DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.028
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0305-03

论著

应用RT-PCR和SSCP分析食管癌组织中p73基因的表达

冯 滨[1],蒋耀光[1],王如文[1],范士志[1],陈 嵩[2] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所胸心外科,重庆 400042;[2]附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察p73基因在食管癌中的表达与突变状况,探讨p73基因在食管癌发生、发展中的意义。方法 采用RT-PCR和SSCP检测37例食管鳞状细胞癌肿瘤组织、癌旁组织、区域淋巴结和相应正常食管组织中p73 mRNA的表达和基因的突变情况。结果 37例食管肿瘤组织中有21例(51.8%)p73 mRNA检测到过度表达,其阳性表达率显著高于相应的癌旁组织、区域淋巴结和正常组织($P<0.05$),与食管癌临床病理分期、细胞分化程度和病理类型均无显著性差异($P>0.05$);未发现食管癌组织中p73基因有任何突变。结论 p73 mRNA在食管癌组织中有较高的表达率和表达水平,本研究未发现p73在食管癌中有突变。p73基因在食管癌中的过表达和正常基因型没有能够阻止癌症的发生及恶化,可能没有主要的抑癌作用。

关键词:p73基因;食管癌;表达;突变;PCR-SSCP
中图法分类号:R394.2;R446.9;R735.1 文献标识码:A

Expression of p73 gene in esophageal cancer tissues

FENG Bin, JIANG Yao-guang, WUANG Ru-wen, FAN Shi-zhi, Chen Song (Department of Cardiothoraic Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042)

Abstract: Objective To detect situation of p73 genic transcriptional expression and mutation, and to explore the significance of p73 genic tumorigenesis or its development in esophageal cancer. Methods The expression of p73 mRNA and mutation of p73 gene were detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and by single-strand conformation polymorphism (SSCP) in 37 cases of esophageal cancer tissues, para-cancer tissues, regional lymphonodi and matched normal esophageal tissues. The relationship between p73 genic expression or mutation and clinical pathologic characteristic of esophageal cancer were analysed. Results Overexpression of p73 mRNA was found in 21/37 (51.8%) esophageal cancer tissues. The positive expression rate of p73 mRNA in the tumor tissues was significantly higher than that in the para-cancer tissues, regional lymphonodi and matched normal esophageal tissues ($P<0.05$). No significant relationship was observed between positive expression of p73 mRNA and differentia grades, clinical pathological classification or pathologic stages in esophageal cancer ($P>0.05$). No mutation of p73 gene was found in esophageal cancer tissues. Conclusion Higher expression rate and level of p73 mRNA and no mutation of p73 gene was found in the esophageal cancer tissues. The results suggested that overexpression of p73 mRNA and normal genic type of p73 cannot prevent tumor form tumorigenesis or development. p73 gene might not play a major role in suppression of development in esophageal cancer.

Key words: p73 gene; esophageal cancer; expression; mutation; SSCP

作为第一个被发现的p53基因家族中的新成员,p73基因与p53基因共同组成了一个抑癌基因家族[1],自1997年被发现以来[2],就倍受研究者的关注。p73基因的表达水平、等位基因型在不同类型的肿瘤细胞中不尽相同,虽然p73基因编码区域存在多态性的改变,但迄今却未发现在肿瘤中特征性的突变[3]。我国是食管癌高发地区,对食管癌组织p73基因的研究,迄今为止,国内尚无报道,国外也仅有两位学者[4,5]进行了初步研究。鉴于此,我们应用逆转录多聚酶链反应技术(Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)和单链PCR构象多态性(Single-strand conformation polymorphism, SSCP)分析法检测p73基因在食管癌中的表达和突变状况,并探讨p73基因在食管癌发生、发展中的意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

37例标本均取自我科2000年3月至9月行手术切除的食管癌住院患者。其中男28例,女9例,平均年龄58.45±9.27岁(32~80岁);肿瘤组织经病理学检查证实均为鳞状上皮细胞癌;临床分型:髓质型30例(79%),溃疡型5例(14%),蕈伞型1例(3.5%),缩窄型1例(3.5%)。分化程度:高分化13例(35.1%),中分化15例(40.5%),低分化9例(24.3%)。肿瘤临床分期:按国际TNM分期(UICC, 1997年),Ⅱa期13例;Ⅱb期4例;Ⅲ期19例;Ⅳ期仅1例。

1.2 标本收集

标本均在手术中收集,取材后速冻于液氮中,并于-80 ℃超低温冰箱中贮存备用。标本取材大小均约1 cm×1 cm×0.2 cm;肿瘤组织均在原发灶取材,避开坏死、炎症区域;癌旁组织取自相应肿块旁2 cm;远癌组织取自距肿块边缘5 cm以上的食管组织。

作者简介:冯 滨(1965-),男,山西省平遥县人,博士研究生,主治医师,主要从事食管癌相关基因表达与突变;心瓣膜病血液动力学与心功能和心肌病理损害相关性以及普通胸外科和心脏外科临床治疗方面的研究,发表论文13篇。电话:(023)68757241

收稿日期:2001-06-05;修回日期:2001-12-14

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 引物设计

参照 Mai[6] 的序列合成一对 p73 基因的引物，由北京中山生物技术有限公司合成。用β-actin 做为参照。

1.4 主要试剂和仪器

载样缓冲液和 SyBR Green I 染料均购自 FMC 公司(美国)；DNA Markers (Lambda-puc mhx marker)和 DNA 纯化试剂盒购自上海生工生物技术服务有限公司。PCR 扩增仪(美国 Perkin-Elmer 公司，9600 型)；高速台式冷冻离心机(德国 Heraeus 公司)；Protean II xi cell 型电泳仪和 GET DOC2000 型凝胶成像仪均购自美国 Bio RAD 公司。

1.5 组织中总 RNA 的提取

采取 Tripure Islation Reagent 提取 RNA 一步法。

1.6 RT-PCR 扩增

先将以上所提取的总 RNA 反转录成 cDNA。我们选择扩增的是 p73 基因第 13 外显子区域。PCR 扩增反应：反应体积为 50 μl，95 ℃变性 10 min，其间在 5 min 后加 Taq DNA 聚合酶 1 μl；95 ℃变性 60 s，60 ℃退火 60 s，72 ℃ 延伸 90 s；经 35 个循环周期后，72 ℃ 10 min，取出，40 ℃贮存备用。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色后，紫外透射反射仪下观察结果，并在凝胶成象仪上照相。以 PCR-Maker 为标准，在 231bp 位置出现条带为 p73 表达阳性。而β-actin 在 300 bp 位置上出现条带为表达阳性。

1.7 SSCP

选取 p73 基因 mRNA 表达阳性的 PCR 扩增产物进行 cDNA 纯化，按试剂盒操作方法进行。配制终体积为 35 ml 的 8% 丙烯酰胺凝胶液。取 cDNA 纯化产物 10 μl 与 10 μl 载样缓冲液混匀，95 ℃变性 3 min 后，迅速冰浴 10 min；取 DNA Marker 2 μl，加入 2 μl 载样缓冲液混合，作为标准分子量参照。接通电源，电压设为 140 V，电泳约 14 h。

1.8 染色与凝胶成像

将凝胶置于 SyBR Green I 染料液(1∶10 000 稀释)中染色 30 min，然后置于凝胶成像仪中进行扫描并摄像。仅在 231 bp 位置出现条带说明 p73 基因表达阳性，且无突变；在其它位置上出现条带，则提示存在 p73 基因的突变。

1.9 统计学处理

数据采用 χ^2 检验。

2 结果

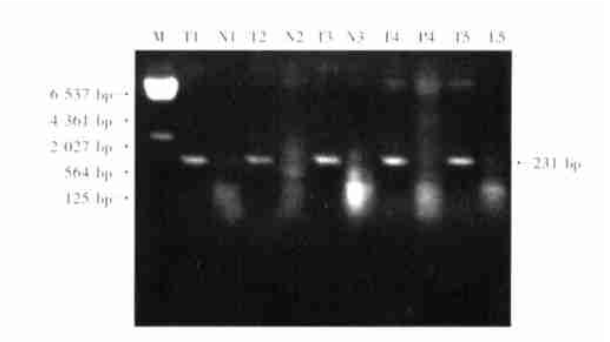
2.1 PCR 扩增见图 1

从表 1 可以知道，肿瘤组织中 p73 mRNA 阳性表达率显著高于癌旁组织、非癌组织以及区域淋巴结的阳性表达率($P<0.05$)；后三者之间的 p73 mRNA 阳性表达率无显著性差异。

表 1 食管癌组织中 **p73 mRNA** 表达的比较

Tab 1 Comparison of p73 mRNA expression in the different esophageal cancer tissues

Groups	Positive(n)	Positive rate	Overexpression(n)
Esophageal cancer tissues(37)	21	56.8	21
Esophageal adjacent tissues(37)	6	16.2	3
Regional lymphonodi(25)	3	12.0	0
Matched normal esophageal tissues(37)	7	18.9	0



M: Markers; T: Esophageal cancer tissues; N: Matched normal esophagealtissues; P: Para-cancer tissues; L: Matched regional lymphonodi 2% gelose electrophoresis

图 1 **RT-PCR** 分析 **p73** 基因表达

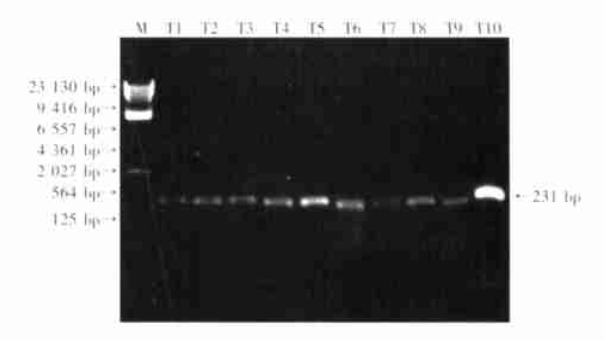
Fig 1 RT-PCR analysis of p73 gene expression in different esophageal cancer tissues

2.2 p73 mRNA 表达与食管癌临床病理特征之间的关系

p73 mRNA 阳性表达率为：Ⅱa 期 61.5%(8/13)，Ⅱb 期 50.0%(2/4)，Ⅲ期 57.9%(11/19)，Ⅳ期 0%(0/1)；低分化 55.6%(5/9)，中分化 60.0%(9/15)，高分化 53.8%(7/13)；髓质型 53.3%(16/30)，溃疡型 80.0%(4/5)，缩窄型 100%(1/1)，蕈伞型 0%(0/1)。统计学分析表明，肿瘤组织 p73 mRNA 阳性表达率与食管癌临床分期、细胞分化程度和病理类型均无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 PCR-SSCP 检测结果，见图 2

从图 2 中我们可以看出，PCR-SSCP 未检出 p73 基因 cDNA 单链有突变的迁移图谱，说明 p73 基因在食管癌中未发现任何突变。



M: Markers; T: Sample of esophageal cancer tissues

图 2 **PCR-SSCP** 检测食管癌组织 **p73** 基因突变

Fig 2 PCR-SSCP examination of p73 gene mutation in esophageal cancer tissues

3 讨论

p73 基因在人体内低水平广泛表达，通过 RT-PCR 方法在人脑、心、肝、脾、肾等器官组织中均可检测到

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

p73 基因的转录。业已研究表明, 神经母细胞瘤, 结肠直肠癌, 肺癌, 前列腺癌及其它一些肿瘤中 p73 基因呈低水平的表达; 相反, 在恶性黑素瘤及膀胱癌却发现明显的过度表达[2,6~8]。我们用 RT-PCR 分别对 37 例食管癌患者的肿瘤组织、癌旁组织、区域淋巴结以及远癌组织的 p73mRNA 表达水平进行分析, 发现食管肿瘤组织中 p73mRNA 阳性表达率为 56.8%, 而癌旁组织、区域淋巴结和远癌组织分别为 16.2%、12.0%和 18.9%。食管肿瘤组织中 p73mRNA 阳性表达率明显高于癌旁组织、区域淋巴结和相应的远癌组织($P<0.05$); 而后 3 者之间的 p73mRNA 阳性表达无显著性差异($P>0.05$); 食管肿瘤组织中 p73mRNA 阳性表达率与食管癌临床分期、细胞分化程度及病理类型均无显著相关性($P>0.05$)。本实验结果证实了食管肿瘤组织中的确存在 p73 基因在食管肿瘤组织中的过度表达, 可能是食管癌发展过程中的分子事件, 有助于食管肿瘤的发生, 参与了调控食管癌的发展过程, 这与 Cai[5] 研究结果一致。

迄今为止, 在已检测的细胞株和人类肿瘤如肺癌, 乳腺癌, 神经母细胞瘤, 前列腺癌及肝癌等的研究中均未发现 p73 基因的突变[2,6~9], 并且在肿瘤组织中 p73 比正常组织中表达更高[10]。Cai[5] 发现 p73 基因在 14 例食管鳞状细胞癌(ESCC)肿瘤标本中有 9 例(64%)存在杂合性丢失(LOH), 未发现 p73 基因突变; 而 p53 基因在 80%(12/15)的 ESCC 肿瘤标本中存在基因缺陷, 包括错义突变, 非编码区缺失或插入。同样, Nimura[4] 采用 PCR-SSCP 和 LOH 分析技术, 检测了 48 例 ESCC 肿瘤标本 p73 基因的 LOH 频率和突变, 发现 p73 基因的 LOH 在 25 例中仅有 2 例(8%), 未发现 p73 基因任何类型的突变, p73mRNA 表达也仅有 8 例(16.7%); 而 p53 基因在 PCR-SSCP 凝胶中发现有 mRNA 表达的为 39%(15/38)。Nimura 认为 p73 基因的等位基因的缺失或突变, 可能不是食管癌发生的主要分子事件, 这与 p53 基因情况不同。

单链 PCR 构象多态性(PCR-SCCP)来分析基因的变异性, 其基本原理是单链 DNA 在非变性聚丙烯酰胺凝中泳动时, 迁移率受单链 DNA 空间构象的影响, 而此空间构象决定于 DNA 分子中的碱基序列。因而根据 DNA 迁移率的改变, 既可得知 DNA 是否有突变。我们应用 SCCP 技术来分析食管癌 p73 基因的变异性, 实验结果显示, 在 231 bp 的位置上, p73 基因 cDNA 迁移成一条带, 说明 p73 基因在食管癌中未发生任何突变, 它的正常存在并没有能够阻止癌症的恶化; p73 基因可能是 p53 基因的一种模拟突变体, 在细胞内 p73 分子可模拟 p53 分子而行使 p53 分子的功能, 从而是 p53 分子失效, 造成细胞恶变, 在肿瘤发展中起重要作用, 所以它在食管癌中没有担当起重要的抑癌作用。这似乎预示了一个论点, 即 p73 作为抑癌基因, 发挥抑癌作用, 有组织特异性, 这与 Mai[6] 和 Nomoto[11] 的观点相一致。

食管癌的发生、发展是一个复杂的多步骤的病理过程, 涉及到多个病源因子和基因异常。到目前为止, 人们对 p73 基因的了解还很有限, 它的诸多功能、作用机理以及与 p53 基因的相互关系等许多方面还不十分清楚。随着对 p73 基因和其它食管癌相关基因的深入研究, 从分子生物学水平阐释食管癌的发生发展机制, 为食管癌的早期诊断和基因治疗提供理论依据和技术手段, 具有一定帮助。

参考文献:

[1] Dickman S. First p53 relative may be a new tumor suppressor[J]. Science, 1997, 277(5 332): 1 605—1 606.

[2] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, *et al*. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancer[J]. Cell, 1997, 90(4): 809—819.

[3] Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, *et al*. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions[J]. J Cell Sci, 2000, 113(10): 1 661—1 670.

[4] Nimura Y, Mihara M, Zehimiya S, *et al*. p73, a gene related to p53, is not mutated in esophageal carcinomas[J]. Int J Cancer, 1998, 78(4): 437—440.

[5] Cai Y C, Yang G Y, Nie Y, *et al*. Molecular alterations of p73 in human esophageal squamous cell carcinomas: loss of heterozygosity occurs frequently; loss of imprinting and elevation of p73 expression may be related to defective p53[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(4): 683—689.

[6] Mai M, Yokomizo A, Qian C, *et al*. Activation of p73 silent allele in lung cancer[J]. Cancer Res, 1998, 58(11): 2 347—2 349.

[7] Yokomizo A, Mai M, Bostwick D G, *et al*. Mutation and expression analysis of the p73 gene in prostate cancer[J]. Prostate, 1999, 39(2): 94—100.

[8] Zaika A I, Kovalev S, Marchenko N D, *et al*. Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines[J]. Cancer Res, 1999, 59(13): 3 257—3 263.

[9] Mihara M, Nimura Y, Ichimiya S, *et al*. Absence of mutation of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in hepatocellura carcinoma[J]. Br J Cancer, 1999, 79(1): 164—167.

[10] Kaelin W G Jr. The p53 gene family[J]. Oncogene, 1999, 18(53): 7 701—7 705.

[11] Nomoto S, Haruki N, Kondo M, *et al*. Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers[J]. Cancer Res, 1998, 58(7): 1 380—1 383.

(编辑　潘式文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net