

· 论著摘要 ·

人肝组织谷氨酰转肽酶 mRNA 亚型转化与肝细胞癌变关系的研究

韩国庆 秦成勇

73 6

与正常肝组织相比,肝癌细胞表达的 γ -谷氨酰转肽酶 (GGT) 具有特异的糖链结构,但是在肝细胞癌变过程中, GGT 异常表达的机制尚不清楚。我们检测人肝组织及肝癌组织二种 GGT mRNA 亚型,分析不同疾病肝组织的 GGT mRNA 亚型,探讨 GGT mRNA 亚型转化与肝细胞癌变的关系。

一、材料与方 法

1. 研究对象:按肝病的种类分为四组 ①正常健康对照组 11 例;②非癌肝病组 29 例,其中急性病毒性肝炎 6 例,慢性肝炎 15 例,肝硬化 8 例;③原发性肝癌组 26 例;④转移性肝癌组 12 例,其中原发病为肺癌 4 例,胃癌 4 例,结肠癌 2 例,卵巢癌 1 例,前列腺癌 1 例。以肝穿刺活检或手术获取肝组织(转移性肝癌组获取的是癌周组织);肝癌组织,癌旁组织(距癌灶边缘 3 cm 以内)及远癌组织(距癌灶边缘 > 5 cm)。

2. RNA 提取及逆转录多聚酶链反应(RT-PCR):取肝组织 50 mg 按文献[1]方法提取总 RNA,于岛津 UV-2201 紫外分光光度计上测总 RNA 浓度(mg/g 组织)。

根据 GGT 基因 5'-NC 区设计 3 种 GGT mRNA 亚型的引物,由上海生工工程公司合成^[2]。以 RNA 为模板合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 基因扩增,反应条件为:预变性 94°C 3 min;变性 94°C 30 s,退火 58°C 30 s,延伸 72°C 30 s,循环 30 次;最后 72°C 延伸 8 min,得到反应终产物。预期终产物分子大小:F 亚型 308 bp, H 亚型 300 bp, P 亚型 386 bp。

3. 统计学处理:经 χ^2 检验或四格表确切概率法分析数据。

二、结果

1. 各肝组织总 RNA 浓度比较:正常对照组、非癌肝病组及转移性肝癌组肝组织总 RNA 浓度(湿重肝组织)分别为:(50.3 ± 28.4) mg/g, (41.4 ± 31.6) mg/g 和 (51.5 ± 38.6) mg/g。原发性肝癌组癌、癌旁及远癌组织总 RNA 浓度分别为 (26.8 ± 30.5) mg/g, (48.6 ± 25.3) mg/g 和 (54.8 ± 32.5) mg/g。肝癌组织总 RNA 浓度明显低于癌旁、远癌、正常对照、非癌肝病及转移性肝癌组 ($P < 0.05$)。

2. 三种 GGT mRNA 亚型分析:①在正常肝组织中,主要的 GGT mRNA 类型为 F 亚型,大多数标本(9/11 例)为单基因型(F 亚型),少部分(2/11 例)为复合基因型(F+P)。在非癌肝病中全部均检出 F 亚型,单基因 F 亚型占 62.1% (18/29 例),复合基因

型为 F+H(6 例)或 F+P(5 例),在 6 例 H 亚型阳性者中包括慢性活动性肝炎及肝硬化各 3 例,本组中各 GGT mRNA 亚型阳性率与健康对照组比较,差异无显著性。②在癌组织中,主要的 GGT mRNA 亚型为 H 亚型,其阳性率明显高于对照组及非癌肝病组 ($P < 0.05$),而 GGT mRNA-F 亚型的阳性率明显低于对照组及非癌肝病组 ($P < 0.05$)。在癌旁及远癌组织中主要的为 F 及 H 亚型,H 亚型的阳性率均显著高于健康对照组及非癌肝病组 ($P < 0.05$)。F 及 P 亚型的阳性率与健康对照及非癌肝病组比较差异无显著性。③转移性肝癌癌周组织的三种 GGT mRNA 亚型的阳性率与健康组及非癌肝病组相比较差异无显著性。

讨论 如何早期监测肝细胞癌变仍是肝癌诊断的难题^[3]。人类 GGT 基因位于 22 号染色体 q11→qter 的 BCR 基因相关区域,对胎肝、人肝癌组织(HepG)及胎盘组织 GGT cDNA 文库的研究显示:它们之间的主要区别在于其 5'-NC 区,而可读框 ORF 相同^[2]。根据上述三种 GGT cDNA 的 5'-NC 区分别设计 RT-PCR 反应所需的特异性引物,GGT mRNA 源于人胎肝的称之为 GGT mRNA-F 亚型;源于 HepG₂ 肝癌组织的称为 H 亚型;源于胎盘的称为 P 亚型。

本研究中正常肝组织与非癌肝病组织主要的 GGT mRNA 类型为 F 亚型;在肝癌组织中主要为 H 亚型;在癌旁组织及远癌组织中主要为 F 和 H 亚型。肝癌癌组织及癌旁、远癌组织 H 亚型的阳性率明显高于正常肝组织及非癌肝病组织,而肝癌组织 F 亚型的阳性率则明显低于正常肝及非癌肝病组织,远癌及癌旁肝组织的 F 亚型阳性率与正常肝及非癌肝病组织相似,这说明 GGT mRNA 亚型由 F 向 H 转化与肝癌发生有密切关系。在癌旁及远癌组织中 H 亚型的阳性率明显高于非肿瘤组,与癌组织相似,说明 GGT mRNA 由 F 亚型向 H 亚型的转化可能发生于癌前期病变。GGT mRNA-H 亚型阳性的 3 例慢性活动性肝炎及 3 例肝硬化的肝组织中,是否有少量肝细胞已发展至癌前期或已经癌变,该部分患者会在多长时间内生发肝癌,尚须进一步的随访观察加以证实。

转移性肝癌癌周组织的 GGT mRNA 亚型与正常对照组相似,说明转移性肝癌不伴有肝组织 GGT mRNA 亚型由 F 向 H 的转化。

本研究结果显示,在肝细胞癌变过程中存在着 GGT mRNA 亚型由 F 向 H 转化的现象,这种现象不但存在于已经癌变的癌组织,并且在癌旁组织、远癌组织甚至在部分慢性活动性肝炎及肝硬化组织中也已存在。由此可以推测,GGT mRNA 亚型转化是众多导致肝细胞癌变因素中的一个重要方面,分析 GGT

作者单位:250021 济南,山东省立医院肝病病房

mRNA亚型可监测肝细胞癌变,并有助于肝癌的早期诊断及鉴别诊断。

参 考 文 献

1 Simms D, Cizdziel PE, Chomczynski P. TRIzol™: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*, 1993, 15:99-102.

2 Tsutsumi M, Sakamuro D, Takada A, et al. Detection of a unique γ -glutamyl transpeptidase messenger RNA species closely related to the develop-

ment of hepatocellular carcinoma in humans: a new candidate for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1996, 23:1093-1097.

3 Miyagawa S, Kawasaki S, Makuuchi M. Comparison of the characteristics of hepatocellular carcinoma between hepatitis B and C viral infection: tumor multicentricity in cirrhotic liver with hepatitis C. *Hepatology*, 1996, 24:307-310.

(收稿日期:2001-05-21)
(本文编辑:陈蔚)

酒精性肝病与白介素-1 受体拮抗剂基因内含子 2 多态性的关系

陈卫星 厉有名 虞朝辉

R57 B

白介素 1 受体拮抗剂(IL-1 RN)是 IL-1 强有力的内生拮抗剂,通过抑制 IL-1 的作用而产生一系列生物活性。为了探讨 IL-1 RN 多态性与酒精性肝病的关系,我们采用 PCR 技术对酒精性肝病患者外周血单核细胞(PBMC)基因组 DNA 的 IL-1 RN 内含子 2 的基因型多态性进行了检测,现报告如下。

一、材料与方 法

1. 研究对象:165 例嗜酒者,均来自浙江省酒精性肝病流行病学调查人群,其中无肝脏损害者 43 例,酒精性脂肪肝 30 例,酒精性肝炎 61 例,酒精性肝硬化 31 例;全部为男性;年龄为 25~70 岁,平均(44.00±10.68)岁。诊断标准参照“酒精性肝病的诊断依据及治愈、好转标准”^[1]。并测定乙型肝炎表面抗原和丙型肝炎抗体,不典型者做肝穿刺活检。

2. 标本收集:每例抽取新鲜全血(EDTA 抗凝)2 ml,以 Ficoll 分离液分离 PBMC,用常规低渗溶血法抽提基因组 DNA。

3. 研究方法:应用文献已报道的引物扩增 IL-1 RN 内含子 2 的多态区,该引物以多态位点侧翼序列为基础,上游引物 5'-CCCCTCAGCAACACTCC,下游引物 5'-GGTCAGAAGGGCAGA GA。PCR 反应体积为 30 μ l,含 DNA 样品 3 μ l,4 种 dNTPs 各 0.5 μ l, Taq 酶(5 U/ μ l)0.5 μ l,引物(10 mmol/L)各 1 μ l。反应在 DNA 热循环仪上进行。变性、退火和延伸条件分别为 94°C 45 s, 72°C 45 s, 60°C 45 s。35 个循环后,72°C 延伸 5 min。扩增产物的片段大小经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析,紫外灯下观察结果。

4. 统计学分析:根据电泳结果得出每例患者的 IL-1 RN 等位基因型别,基因频率显著性检验用四格表 χ^2 检验。

二、结 果

应用上述引物对基因组 DNA 进行 PCR,结果扩增出 3 种条带,其大小分别为 442、270 和 356 bp,对应于 IL-1 RN1(4 个重复体)、IL-1 RN2(2 个重复体)和 IL-1 RN4(3 个重复体)3 种等位基因,未见 IL-1 RN3 及 IL-1 RN5 产物。

嗜酒者中酒精性肝炎和酒精性肝硬化的 IL-1 RN*1 杂合

子的频率与无肝脏损害者比较明显升高(32.79%, 29.03% 比 9.30%; $\chi^2=7.84, \chi^2=4.84; P<0.01, P<0.05$);酒精性脂肪肝的 IL-1 RN*1 杂合子的频率与无肝脏损害者比较,差异无显著性(23.33% 比 9.30%, $\chi^2=2.718, P>0.05$),见表 1。

表 1 嗜酒者各组的 IL-1 RN*1 杂合子的频率比较

病例	IL-1 RN*1 杂合子	IL-1 RN*1 杂合子频率(%)	χ^2	P 值
无肝脏损害者	43	4	9.302	
酒精性脂肪肝	30	7	23.333	2.718 >0.050
酒精性肝炎	61	20	32.787	7.836 <0.010
酒精性肝硬化	31	9	29.032	4.842 <0.005

嗜酒者中酒精性肝炎和酒精性肝硬化的 IL-1 RN*2 的频率明显高于无肝脏损害者(13.93%, 17.74% 比 4.65%; $\chi^2=4.79, \chi^2=6.78; P<0.05, P<0.01$)。酒精性脂肪肝的 IL-1 RN*2 频率与无肝脏损害者比较,差异无显著性(11.67% 比 4.65%, $\chi^2=2.72, \chi^2=2.499, P>0.05$),见表 2。

表 2 嗜酒者各组的 IL-1 RN*2 等位基因的频率比较

病例	IL-1 RN*2 等位基因	IL-1 RN*2 等位基因的频率(%)	χ^2	P 值
无肝脏损害者	43	4	4.651	
酒精性脂肪肝	30	7	11.667	2.718 >0.050
酒精性肝炎	61	17	13.934	4.789 <0.005
酒精性肝硬化	31	11	17.742	4.789 <0.010

讨论 IL-1 RN 是一种蛋白质细胞因子,是 IL-1 家族中继 IL-1 α 和 IL-1 β 后的又一新成员,氨基酸序列分别与 IL-1 α 和 IL-1 β 有 19% 和 30% 的同源性,能与 IL-1 受体特异性地结合而不激发传导信号,因而有拮抗 IL-1 多种生物学效应的作用。IL-1 RN 位于染色体的 2q14-q21,用 IL-1 RN 的第二内含子长度多态性确定 IL-1 RN 和 IL-1 α 、IL-1 β 存在 2 号染色体的同样区域^[2]。Tarlow 等^[3]报道,IL-1 RN 基因的内因子 2 的多态性,表现为为数日可变的串联重复(variable number of tandem repeat, VNTR),其重复序列为 86 bp,在人类已检出 5 种不同重复组合的等位基因,即 2 个重复体(IL-1 RN2)、3 个重复体(IL-1 RN4)、4 个重复体(IL-1 RN1)、5 个重复体(IL-1 RN3)和 6 个重复体(IL-1 RN5)。

作者单位:310003 浙江大学医学院第一医院消化科