

FHIT 基因与 MDR1 基因 mRNA 在鼻咽癌组织中表达的临床意义及关系

李 屏， 莫武宁， 陈 旭， 张 辉， 杨 峥， 覃灵燕

作者单位：530021 南宁,广西医科大学第一附属医院检验科
作者简介：李 屏(1984 -),女,在读研究生,研究方向:医学检验诊断学。E-mail:liping19304@163.com
通讯作者：莫武宁(1963 -),女,医学博士,教授,研究方向:医学检验诊断学。E-mail:mown163@163.com

[摘要] 目的 检测鼻咽癌组织中 FHIT 和 MDR1 mRNA 表达量,并探讨它们与临床病理学之间的关系。方法 用实时荧光(real-time)相对定量 PCR,检测炎性对照组 45 例和癌症实验组 61 例鼻咽部组织。结果 FHIT 基因与 MDR1 基因 mRNA 的表达量炎性对照组和癌症实验组差异均有统计学意义(P 值分别为 0.049 和 0.014)。癌症实验组 FHIT 基因 mRNA 表达量低于炎性对照组,并且在癌症实验组中组织学分型、临床分期、局部侵袭中表达差异有统计学意义,其表达量随着癌症进一步发展而降低。癌症实验组 MDR1 基因 mRNA 表达量高于炎性对照组($P<0.05$),组织学分层中差异有统计学意义($P=0.05$),在其他临床病理指标分层中差异无统计学意义($P>0.05$),两个基因的相关性分析显示两者之间相关差异无统计学意义($P=0.14$)。结论 FHIT 基因 mRNA 表达量在鼻咽癌组织中较低,并随着病情恶化表达降低。MDR1 mRNA 在鼻咽癌实验组织中表达较高。FHIT 与 MDR1 在癌症实验组中 mRNA 表达相关性比较差异无统计学意义。

[关键词] 鼻咽癌; FHIT,基因; MDR1
[中图分类号] R 739.6 [文献标识码] A [文章编号] 1674 - 3806(2013)03 - 0215 - 04
doi:10.3969/j.issn.1674 - 3806.2013.03.08

The relationship between the FHIT and MDR1 genes in the nasopharyngeal carcinoma tissue LI Ping, MO Wu-ning, Chen Xu, et al. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] Objective To explore the relationship between nasopharyngeal carcinoma and mRNA of FHIT and MDR1 gene. Methods Real-time PCR was used to test the two gene's mRNA expression in 45 inflammatory control group and 61 nasopharyngeal carcinoma group. Results The two gene's mRNA expression was different between 45 inflammatory control group and 61 nasopharyngeal carcinoma group ($P=0.049$ and $P=0.014$ respectively). mRNA expression of FHIT was related to histological type, clinical stages and invasion stages. It was lower in the nasopharyngeal carcinoma than that inflammatory control group. It declined with the cancer deteriorating. mRNA expression of MDR1 is higher in the 61 nasopharyngeal carcinoma group. There were no correlation between the expression of FHIT mRNA and MDR1 mRNA in nasopharyngeal carcinoma tissue ($P=0.14$). Conclusion The expression of FHIT mRNA is lower and MDR1 mRNA is higher in nasopharyngeal carcinoma tissue. There is no correlation between FHIT and MDR1.

[Key words] Nasopharyngeal carcinoma(NPC); FHIT; Genes; MDR1

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)发展过程是多因素、多步骤的,既有癌基因的激活,也伴随着抑癌基因的失活,因而有必要在分子生物学水平对 NPC 的发生发展做更深入的研究探讨。脆性组氨酸三联体(FHIT)基因位于人常染色体脆性位点

FRA3B,最早由 Ohta^[1]于 1996 年发现。它是第一个与人类脆性位点相关联的抑癌基因。多耐药基因 1(MDR1)编码 P170 糖蛋白(P-gpcoprotein),许多癌症研究表明其过度表达与癌症对放疗化疗的耐药性有关系。FHIT 基因作为抑癌基因,MDR1 基因作为

多耐药基因,其两者与肿瘤的相关性研究分别已有许多文献报道。而MDR1基因,其与抑癌基因FHIT的关系尚研究较少。笔者采用荧光实时PCR(real-time PCR)技术,分析42例正常人鼻咽部组织炎性标本和61例鼻咽癌组织标本中FHIT与MDR1的转录情况,并且与临床指标对比分析,以探讨两者之间的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集我院2012-02~2012-09之间106例鼻咽部组织标本。对照组和实验组均来自广西区内。其中对照组45例,年龄在14~66岁,中位年龄42岁,纳入标准为无肿瘤史且经病理证实为慢

性黏膜炎症者。实验组61例,年龄23~80岁,中位年龄45岁。纳入标准为初诊经病理证实为鼻咽癌,未经过化疗和放疗的病人。实验组病理类型:低分化鳞癌46例,高分化鳞癌15例。

1.2 主要试剂 组织DNA、RNA共提试剂盒(北京天根生化科技有限公司),逆转录试剂盒(北京天根生化科技有限公司),SYBR Green real-time PCR Master Mix(北京天根生化科技有限公司)。6×上样缓冲液,50 bp DNA marker。

1.3 real-time PCR 扩增引物 18 s(内参照),FHIT(目的基因),MDR1(目的基因)引物见表1(上海生工合成)。

表1 18 s、FHIT、MDR1 引物序列

基 因	上游引物	下游引物	扩增产物
18 s	CAGCCACCCGAGATTGAGCA	TAGTAGCGACGGCGGTGTG	253
FHIT	CAACATCTCATCAAGCCCTCT	TCCACCACTGTCCCGACT	191
MDR1	CCCATCATTGCAATAGCAGG	GTTCAAACCTTCTGCTCTGA	167

1.4 方法 门诊手术活检取标本后,立即用无菌生理盐水洗清血渍,置于1.5 ml EP管中放置-80℃低温冰箱保存。

1.4.1 组织RNA提取 采用天根DNA、RNA共提试剂盒提取。将裂解液配制好后加入1.5 ml EP管中,使用0.8 mm直径玻璃研磨杵在冰上研磨。之后操作按试剂盒提取说明书操作。

1.4.2 逆转录合成cDNA 取10.5 μl(总RNA含量1~5 μg),按天根逆转录试剂盒配制20 μl反应体系,按试剂盒说明书操作,加入30 μl去RNA酶水。用内参照18 s进行PCR,琼脂糖凝胶电泳确定cDNA产物正确之后,存放于-20℃冰箱待用。

1.4.3 相对定量real-time PCR 反应体系为20 μl。将10 μl SYBR Green real-time PCR Master Mix,0.6 μl上游引物,0.6 μl下游引物,2 μl cDNA,2 μl ROX Reference Dye(试剂盒内配备),4.8 μl去离子水在八连管内混合均匀,上离心机3 500转30 s去掉管内气泡。仪器使用ABI7500,循环条件为95℃10 min;95℃15 s,60℃15 s,72℃20 s 45个循环。在72℃时收集荧光。以18 s基因的表达量作为内参照,校正FHIT和MDR1基因mRNA的表达量。每个标本重复2管,取Ct的平均值。计算标本ΔCt值,ΔCt=(目的基因Ct值-内参基因Ct值)。

1.4.4 real-time PCR产物特异性验证 取PCR产

物5 μl,加6×上样缓冲液1 μl进行琼脂糖凝胶电泳,以50 bp DNA marker做参照,验证目的条带大小,确定PCR产物的特异性。

1.5 统计学方法 应用SPSS13.0统计软件比较两组标本ΔCt值,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用t检验,相关性分析用直线相关分析,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组FHIT基因mRNA相对表达量比较 炎症对照组和实验组FHIT基因mRNA表达ΔCt值分别为(11.24±5.27)和(13.36±5.51),实验组表达量是对照组0.23倍,差异有统计学意义($t = -1.99, P < 0.05$)。

2.2 两组MDR1基因mRNA相对表达量比较 炎症对照组和实验组MDR1基因mRNA表达ΔCt值分别为(17.93±4.62)和(15.7±4.49),实验组表达量是对照组4.69倍,差异有统计学意义($t = 2.50, P < 0.05$)。

2.3 NPC临床分层与FHIT、MDR1 mRNA表达关系 实验组按临床诊断指标分层分析,发现按组织学类型分层、临床分期和局部侵袭FHIT基因mRNA表达差异有统计学意义,MDR1基因mRNA表达在组织学分型中表达差异有统计学意义,其他差异均无统计学意义,见表2。

表 2 实验组临床分层与 FHIT、MDR1 mRNA 表达的关系

临床病理资料		FHIT mRNA			MDR1 mRNA		
		($\bar{x} \pm s$)	<i>t</i>	<i>P</i>	($\bar{x} \pm s$)	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄	<50	13.16 ± 5.96			15.4 ± 4.93		
	>51	13.77 ± 4.89	-0.06	0.97	15.9 ± 4.99	-0.48	0.95
性别	男	13.06 ± 5.67			14.97 ± 4.70		
	女	13.82 ± 5.81	-0.15	0.88	15.44 ± 5.96	-0.19	0.86
组织学类型	未分化鳞癌	15.24 ± 6.12			14.82 ± 6.01		
	高分化鳞癌	11.36 ± 4.89	-2.62	0.01	15.79 ± 4.99	-1.99	0.05
临床分期	I ~ II	12.92 ± 5.13			14.17 ± 5.29		
	III ~ IV	15.46 ± 6.79	-2.36	0.02	15.88 ± 4.19	-1.58	0.12
局部侵袭	T1 ~ T2	12.18 ± 5.93			15.07 ± 4.51		
	T3 ~ T4	15.45 ± 5.02	-2.21	0.03	16.0 ± 6.86	-1.32	0.19
淋巴结转移	N0	11.77 ± 6.11			14.77 ± 5.48		
	N1 ~ N3	14.96 ± 5.98	-1.73	0.09	16.15 ± 4.49	-1.35	0.18
远处转移	M0	13.87 ± 5.09			16.23 ± 5.84		
	M1	14.17 ± 5.22	0.43	0.64	14.51 ± 7.26	-0.28	0.72

2.4 相关分析结果 实验组 FHIT 与 MDR1 基因 mRNA 表达量进行相关分析,结果显示相关性不明显($r=0.19,P=0.142$)。

3 讨论

3.1 NPC 是一种上皮源性恶性肿瘤,以低分化鳞癌多见。我国 NPC 的发病率与死亡率居世界首位,其癌变部位隐匿且周围淋巴循环丰富,是一种发现期晚、早期即容易发生淋巴结转移的恶性癌症。因此,寻找新的基因诊断方法对 NPC 的早期诊断有非常重要的临床意义。

3.2 关于 FHIT 基因,过去 10 多年间研究显示它在头颈部肿瘤^[2]、乳腺癌^[3]、宫颈癌^[4]、肺癌^[5]、胃肠道肿瘤^[6]等许多肿瘤中发挥着抑癌基因的作用。人类基因组目前发现常见脆性位点 80 个,FHIT 是其中最活跃的位点。这个部位的染色体易发生断裂、重组和缺失。Hu 等^[7]对 NPC 做了全基因组拷贝数分析发现,FHIT 基因的异常拷贝数在 NPC 病人中有重要意义,并有可能是 NPC 发生的驱动性程序。邓燕飞等^[8]的研究表明 FHIT 基因部位的 LOH 和鼻咽癌分级、EB 病毒感染相关。本研究通过荧光相对定量 PCR 发现,FHIT 基因 mRNA 在鼻咽癌细胞株 CNE1、CNE2 中表达缺失;在鼻咽部组织中呈低表达。实验组表达量低于炎性对照组,并且在实验组中组织学分型、临床分期、局部分型中表达差异有统计学意义。其表达量随着癌症进一步发展而降低。这表

明 FHIT 基因 mRNA 表达量降低在 NPC 发

生上是一个早期事件,随着癌症进一步发展 mRNA 表达量随之下降。
3.3 MDR1 基因是目前为止发现的最重要的细胞耐药基因,抗肿瘤药物、致癌剂、紫外线、热效应等都可以将其激活。NPC 对射线治疗高度敏感,但聂新民等^[9]的研究表明 X 线能激发 NPC 细胞 MDR1 mRNA 和 P170 糖蛋白表达量,是导致癌细胞耐药的重要原因。本研究发现,MDR1 mRNA 表达量实验组高于炎性对照组。但在实验组临床分层研究中仅组织学类型分型差异有统计学意义。

3.4 杨志慧等^[10]通过免疫组化对 FHIT、MDR1 基因蛋白表达量的研究显示,两者蛋白表达呈负相关。而本研究显示两者相关差异无统计学意义。所以我们根据实验数据提出设想有以下几种可能:(1) 荧光 PCR 扩增基因的片段长度较短,本次挑选扩增片段位于 FHIT 基因 mRNA 常发生丢失的第 5、第 6 外显子。所扩增的片段不是完全覆盖整段基因位置,由此可能导致 mRNA 所检测出量高于实际蛋白生成量,因为有存在其他部位外显子缺失的情况。(2) FHIT 基因失活由许多种原因导致,比如杂合性缺失^[11],基因突变和启动子甲基化^[12]等,因此有许多原因可导致 FHIT 蛋白减少。(3) MDR1 表达量在受 X 射线和化疗药物作用后升高,这有一个激发的过程。而我们的实验标本来自未经过放、化疗的初诊病人,这之间的影响因素比较大。(4) 经相关性分析显示,FHIT 与 MDR1 的 mRNA 表达量相关

性不明显,结果未能证实这两个基因在同一个细胞信号通路上,其相互之间的影响还有待于更进一步的研究。

3.5 FHIT 在本研究中与 NPC 的组织学分型和临床分期显示了良好的一致性,但其与癌症的预后相关还有待进一步研究。肿瘤的发生原因是多阶段多步骤的复杂过程,受多种因素影响。目前对肿瘤的研究还只是冰山一角,还有更多未知的内容等待我们去探索发现。

参考文献

1 Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t (3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers[J]. Cell, 1996, 84(4): 587-597.

2 Virgilio L, Shuster M, Gollin SM, et al. FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(18): 9770-9775.

3 Michael D, Beer DG, Wilke CW, et al. Frequent deletions of FHIT and FRA3B in Barrett's metaplasia and esophageal adenocarcinomas[J]. Oncogene, 1997, 15(14): 1653-1659.

4 Mao L, Lee JS, Kurie JM, et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers[J]. J Natl Cancer Inst, 1997,

89(12): 857-862.

5 Wang X, Yuan L, Zheng H, et al. Expression of FHIT Protein in Lung Cancer by Cell Array[J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2009, 12(2): 131-134.

6 Baffa R, Veronese ML, Santoro R, et al. Loss of FHIT expression in gastric carcinoma[J]. Cancer Res, 1998, 58(20): 4708-4714.

7 Hu C, Wei W, Chen X, et al. A global view of the oncogenic landscape in nasopharyngeal carcinoma: an integrated analysis at the genetic and expression levels[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41055.

8 邓燕飞, 田芳, 杨新明. 鼻咽癌染色体 3p14 的精细等位基因缺失研究[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2000, 35(5): 391.

9 聂新民, 黄竹英, 姚辉, 等. X 射线照射后鼻咽癌细胞系 HNE1 多药耐药基因 MDR1 的表达研究[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(4): 220-222.

10 杨志慧, 刘惠敏, 孙静, 等. 肺癌组织中 FHIT 蛋白的表达及其与 MDR1 的关系[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(11): 1218-1221.

11 Ismail HM, Medhat AM, Karim AM, et al. Multiple Patterns of FHIT Gene Homozygous Deletion in Egyptian Breast Cancer Patients[J]. Int J Breast Cancer, 2011, 2011: 325947.

12 Syeed N, Husain SA, Sameer AS, et al. Mutational and promoter hypermethylation status of FHIT gene in breast cancer patients of Kashmir[J]. Mutat Res, 2011, 707(1-2): 1-8.

[收稿日期 2012-12-26][本文编辑 杨光和 韦所苏]

博硕论坛·论著

多环黏膜切除术在大肠癌肠道病变中的应用

罗显克, 谭建荣, 唐雪媛

作者单位: 530001 南宁, 广西民族医院消化内科

作者简介: 罗显克(1976-), 男, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 消化内科疾病诊治。E-mail: luxike0142@163.com

[摘要] **目的** 探讨多环黏膜切除术在肠道病变治疗中应用的可行性。**方法** 采用多环黏膜切除术治疗 18 例大肠癌患者肠道扁平病灶, 观察其切除率及出血、穿孔等并发症的发生概率。**结果** 多环黏膜切除术切除率达 85.00%, 出血率为 11.76%。**结论** 多环黏膜切除术安全可靠、创伤小, 疗效确切。

[关键词] 扁平病灶; 放大内镜; 早期大肠癌

[中图分类号] R 574 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)03-0218-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.03.09

The application of polycyclic mucosal resection in colon lesions LUO Xian-ke, TAN Jian-rong, TANG Xue-yuan.
Department of Gastroenterology, Minzu Hospital Of Guangxi Zhuang Autonmous Region, Nanning 530001, China

[Abstract] **Objective** To explore the feasibility of application of polycyclic mucosal resection in the treatment of intestinal lesions. **Methods** The polycyclic mucosal resection was used for the treatment of intestinal flat lesions in 18 patients with flat lesions. Its removal rate and the probability of complications such as bleeding, perforation