ 169
MT1XT20	F: TGACAGCTGTGCTCTCAGATGTAAA R: CCAAGTGCCATATACCCAGTGA	16q13	180 ~ 190

**1.3 结果判定** 肿瘤组织与正常组织相对照, 银染条带出现等位带的移动、缺失、延长、缩短或电泳图的形状改变, 即判定为 MSI。美国国立癌症研究院推荐的 5 个微卫星位点中,  $\geq 2$  个位点判定为不稳定时, 即定为高度微卫星不稳定 (MSI-H); 只有 1 个位点是不稳定时, 即定为低度微卫星不稳定 (MSI-L); 没有出现不稳定位点时, 即定为 MSS<sup>[3]</sup>。MT1XT20 序列通过癌组织及相应癌旁正常组织与 MSI 的 5 个位点相对照, 判断 MT1XT20 序列与 MSI 结直肠癌的相关性。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件对所得数据进行组间  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

新疆维吾尔族 MSI 结直肠癌微卫星改变的表现形式及 6 个位点微卫星改变的发生情况见图 1。

本实验所检出的微卫星改变形式主要表现为癌组织及相应癌旁正常组织出现 DNA 等位基因条带增加、减少或漂移。43 例结直肠癌组织中有 24 例发生了至少一个位点的微卫星改变, 其中 16 例有 2 个位点发生改变 (即 MSI-H), 总发生率为 55.81%, 8 例发生 1 个位点的改变 (即 MSI-L), 总发生率为 18.60%。另 19 例未检测到位点的改变 (即 MSS), 总发生率为 44.19%。MT1XT20 (17/43)、BAT-26 (19/43)、BAT-25 (16/43)、D2S123 (3/43)、D5S346 (2/43) 和 D17S250 (4/43) 的发生率分别为 39.53%、44.19%、37.21%、6.98%、4.65% 及 9.30%。6 个位点的 MSI 检出率差异无统计学意义。患者的癌旁正常组织中未检测到 MSI。24 例新疆维吾尔族 MSI 结直肠癌中 MT1XT20 检出率 (17/24, 70.83%)、BAT-26 检出率 (19/24, 79.17%)、BAT-25 检出率 (16/24, 66.67%)、D2S123 检出率 (3/24, 12.50%)、D5S346 检出率 (2/24, 8.33%) 和 D17S250 检出率 (4/24, 16.67%)。在 MSI-H 中 MT1XT20 检出率为 (13/16, 81.25%), MSI-L 中 MT1XT20 检出率为 (5/8, 62.50%)。MSI-H 与 MSS 比较差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 24.56, P < 0.01$ )。MSI-L 与 MSS 比较差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 14.574, P < 0.01$ )。MSI-H 与 MSI-L 比较差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 1$ )。提示新疆维吾尔族 MSI 结直肠癌患者与 MT1XT20 有相关性 ( $P < 0.01$ )。

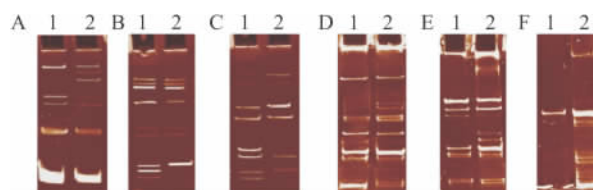


图 1 各微卫星位点在癌组织及癌旁正常组织中的银染区别

A: BAT-25; B: BAT-26; C: D2S123; D: D5S346; E: D17S250; F: MT1XT20; 1: 癌组织; 2: 癌旁正常组织

## 3 讨论

微卫星是指由 1 ~ 6 个核苷酸串联排列的简单 DNA 重复序列, 极易出现聚合酶的复制错误, 呈现高度多态性, 突变频率高。肿瘤 MSI<sup>[4]</sup> 最早是在对 HNPCC 研究过程中提出来, 错配修复是 DNA 修复机制之一, 最早发现的 4 个错配修复基因分别为 hMSH2、hMLH1、hPMS1 和 hPMS2, 其突变导致了 MSI<sup>[5]</sup>。MSI 的热点导致了基因修复缺陷从而导致肿瘤。本研究采用 PCR-SSCP 技术逐个检测 NCI 推荐的 5 个微卫星位点 (BAT-25、BAT-26、D2S123、

D5S346 和 D17S250) 及 MT1XT20 在判定为 MSI 的 24 例 HNPCC 中 MT1XT20 检出率为 70.83%, 低于 Morandi et al<sup>[3]</sup> 的报道(检出率约为 97.3%)。通过与 MSS 结直肠肿瘤的对比提示新疆地区维吾尔族人群中的 MT1XT20 基因片段与 MSI 结直肠癌呈显著相关性。

临床上遴选 HNPCC 家系的主要依据是临床标准(即 Amsterdam 标准 II), 但该标准缺乏前瞻性, 并且遴选效率也不高<sup>[6]</sup>。DNA 错配修复(MMR)基因检测为 HNPCC 最根本的方法, 但是费用高、费时, 临床难以广泛推广。尽管 MSI 致病因素的具体过程目前尚无定论, 但 MSI 是 MMR 基因发生杂合性缺失的表现型, 因此检测 MSI 现象最重要的价值在于发现携带 MMR 基因突变的肿瘤家族即 HNPCC 家族。MSI 检测的方法相对于直接检测 MMR 基因来说比较方便并且敏感, 有文献<sup>[7]</sup>报道 MSI 现象经常出现在发生 MMR 基因杂合性缺失的细胞即将癌变的细胞, 因此从结直肠脱落细胞中检测 MSI, 经过检测发现有 MSI 现象, 说明该结直肠中有细胞可能发生癌变, 需要定期密切观察, 以发现早期的 HNPCC, 因此 MSI 现象可以用于早期筛查结直肠癌。本研究所检测的 MSI 片段证实了 MT1XT20 与新疆地区维吾尔族人群的 MSI 结直肠癌有显著相关性。通过对 MT1XT20 的检测不仅有助于早期发

现新疆地区维吾尔族高危 HNPCC 家系人群, 而且有助于临床上用于 HNPCC 的早期诊治及预防。

### 参考文献

- [1] Fang W L, Chang S C, Lan Y T, et al. Microsatellite instability is associated with a better prognosis for gastric cancer patients after curative surgery[J]. *World J Surg* 2012 36(9):2131-8.
- [2] Nakanishi R, Kitao H, Fujinaka Y, et al. FANCD1 expression predicts the response to 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy in MLH1-proficient colorectal cancer[J]. *Ann Surg Oncol* 2012 19(11):3627-35.
- [3] Morandi L, de Biase D, Visani M, et al. T( [20]) repeat in the 3'-untranslated region of the MT1X gene: a marker with high sensitivity and specificity to detect microsatellite instability in colorectal cancer[J]. *Int J Colorectal Dis* 2012 27(5):647-56.
- [4] Urso E, Agostini M, Pucciarelli S, et al. Soft tissue sarcoma and the hereditary non-polyposis colorectal cancer(HNPCC) syndrome: formulation of an hypothesis[J]. *Mol Biol Rep* 2012 39(10):9307-10.
- [5] Yim K L. Microsatellite instability in metastatic colorectal cancer: a review of pathology, response to chemotherapy and clinical outcome[J]. *Med Oncol* 2012 29(3):1796-801.
- [6] Foster P A. Oestrogen and colorectal cancer: mechanisms and controversies[J]. *Int J Colorectal Dis* 2013 28(6):737-49.
- [7] 管莎莎, 戴广海. 遗传性非息肉病性结直肠癌的分子生物学特点和临床特征[J]. 2012 7(3):297-3.

## The association study between Xinjiang Uygur people MT1XT20 gene and microsatellite instability colorectal cancer

Wu Jing<sup>1,2</sup>, Gong Xuchen<sup>1</sup>, Kong Changqing<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Anorectal Surgery, <sup>2</sup>Dept of Hepatobiliary and Vascular Surgery, The Xinjiang Clinical College(Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital) of Anhui Medical University, Urumqi 830001)

**Abstract** The microsatellite (MSI) stability of cancer and adjacent normal tissues was detected in 43 cases of Xinjiang Uygur patients with colorectal cancer after resection and the relationship between the MT1XT20 gene and the incidence of MSI colorectal cancer in Xinjiang Uygur people was discussed. The polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technique was used for the detection and analysis of the Xinjiang Uygur MT1XT20 gene and MSI colorectal cancer. In 43 Xinjiang Uygur patients, 24 cases had microsatellite alterations, with the total detection rate of 55.81%, 8 cases sent a microsatellite alteration and 16 cases had more than two locus alterations. However, no microsatellite alteration was found in adjacent normal tissues. There was a high frequency of microsatellite alteration at the MT1XT20 locus, suggesting a close relationship between MT1XT20 gene and the incidence of colorectal cancer in Xinjiang Uygur people, thus providing a significant measure for the early diagnosis of MSI colorectal cancer.

**Key words** colon carcinoma; microsatellite instability; MT1XT20 gene