

肝组织谷氨酰转移酶mRNA亚型的测定及其意义

韩国庆 秦成勇

R73 A

【摘要】 目的 探讨谷氨酰转移酶 (GGT) mRNA 亚型转化与原发性肝癌 (HCC) 发生的关系。 **方法** 以 RT-PCR 方法检测正常肝组织、非癌肝病肝组织、肝癌组织、癌旁组织、远癌组织及肝转移癌周组织的三种 GGT mRNA 亚型 (F、H、P 亚型)。 **结果** 正常肝组织主要的 GGT mRNA 类型为 F 亚型, 非癌肝病肝组织及肝转移癌周组织的各 GGT mRNA 亚型与正常肝组织相似, 肝癌组织、癌旁组织及远癌组织 GGT mRNA-H 亚型的阳性率显著高于正常肝脏及非癌肝病肝组织 (96.2% 与 0 和 20.7%, χ^2 值分别为 28.36、22.42, $P < 0.05$), 肝癌组织 GGT mRNA-F 亚型阳性率明显低于正常对照及非癌肝病组 (50% 与 100%, $\chi^2 = 18.99, P < 0.05$)。 **结论** GGT mRNA 亚型转化与肝癌发生有密切关系, 分析 GGT 基因可望成为检测肝细胞癌变的灵敏方法。

【关键词】 癌, 肝细胞, 基因, GGT, 基因表达

Determination and the significance of three types of GGT mRNA in human liver tissues HAN Guoqing, QIN Chengyong. Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, China

【Abstract】 Objective To explore the relationship between the alteration in GGT mRNA expression and the development of HCC. **Methods** Three GGT mRNA types (F, H, and P) in normal liver tissues, diseased liver tissues without HCC, cancerous and noncancerous tissues from livers with HCC, and noncancerous tissues from livers with metastatic tumor were tested by RT-PCR. **Results** In normal livers, the main type of GGT mRNA was type F. In liver diseases but not HCC, the distribution of the type GGT mRNA was nearly the same as in normal livers. The prevalence of type H was significantly higher in both cancerous and noncancerous tissues of livers with HCC than in livers without HCC ($P < 0.05$). The prevalence of type F in cancerous tissues was significantly lower than that in livers without HCC ($P < 0.05$). **Conclusions** The GGT mRNA expression in the human liver will shift from type F to type H during the development of HCC. The fragment analysis of GGT genes may be a sensitive assay to detect hepatic cell canceration.

【Key words】 Carcinoma, hepatocellular; Gene, GGT; Gene expression

体内谷氨酰转移酶 (GGT) 既与生物转化、核酸代谢及肿瘤发生有关, 又是反映肝细胞实质恶性病变的灵敏标志酶, 人类 GGT 在胚胎期活性甚高, 出生后迅速下降至低水平, 肝细胞癌变时又重新大量表达, 并出现肝癌特异性酶区带^[1], 但是在肝细胞癌变过程中 GGT 异常表达的机制尚不清楚, 有关肝癌 GGT mRNA 亚型分析也少见报道。我们通过检测人肝组织三种 GGT mRNA 亚型, 分析不同疾病肝组织的 GGT mRNA 亚型种类, 探讨 GGT mRNA 亚型转化与肝细胞癌变的关系。

资料与方法

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 (男 8 例, 女 3 例)。(2) 非癌肝病组 29 例 (男 23 例, 女 6 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 (男 20 例, 女 6 例)。(4) 肝转移癌组 12 例 (男 8 例, 女 4 例), 其中原发病为肺癌者 4 例, 胃癌者 4 例, 结肠癌 2 例, 卵巢癌 1 例, 前列腺癌者 1 例。

肝组织标本的采集: 第(1)、(2)、(4)组以肝穿刺活检术获取条状肝组织约 3 cm (肝转移癌组获取的是癌周组织, 而不是癌组织); 第(3)组在外科手术时留取肝癌组织、癌旁组织 (距癌灶边缘 3 cm 以内) 及远

作者单位: 250021 济南, 山东省立医院肝病中心
韩国庆 男, 35 岁, 主治医师, 硕士, 发表论文 10 篇。

癌组织(距癌灶边缘>5 cm)各一份(约300 mg);上述所有肝组织都分为两份,一份作病理学检查,另一份经液氮速冻后,转入-85℃冰箱保存,留作提取总RNA及检测GGT mRNA各亚型。

2. 肝组织总RNA提取:肝组织50 mg置无RNA酶匀浆器中,加入RNA制备剂(TRIzol)后匀浆,按文献[2]方法提取总RNA,于岛津UV-2201紫外分光光度计上检测其吸光度(A260),并换算出肝组织中总RNA质量分数(mg/g)。

3. 逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测肝组织GGT mRNA亚型:根据GGT基因5'-NC区设计3种GGT mRNA亚型的引物^[3],引物序列为:F亚型 Sense 5'-CAC AGG GGA CAT ACA GTG AG-3' Antisense 5'-GAA ATA GCT GAA GCA CGC GC-3', H亚型 Sense 5'-GGA TTC TCC CAG AGA TTG CC-3' Antisense 5'-GAA GGT CAA GGG AGG TTA CC-3', P亚型 Sense 5'-GCC CAG AAG TGA GAG CAG TT-3' Antisense 5'-TCC AGA AAG CAG CTA GAG GG-3',引物由上海生工工程公司合成。以RNA为模板加入随机引物(Oligdt)及逆转录酶(M-MLV)合成cDNA,然后以cDNA为模板进行PCR基因扩增,反应条件为:预变性94℃ 3 min,变性94℃ 30 s,退火58℃ 30 s,延伸72℃ 30 s,循环30次;最后72℃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,终产物经1.3%琼脂糖凝胶电泳,紫外线灯光下观察,并与标准DNA比较判断结果。

4. 统计学处理:计数资料用 χ^2 检验或四格表确

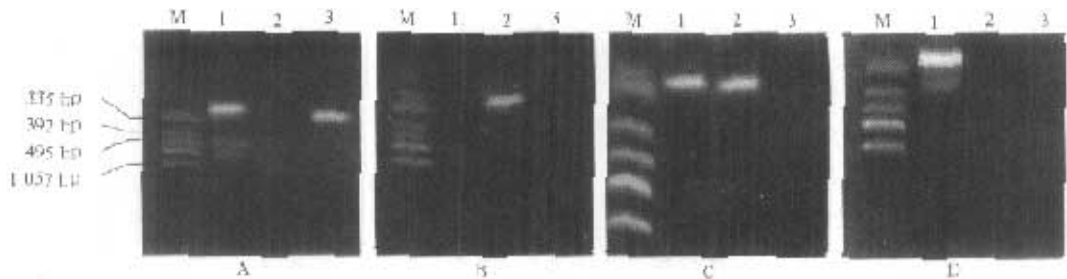
切概率法。

结 果

各组三种GGT mRNA亚型分析:以RT-PCR法成功扩增了肝癌组织及肝组织的三种GGT mRNA亚型(F、H、P),其终产物与原设计完全一致,区带清晰且未见非特异性片段出现(图1)。

各组GGT mRNA亚型的检测结果:在11例正常肝组织中,主要的GGT mRNA类型为F亚型,见于所有标本(100%),H亚型未检出,P亚型2例阳性,大多数标本(9/11)为单基因型(F亚型),少部分标本(2/11)为复合基因型(F+P)。在29例非癌肝病中,全部肝组织均检出F亚型(100%),H亚型6例(20.7%),P亚型5例(17.2%),单基因F亚型占62.1%(18/29),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无统计学差异。

在26例癌组织中,GGT mRNA亚型为H亚型阳性者25例(阳性率96.2%),明显高于健康对照组(0)及非癌肝病组20.7% ($\chi^2 = 31.74, P < 0.05$),而GGTmRNA-F亚型的阳性率为50%(13/26),明显低于对照组100%(11/11)及非癌肝病组100%(29/29) ($\chi^2 = 18.99, P < 0.05$)。在癌旁及远癌组织中主要的GGT mRNA亚型为F型(阳性率为96.2%、100%)及H亚型,H亚型的阳性率分别为92.3%、84.6%,均显著高于健康对照组(0)及非癌肝病组20.7% (χ^2 值分别是28.36、22.42, $P < 0.05$)。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



M: DNA marker, 1: GGT mRNA-F亚型, 2: GGT mRNA-H亚型, 3: GGT mRNA-P亚型, A: 正常肝组织, B: HCC癌组织, C: HCC癌旁组织, D: 肝转移癌周组织

M: DNA marker, 1: GGT mRNA-F subtype, 2: GGT mRNA-H subtype, 3: GGT mRNA-P subtype, A: normal liver tissues, B: cancerous tissues from livers with HCC, C: adjacent paracancerous tissues from livers with HCC, D: noncancerous tissues from livers with metastatic carcinoma

图1 GGT mRNA亚型的RT-PCR电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis result of each GGT mRNA subtypes

性。为了比较肝转移癌及原发性肝癌周组织各GGT mRNA亚型的差异,我们检测了12例肝转移癌周组织的三种GGT mRNA亚型,各亚型阳性率与健康组及非癌肝病组比较无统计学差异。

讨 论

GGT mRNA源于人胎肝的我们称之为GGT mRNA-F亚型;源于HepG2肝癌细胞的称为H亚型;源于胎盘的称为P亚型。

研究显示正常肝脏组织的主要GGT mRNA类型为F亚型,一般为单基因型(F亚型),部分为复合基因型。非癌肝病肝组织的GGT mRNA亚型与正常肝组织相似,主要为F亚型,但在部分肝硬化及慢性活动性肝炎肝组织中可检出H亚型。肝癌组织主要的GGT mRNA亚型为H亚型,而癌旁组织及远癌组织主要的GGT mRNA亚型为F和H亚型。肝癌组织及癌旁、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亚型的阳性率则显著低于正常肝及非癌肝病肝组织,远癌及癌旁肝组织的F亚型阳性率与正常肝及非癌肝病肝组织相似,这一点有力地说明在肝细胞癌变过程中可能存在着GGT mRNA由F亚型向H亚型的转换。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亚型阳性的慢性活动性肝炎及肝硬化患者肝组织中是否有部分肝细胞已发展至癌前期或是已经癌变,该部分患者会在多长时间内发生肝癌,尚须进一步的随访观察加以证实。肝转移癌不伴有肝组织GGT mRNA亚型由F向H的转化。可见肝癌发生过程中伴有GGT mRNA亚型转化,分析GGT mRNA亚型可望成为监测肝细胞癌变一种有效方法。

参 考 文 献

- 1 Yao DF, Huang ZW, Chen SZ, et al. Diagnosis of hepatocellular carcinoma by quantitative detection of hepatoma-specific bands of serum gamma-glutamyltransferase. *Am J Clin Pathol*, 1998, 110: 743-749.
- 2 Simms D, Cizdziel PE, Chomczynski P, Trizol TM; a new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*, 1993, 15: 99-102.
- 3 Tsutsumi M, Sakamuro D, Takada A, et al. Detection of a unique gamma-glutamyl transpeptidase messenger RNA species closely related to the development of hepatocellular carcinoma in humans; a new candidate for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1996, 23: 1093-1097.

(收稿日期: 2001-05-20)

(本文编辑: 何亚玲)

(上接第125页)

47.1 ± 2.08, 52.9 ± 3.67, 65.8 ± 4.91, 作用1h后选择素-P: 79.86 ± 6.09。随着TNF-α浓度的增加,粘附分子的表达逐渐增强(P < 0.05)。(2)不同浓度的DEX (0.1 μmol/L, 1.0 μmol/L), 均能减弱TNF-α(100 U/ml)诱导的两组内皮细胞ICAM-1及选择素-P的表达(P < 0.05)。正常组ICAM-1的表达在TNF-α(100 U/ml), DEX(0.1 μmol/L)作用1, 12, 24h后的表达分别为: 10.68 ± 2.92, 8.23 ± 3.54, 6.82 ± 2.07, 作用1h后选择素-P: 4.01 ± 0.81; 在TNF-α(100U/ml), DEX(1 μmol/L)作用1, 12, 24h后的表达分别为: 8.01 ± 1.09, 6.66 ± 1.02, 4.21 ± 1.57, 作用1h后选择素-P: 0.28 ± 0.01。ICP组ICAM-1的表达在TNF-α(100 U/ml), DEX(0.1 μmol/L)作用1, 12, 24h后的表达分别为: 19.03 ± 3.04, 17.01 ± 2.41, 13.54 ± 2.72, 作用1h后选择素-P: 15.32 ± 1.79; 在TNF-α(100 U/

ml), DEX(1 μmol/L)作用1, 12, 24h后的表达分别为: 16.66 ± 2.39, 12.33 ± 1.42, 8.12 ± 2.21, 作用1h后选择素-P: 6.28 ± 0.97。

4. 讨论: 研究表明培养的内皮细胞经TNF-α诱导1h后均上调ICAM-1、选择素-P的表达。同时随着TNF-α剂量的增加、作用时间的延长,它对粘附分子ICAM-1的上调作用更强。分析原因可能是在TNF-α作用下, ICAM-1、选择素-P由细胞内贮池转移到细胞膜或者由于蛋白合成增加而使细胞膜表面的ICAM-1、选择素-P的数量增多,这有待于今后进一步的mRNA水平的研究加以证实。同时本研究还发现经TNF-α刺激后ICP组粘附分子的表达与正常组相比差异有非常显著性(P < 0.01)。这可能与细胞本身释放的分泌物TNF-α等相互起着协同或加强作用有关[3]。DEX能抑制TNF-α对内皮细胞粘附分子的上调作用,而且随着DEX浓度的增加、作

用时间的延长,抑制作用增强粘附。说明DEX具有抑制细胞因子对分子表达的作用,可能是其临床上用以治疗的重要药理机制之一。

参 考 文 献

- 1 曹泽毅, 主编. 中华妇产科学. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
- Cao ZY, ed. Chinese obstetrics and gynecology. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999.
- 2 张宝庚, 陈铁镇, 张晶花, 等. 人脐带静脉及大鼠动脉内皮细胞的培养. *中华心血管杂志*, 1985, 13: 52.
- Zhang BG, Chen TZ, Zhang JF, et al. The culture of human endothelial cells umbilical vena and murine vascular endothelial cells. *Zhonghua Xinxueguan Zazhi*, 1985, 13: 52.
- 3 Hunt BJ, Jurd KM. Endothelial cell activation: A central pathophysiological process. *BMJ*, 1998, 316: 1328-1329.

(收稿日期: 2001-12-15)

(本文编辑: 袁平戈)