DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.035
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
830 2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)07-0830-03

肺癌K-ras基因突变与呼吸道合胞病毒感染关系的研究

陈杭薇[1],邬光惠[2],周 景[3],李继成[1],尤兰华[1],刘晓联[1] (北京军区总医院:[1]呼吸内科;[2]肝病研究所;[3]病理科;北京 100700)

提 要:目的 探讨肺癌K-ras基因突变与呼吸道合胞病毒(RSV)感染的关系。方法 应用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)结合单链构象多态性分析(SSCP)免疫组化和ELISA方法检测肺癌组织中RSV、K-ras基因和血清sIgM抗体。结果 ①RT-PCR显示17.9%(7/39)的肺癌标本中存在有RSV基因序列。②RSV RT-PCR阳性的肺癌组织冰冻切片免疫组化显示RSV抗原在细胞浆呈弥漫性着色。③不经反转录反应直接作PCR扩增,则RSV阳性的标本不能观察到RSV特异的电泳区带。④SSCP电泳示25.6%(10/39)的肺癌组织标本中K-ras基因的第12位密码子有突变。⑤肺癌组织RSV基因的检出与K-ras基因突变结果经配对计数资料McNemar检验分析,$\chi^2=0.36$, $P>0.05$。结论 肺癌组织内有RSV感染,可能和K-ras基因的突变有关。

关键词:肺肿瘤;呼吸道合胞病毒;Ras基因;反转录聚合酶链反应;单链构象多态性分析
中图法分类号:R373.1;R394.2;R734.2 文献标识码:A

Study on the relationship between K-ras gene mutation and respiratory syncytial virus infection in lung cancer

CHEN Hang-wei, WU Guang-hui, ZHOU Jing, LI Ji-cheng, YOU Lan-hua, LIU Xiao-lian (Department of Respiratory Disease, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100700, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between respiratory syncytial virus (RSV) infection and K-ras gene mutation in lung cancer. **Methods** The RSV and K-ras gene in lung cancer and specific IgM in serum were detected by reverse transcription-PCR (RT-PCR), single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP), immunohistochemical staining and ELISA respectively. **Results** ①The existence of RSV gene sequences has been detected in 17.9% (7/39) of the lung cancer tissue samples. ②Immunohistochemical analysis showed the positive reactions covered the cytoplasm in freezing sections of lung cancer tissues. ③The specific RSV bands could not be observed in the product of PCR which was short of reverse transcription in the RSV positive samples. ④Mutation of K-ras gene at codon 12 has been found in 25.6% (10/39) of the cases of lung cancer by SSCP. ⑤The results of existence of RSV gene and mutation of K-ras gene in lung cancer tissues were analysed statistially with Paired Enumeration Data, $\chi^2=0.36$, $P>0.05$. **Conclusion** The results confirm the existence of RSV in lung cancer tissues, and propose that there is a relationship between RSV gene and K-ras gene mutation.

Key words: lung neoplasms; RSV; Ras gene; RT-PCR; RSV; SSCP

肺癌的发病率近年呈上升趋势。我国肺癌的发病率每年递增率为11.9%,已占常见肿瘤的首位[1]。近年有专家证实人乳头瘤病毒感染与肺癌可能有关[2,3]。我们在临床实践中发现肺癌患者上呼吸道分泌物中的呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus, RSV)阳性检出率较呼吸道感染疾病患者高,本研究应用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)结合单链构象多态性分析(SSCP)、免疫组化和ELISA法检测了39例肺癌手术标本的RSV、K-ras基因和血清SIgM抗体。探讨肺癌K-ras基因突变与RSV感染的关系。

1 材料和方法

1.1 病例选择

自1996年5月至1997年12月住院的肺癌患者39例,男性29例,女性10例,年龄21~76岁,平均54岁,均经手术证实诊断。其中鳞癌23例,腺癌9例,小细胞癌7例。对照组37例,男性26例,女性11例,年龄18~73岁,平均50岁,为同期住院的呼吸道感染患者。其中包括:急性支气管炎、肺炎、肺结核病、肺心病急性发作期等。

1.2 标本和材料

1.2.1 肺癌组织 手术切除的新鲜肺癌组织1 cm^3,立即置EP管-20 ℃冻存。

1.2.2 炎性组织 经纤维支气管镜活检钳取出后,立即置EP管-20 ℃冻存。

1.2.3 血清 以上患者于手术次日抽静脉血2 ml,离心后取血清-20 ℃冻存。

1.2.4 RSV病毒液 标准Long株,由首都儿科研究所病毒室提供。

1.3 实验方法

1.3.1 肺癌组织基因扩增

1.3.1.1 RSV基因RT-PCR 取肺癌1 mm^3组织块加TE缓冲液25 μl,研磨成组织浆后加入高效基因释放剂(美国Bioventures公司专利产品)50 μl,震荡30 s,100 ℃煮沸10 min,离心后取上清,酚/氯仿抽提,冷乙醇沉淀,弃上清,70%乙醇洗一遍后凉干,制备成RNA模板。按Freymuth等[4]的方法加以改进,引物设计位于病毒N基因稳定区,引物由北京师范大学京师生物

基金项目:全军"九五"医药卫生科研基金重点资助项目(98Z061)
作者简介:陈杭薇(1952-),女,江苏省扬中市人,博士,主任医师,主要从事呼吸道感染方面的研究,发表论文20篇。电话:(0201)7216298044
收稿日期:2000-09-01;修回日期:2000-11-20

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

工程公司合成, 序列为(5'-3')上游: GGTGAGGTTTATGAATATGC; 下游: GGAGTCTAGTACACTGTAGT。扩增采用 25 μl 常规标准反应体系, 42 ℃ 30 min 反转录合成 cDNA 后, 94 ℃ 45 s, 50 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s 经过 35 个循环, 最后 72 ℃延伸 5 min。在 2%琼脂糖凝胶中电泳确认 280 bp 目标区带。

1.3.1.2　K-ras 基因 PCR　　模板的制备方法同 RSV, 基因扩增按张广宇[5]的方法加以改进, 检测第 12 密码子突变, 引物由北京师范大学京师生物工程公司合成, 序列为(5'-3')上游: GACT GAATATAAACTTGTGG; 下游: CTATTGTTGGATCATATTC。扩增亦采用常规标准反应体系, 94 ℃ 45 s, 46 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 35 个循环后, 72 ℃延伸 5 min。在 2% 琼脂糖凝胶中电泳确认 108 bp 目标 DNA 区带。

1.3.2　SSCP 电泳　　取 5 μl PCR 产物, 加等量变性上样缓冲液, 95 ℃ 5 min 变性上样于制备好的 10%聚丙烯酰胺凝胶上, 40 伏 8 ℃条件下电泳 5 h。取下凝胶固定, 银染色后, 显色至条带清晰, 终止反应后判断结果。每次电泳均设置未突变型对照。

1.3.3　免疫组化碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶桥联酶标反应(APAAP)　　肺癌组织冰冻切片(4~6 μm), 粘贴于玻片上吹干, 固定后, 分别与抗 RSV-McAb、兔抗鼠 IgG、APAAP 复合物、坚固红底物液、甲基绿复染液染色, 每步反应后洗净多余抗体, 吹干, 普通光镜观察结果。APAAP 快速诊断试剂盒购自解放军第二炮兵总医院实验科。

1.3.4　RSV sIgM 抗体 ELISA 捕捉检测法　　兔抗人 IgM-μ 抗体包被, 37 ℃过夜。分别加入待测血清(稀释度 1∶100)、RSV、RSV 免疫血清、辣根过氧化物酶酶标抗体, 每步反应后洗净多余反应物, 底物显色, 终止反应后测 D 值, 波长 490 nm, 较对照反应>2 倍为阳性。

1.4　统计学处理

采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　肺癌组织标本的 RSV 基因检测

39 例肺癌标本中检出 RSV 基因序列 7 例(17.9%), 其中 5 例鳞癌, 2 例腺癌。2%琼脂糖凝胶电泳可观察到 280 bp 区带, 见图 1。炎性组织标本未发现特异性阳性区带。

2.2　肺癌标本中 RSV 基因序列的特异性鉴定

2.2.1　Southern 印迹杂交　　扩增产物经琼脂糖凝胶电泳得到的 280 bp 区带, 经变性后转移并印迹于硝酸纤维膜上, 然后与地高辛标记的已知 RSV 序列的探针进行杂交, 通过显色反应, 膜上显示阳性斑点的位置和电泳胶上的区带位置相同。

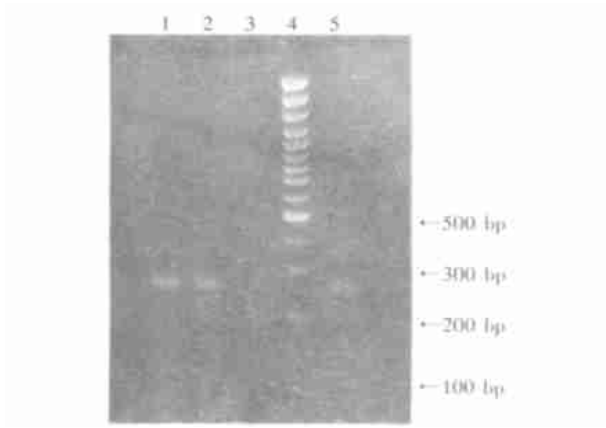


图 **1**　**RT-PCR** 扩增的 **RSV cDNA 280 bp** 片断琼脂糖凝胶电泳

Fig 1　RT-PCR RSV cDNA 280 bp

Lane 1, 2: The positive of lung cancer tissue; Lane 3: The negative of lung cancer tissue; Lane 4: 100 bp marker; Lane 5: RSV (Control)

2.2.2　再次 PCR 扩增　　经琼脂糖凝胶电泳证实阳性的扩增产物, 用常规标准反应体系在相同条件下再次扩增, 电泳鉴定仍可见到 280 bp 特异性 DNA 区带。

2.2.3　直接 PCR 扩增　　即不经过反转录这一步反应, 原扩增阳性的标本则不能扩增出 RSV 基因序列。进一步证明扩增产物为 RSV 的 RNA 序列。

2.3　APAAP 法检测 RSV 基因表达

RSV 基因扩增阳性的肺癌组织冰冻切片可见细胞浆呈弥漫性阳性反应, 而 RSV 基因扩增阴性的肺癌组织对照切片则未见阳性着色, 见图 2、3。

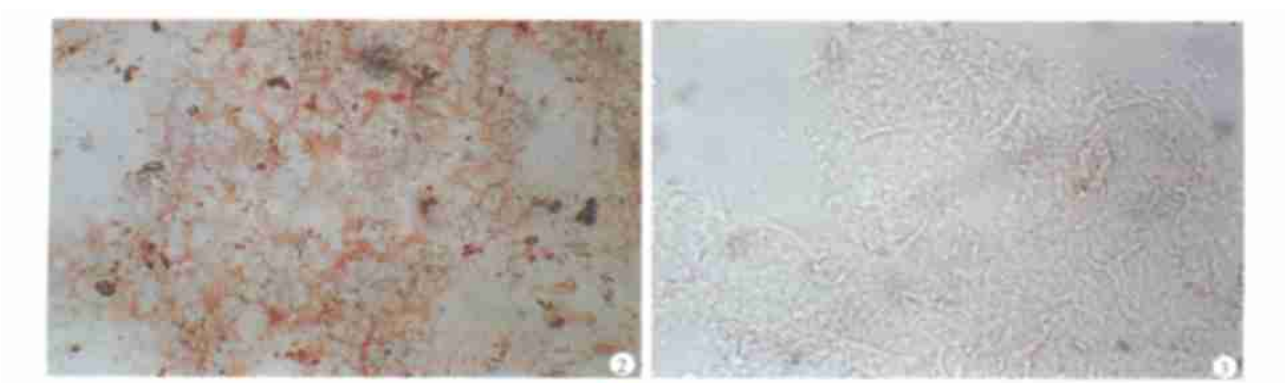


图 **2**　肺癌组织细胞浆呈弥漫性着色　(APAAP× 200)

Fig 2　Diffused positive staining of plasma in RSV positive lung cancer tissue　(APAAP× 200)

图 **3**　对照组肺组织细胞浆未见着色　(APAAP× 200)

Fig 3　No positive staining was found in RSV negative lung cancer tissue　(APAAP× 200)

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

2.4 肺癌组织标本中K-ras基因PCR-SSCP检测

检测39例肺癌组织，其中发现10例K-ras基因的第12位密码子有突变，显示其单链迁移率与正常对照比较有变化。

2.5 肺癌组织RSV基因序列检出与K-ras基因12位点突变的关系

39例肺癌组织RSV基因扩增并同时检测K-ras基因突变的结果，同时阳性者3例，同时阴性者25例，经配对计数资料的McNemar检验分析，$\chi^2=0.36$，$P>0.05$，差异无显著性意义。显示两种检测结果一致性显著，见表1。

表1 肺癌组织K-ras突变与RSV基因存在的关系

Tab 1 Relationship between K-ras gene mutation and RSV infection in lung cancer

K-ras	RSV		Total
	Gene(+)	Gene(−)	
Mutation +	3	7	10
Mutation −	4	25	29
Total	7	32	39

2.6 血清RSV sIgM抗体检测

对其中同期住院的21例肺癌和25例呼吸道感染患者检测了血清RSV sIgM抗体，从感染阳性的例数来看，肺癌组偏高，但经χ^2检验分析$\chi^2=1.155$，$P>0.05$，差异无显著性意义，见表2。

表2 肺癌和呼吸道感染患者RSV sIgM检测结果

Tab 2 Detection of RSV sIgM in patients lung cancer and respiratory tract infection

Patient	IgM +	IgM −	Total
Lung cancer	5	16	21
Infection	2	23	25
Total	7	39	46

3 讨论

自80年代末期以来我们做了有关RSV感染的系列研究，结果显示RSV不仅感染小儿，且引起成年人的许多严重感染，国外近年来也有类似报道[6,7]。成人在感染RSV 7~10 d后出现血清sIgM抗体升高，持续3~6个月。sIgM的升高表明患者可能有RSV的近期感染。本实验做了肺癌和呼吸道感染两组患者RSV sIgM检测对比，显示肺癌患者RSV的感染率偏高。但因样本例数少，尚未显示出差异。

Ras基因是人类肿瘤中最广泛存在的突变癌基因[8]，尤其是K-ras基因突变，属肺癌发生的早期事件[9]。突变主要发生在K-ras基因第12密码子处。本组患者的标本中检出了RSV基因，同时发现其中有的同时存在K-ras突变，两种检出结果经配对计数资料McNemar检验分析，差异无显著性意义，提示以上两种检测结果一致性显著，但两者之间是否存在相互影响的关系尚需进一步研究。

RSV属单股负链RNA病毒。应用RT-PCR方法[10]，扩增肺癌手术标本中的RSV，17.9%(7/39)的标本获得了RSV cDNA片断，而对照组的炎性组织则无阳性反应。免疫组化分析显示扩增出RSV基因片断的肺癌标本细胞浆呈弥漫性阳性反应，亦提示RSV基因确实存在于肺癌细胞，其表达产物主要定位于胞浆。经两次PCR能扩增出同一特异性cDNA片段，如不经过反转录直接作PCR则不能获得扩增产物，表明了本研究用RT-PCR检出的是RSV的RNA。RSV基因片断从肺癌组织的检出，给肺癌的发生与RSV感染关系的研究提供了新线索。

参考文献：

[1] 中华结核和呼吸杂志编辑部. 肺癌临床研究的进展和新的趋向[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1995, 18(5): 261−263.

[2] Johnson E S, Dalmas D, Noss J, *et al*. Cancer mortality among workers in abattoirs and meatpacking plants: an update[J]. Am J Ind Med, 1995, 27(3): 389−403.

[3] 笪襄平, 胡益云, 陈乐真, 等. 肺癌人乳头瘤病毒感染与p53基因突变的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 1996, 18(1): 27−29.

[4] Freymuth F, Eugene G, Vabret A, *et al*. Detection of respiratory syncytial virus by reverse transcription-PCR and hybridization with a DNA enzyme immunoassay[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(12): 3 352−3 355.

[5] 张广宇, 孙以瑜, 王孟山, 等. 肺癌K-ras基因突变的检测及临床应用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1995, 18(5): 282−284.

[6] 陈杭薇, 陈佩兰, 李继成, 等. 成人呼吸道合胞病毒的电镜和免疫电镜研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1993, 16(5): 281−283.

[7] Montagne J R L. RSV pneumonia, a community-acquired infection in adults [J]. Lancet, 1997, 349(9 046): 149−150.

[8] 张 波, 崔 文, 高英堂, 等. 高转移性人肺癌细胞系p53基因突变的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 1995, 17(4): 279−282.

[9] 王国凤, 陈培辉, 曹 敏, 等. 肺癌及癌旁组织p21蛋白表达及意义[J]. 癌症, 1997, 16(4): 293−294.

[10] 陈杭薇, 邬光惠, 李继成, 等. 反转录-聚合酶链反应在呼吸道合胞病毒感染检测的应用[J]. 军医进修学院学报, 1997, 18(2): 114−117.

（编辑 薛国文）

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