

错配修复基因 hMLH3 在家族性胃癌中的突变

赵成海, 刘宏旭, 卜献民

赵成海, 中国医科大学病理生理教研室 辽宁省沈阳市 110001
刘宏旭, 中国医科大学附属第一医院胸外科 辽宁省沈阳市 110001
卜献民, 中国医科大学附属第二医院普外科 辽宁省沈阳市 110001
赵成海, 男, 1971-10-25 生, 辽宁省庄河人, 汉族. 1997 年于中国医科大学硕士毕业, 讲师. 现主要从事肿瘤基础研究.
项目负责人: 刘宏旭, 110001, 辽宁省沈阳市和平区, 中国医科大学附属第一医院胸外科. hongxuli@yahoo.com
电话: 024-23256666-6256
收稿日期: 2003-12-29 接受日期: 2004-01-15

Mutation of mismatch repair gene hMLH3 in familial gastric cancer

Cheng-Hai Zhao, Hong-Xu Liu, Xian-Min Bu

Cheng-Hai Zhao, Department of Pathophysiology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Hong-Xu Liu, Department of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Xian-Min Bu, Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Supported by Swedish Institute Bilateral Scholarship and China Medical University Doctor Foundation
Correspondence to: Dr Hong-Xu Liu, Department of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. hongxuli@yahoo.com
Received: 2003-12-29 Accepted: 2004-01-15

Abstract

AIM: To detect the mutations of mismatch repair gene hMLH3 and to investigate its possible role in familial gastric cancer.

METHODS: A total of 84 members from 16 suggestive hereditary gastric cancer families were investigated with PCR, denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) and direct sequencing. The diagnostic criteria for familial gastric cancer are as follows: (1) at least two successive generations, (2) at least two patients with gastric cancer, (3) one of them should be first-degree relative of the other, and (4) at least one patient was diagnosed before 50 years old.

RESULTS: Five missense mutations were identified in five gastric cancer families, four mutations within exon 1 and one mutation within exon 12. Carcinogenesis was obviously associated with hMLH3 mutations in family 6, but not in other families. No mutations were found in sporadic gastric cancer and normal controls.

CONCLUSION: hMLH3 probably acts as a low risk gene in familial gastric cancer. The mutations of hMLH3 may work together with other genes and result in an elevated risk of gastric cancer in the family.

Zhao CH, Liu HX, Bu XM. Mutation of mismatch repair gene hMLH3 in familial gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1030-1033

摘要

目的: 检测错配修复基因 hMLH3 在家族性胃癌中的突变情况, 以探讨 hMLH3 在家族性胃癌中的作用。

方法: 采用聚合酶链反应(PCR)、变性高效液相色谱分析(DHPLC)和直接测序法, 检查有遗传背景的 16 个胃癌家系(共 84 名成员)的错配修复基因 hMLH3 突变情况。胃癌家系选择参考以下标准: (1)至少连续两代; (2)至少 2 例胃癌患者; (3)至少有 1 例患者为其他患者的一级亲属; (4)至少有 1 例患者 50 岁前被诊断出胃癌。

结果: 所有样品的外显子均成功进行 PCR 扩增, DHPLC 分析和基因测序。共在 5 个家系中发现 5 处错义突变(31.3%, 5/16), 4 处在外显子 1, 另外 1 处在外显子 12。家系 6 中 hMLH3 的突变与胃癌发生呈现出较强的相关性, 而另外几个家系中的突变情况与胃癌没有表现出明显的相关性。在散发性胃癌及正常对照中未发现突变的存在。

结论: hMLH3 基因在家族性胃癌发生中可能为一低风险基因, 他可能通过与其他基因互相叠加、共同起作用。

赵成海, 刘宏旭, 卜献民. 错配修复基因 hMLH3 在家族性胃癌中的突变. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1030-1033

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1030.asp>

0 引言

错配修复基因的缺陷与人类多种恶性肿瘤的发病关系密切^[1-3], 其中 hMLH1、hMSH2 和 hMSH6 等基因的突变在遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC)中的作用已得到广泛的证实^[4-6]。胃癌在我国常见^[7-18], 也存在这些基因的变异或者失活以及其表达的改变^[19-23]。hMLH3 为一种新近被克隆和定性的错配修复基因, 可能是另一个与人类恶性肿瘤有关的错配修复备选基因。目前已有学者在 HNPCC 患者中检出 hMLH3 突变^[23-24], 且部分家系显示出该突变具有较强的致病性^[24]。我们对部分有遗传背景的胃癌家系进行研究, 以探讨 hMLH3 在家族性胃癌中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 有遗传背景的胃癌家系 16 个, 均来自于中国医科大学附属第一医院, 共有 84 名成员。另散发性胃癌 96 例及正常对照 96 例。胃癌家系选择参考以下标准: 至少两代; 至少 2 例胃癌患者; 至少有 1 例患者为另外 1

例的一级亲属和至少有 1 例患者 50 岁前被诊断出胃癌。PCR 仪(UNO- II, Biometra); DNA 片段分析仪(Wave 2100, Transgenomic)及 WaveMaker4.1 软件; DNA 测序仪(Prism377, IBM). hMLH3 基因 12 个外显子的 17 对引物, Ampli Taq Gold 酶(5MU/L, Biosystems); DHPLC 分析缓冲液: 三乙基醋酸及己腈(Bie & Bernsten A-S); DNA 测序试剂盒(Biosystems); PCR 纯化试剂盒(Qiagen 公司).

1.2 方法 按常规方法提取血液和肿瘤组织 DNA. 将 hMLH3 基因第 1 外显子划分为 7 个重叠的片段, 而将片段过短且相距很近的外显子 9 和 10 划为 1 个片段, 因此共设计 17 对引物. 聚合酶链反应体系共 50 μ L, 含有 100 ng 基因组 DNA, 1 \times PCR 缓冲液, 1.5 mmol/L 的 Mg^{2+} , 100 μ mol/L 的各种 dNTP, 0.2 μ mol/L 的各种引物和 Ampli Taq Gold 聚合酶 1.25 U. PCR 片段的长度、引物序列、相应的退火温度及 PCR 的反应程序参考文献^[24]. DHPLC 分析在装有 DNA 层析柱的 DNA 片段分析仪中自动进行. 具体操作程序参考文献^[24]. 层析柱中 DNA 双链分离后, 可被紫外线吸收仪在波长为 254 nm 处检测到, 表现为特征性的洗脱峰. 同源双链(纯合的野生型)DNA 表现为单一窄峰, 而突变型和野生型 DNA 组成的异源杂合双链则表现为提前出现一个或多个的额外洗脱峰. 在 PCR 产物测序中将经 DHPLC 检测有异常峰型的 DNA 样品作为检测重点, 进行测序. 步骤: (1)重新进行 PCR 扩增; (2)PCR 产物纯化; (3)DNA 测序试剂盒进行测序反应; (4)DNA 测序仪上电泳, 测出碱基序列.

2 结果

在全部样品中所有外显子均成功进行 PCR 扩增(图 1),

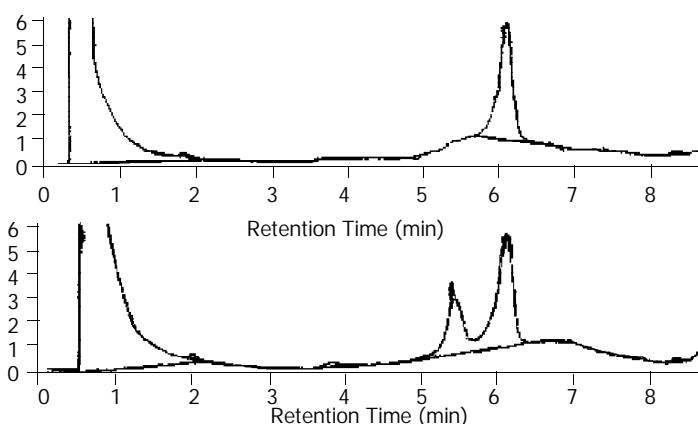


图 2 DHPLC 图像. 正常对照(纯合性)表现为单一的洗脱峰; 而发生突变成异源杂合双链的 DNA 表现提前出现的额外洗脱峰.

表 1 hMLH3 在家族性胃癌中突变情况

外显子	核苷酸改变	氨基酸改变	家系	胃癌家系中的频率	散发胃癌中的频率	对照中的频率
1 ¹	A1234G	Lys412Glu	2	2.4% (2/84)	0% (0/96)	0% (0/96)
1	A2173C	Asn725His	6	4.8% (4/84)	0% (0/96)	0% (0/96)
1	G2221T	Val741Phe	13	4.8% (4/84)	0% (0/96)	0% (0/96)
1	T2896C	Ser966Pro	8	6.0% (5/84)	0% (0/96)	0% (0/96)
12	G4351A	Glu1451Lys	16	3.6% (3/84)	0% (0/96)	0% (0/96)

¹ 根据 cDNA 的起始密码子计数, 基因库号码 AF195657.

DHPLC 分析(图 2)和基因测序(图 3). 共在 5 个胃癌家系中发现 5 处错义突变(31.3%, 5/16). 尽管未发现无义突变和移码突变, 但在散发性胃癌及正常对照中均未检出上述错义突变的存在(表 1).

错义突变 A1234G 见于家系 2 中. 该家系有 1 例 65 岁胃癌患者及其 1 例 32 岁健康子女被检出这种突变. 但其患胃癌的弟弟及健康的姐姐没有检出(图 4A). 错义突变 A2173C 见于家系 6 中. 该家系共有祖孙三代 3 例胃癌患者及 1 例健康亲属被检出, 显示出这种突变与该家系胃癌发生具有较强的相关性(图 4B). 错义突变 G2221T 见于家系 13 中. 该家系患胃癌的父亲及其 2 例患大肠癌的儿子被检出. 但其另 1 例患胃癌的儿子却没有检出. 该家系还有 1 例健康亲属被检出(图 4C). 错义突变 T2896C 见于家系 8 中. 该家系共有 5 例成员被检出, 包括 2 例胃癌患者(父女)及 1 例大肠癌患者. 同时他们的 2 例健康亲属也被检出. 但该家系另 1 例女性胃癌患者未被检出(图 4D). 错义突变 G4351A 见于家系 16 中. 该家系由父亲、母亲及其 3 例子女构成. 患胃癌的父亲没有检出. 但患大肠癌的母亲和 1 例患胃癌的儿子及另 1 例健康的儿子被检出(图 4E).

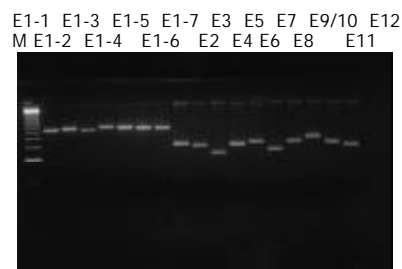


图 1 hMLH3 各片段 PCR 产物脂糖凝胶电泳. M: 分子质量标记物.

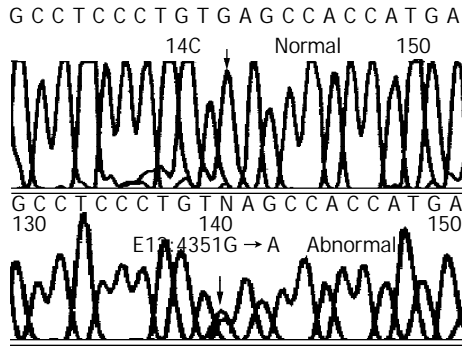


图3 测序结果显示外显子12中的杂合子的错义突变, G4351A, 导致 Glu1451Lys.

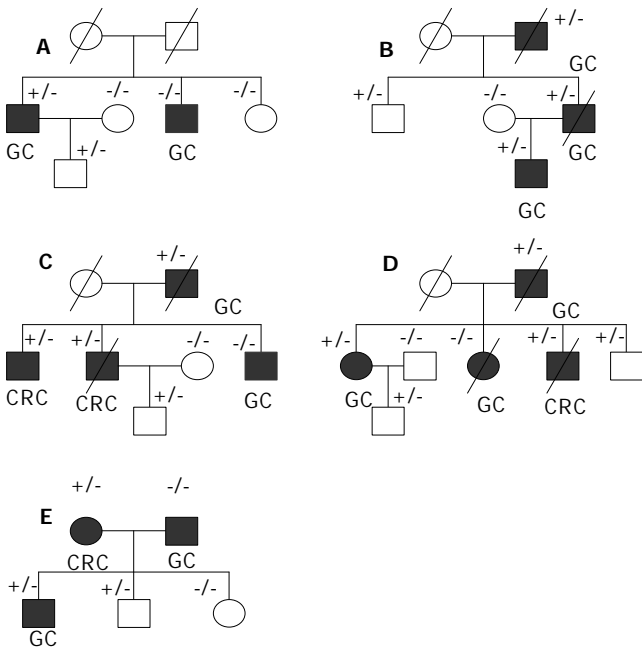


图4 有hMLH3基因突变的家系. GC: 胃癌; CRC: 大肠癌; +: 变异体携带者; -: 非变异体的携带者. A: 家系2 A1234G; B: 家系6 A2173C; C: 家系13 G2221T; D: 家系8 T2896C; E: 家系16 G4351A.

3 讨论

在我国的各种恶性肿瘤中, 胃癌一直具有较高的发病率和死亡率. 一些地区的胃癌患者亦呈现出明显的家族性, 显示出遗传因素在胃癌的发病中具有重要作用. 目前一般认为在消化道上皮恶性肿瘤中起作用的基因主要有三类: 癌基因, 抑癌基因及错配修复基因. 后者编码的错配修复系统可检查 DNA 双螺旋上错配的碱基对, 将其切除并重新合成正确的碱基对. 错配修复基因的突变可导致 DNA 复制后的修复缺陷, 产生基因组的不稳定性, 引起关键作用的基因突变频率显著增加, 特别是那些与癌变相关的原癌基因、抑癌基因或其他基因的突变, 导致肿瘤的发生. Fang et al [19]在 68 例胃癌患者中发现 2 例 hMSH6 移码突变. Menoyo et al [20]对 23 例 MSI 阳性的散发性胃癌移码突变研究中发现, 分别有 56% 和 43% 的患者具有 hMSH3 和 hMSH6 的移码突变. 但没有检出 hMLH3 移码突变, 尽管他们发现 1 例 hMLH3 腺嘌呤缺失. 然而更多的研究显示, hMLH1 启动子甲基化

导致其失活及表达改变或消失[21-22], 在一些胃癌的发病中可能起到更大的作用.

hMLH3 是 2000 年克隆并定性的一种错配修复基因, 定位于 14q24.3, 编码全区长 4.3 kb, 由 12 个外显子组成. 由于其存在与 hMLH1 相互作用的区域[25], 且与酵母的 MLH3 极为相似[25], 因此被预测可能是另一个与人类恶性肿瘤有关的错配修复备选基因. Wu et al [23]对 288 个疑似有 HNPCC 的索引患者的筛查中发现 12 个病例中存在 10 个不同的 hMLH3 生殖系突变, 1 例移码突变和 9 例错义突变. Liu et al [24]在对 70 个 HNPCC 家系的研究中共鉴定出一个移码突变和 9 个错义突变. hMLH3 与胃癌的关系除了前文所提的 Anna Menoyo 外, 再未见其他报道. 然而 Anna Menoyo et al 的研究对象是散发性胃癌, 他们也只观察了移码突变的情况, 其他的突变情况并没有涉及. 本文的研究尽管亦没有发现移码突变, 但发现了 5 处错义突变. 尤其是在家系 6 中由于祖孙三代 3 例胃癌患者均检出 A2173C 突变, 显示出该突变在这个胃癌家系中可能具有较强的致病性. 在其他的家系中, 尽管突变与胃癌没有显示出较强的相关性, 但在散发性胃癌及正常对照中均未检出同样的突变, 从而显示这些家系中存在的突变可能也具有一定的致病性. 目前推断 hMLH3 基因可能作为一个低风险的等位基因, 他可能通过与其他基因互相叠加、共同起作用, 在一些家系中提高了患 HNPCC 及胃癌等恶性肿瘤的风险. 但其确切的作用, 尚需进行蛋白功能方面的深入研究.

4 参考文献

- Cheng L, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2642-2649
- Tomaszewska R, Okon K, Stachura J. Expression of the DNA mismatch repair proteins (hMLH1 and hMSH2) in infiltrating pancreatic cancer and its relation to some phenotypic features. *Pol J Pathol* 2003;54:31-37
- Geisler JP, Goodheart MJ, Sood AK, Holmes RJ, Hatterman-Zogg MA, Buller RE. Mismatch repair gene expression defects contribute to microsatellite instability in ovarian carcinoma. *Cancer* 2003;98:2199-2206
- Cui L, Jin HY, Cheng HY, Yan YD, Meng RG, Yu DH. Genetic detection of Chinese hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:209-213
- Ponz De Leon M, Benatti P, Di Gregorio C, Pedroni M, Losi L, Genuardi M, Viel A, Fornasari M, Lucci-Cordisco E, Anti M, Ponti G, Borghi F, Lamberti I, Roncucci L. Genetic testing among high-risk individuals in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004;90:882-887
- Zhao B, Wang ZJ, Xu YF, Wan YL, Li P, Huang YT. Report of 16 kindreds and one kindred with hMLH1 germline mutation. *World J Gastroenterol* 2002;8:263-266
- Wang CH, Tang CW, Liu CL, Tang LP. Inhibitory effect of octreotide on gastric cancer growth via MAPK pathway. *World J Gastroenterol* 2003;9:1904-1908
- Sun L, Wang X. Effects of allicin on both telomerase activity and apoptosis in gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1930-1934
- Xu C, Li ZS, Tu ZX, Xu GM, Gong YF, Man XH. Distribution of cagG gene in *Helicobacter pylori* isolates from Chinese patients with different gastroduodenal diseases and its clinical and pathological significance. *World J Gastroenterol* 2003;9:2258-2260
- Qiu GB, Gong LG, Hao DM, Zhen ZH, Sun KL. Expression of MTLC gene in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;

- 9:2160-2163
- 11 Gao S, Yu BP, Li Y, Dong WG, Luo HS. Antiproliferative effect of octreotide on gastric cancer cells mediated by inhibition of Akt/PKB and telomerase. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2362-2365
 - 12 Zhu JS, Shen B, Chen JL, Chen GQ, Yu XH, Yu HF, Zhu ZM. Molecule action mechanisms of NM-3 on human gastric cancer SGC-7901 cells in vivo or in vitro. *World J Gastroenterol* 2003;9:2366-2369
 - 13 Zhang B, Wu Q, Ye XF, Liu S, Lin XF, Chen MC. Roles of PLC-gamma2 and PKCalpha in TPA-induced apoptosis of gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:2413-2418
 - 14 Lu JB, Sun XB, Dai DX, Zhu SK, Chang QL, Liu SZ, Duan WJ. Epidemiology of gastroenterologic cancer in Henan Province, China. *World J Gastroenterol* 2003;9:2400-2403
 - 15 Liu YB, Wei ZX, Li L, Li HS, Chen H, Li XW. Construction and analysis of SSH cDNA library of human vascular endothelial cells related to gastrocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9: 2419-2423
 - 16 Xu AH, Chen HS, Sun BC, Xiang XR, Chu YF, Zhai F, Jia LC. Therapeutic mechanism of ginkgo biloba exocarp polysaccharides on gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2424-2427
 - 17 Wang KX, Wang XF, Peng JL, Cui YB, Wang J, Li CP. Detection of serum anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G in patients with different digestive malignant tumors. *World J Gastroenterol* 2003;9:2501-2504
 - 18 Yang LQ, Fang DC, Wang RQ, Yang SM. Effect of NF-kappaB, survivin, Bcl-2 and Caspase3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand. *World J Gastroenterol* 2004;10:22-25
 - 19 Fang DC, Yang SM, Zhou XD, Wang DX, Luo YH. Telomere erosion is independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:522-526
 - 20 Menoyo A, Alazzouzi H, Espin E, Armengol M, Yamamoto H, Schwartz S Jr. Somatic mutations in the DNA damage-response genes ATR and CHK1 in sporadic stomach tumors with microsatellite instability. *Cancer Res* 2001;61:7727-7730
 - 21 Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Yang JM, Liu HF, Peng GY, Xiao TL, Luo YH. Mutation and methylation of hMLH1 in gastric carcinomas with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2003;9:655-659
 - 22 Kang YH, Bae SI, Kim WH. Comprehensive analysis of promoter methylation and altered expression of hMLH1 in gastric cancer cell lines with microsatellite instability. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:119-124
 - 23 Wu Y, Berends MJ, Sijmons RH, Mensink RG, Verlind E, Kooi KA, van der Sluis T, Kempinga C, van dDer Zee AG, Hollema H, Buys CH, Kleibeuker JH, Hofstra RM. A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 2001; 29:137-138
 - 24 Liu HX, Zhou XL, Liu T, Werelius B, Lindmark G, Dahl N, Lindblom A. The role of hMLH3 in familial colorectal cancer. *Cancer Res* 2003;63:1894-1899
 - 25 Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Lynch HT, Elliott RM, Collins FS. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat Genet* 2000;24:27-35

World Journal of Gastroenterology 国际检索系统收录

ISI 编制出版的《科学引文索引》(Science Citation Index®-Expanded, SCI-E)是一种大型的综合性检索工具, 收录世界上 5876 多种权威科技期刊. 它具有严格的选刊标准, 是国际公认的进行科学统计与科学评价的主要工具, 是衡量期刊质量和论文学术水平的重要依据. 由于 SCI-E 特有的著者与著者、文献与文献之间的引用与被引用关系, 使之成为目前国际上最具权威性的科研成果评价体系. 一个国家或地区的科技期刊和论文被 SCI-E 收录和引用的多少, 被认为是评价该国或该地区科学研究水平高低的标志之一. 1998 年以来《World Journal of Gastroenterology, WJG》先后被美国《科学引文索引》(SCI-E, Research Alert®, Current Contents/Clinical Medicine®, Journal Citation Reports®, Clinical Medicine Citation Index®), 美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE), 美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA), 荷兰《医学文摘库 / 医学文摘》(EMBASE/Excerpta Medica, EM), 俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journals, AJ) 收录.