

PCR检测原发性肝细胞癌 WWOX基因表达及意义*

陈锦萍¹, 王效民^{2a}, 张忠英^{2b}, 游攀^{2b}, 李涌^{2a}, 黄建炜³, 吴绍峰^{2a}, 傅锦波^{2a} (1. 福建医科大学 2004级研究生, 福州 350004; 2. 厦门大学医学院附属中山医院 a 肝胆外科, b 厦门市临床检验中心, 福建厦门 361004; 3. 厦门市疾病预防控制中心 分子生物实验室)

摘要:目的 检测染色体普通型脆性位点 FRA16D (16q23.3-q24.1)上 WWOX(WW domain containing oxidoreductase)基因在原发性肝细胞癌(HCC)中的表达及意义。方法 用 RT-PCR、荧光定量 PCR方法分别对 40例原发性肝细胞癌组织(以下简称肝癌组织)、癌旁组织中 WWOX基因的 6-8变异情况及其 mRNA表达差异进行检测。结果 WWOX mRNA在肝癌组织的表达(0.318 ± 0.0559)显著低于癌旁组织(1.0), $P < 0.05$;而且在肝癌组织中 6-8变异体的出现频率为 20% (8/40), 显著高于癌旁组织 2.5% (1/40), $P < 0.05$ 。结论 WWOX基因的低表达、变异可能在肝癌的发生发展中起重要作用,并有可能作为肝癌的早期诊断指标之一。

关键词:肝细胞癌; WWOX基因; 抑癌基因; 脆性位点

脆性位点是染色体在特殊条件下易断裂的非随意位点。脆性位点有罕见型和普通型。许多肿瘤的发生往往涉及普通型脆性位点的纯合性或杂合性缺失。在人类染色体上已发现一系列的脆性位点。近 80%的普通型染色体脆性位点(common fragile sites, CFSs)已经被描述,常见的是 FRA3B (3p14.2)和 FRA16D (16q23.3-q24.1)。Bednarek^[1], Paige^[2]和 Ried^[3]等在 2000年同时发现了一个与 FHIT基因相类似的新基因 WWOX(WW domain-containing oxidoreductase, 也称 WOX1 或 FOR II 或 WWOXv1),位于人类普通型染色体脆性位点 FRA16D (16q23.3-q24.1)上。据文献报道,WWOX与多种肿瘤包括肝癌的发生和发展有关。但目前研究的大多是细胞系,尚有必要对癌组织、癌旁组织 WWOX基因的表达情况作进一步的分析。本研究试从 WWOX基因 mRNA在 HCC病例中的表达水平的差异来探讨 WWOX在肝癌的发生进展中的作用。

1 材料和方法

1.1 组织标本 40例原发性 HCC组织及其癌旁组织标本收集自 2004~2006年在厦门中山医院肝胆外科接受手术治疗的 HCC患者,均经病理确诊,男性 35例,女性 5例,年龄 29~71岁,平均 48.5岁。取癌组织、癌旁组织(距离癌组织边缘至少 2 cm,均经病理学证实无癌组织残留)后立即置入液氮,转储 -80℃ 冰箱备用。

1.2 主要试剂与仪器 TRzol试剂(Invitrogen公

司)、MMLV 逆转录酶(Promega公司)、FQ-PCR PreMix(Hot Start) Kit(上海轩昊公司)、Taq酶、200 bp Ladder(华美公司)、琼脂糖(Biowest)、Genefinder染料(百维信公司)、DNA Extraction Kit纯化回收试剂盒(MB I公司);引物全部由 Invitrogen公司合成。Beckman Coulter U260紫外分光光度计、Eppendorf 梯度 PCR 仪、Bio-Rad PAC200电泳仪、DBT-8000-WL uvipro凝胶图像分析系统、ABI Prism 7000 荧光定量 PCR 仪、Beckman Coulter CEQ 8000测序仪。

1.3 引物 见表 1、表 2。

表 1 荧光定量 PCR引物序列

名称	序列	产物长度	
WWOX 基因 ^[4]	上游引物	5'-CGTGCA GCA TTTTGCTGAAAG-3'	73 bp
	下游引物	5'-AGTTGCTGCGTTGCACACA-3'	
	TaqMan 探针	5'-HEX-AGGCCAAGAA TGTGCCTCTTCA TGTGC-TAMRA-3'	
内参照 -gbbin 基因	上游引物	5'-GTGCACCTGACTCTGAGGAGA-3'	102 bp
	下游引物	5'-CCTTGA TACCAACCTGCCACG-3'	
	TaqMan 探针	5'-FAM -AAGGTGAACGTGGAT-GAAGTTGGTGG-TAMRA-3'	

1.4 组织中总 RNA提取 按 TRzol试剂盒说明书进行操作。

1.5 cDNA 第一链的合成 按 Promega公司的 MMLV逆转录酶试剂盒说明书进行操作;合成的 cDNA第一链储存于 -20℃ 冰箱或立即进行 PCR。

* 作者简介:陈锦萍,1976年生,男,主治医师,在读硕士研究生,主要从事肝胆胰肿瘤研究。E-mail: chenjinping1976@hotmail.com。

通讯作者:王效民,1957年生,男,教授,主任医师,博士研究生导师,专业:肝胆外科。Tel: 0592-2292203, E-mail: wxm@xmzsh.com。

表 2 普通 PCR引物序列

名称	序列	产物长度
WWOX mRNA 全长序列 ^[5]	上游引物 5-GAGTTCCTGAGCGAGTGGAC-3 下游引物 5-CCCCAGGAAATCCCTGCTT-3	1 490 bp
内参照 (GAP-DH)	上游引物 5-ACCTGACCTGCCGCTAGAA-3 下游引物 5-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3	307 bp

1.6 FQ-PCR (双色荧光相对定量多重 PCR)扩增 PCR反应体系为 50 μl: cDNA 第一链 5 μl, 2 ×FQ-PCR PreMix (Hot Start) 25 μl, 10 μmol/L WWOX上、下游引物各 1 μl, 2 μmol/L WWOX TaqMan 探针 5.0 μl, 10 μmol/L β-globin上、下游引物各 0.5 μl, 2 μmol/L β-globin TaqMan 探针 2.5 μl, 无酶水补足 50 μl。FQ-PCR 反应条件: 95 °C 20 min, 95 °C 30 s, 60 °C 1 min, 40个循环。

1.7 普通 PCR扩增 反应体系为 25 μl: cDNA 第一链 1.5 μl, 10 ×buffer 2.5 μl, 25 mmol/L的 MgCl₂ 2 μl, 10 μmol/L WWOX上、下游引物各 0.75 μl, 10 μmol/L GAPDH上、下游引物各 0.4 μl, 10 mmol/L dNTPs 0.25 μl, 5 U/μl Taq酶 0.1 μl, 无酶水补足 25 μl。反应条件: 95 °C 5 min, 94 °C 1 min, 62 °C 1 min, 72 °C 90 s, 40个循环后 72 °C 5 min。

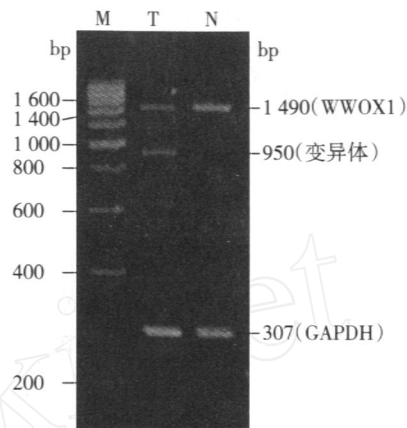
1.8 FQ-PCR产物的相对定量及数据处理 Ct值与样品中起始模板拷贝数的对数成线性反比关系 (Ct值含义是 PCR扩增过程中荧光信号强度达到阈值所需要的循环数)。每个标本重复 3次, 取平均值为 Ct值, Ct值 =WWOX基因 Ct值 - β-globin基因 Ct值, Ct值 =肝癌组 WWOX的 Ct值 - 癌旁组 WWOX的 Ct值;以癌旁组 WWOX基因表达量为 1, 2^{-Ct}值即为肝癌组 WWOX较癌旁组 WWOX表达的倍数。

1.9 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SSPS 13.0统计软件进行处理, 所用的统计学方法为配对t检验及卡方检验。P < 0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 WWOX基因在 40例原发性 HCC癌组织、癌旁组织中的表达差异情况 WWOX mRNA在肝癌组织的表达相对在癌旁组织表达的差异倍数 2^{-Ct} (0.318 ± 0.0559)明显低于 1.0, P < 0.05;其中 31例低于癌旁组织, 7例表达无明显差异, 2例表达增高。

2.2 WWOX基因的 6⁸变异情况 40例癌组织及其癌旁组织 WWOX mRNA的 950 bp 变异体出现率分别为 20% (8/40)和 2.5% (1/40)。两者比较, P < 0.05, 差异有统计学意义; 950 bp 变异体经测序证实为 6⁸变异体。图 1为 WWOX基因的 6⁸变异情况, 图 2为 WWOX基因的 6⁸变异体测序图。



M: 200-2 000 bp Marker, T: 肝癌组织 (出现 950 bp 6⁸变异条带); N: 癌旁组织。

图 1 WWOX基因的 6⁸变异情况

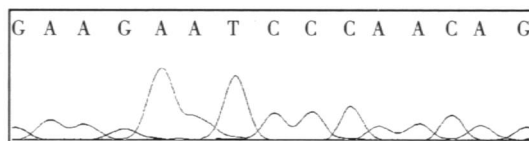


图 2 WWOX基因的 6⁸变异体测序图

3 讨论

WWOX基因包含人类另一个常见普通型染色体脆性位点 FRA16D (16q23.3-q24.1)。WWOX基因的功能比较复杂, 国外有关 WWOX在动物和细胞株方面的研究比较多, 国内相关研究少见。

本研究结果表明, WWOX在原发性 HCC及其相应癌旁组织中的表达存在显著差异, WWOX mRNA在肝癌组织的表达明显低于癌旁组织。提示 WWOX基因表达缺失或低表达在原发性 HCC的发病过程中可能起重要作用。WWOX蛋白的氨基末端有两个 WW 结构域, WW 功能域主要与蛋白之间相互作用有关^[6]。WWOX蛋白的中心部位有一短链氧化还原酶功能域 (SDR), SDR 家族是一类主要作用代谢乙醇、糖、维生素 A 类、类固醇与其他羟类和酮类底物的酶。WWOX在底物结合位点 Y NRSK的上游 12 蛋白质是一个丝氨酸残基 (S), 所在的位置与类固醇脱氢酶的位置极相近, 提示有代

谢类固醇(激素)作用^[1, 7]。肝脏是激素(包括性激素,如雌激素)灭活的主要场所,雌激素、雌激素受体与肝癌发生密切相关^[5],结合 WWOX蛋白具有代谢激素的结构特点,故推测:WWOX可能通过与激素或激素受体作用等途径抑癌,具体机制有待进一步研究。

本实验结果还显示,在肝癌组织中也出现⁶⁻⁸变异体,出现频率显著高于癌旁组织,这与 Bednarek等的报道结果相符^[8]。WWOX可能为多种外源性有害物质的作用靶点,在受到如紫外线、黄曲霉素、乙醇、HBV等外界致癌因素^[9-11]的影响时,易使普通型脆性位点上的 WWOX基因损伤,导致基因表达的变异或缺失。肝脏作为人体最重要的解毒场所,要代谢大量来自周围环境的有害物质,这些有害物质很可能诱发肝脏中 WWOX基因的改变,并成为致癌的直接因素。

参考文献:

- [1] Bednarek A K, Laflin K J, Daniel R L, *et al* WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23. 3-24. 1, a region frequently affected in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (8): 2140-2145.
- [2] Paige A J, Taylor K J, Stewart A, *et al* A 700-kb physical map of a region of 16q23. 2 homozygously deleted in multiple cancers and spanning the common fragile site FRA16D[J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (6): 1690-1697.
- [3] Ried K, Finniss M, Hobson L, *et al* Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9: 1651-1663.
- [4] Kuwaki T, Yendamuri S, Trapasso F, *et al* The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10 (7): 2459-2465.
- [5] Park SW, Ludes-Meyers J, Zimonjic D B, *et al* Frequent downregulation and loss of WWOX gene expression in human hepatocellular carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2004, 91 (4): 753-759.
- [6] Kuwaki T, Yendamuri S, Trapasso F, *et al* The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10 (7): 2459-2465.
- [7] Nunez M I, Ludes-Meyers J, Abba M C, *et al* Frequent loss of WWOX expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor status[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 89 (2): 99-105.
- [8] Bednarek A K, Keck-Waggoner C L, Daniel R L, *et al* WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth[J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (22): 8068-8073.
- [9] Ishii H, Mimori K, Inageta T, *et al* Components of DNA damage checkpoint pathway regulate UV exposure-dependent alterations of gene expression of FHIT and WWOX at chromosome fragile sites[J]. *Mol Cancer Res*, 2005, 3 (3): 130-138.
- [10] Iida M, Anna C H, Holliday W M, *et al* Unique patterns of gene expression changes in liver after treatment of mice for 2 weeks with different known carcinogens and non-carcinogens[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26 (3): 689-699.
- [11] Yakicier M C, Legoux P, Vaury C, *et al* Identification of homozygous deletions at chromosome 16q23 in aflatoxin B1 exposed hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2001, 20 (37): 5232-5238.

Study on expression and significance of tumor suppressor gene WWOX in hepatocellular carcinoma tissues by real-time fluorescent quantitative PCR

CHEN Jinping¹, WANG Xiaomin², ZHANG Zhongying², *et al* (1. Fujian Medical University, Fuzhou 350004; 2. Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, China)

Abstract: Objective To evaluate the expression and significance of tumor suppressor gene (WWOX) in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues. **Methods** Variant delta 6-8 of WWOX in patients with hepatocellular carcinoma was detected by RT-PCR and the expression of WWOX mRNA was examined by fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR). **Results** The expression of WWOX mRNA in HCC patients (0.318 ± 0.0559) was significantly lower than that in para-carcinoma tissue ($P < 0.05$). Variant delta 6-8 was found in HCC and its frequency (20%, 8/40) was significantly higher than that in para-carcinoma tissue (2.5%, 1/40, $P < 0.05$). **Conclusions** The decreased expression of WWOX gene and its variant may play an important role in carcinogenesis and development of HCC, and may be used as a new marker for prediagnosis of HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma; wwox gene; tumor suppressor gene; fragile sites

(收稿日期: 2006-11-27, 修回日期: 2007-03-15)

(本文编辑: 陈维忠)

欢迎投稿, 欢迎订阅《临床检验杂志》, 邮发代号: 28-104。