DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.046
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

文章编号:1000-5404(2001)03-0349-03

论著

大肠癌中抑癌基因 p33/ING1 mRNA 的表达及意义

王自强,蔡志民,余佩武 (第三军医大学附属西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 了解p33/ING1表达与大肠癌临床病理特征的关系及其可能作用机制。方法 采用逆转录PCR检测52例散发性大肠癌癌组织及正常大肠粘膜中ING1的表达。结果 在大肠癌组织中p33/ING1 mRNA表达较正常粘膜明显减弱(30/52,57.7%),p33/ING1的低表达与肿瘤的Duke's分期及淋巴结转移显著相关。结论 ING1 mRNA表达的减弱在大肠癌发展过程中起重要调节作用。

关键词:结直肠癌;抑癌基因;ING1;RT-PCR
中图法分类号:R394.2;R735.34 文献标识码:A

Expression of tumor suppressor gene-p33/ING1 in colorectal carcinoma

WANG Zi-qiang, CAI Zhi-min, YU Pei-wu (Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the correlation between the expression of p33/ING1 and the clinicopathological features in patients with colorectal cancer, and to understand the possible mechanism of p33/ING1 in the oncogenesis of colorectal neoplasms. Methods All samples of normal mucosa and cancer tissues from 52 patients with colorectal cancer were detected for their expression levels of p33/ING1 by RT-PCR. Results A significant decrease in p33/ING1 mRNA expression was found in 30 out of 52(57.7%) colorectal cancer tissues. The results also showed that repression of p33/ING1 expression markedly related to both the Duke's stage and metastasis. Conclusion Down-regulation of p33/ING1 may play an important role in the oncogenesis and development of colorectal carcinoma.

Key words: colorectal neoplasms; tumor suppressor genes; ING1; RT-PCR

p33/ING1(Inhibitor of growth 1)是新发现的一个抑癌基因。它在细胞周期的调控与凋亡调节中发挥重要作用。p33过渡表达导致与p53类似的凋亡增强及细胞G_1期静息,并发现p33对p53功能的发挥起明显抑制作用。因此了解p33在各种肿瘤中的表达情况,将不仅有助于理解肿瘤发生的基因机制,更有利于探索恰当的肿瘤基因治疗方案[1]。目前国内外均未见关于ING1在大肠癌中的研究报道。本研究采用逆转录PCR(以下简称RT-PCR)检测癌组织及正常大肠粘膜中ING1的表达,以探讨ING1与大肠癌临床病理特征的关系及其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源

取自1998年10月至1999年10月在我院住院手术切除的大肠癌52例,其中男性29例,女性23例,平均年龄50.28岁,术前未做任何治疗。新鲜标本于手术中分别取自距肿瘤边缘10 cm正常粘膜及肿瘤组织。取材后迅速置液氮冻存备检。52例标本均经病理证实为大肠癌。

1.2 引物

ING1基因序列缘自GeneBank AF044076;人β-actin作为内参。根据引物设计原则,通过计算机软件(Primer premier 4.0)辅助设计(引物序列及扩增长度),见表1。

1.3 总RNA提取及逆转录

100 mg组织经匀浆后,采用Roche公司Tripure RNA提取试剂按说明书步骤提取总RNA。并用紫外/可见光分光光度计(美国Beckman)测定其含量及A_{260}/A_{280}比值,所有标本A_{260}/A_{280}比值均在1.75~1.95间。取2 μg总RNA采用逆转录酶Mu-MLV按20 μl体系37 ℃逆转录1 h。

表1 引物序列及理论扩增长度

Tab 1 Sequence of primers and theoretical size of products

Gene	Sequence	Length
ING1	Sense: 5' GAA GCG GCG GAT GCT GCA CT 3' Anti-S: 5' ACG CAC GAG AAG TGG AAC CA 3'	525 bp
β-actin	Sense: 5' GAG CTA CGA GCT GCC TGA G 3' Anti-S: 5' GCA TTT GCG GTG GAC GAT 3'	409 bp

1.4 PCR最适循环参数的测定

所用Taq酶购自上海生物工程公司。总反应体积50 μl,PCR仪为PTC-200(美国),94 ℃、1 min→60 ℃、45 s→72 ℃、45 s×20/24/28/32/36/40 cycles→最后72 ℃延长8 min。取ING1产物10 μl/β-actin产物5 μl,2%琼脂糖电泳,EB染色,见图1。按文献[2]方法测定最适合循环参数。ING1最适循环为36 cycles,β-actin为32 cycles。

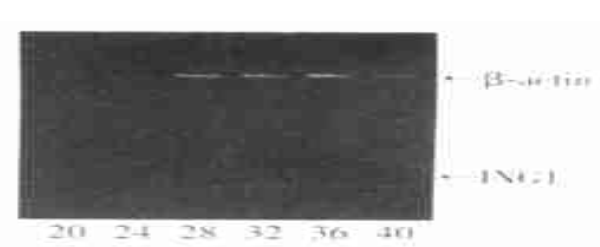


图1 ING1、β-actin最适循环参数检测

Fig 1 Detection of the most appropriate cycles for ING1 and β-actin

1.5 PCR及产物鉴定、半定量分析

反应条件同前,按最适循环进行反应。2%琼脂糖电泳,EB染色,以PCR marker测定分子量,见图2。采用凝胶图像分析仪

作者简介:王自强(1972—),男,四川省自贡市人,硕士研究生,主治医师,主要从事结直肠癌、抑癌基因方面的研究。电话:(023)68754000-73075
收稿日期:2000-06-30;修回日期:2000-12-15

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

(geldoctor2000, Bio-Rad)分别测定β-actin 及 ING1 条带的 V 值(Volume=平均光密度值×条带面积)。ING1 表达强度 Rv=$V_{ING1}/V_{\beta\text{-actin}}$。

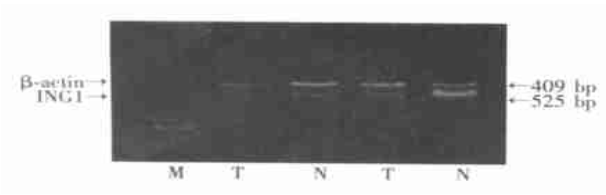


图 2 大肠癌中 **ING1 mRNA** 的表达

Fig 2 Expression of ING1 mRNA in patients with colorectal cancer

M: Marker; T: Tumor; N: Normal

1.6 统计学分析

表达强度用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPLM 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 ING1 mRNA 的表达

本组 52 例标本的所有正常肠粘膜中均能检测出 ING1 mRNA 的表达,正常粘膜中 ING1 表达强度 Rv 为 1.166±0.245,结肠肿瘤标本中表达强度为 0.626±0.382,与正常粘膜对比显著减弱($P<0.001$)。30 例病人(57.7%)ING1 表达明显低于正常,其中 24(80%)例病人 Duke's 分期为 C/D 期。

2.2 ING1 表达与大肠癌临床病理特征的关系

ING1 mRNA 表达的减低与患者的性别、年龄、肿瘤分化程度、肿瘤部位及浸润深度无关,与肿瘤的 Duke's 分期及淋巴结转移显著相关($P<0.01$),见表 2。肿瘤分期越晚,并发淋巴结转移,肿瘤组织中 ING1 表达越低。

表 2 **ING1 mRNA** 表达与大肠癌临床病理特征的关系

Tab 2 Expression of ING1 mRNA and its correlation to the clinopathological features in patients with colorectal cancer

Items	*n*	Relative intensity (Rv)
Gender		
Male	29	0.744±0.384
Female	23	0.589±0.394
Age		
≤45	21	0.834±0.425
>45	31	0.585±0.256
Location of tumor		
Colon	26	0.624±0.347
Rectum	26	0.730±0.435
Differentiation		
High	10	0.786±0.390
Medium	30	0.690±0.452
Low△	12	0.591±0.188
Tumor penetration		
Mucosa	7	0.597±0.411
Muscularis	20	0.673±0.427
Serosa and extra	25	0.672±0.376
Duke's Stage		
A	7	1.114±0.116
B	16	0.763±0.287
C	21	0.516±0.394 **
D	8	0.354±0.237 **
Lymphatic metastases		
Positive	26	0.393±0.243 **
Negetive	26	0.960±0.299

△: Cases of mucinous adenocarcinoma were included; **: $P<0.01$

3 讨论

p33/ING1 定位于 13q33-34,通过不同的启动子,至少转录 3 种不同分子量的蛋白:P33、P47、P24。当用反义 RNA 抑制 ING1 表达时,可促进乳腺上皮细胞的悬浮生长及增加 NIH 3T3 细胞的集落形成、延长二倍体成纤维细胞的生存[1,2]。外源性表达 ING1 将导致细胞的 G_1 期静息及促进多种细胞发生凋亡[3]。业已证明 ING1 参与了细胞生长的负性调节、细胞衰老控制及凋亡。p33/ING1 与 p53 在生物学效应上相似并相互制约。两者单一存在时均不能发挥生长抑制作用。p53 介导的 p21/Waf1 的激活也必须依赖 ING1 的表达[1]。新近的研究表明,在胃癌及乳腺癌中亦存在 ING1 表达的减弱,并且在 ING1 减弱的病例中大多数存在野生型 p53 的表达[4,5],说明在肿瘤发生发展过程中 ING1 的低表达亦是 p53 失活的机制之一。

ING1 mRNA 在正常大肠粘膜中广泛表达,我们最近的研究结果表明 p33/ING1 表达于大肠粘膜上皮细胞核,在肠腺顶部表达明显强于肠隐窝,这与 ING1 的细胞衰老控制作用相符合。我们应用 RT-PCR 方法半定量检测大肠癌组织中 ING1 mRNA 的表达水平,并与正常粘膜表达水平对比,发现 52 例中 30 例表达明显低于正常,其中 24 例病人伴有局部淋巴结或远处转移。分析 ING1 mRNA 表达与临床病理特征关系发现患者分期越晚,伴有转移的原发肿瘤中,ING1 的表达越低。说明 ING1 mRNA 表达的减弱在大肠癌发展过程中起重要调节作用。同时提示检测 ING1 mRNA 表达可能有助于临床对大肠癌远处转移的判断。同时,我们通过对 PCR 产物的单链多态性分析(SSCP),还发现在 52 例大肠癌中仅有 1 例发现有突变。说明 p33/ING1 在大肠癌中并不象 p53 那样通过突变失活,而主要是表达水平的降低。

最近的研究还揭示在小鼠中亦存在两种形式的 ING1,p37 和 p24,其中 p37/ING1 能与 p53 免疫共沉淀,从而抑制 p53 的功能发挥[6]。在人的不同 ING1 亚型中是否存在负性功能的 ING1 蛋白及其在肿瘤发生发展中的作用,尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Garkavtsev I, Grigorian I A, Ossovskaya V S, *et al*. The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control[J]. Nature, 1998, 391(6 664): 295-298.

[2] Garkavtsev I, Riabowol K. Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the p33ING1 candidate tumor suppressor [J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(4): 2 014-2 019.

[3] Helbing C C, Veillette C, Riabowol K, *et al*. A novel candidate tumor suppressor, ING1, is involved in the regulation of apoptosis[J]. Cancer

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

Res, 1997, 57(7): 1 255—1 258.
[4] Toyama T, Iwase H, Watson P, *et al*. Suppression of ING1 expression in sporadic breast cancer[J]. Oncogene, 1999, 18(37): 5 187—5 193.
[5] Oki E, Maehara Y, Tokunaga E, *et al*. Reduced expression of p33(ING1) and the relationship with p53 expression in human gastric cancer[J]. Cancer Lett, 1999, 147(1-2): 157—162.
[6] Zeremski M, Hill J E, Kwek S S, *et al*. Structure and regulation of the mouse ing1 gene. Three alternative transcripts encode two phd finger proteins that have opposite effects on p53 function[J]. J Biol Chem, 1999, 274(45): 32 172—32 181.

(编辑 汪勤俭)

文章编号: 1000-5404(2001)03-0351-01

经验与短篇

3 784 份儿童血培养结果分析

Analyses on the results of 3 784 blood culture in children

何惠兰, 杨劳荣, 刘晓光, 张纪平 (武汉市儿童医院, 武汉 430016)

我院自 1997 年 6 月引进全自动 BacT/Alert 全自动血培养仪及 ATB 鉴定系统, 用于小儿败血症及严重感染的病原学诊断, 为临床提供了快速而正确的报告, 现介绍如下。

1 材料和方法

标本来源: 我院自 1997 年 6 月至 1998 年 9 月疑为败血症及严重感染的患儿, 于入院当日或次日清晨采集血标本, 血培养瓶为一次性全封闭瓶, 采血新生儿 0.5~1 ml, 幼儿 1~2 ml。

操作方法: 将培养瓶放入全自动细菌培养仪, 在恒温 35 ℃条件下, 培养瓶连续震荡(60 r/min), 每分钟检测 1 次(1 d 144 次), 其原理依据概率最大似然模型法, 如培养瓶生长的细菌绝对似然值与内存模型菌值大于或相等即为阳性, 报警通知鉴定人员, 检测人员将培养瓶取出转种血琼脂平板, 分离单个菌落, 再调正一定浓度的菌液, 经 ATB 系统鉴定出细菌种类。培养 5 d 后无细菌生长, 即可取出培养瓶, 按常规报告无细菌生长。

2 结果

送检血培养标本 3 784 份, 培养出阳性菌生长 450 份, 阳性率 11.89%, 阳性报告时间 92.2% 在 48 h 内。阳性标本多集中在新生儿内科(31.1%), 消化内科(17.1%)及呼吸内科(10.2%)。

阳性 450 株细菌中, 分布情况为: 革兰阳性球菌中以葡萄球菌居首位, (330 株占总阳性细菌为 73.3%), 该菌属共鉴定细菌 20 种, 次为微球菌及肠球菌属。

革兰阳性杆菌中有枯草杆菌及腊样芽胞菌。革兰阴性杆菌共 81 株, 以大肠埃希氏菌、肺炎克雷伯氏菌、伤寒沙门氏菌较多。3 184 份血标本中, 假阳性标本 31 份, 假阳性率 0.82%。

3 讨论

近 20 余年, 临床细菌学巨大进步, 特别是仪器的发展和应用, 使人类对于病原菌种类和数量的认识有所提高, 以前曾被认为不致病或条件致病的细菌, 今天成为病原菌及主要病原菌, 因此对临床血标本进行细菌学检测, 以便快速而 发现引起感染的病原菌, 从而对临床诊断和治疗提供依据是至关重要的。我院自 1997 年 6 月引进全自动 Bact/Alert 全自动血培养仪及 ATB 鉴定仪后, 使临床细菌检验室的工作质量有所提高: ①检验所需时间快(及时性), 全自动血培养仪阳性报告 92.2% 小于 48 h, 且检验结果准确(可靠性), 假阳性率低(0.82%)。②ATB 鉴定系统资料库丰富鉴定细菌种类多, 如葡萄球菌属鉴定出 20 种之多, 而我院在未引和该仪器前, 该菌属仅能鉴定出表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌及金黄色葡萄球菌 3 种[1]。本组血培养结果分析, 近年败血症感染菌中, 革兰氏阳性菌有上升趋势, 其中凝因酶阴性的葡萄球菌在增多, 而革兰氏阴性杆菌明显下降, 与国外报道的菌种变迁相一致[2]。阳性菌株多集中在新生儿内科、消化内科及呼吸内科。与新生儿期患儿及罹患消化道、呼吸道疾患儿免疫低下有关。本院血培养阳性率 11.89%, 低于其它医院[3], 已报道影响血培养的相关因素有血容量、抽血次数[4], 我院患儿在采集血标本前大多应用抗生素; 注入血标本血量较少是导致血培养阳性率不高的原因。另外, BacT/Alert 系统有假阴性出现, 我院对培养 5 d 无细菌生长的阴性瓶未再进行转种, 亦影响了血培养阳性率。

关键词: 血培养; 细菌; 鉴定系统
中图法分类号: R446.5 文献标识码: B

参考文献:

[1] 何惠兰, 刘晓光. 新生儿葡萄球菌菌血症病原菌分布及药物敏感试验[J]. 中华流行病学杂志, 1998, 19(5A): 485.
[2] 池康嘉. 肠球菌の高度药剂耐性[J]. 临床检查, 1996, 40: 443—445.
[3] 黄学清, 杜仲贵, 周富道. 第二医院 1993~1994 年度细菌培养情况分析[J]. 重庆医科大学学报, 1996, 2(11): 76.
[4] 周贵民, 张军民. 血培养方法研究进展[J]. 中华医院检验杂志, 1996, 19(6): 331.

(编辑 冯崇英)

作者简介: 何惠兰(1938—), 女, 湖北省武汉市人, 主任医师。电话: (027) 82433200
收稿日期: 2000-07-05; 修回日期: 2000-12-15

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