

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 例原发性肝细胞癌癌组织(以下简称肝癌组织)、癌旁组织中 WWOX 基因的 $\Delta 6.8$ 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 ± 0.059) 显著低于癌旁组织 (1.0), $P < 0.05$ 而且在肝癌组织中 $\Delta 6.8$ 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 FHII 基因相类似的新基因 WWOX (WW domain containing oxidoreductase, 也称 WOX1 或 FORII 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。本研究试图从 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 TRIzol 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 (Bioest)、Gene finder 染料(百维信公司)、DNA Extraction Kit 纯化回收试剂盒 (MBI 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'-CGTGCAGCATTTTGCTGAAG-3'	73 bp
	下游引物	5'-AGTTGCTGCGTTGCACACA-3'	
	TaqMan 探针	5'-HEX-AGGCCAAGAA TGTG CCTCTTCA TGTG C-TAMRA-3'	
内参照 β -globin 基因	上游引物	5'-GTGCACCTGACTCTGAGGAGA-3'	102 bp
	下游引物	5'-CCTTGATACCAA CCTGCCAG-3'	
	TaqMan 探针	5'-FAM-AAGGTGAA CGTG GATGAAGTGGTGG-TAMRA-3'	

1.4 组织中总 RNA 提取 按 TRIzol 试剂盒说明书进行操作。

1.5 cDNA 第一链的合成 按 Promega 公司的 M-MLV 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@xmzh.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'-CCCCAGGAATTCCCTGCTT-3'	1 490 bp
内参照 (GAPDH)	上游引物 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3' 下游引物 5'-TCCACCA CCCTGTTGCTGTA-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 dDNA 第一链 5 μl 2×FQ-PCR PreM ix (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 dDNA 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

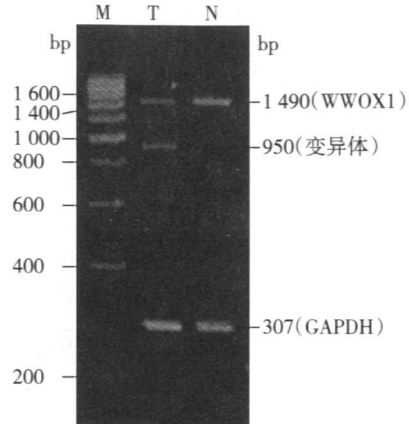
1.8 FQ-PCR 产物的相对定量及数据处理 Ct 值与样品中起始模板拷贝数的对数成线性反比关系 (Ct 值含义是 PCR 扩增过程中荧光信号强度达到阈值所需要的循环数)。每个标本重复 3 次, 取平均值为 Ct 值, ΔCt 值 = WWOX 基因 Ct 值 - β-globin 基因 Ct 值, ΔΔCt 值 = 肝癌组 WWOX 的 ΔCt 值 - 癌旁组 WWOX 的 ΔCt 值; 以癌旁组 WWOX 基因表达量为 1, 2^{-ΔΔCt} 值即为肝癌组 WWOX 较癌旁组 WWOX 表达的倍数。

1.9 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 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^{-ΔΔCt} (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 Δ⁶⁸ 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 Δ⁶⁸ 变异体。图 1 为 WWOX 基因的 Δ⁶⁸ 变异情况, 图 2 为 WWOX 基因的 Δ⁶⁸ 变异体测序图。



M: 200-2000 bp Marker T: 肝癌组织 (出现 950 bp Δ⁶⁸ 变异条带); N: 癌旁组织。

图 1 WWOX 基因的 Δ⁶⁸ 变异情况

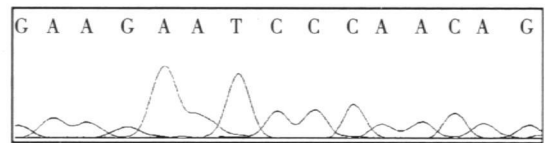


图 2 WWOX 基因的 Δ⁶⁸ 变异体测序图

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^[3],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 Δ^{68} 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] Kuroki T, Yendamuri S, Trapasso E, *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 S W, 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] Kuroki T, Yendamuri S, Trapasso E, *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 J, Ludes Meyers J, Alba M G, *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 W, Aggoner 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, Minori 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] Yacicier M G, Legoux P, Vauray G, *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 Xiamin², 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 68 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 ± 0.059) was significantly lower than that in paracarcinoma tissue ($P < 0.05$). Variant delta 68 was found in HCC and its frequency (20%, 8/40) was significantly higher than that in paracarcinoma 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 prediction 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.