

文章编号:1005-6947(2006)08-0582-04

· 基础研究 ·

BC047440 基因在肝细胞癌中的表达及其意义

郑璐, 李靖, 杨彤翰, 赵弘智, 梁平, 黄小兵

(第三军医大学新桥医院 肝胆外科, 重庆 400037)

摘要: **目的** 探讨肝癌相关的新基因 BC047440 在肝细胞癌(HCC)中的表达及其病理学意义。**方法** 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)半定量检测 36 例 HCC 及其相应的癌旁肝组织中 BC047440 mRNA 的表达,并将该基因在 HCC 中的表达分为过高表达组及较高表达组,分析其与肿瘤病理变化的关系。**结果** 36 例 HCC 中 BC047440 基因 mRNA 的表达较癌旁肝组织高,其平均光密度比值分别为 0.2594 ± 0.0928 和 0.0942 ± 0.0443 , 差异有极显著性意义 ($P < 0.01$); 过高表达组与较高表达组相比较,前者肝癌直径较大,门静脉受侵较严重,差异有显著性 ($P < 0.05$)。**结论** BC047440 基因与 HCC 的发生、发展和侵袭转移有关。

关键词: 肝肿瘤/病理学; 肝细胞癌/病理学; 基因 - BC047440

中图分类号: R735.7; R730.261

文献标识码: A

Expression of BC047440 gene in human hepatocellular carcinoma tissues and its significance

ZHENG Lu, LI Jing, YANG Tong-han, ZHAO Hong-Zhi, LIANG Ping, HUANG Xiao-Bing
(Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the BC047440 mRNA expression in human hepatocellular carcinoma tissues, and the role of BC047440 gene in the carcinogenesis and development of human hepatocellular carcinoma.

Methods Specimens from 36 cases of hepatocellular carcinoma and their corresponding adjacent non-cancerous tissues were examined for BC047440 mRNA expression by polymerase chain reaction after reverse transcription (RT-PCR). **Results** (1) the BC047440 mRNA expression in specimens of 36 cases of hepatocellular carcinoma was higher than that in their adjacent non-cancerous tissues (0.2594 ± 0.0928 and 0.0942 ± 0.0443 , respectively, $P < 0.01$). (2) In BC047440 mRNA over expression group, the tumor was bigger, and invasion of portal was more severe than those in BC047440 mRNA high expression group (all $P < 0.05$). **Conclusions** The expression of BC047440 gene may be related to the carcinogenesis, the growth, infiltration and metastasis of human hepatocellular carcinoma.

Key words: Liver Neoplasms/pathol; Hepatocellular Carcinoma/pathol; Gene BC047440

CLC number: R735.7; R730.261

Document code: A

在肝癌相关基因的筛选中,通过抑制消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 技术,笔者已发现 1 条新的肝癌相关基因片段表达序列标签

(EST),进行序列分析后,发现它代表新基因或不同剪接体的 EST^[1-2]。进一步用 RACE 等方法获得该新基因全长 cDNA 序列,经检索基因库 (GeneBank),发现其与 1 条新公布但功能未知的长 1476bp 的基因序列 (登录号 BC047440) 同源^[2]。为进一步确定该基因与肝癌发生发展的关系,笔者采用半定量逆转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测肝细胞癌 (HCC) 中 BC047440 基因 mRNA 的表

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170424)。

收稿日期:2005-12-06; **修订日期:**2006-05-08。

作者简介:郑璐,男,重庆人,第三军医大学新桥医院博士研究生,主要从事肝胆肿瘤方面的研究。

通讯作者:李靖 E-mail:xqyylj@tom.com。

达,并分析其与肝癌临床病理特征的关系,以探讨 BC047440 基因在肝细胞癌发生发展和侵袭转移中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料来源

标本取自本院手术切除的 36 例 HCC 组织和相应的癌旁肝组织。其中男 29 例,女 7 例;年龄 32 ~ 78 (平均 53) 岁,术前均未经化疗或栓塞治疗。所有标本经病理组织学切片证实。肿瘤切除后立即切取肝癌组织与距癌组织边缘 1.5 cm 以上的肝组织,放入液氮中保存。切缘经病理证实未见癌细胞。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取 采用 Promega 公司的 SV 总 RNA 分离系统(SV Total RNA Isolation System)。按操作说明称取 30 mg HCC 及癌旁肝组织提取总 RNA;用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析并证实其完整性,紫外分光光度仪测其 OD 值和浓度。

1.2.2 RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,按说明书操作。向灭 RNA 酶的 PCR 管中依次加入试剂盒内 $MgCl_2$ 2 μL , 10 \times RT 缓冲液 1 μL , dNTP 1 μL , RNase 抑制剂 0.25 μL , AMV 逆转录酶 0.5 μL , Oligo 引物 primer 0.5 μL 。根据 RNA 浓度计算所加 RNA 体积,总 RNA 投入量 1 μg ,再调整不含 RNA 酶的水(RNase free dH_2O)量,使反应终体积为 10 μL 。逆转录条件:50 $^{\circ}C$, 30 min; 99 $^{\circ}C$, 5 min; 5 $^{\circ}C$, 5 min。逆转录产物置于 -20 $^{\circ}C$ 保存,取 5 μL 产物用于 PCR 反应。

1.2.3 PCR 引物的设计 根据人 BC047440 基因及 β -actin 基因碱基序列,应用 Primer Premier 5.0 软件,于基因不同外显子上设计上下游引物。BC047440 和 β -actin 扩增片段长度分别为 367 bp 和 300 bp。引物序列为:BC047440 上游引物为 5' CCCTTCCCTGGGTGACTGCTCT 3', 下游引物为 5' CCGCCGATTCCTCAGCCATAAAC 3'; β -actin 上游引物为 5' CATCTCTTGCTCGAAGTCCA 3', 下游引物为 5' ATCATGTTTGAGACCTTCAACA 3'。所有引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2.4 PCR 操作步骤 BC047440 与 β -actin 采取

两管法异管扩增。向消毒 PCR 管中逐项加入 5 \times RT 缓冲液 10 μL , BC047440 (或 β -actin) 上游引物 (20 pmol/ μL) 1 μL , 下游引物 (20 pmol/ μL) 1 μL , Taq DNA 聚合酶 (polymerase) 0.25 μL , cDNA 5 μL , ddH₂O 32.75 μL ; 总体积 50 μL 。将 PCR 管置入 DNA 扩增仪中,按下述条件进行扩增。BC047440 基因的扩增条件为:94 $^{\circ}C$ 预变性 2 min; 26 个循环:94 $^{\circ}C$, 30 s; 62 $^{\circ}C$, 30 s; 72 $^{\circ}C$, 30 s; 最后于 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。 β -actin 扩增条件为 94 $^{\circ}C$ 预变性 2 min; 26 个循环:94 $^{\circ}C$, 45 s; 55 $^{\circ}C$, 45 s; 72 $^{\circ}C$, 45 s; 最后于 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。PCR 产物置于 -20 $^{\circ}C$ 保存。用含 0.5 $\mu g/mL$ 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行鉴定。取 DL2000 marker 4 μL 与 PCR 产物同时进行电泳,通过 PCR 扩增片段条带位置与 DL2000 marker 比较,判断扩增片段的大小。

1.2.5 半定量分析 BC047440 基因 mRNA 表达丰度的半定量,是通过将配对组织样本中 BC047440 基因和细胞中恒定表达的 β -actin 基因的 RT-PCR 产物的比较而进行的。以此判断该基因在不同组织中表达丰度的高低。通过 Quantity One 软件测定不同条带的光密度值,基因的表达值以 (BC047440 密度值/ β -actin 密度值) \times 100% 表示。

为建立可比性,在 RT-PCR 步骤及其产物电泳过程中均采取以下措施:(1) 肝癌组织及癌旁正常肝组织提取的总 RNA 均经紫外分光光度仪测定其纯度及含量。用于逆转录步骤中的标本 RNA 吸光度 260 nm/280 nm 值均在 1.7 ~ 2.0,各样本在行 RT 时均取 1 μg 总 RNA 进行逆转录。(2) 同时扩增两对引物的目的条带,采取 BC047440 与 β -actin 异管扩增,理由:若在同一 PCR 反应体系中同时扩增 BC047440 与 β -actin,两对引物将会竞争模版,且极易产生引物二聚体,出现非特异性扩增^[7];而且 β -actin 基因表达丰度较高,PCR 反应条件与 BC047440 也不相同。(3) 各反应管中各样本 cDNA 量完全相同 (5 μL), BC047440 及 β -actin 的循环次数均为 26,PCR 产物加不同泳道电泳作为外参照。(4) 电泳时每一泳道加各样本的 BC047440 及 β -actin PCR 产物的溶液量均相同。用凝胶成像系统摄取各样本,在同一凝胶上的电泳图,通过成像分析软件计算比较每一泳道中 BC047440 及 β -ac-

tin PCR 产物条带的光密度值,计算 BC047440 与 β -actin 条带的光密度的相对比值,通过比较各样本的 BC047440 相对值。最终得出 BC047440 在肝癌组织及癌旁肝组织中表达的相对含量。

1.3 统计学处理

HCC 与癌旁肝组织中 BC047440 mRNA 的表达的比较采用单因素方差分析; HCC 中 BC047440 mRNA 的表达与临床病理学指标之间的关系的关系的检验采用 Fisher 确切概率法检验,应用 SPSS10.0 统计软件进行分析。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 BC047440 基因的表达情况

本结果显示 BC047440 基因在 HCC 组织和癌旁肝组织中有不同程度的表达,但 HCC 组织中 BC047440 基因 mRNA 的表达水平明显高于相应的癌旁肝组织(附图)。36 例 HCC 组织中 BC047440 基因 mRNA 表达量的平均光密度比值为 0.2594 ± 0.0928 ,癌旁肝组织中 BC047440 基因 mRNA 表达量的平均光密度比值为 0.0942 ± 0.0443 ,二者差异有非常显著意义($P < 0.01$)。

附图 RT-PCR 产物电泳条带 BC047440 产物为 367bp,内参照 β -actin 产物为 300bp。从右至左依次为 DL2000 Marker、肝癌(T)、肝癌内参照、癌旁肝组织(N)、癌旁内参照; BC047440 在肝癌中的表达明显高于癌旁肝组织

2.2 BC047440 基因表达与 HCC 临床病理学指标的关系

以 36 例 HCC 中 BC047440 基因 mRNA 表达量的平均值与癌旁肝组织中 BC047440 基因 mRNA 表

达量的平均值的比值($X_t : X_n = 2.1$)为界,将 HCC 分为过高表达组 20 例和较高表达组 16 例。比较两组在临床病理学指标之间是否存在差异。结果发现:BC047440 基因过高表达组肿瘤直径较大,肝内转移、肿瘤包膜及门静脉侵犯较多,肝硬化程度较重;其中肿瘤直径、门静脉侵犯上差异有显著意义($P < 0.05$);而两组在甲胎蛋白(AFP)、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阳性及细胞分化程度等指标差异不明显(附表)。

附表 肝细胞癌临床病理学指标与 BC047440 表达的关系

临床病理特征	过高表达组	较高表达组	P 值
性别			
男	16	13	1.000
女	4	3	
直径(cm)			
≥ 5	15	6	0.041
< 5	5	10	
HBsAg			
阳性	14	10	1.000
阴性	6	6	
AFP(ng/mL)			
≥ 20	15	11	0.722
< 20	5	5	
分化程度			
低中	11	7	0.315
高	9	9	
肝硬化程度			
轻	12	8	0.737
重	8	8	
肿瘤包膜侵犯			
有	13	8	0.500
无	7	8	
肝内转移			
有	8	5	0.731
无	12	11	
门静脉侵犯			
有	12	3	0.019
无	8	13	

3 讨论

肝癌的发生是多基因、多因素参与的不同基因

在不同时期的表达及功能紊乱而引起的复杂过程。目前发现的与肝癌发生、发展有密切关系的基因还不多。寻找肝癌相关的新基因是近年来研究的热点^[3]。自1984年顾健人等对原发性肝癌及肝癌7402细胞株DNA转染NIH/3T3所得转化细胞的研究证明存在人N-ras基因序列以来,肝癌相关基因的研究迅速发展,目前已经发现与人类肝癌发生有关的基因有N-ras, c-fms, p53, c-myc, IGF-II, IGF-1R, p16, p21, DCC, nm23, TGF- α , C-ets-2及Rb等^[4],但仍有许多与肝癌发生发展有关的基因尚待确定。国内外不少学者已展开了肝癌新基因克隆与鉴定的研究,通过弄清它们的结构和功能,从本质上阐明肝癌的发生机制,为肝癌的基因诊断与基因治疗打下基础。

肿瘤是细胞中多种基因突变累积的结果,其中原癌基因的活化在肿瘤的发生、发展过程中起重要的促进作用。例如癌基因c-erbB-2可引起细胞恶性转化,在维持肿瘤细胞恶性表型上也起重要作用,其表达可被EGF等肽类调节因子诱导。有人^[5]发现c-erbB-2/neu能阻止细胞的程序性死亡。原癌基因c-jun对人卵巢癌细胞生长有促进作用,系一有意义的治疗靶基因。原癌基因MDM2编码p90(MDM2),能与p53结合阻断其转录活化区进而灭活并降解p53蛋白。野生型MDM2基因还有另一产物p76(MDM2),它不能与p53结合,p90与p76共存的比率能调节组织对DNA损伤的应激作用^[6]。本研究运用半定量RT-PCR技术,在肝癌和癌旁肝组织检测新基因BC047440的表达。结果表明该基因在肝癌组织和癌旁肝组织中均表达,但癌组织中的表达水平明显高于相应的癌旁肝组织($P < 0.01$)。HCC中过高表达组同较高表达组相比,涉及到肿瘤侵袭、转移方面的特征如门静脉侵犯等方面均有显著差异,还与肿瘤大小有关。本研究提示BC047440基因是与肝癌生长、侵袭、转移能力增强的一个密切有关基

因。因此推测,BC047440基因可能是与HCC的产生有关的癌基因之一。恶性肿瘤发生侵袭和转移包括基质降解^[7]、细胞迁移和血管生成^[8]等一系列步骤,BC047440基因也可能在肝癌发生侵袭、转移的某些步骤中起作用。该基因是否能作为肝癌的早期诊断及判断肝癌转移潜能的一个新的指标,或者是否可将其作为肝癌治疗的一个新的靶点?存疑的问题都有待加大样本作深入研究方能定论。

参考文献:

- [1] Li J, Han BL, Huang GJ, *et al.* Screening and identification for cDNA of differentially expressed genes in human primary hepatocellular carcinoma [J]. *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi*, 2003, 20(1): 49-52.
- [2] 赵弘智, 梁平, 李靖, 等. 肝癌相关cDNA片段的快速克隆和表达[J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 12(8): 1785-1788.
- [3] Goldenberg D, Ayesh S, Schneider T, *et al.* Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using cDNA arrays [J]. *Mol Carcinog*, 2002, 33(2): 113-124.
- [4] 史光军, 陈孝平, 张万广, 等. Rb基因产物与原发性肝癌的生物学特性及预后关系的研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 12(9): 710-712.
- [5] Lazar H, Baltzer A, Gimmi C, *et al.* Over-expression of erbB-2/neu is paralleled by inhibition of mouse-mammary-epithelial-cell differentiation and developmental apoptosis [J]. *Int Cancer*, 2000, 85(4): 578-583.
- [6] Perry ME, Mendrysa SM, Saucedo LJ, *et al.* p76(MDM2) inhibits the ability of p90(MDM2) to destabilize p53 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5733-5738.
- [7] 刘合利, 杨连粤, 黄耿文, 等. 整合素 α 亚基对肝细胞性肝癌血管生成、侵袭转移的影响[J]. *中华普通外科杂志*, 2002, 17(9): 542-543.
- [8] 黄耿文, 杨连粤, 杨建青, 等. 肝细胞癌中表皮生长因子与血管内皮生长因子过量表达的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24(6): 564-567.