DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.05.020
第23卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 5
536 2001年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)05-0536-03

p73基因在人非小细胞肺癌组织中的表达

何 勇,李志平,范士志,蒋耀光,陈建明 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所胸心外科,重庆 400042)

提 要:目的 研究人非小细胞肺癌中p73基因的mRNA表达状况,并探讨其表达水平与肿瘤各项临床病理指标间的相关性。方法 应用半定量RT-PCR方法检测人非小细胞肺癌组织、相应癌旁肺组织及远癌肺组织中p73的mRNA表达。结果 p73基因的表达水平及表达阳性率在肺癌组织中为87.5%(28/32)明显高于相应的癌旁肺组织和远癌肺组织($P<0.01$);不同临床病理学类型、分化程度及TNM分期的肺癌组织间p73mRNA的表达差异无显著性($P>0.05$)。结论 p73基因在人非小细胞肺癌组织中的表达显著上调。

关键词:肺肿瘤;p73基因;基因表达;RT-PCR
中图法分类号:R394.3;R734.2 文献标识码:A

Expression of p73 gene in human non-small cell lung cancer *in vitro*

HE Yong, LI Zhi-ping, FAN Shi-zhi, JIANG Yao-guang, CHEN Jian-ming (Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract **Objective** To study the expression of p73 in human non-small cell lung cancer (NSCLC) and the relationship between p73 expression and clinico-pathological parameters. **Methods** Expression of p73 gene was detected by RT-PCR in 32 human NSCLC tissues, tissues adjacent to cancer and non-cancer lung tissues. **Results** p73 gene expression up-regulated substantially and detected in 87.5%(28/32) of human NSCLC tissues while expressed at low level in tissues adjacent to cancer and non-cancer lung tissues. **Conclusion** Marked up-regulation of p73 gene expression is found in human NSCLC.

Key words lung neoplasm; p73 gene; gene expression; RT-PCR

p73是近来发现的p53基因家族的新成员,其产物与P53蛋白具有非常相似的结构和功能,被认为是一个候选抑癌基因[1]。我们应用反转录多聚酶链反应技术(Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)检测了32例非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)癌组织、癌旁组织和远癌肺组织中p73 mRNA的表达水平,以探讨p73基因表达在人非小细胞肺癌中的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

全部标本取自本科和重庆医科大学附一院胸心外科1999年1至4月住院患者的手术切除肺组织,并经病理学检查确诊为非小细胞肺癌。32例患者中,男23例,女9例,年龄41~72岁,平均57.5岁;其中鳞癌17例,腺癌13例,腺鳞癌2例;病理分期采用1997年UICC肺癌国际分期标准,Ⅰ期10例,Ⅱ期13例,ⅢaⅢb期9例。全部标本均在手术时收集。一部分常规10%福尔马林固定;另一部分取材后立即放入液氮待检。肿瘤均在原发灶取材,癌旁组织取自相应肿块旁2 cm,远癌肺组织取自距肿块5 cm以上之肺组织,并经病理学检查未见癌细胞。

1.2 引物

参照Mai等[2]的序列合成1对p73基因的引物,由美国Mayo研究所Wanguo Liu教授合成后惠赠。引物序列:上游引物:5'-AACGCTGCCCCAACCACGAG-3';下游引物:5'-GCCG-GTTCATGCCCCCTACA-3'。PCR产物片段为231 bp。为保证逆转录效率和确定cDNA的完整性,将β-actin做为参照。β-actin引物购自英国Stratagene公司,PCR产物片段为661 bp。

1.3 实验方法

先提取组织中的总RNA,按Tripure分离试剂盒说明书操作,并用紫外分光光度计定量,吸光度$A_{260/280}$比值均在1.80以上;行1%琼脂糖甲醛变性凝胶电泳,可见有28S、18S两条清晰的rRNA电泳条带。用AMV-RTase和Oligo(dT)15引物将总RNA反转录成cDNA。取4 μl反转录cDNA作PCR扩增,反应体系为20 μl,含10× PCR buffer 2 μl,Mg^{2+} 2 mmol/L,dNTP各200 μmol/L,Taq DNA聚合酶0.5 U,引物各0.3 μmol/L。按以下参数在PCR扩增仪(Perkin-Elmer公司9600型)上进行。p73反应条件:95 ℃变性60 s,60 ℃退火60 s,72 ℃延伸90 s,经33个循环周期后,产物经6%琼脂糖凝胶(含0.5 mg/L溴化乙锭)电泳,紫外灯下观察结果,照相。以PCR-Marker为标准,在231 bp位置出现条带为p73表达阳性。β-actin反应条件:94 ℃变性70 s,60 ℃退火70 s,72 ℃延伸115 s,经35个循环周期后,1.5%琼脂糖凝胶电泳,在661 bp位置出现条带为β-actin表达阳性。结果判断[3]:阴性结果只有661 bp位置的β-actin内标带出现,阳性结果除内标带外尚有p73基因231 bp的阳性带。将底片置

基金项目:重庆市应用基础基金资助项目(99-5658)
作者简介:何 勇(1972-),男,贵州省遵义市人,博士研究生,医师,主要从事p53家族基因在肺癌中的表达方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68757241
收稿日期:2000-09-19;修回日期:2000-12-08

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

密度扫描仪下分析, 以两条带的积分吸光度比值反映 p73 基因的相对表达。根据 p73/β-actin 大小判断 p73 表达水平高低, 即 p73/β-actin< 0.1 时为阴性, > 0.1 为阳性, 病变组织 p73/β-actin 大于对应正常肺组织为过量表达。

1.4　统计学处理

计数资料采用 χ^2 检验。

2　结果

RT-PCR 扩增结果见图 1。结果表明, p73 基因在 32 例肺癌组织中 28 例表达阳性, 癌旁组织中 5 例表达阳性, 远癌肺组织 4 例表达阳性; 28 例表达阳性肺癌组织的 p73 表达水平均明显高于对应正常肺组织; 5 例表达阳性癌旁组织有 2 例 p73 表达水平明显高于对应正常肺组织。肺癌组织与对应癌旁肺组织及远癌肺组织之间 p73 mRNA 表达率的差异具有非常显著的意义($P< 0.01$), 而癌旁组织与对应远癌肺组织之间 p73 mRNA 表达的差异无显著的意义($P> 0.05$), 见表 1。肺癌中 p73 的转录表达明显比癌旁肺组织和远癌肺组织更高, 癌旁组织虽发现有 2 例过量表达, 但与远癌肺组织间无统计学差异, 而且 2 例过表达不排除癌旁组织距肿瘤近取材受污染或存在普通病检未发现的肿瘤细胞浸润。

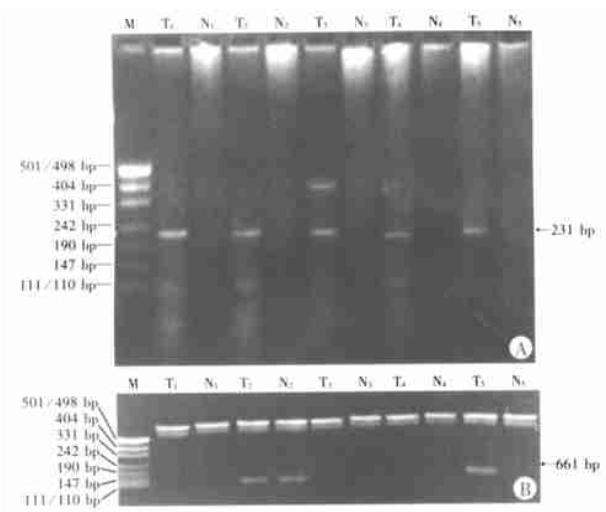


图 1　RT-PCR 分析结果

Fig 1　Results of RT-PCR analysis

A: 6% agarose gel electrophoresis analysis of p73 expression in different lung tissues; B: 1.5% agarose gel electrophoresis analysis of β-actin expression in different lung tissues; M: Maker; T: Lung cancer tissues; N: Non-cancer lung tissues

表 1　不同肺组织中 **p73** 表达的比较

Tab 1　Comparison of p73' expression in different kinds of pulmonary tissues

Group	*n*	Positive	Overexpression	*P*
Lung cancer tissues	32	28(87.5%)	28	
Tissues adjacent to cancer	32	5(15.6%)	2	< 0.01
Normal lung tissues	32	4(12.5%)	—	

不同临床 TNM 分期、组织学类型、细胞分化程度的肺癌组织中 p73mRNA 的表达差异无显著性的意义($P> 0.05$), 见表 2。

表 2　人非小细胞肺癌 **p73 mRNA** 表达水平与临床病理特征的关系

Tab 2　Relation between expression of p73 and clinical pathological characteristics of NSCLC

Group	*n*	Positive	Overexpression	*P*
TNM stage				
Ⅰ	10	9(90.0%)	9	
Ⅱ	13	11(84.6%)	11	> 0.05
Ⅲ	9	8(88.9%)	8	
Differentiation				
Poor	10	9(90.0%)	9	
Moderate	14	12(85.7%)	12	> 0.05
Well	8	7(87.5%)	7	
Histology				
Squamous cell carcinoma	17	14(82.4%)	14	> 0.05
Adenocarcinoma	13	12(92.3%)	12	

3　讨论

p53 基因是在人类肿瘤中发生变异频率高的基因之一, 作为经典的抑癌基因, 具有"基因组卫士"的作用, 能通过调控 $p21^{Waf\text{-}1}$ 等靶基因而引起细胞周期停滞及细胞凋亡。p53 基因在大约 50%的 NSCLC 和 70%的 SCLC 中发生突变, 与肺癌的发生、发展关系密切。1997 年, Kaghad 等[1] 偶然发现了 p73 基因, 因与 p53 基因在结构和功能上具有高度的同源性, 被认为是 p53 基因家族的新成员。进一步的研究发现 p73 定位于 1 号染色体短臂(1p36.33)。该区在多种人类肿瘤如神经母细胞瘤、结肠癌、恶性黑色素瘤、肝细胞癌、乳癌中发生缺失的频率均非常高, 而且近年研究提示该区至少隐藏了两个甚至更多个不同的抑癌基因[4], 由于 p73 基因极为特殊的定位, 使研究者认为 p73 基因是该区一个极具希望的候选抑癌基因。抑癌基因在肿瘤中的表达通常应该是下调的, 因此肿瘤中表达下调基因的分离成为当前筛选候选抑癌基因的一种重要手段。p73 基因在人类各种肿瘤中的表达成为研究热点。

研究发现在神经母细胞瘤、脑膜瘤和前列腺癌[5] 中 p73mRNA 的表达并不升高, 而在大肠癌、乳腺癌和膀胱癌[6] 中 p73mRNA 的过量表达却十分显著。Senoo[7] 认为, 在不同肿瘤中明显的表达差异提示 p73 的作用或许具有组织特异性。我们应用 RT-PCR 方法分析, 发现与癌旁肺组织和远癌肺组织相比较, p73 基因在 87.5% (28/32)的肺癌组织中表达显著上调。这显示, p73 基因表达上调是非小细胞肺癌发生、发展过程中的一个频发事件。许多学者的研究表明, 在已检测的如肺癌、乳腺癌、神经母细胞瘤、前列腺癌及肝癌[8] 等人类肿瘤组织和细胞株中均未发现 p73 基因的突变, 据此我们推测, p73 基因可能通过表达上调参与肺癌的发生和(或)发展, 并非以传统抑癌基因的方式发挥作用。肿瘤中 p73 基因表达上调的机制尚不明确, 可能与其家族基因 p53 的突变和失活有关。Tannapfel 对肝胆管细胞癌的研究发现 p73 的表达与突变型 p53 高度相关, 并认为 p73 的过表达可能补偿野生型 p53 突变所丧失的功能[9]。Herath 等[10] 对肝癌中 p73 功能的研究也认为肿瘤中 p73 的过表达与 p53 的失活明显相关, p73 的过表达或许是

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

对 p53 功能丧失的一种补偿。本研究表明 p73 的表达与临床病理学特征无显著的关系，因此可以推测，或许对于正常组织来说 p73 基因是一种肿瘤防御或应激基因，一旦组织发生癌变就将触发 p73 基因应激性地增强表达，执行其防御功能，这有利于解释 p73 的表达特点与其功能间的关系。

参考文献：

[1] 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 cancers[J]. Cell, 1997, 90(4): 809—819.

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

[3] Broxterman H J, Lankelma J, Pinedo H M. How to probe clinical tumour samples for P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein[J]. Eur J Cancer, 1996, 32A(6): 1 024—1 033.

[4] Thompson F H, Taetle R, Trent J M, *et al*. Band 1p36 abnormalities and t(1, 17) in ovarian carcinoma[J]. Cancer Genet Cytogenet, 1997, 96(1): 106—110.

[5] 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.

[6] Yokomizo A, Mai M, Tindall D J, *et al*. Overexpression of the wild type p73 gene in human bladder cancer[J]. Oncogene, 1999, 18(8): 1 629—1 633.

[7] Senoo M, Seki N, Ohira M, *et al*. A second p53-related protein, p73L, with high homology to p73[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 248(3): 603—607.

[8] Ichimiya S, Nimura Y, Kageyama H, *et al*. p73 at chromosome 1p36.3 is lost in advanced stage neuroblastoma but its mutation is infrequent[J]. Oncogene, 1999, 18(4): 1 061—1 066.

[9] Tannapfel A, Wasner M, Krause K, *et al*. Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(13): 1 154—1 158.

[10] Herath N I, Kew M C, Whitehall V L, *et al*. p73 is up-regulated in a subset of hepatocellular carcinomas[J]. Hepatology, 2000, 31(3): 601—605.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)05-0538-01

胃复安中毒致儿童锥体外系反应 22 例报告

Report of 22 cases of extrapyramidal syndrome due to metoclopramide intoxication in children

龙 华 （重庆市涪陵中心医院儿科，重庆 408000）

我科从 1995～2000 年共收治 22 例基层医院转来的医源性胃复安中毒，并出现锥体外系反应的儿童，经及时处理后全部痊愈。现报告如下。

1 临床资料

患儿男 9 例，女 13 例；年龄 1 岁 4 例，1～3 岁 12 例，3～11 岁 6 例，原发疾病均为上呼吸道感染胃肠炎所出现的呕吐。在当地医院或个体行医点就诊，给予胃复安止吐。其中采用口服给药 7 例，肌注 15 例，剂量 0.5 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$，18 例，0.5 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$，4 例，给药次数 1 次 12 例，2 次 8 例，症状出现时间在肌注后 0.5～1 h，口服后 2～12 h。

临床表现：胃复安中毒引起的锥体外系反应，阵发性双眼凝视 18 例，颈项强直 17 例，阵发性斜颈 4 例，头后倾 3 例，口角歪斜 2 例，发音困难 2 例，视物模糊 1 例，发作时间神志清楚，间歇期如正常儿童，其中 5 例作腰穿检查，其脑脊液压力、生化及常规均正常。

治疗与转归：来院确诊后，立即停用胃复安，给予输液加强药物的排泄，东莨菪碱以降低其药理作用，必要时用安定或鲁米钠对症处理，一般在用药后 2～12 h 症状消失。

2 讨论

胃复安作用延髓催吐化学感受器，阻断多巴胺受体而发挥止吐作用。锥体外系功能由多巴胺和乙酰胆碱相互协调来维持，胃复安在体内能使多巴胺受体受到影响，体内的胆碱能受体相对亢进而出现锥体外系反应，本组胃复安中毒均为医源性，临床上用药剂量过大，甚至正常剂量也可发生锥体外系反应[1]，这可能与小儿神经系统功能发育不完善、个体差异以及机体敏感性有关[2]，因此对于小儿止吐最好不要首选胃复安，特别是婴儿幼儿更应慎用，若需用此药时，剂量应按小儿的体重计算口服剂量一般为 0.2～0.3 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$，分 3 次服，肌注为 0.3～0.5 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$，一些基层医院的医生常用此药止吐，且绝大多数非儿科专科医生，给儿童治疗时，用药未按体重计算而是自己估计着用，往往是剂量过大，以致于出现锥体外系反应。应引起广大医务工作者，特别是基层医院的医务工作者的足够重视，另外，此病一旦确诊，应立即停药，轻者给予对症处理，症状可在 2～12 h 内消失，重者可用安坦等抗胆碱能药对抗，预后良好。治疗时不能用吩噻嗪类药物如氯丙嗪、异丙嗪，否则会加重其毒性，而且也不应与东莨菪碱类药物合用，否则会降低疗效。

关键词：胃复安；锥体外系
中图法分类号：R725.954；R975.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王玉凤. 胃复安与锥体外系综合征[J]. 中国农村医学, 1998, 26(8): 56.

[2] 陈国元. 胃复安致小儿急性肌张力不全 17 例[J]. 四川医学, 1999, 20(4): 419.

（编辑 张大春）

作者简介：龙 华(1963－)，女，重庆市人，主治医师。电话：(023)72228137
收稿日期：2001-01-20；修回日期：2001-04-08

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