DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.06.006

胃粘膜肠化生组织中p53、APC、K-ras基因突变的研究*

王东旭** 房殿春 刘为纹 罗元辉 鲁 荣 (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆,400038

提 要 目的:探讨p53、APC及K-ras基因突变在不同类型肠化生癌变中的作用。方法:用PCR-SSCP及PCR-RFLP技术检测了47例肠化生组织中p53基因5-8外显子及APC基因15-6外显子、K-ras基因第12位点突变。结果:47例肠化生组织中p53突变14例,占29.8%,APC及K-ras基因突变各3例,分别占6.8%。肠化生中Ⅰ、Ⅱ型肠化33例,Ⅲ型肠化14例(其中3例与Ⅰ型肠化并存),Ⅲ型肠化中p53突变率为57.1%(8/14),显著高于Ⅰ、Ⅱ型肠化(18.2%,6/33, $P<0.05$),而APC, K-ras基因在Ⅲ型肠化中的突变率(均为14.3%)虽也高于Ⅰ、Ⅱ型肠化(均为3.0%),但统计学检验无显著意义($P>0.05$)。1例Ⅲ型肠化同时检出p53及K-ras突变。结论:不同类型肠化生其分子改变机制有所不同,p53基因与Ⅲ型肠化生的发生及癌变可能密切相关,并可能成为胃癌早期诊断的分子标志。

关键词 肠化生;突变;p53基因;APC基因;K-ras基因
中图法分类号 R394.2;R735.2

为明确p53、APC、K-ras基因突变在胃粘膜肠化生及其癌变中的作用,我们应用PCR-SSCP和PCR-RFLP技术对不同类型肠化生组织中上述基因改变进行了研究,以期为临床提供早期诊断及高危易感人群的筛选及监测的分子标志。

1 材料与方法

1.1 材料

45例中重度肠化生组织来自我院1988年至1997年间存档的福尔马林石蜡标本,15例新鲜肠化生标本取自手术患者。经病理检查,以上肠化生10例来自良性胃病病人,50例来自癌旁组织。每例标本经连续切片(新鲜标本行冰冻切片),其中厚4μm切片3张,分别行HE及AB/PAS、HID/AB染色,厚10μm切片15张用于DNA抽提。

1.2 方法

1.2.1 DNA抽提 参照Dr. Shiao[1]方法略有改动。依据粘液组化染色结果,肠化生分为Ⅰ、Ⅱ及Ⅲ型[2]。在HE切片上用Marker笔标出各型肠化生病变范围,然后将15张10μm厚切片常规脱蜡至水(新鲜标本不需此步)并风干,置于HE切片上,以经过消毒处理的微量注射器针头依次将每张切片上病变组织及正常组织分别刮入1.5 ml离心管中,以1% SDS及蛋白酶K消化2 d,饱和氯化钠抽提DNA,无水乙醇沉淀。

1.2.2 PCR扩增 选择7对引物,分别扩增p53基因5-8外显子,APC基因15-6外显子及K-ras基因,p53基因5对引物由美国NIH Dr. Shiao惠赠。APC、K-ras基因引物由中科院上海细胞所合成,引物情况见文献[1,3,4]。PCR反应总体积20 μl,其中模板DNA 10~100 ng,Tris HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, $MgCl_2$ 1.5 mmol/L, dNTP 0.125 mmol/L,引物10 pmol/L, Tag DNA多聚酶2.0 U,PCR反应条件依据不同引物而不同。取5μl扩增产物在1.5%~2%琼脂糖凝胶中电泳,以明确扩增成功无杂带。

1.2.3 SSCP分析 以扩增产物为模板分别扩增p53基因5-8外显子及APC基因15-6外显子,引物与上一轮相同。每次PCR反应体积为10μl,其中含10 ng DNA模板,20 pmol/L引物,1 U Tag DNA多聚酶,3.7×10^4 Bq ^{32}P,α dCTP, 0.1 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L Tris HCl,50 mmol/L KCl,反应条件同第一轮扩增,反应周期30个。取PCR产物5μl,加去离子水3μl,上样缓冲液(90%甲酰胺,0.05%二甲苯腈蓝,0.05%溴酚蓝)3μl。混合后100℃变性5 min,取出后迅速放入0℃冰水中以保持单链状态,然后在8%中性聚丙烯酰胺凝胶中电泳,为了提高检出率,采用不同电泳条件进行SSCP分析,电泳室温下进行,时间3~4 h不等。电泳结束后凝胶置80℃干燥1~2 h,然后放射自显影18~36 h。

1.2.4 RFLP分析 取K-ras基因扩增产物14μl加入9 U限制性内切酶Bst NI(6 U/VI)及相应buffer,60℃过夜消化,8%聚丙烯酰胺电泳,EB染色,紫外灯下观察,照相分析。

2 结果

2.1 肠化生组织中p53、APC及K-ras基因突变率

60例标本共有47例DNA抽提成功。其中石蜡32例,新鲜标本15例。共检出p53基因突变14例,占29.8%(14/47),其中Exon5A 3例,E5B6A 4例,E6B 3例,E7 4例,未见E8突变。APC基因15-6外显子突变3例占6.4%(3/47),K-ras 12位点突变3例占6.4%,见图1~4。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39470332

** 王东旭,男,36岁,主治医师,博士,现在解放军254医院消化内科 天津,300142

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

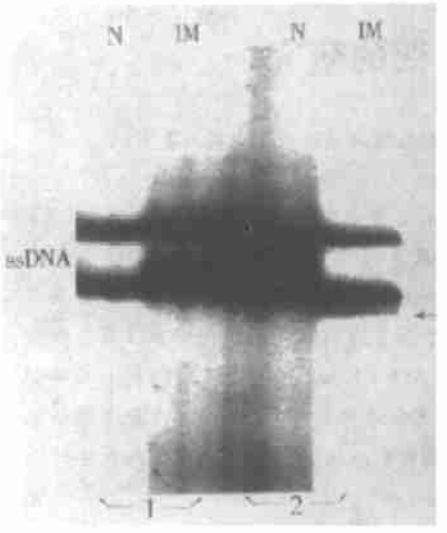


图1 p53基因E6B PCR-SSCP分析
ssDNA：单链DNA，箭头所指为异常移动条带(2号标本) N：正常组织 IM：肠化生组织

Fig 1 PCR-ssCP assay of p53 E6B gene
ssDNA: Single strand DNA, arrow: abnormal shift band (case 2) N: Normal tissue IM: Intestinal metaplasia tissue

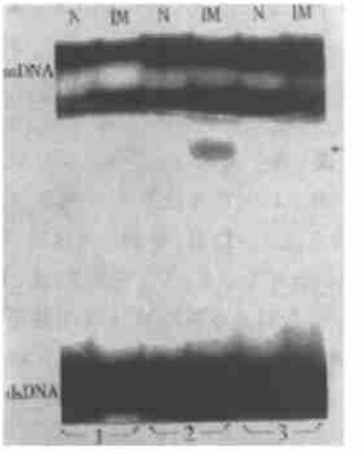


图2 p53基因E7 PCR-SSCP分析
ssDNA：单链DNA dsDNA：变性不完全的双链DNA，箭头所指为异常移动条带(2号标本) N：正常组织 IM：肠化生组织

Fig 2 PCR-ssCP assay of p53 E7 gene
ssDNA: Single strand DNA dsDNA: Double strand DNA, arrow: abnormal shift band (case 2) N: Normal tissue IM: Intestinal metaplasia tissue

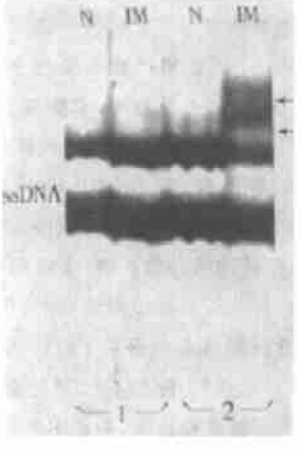


图3 APC基因15-6外显子SSCP分析
ssDNA：单链DNA，箭头所指为异常移动条带(2号标本) N：正常组织 IM：肠化生组织

Fig 3 PCR-ssCP assay of APC15-6 gene
ssDNA: Single strand DNA, arrow: abnormal shift band (case 2) N: Normal tissue IM: Intestinal metaplasia tissue



图4 K-ras基因第12密码子RFLP分析
M：Marker (PBR322＋Hae Ⅲ酶切) 2：扩增片段(157bp) 1，4：突变型(143bp，14bp) 3：野生型(114bp，24bp，14bp)

Fig 4 PCR-RFLP assay of codon 12 of K-ras gene
M: Marker 2: Amplification fragment (157bp) 1, 4: Mutation fragments (143bp, 14bp) 3: Wildness fragments (114bp, 24bp, 14bp)

2.2 不同类型肠化生与p53、APC、K-ras基因突变的关系

根据粘液组化分析，47例肠化中Ⅰ、Ⅱ型肠化33例，Ⅲ型肠化14例(均来自癌旁)。Ⅲ型肠化中p53突变率为57.1%(8/14)，Ⅰ、Ⅱ型肠化为18.2%(6/33)，两组相比有显著差异($P<0.05$)。APC、K-ras基因在Ⅲ型肠化中突变率均为14.3%，与Ⅰ、Ⅱ型肠化两者突变率相比(均为3.0%)无统计学意义。1例Ⅲ型肠化中同时检出p53及K-ras突变。经统计学分析，3者突变差异不显著($P>0.05$)。

2.3 癌旁肠化生与良性胃病肠化生中的基因突变

扩增成功的47例肠化中，癌旁肠化39例，良性胃病肠化8例，癌旁肠化中p53突变12例，APC及K-ras各3例。良性胃

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

病肠化生中 p53 突变 1 例，未见 APC 及 K-ras 突变。经统计学处理两组间 3 种基因突变差异不显著（$P>0.05$）。

3　讨论

胃癌的发生发展是个多阶段多步骤的渐进性过程。一般认为胃癌尤其肠型胃癌经历了从慢性浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠化生→异型增生→癌的演变过程。众多研究显示多基因改变的累积与这一演进过程密切相关，因而对癌前病变阶段尤其肠化生阶段中抑癌基因、癌基因改变的研究正成为新的研究热点。抑癌基因 p53 与肠化生关系研究已有报道[1,5]，本研究发现肠化组织中 p53 突变率为 29.8%，突变集中在 5-7外显子，这与国内外研究相近似[1,5]，提示 p53 基因 5-7 外显子异常在肠化生的演变中可能起重要作用。抑癌基因 APC 及癌基因 K-ras 突变与肠化关系研究目前未见报道，本研究首次证实肠化生组织中存在着 APC 基因 15 外显子及 K-ras12 位点突变，提示 APC 基因及 K-ras 基因在胃粘膜癌变的起始阶段可能起一定作用。

我们既往研究发现Ⅲ型肠化（即不全结肠型）与Ⅰ、Ⅱ型肠化在分化成熟程度、粘液性状、肿瘤相关抗原表达、细胞分裂增殖功能和 DNA 含量方面均有明显差别[2]，提示该型肠化生具有与胃癌相类似的生物学特性。本文进一步对不同类型肠化生组织中 p53、APC 和 K-ras 基因点突变进行研究，首次发现Ⅲ型肠化生 p53 基因突变率显著高于Ⅰ、Ⅱ型肠化（$P<0.05$），APC、K-ras 在Ⅲ型肠化中突变率也高于Ⅰ、Ⅱ型肠化，但统计学上无显著意义。此外还有 1 例Ⅲ型肠化同时检出 p53、K-ras 基因突变。以上结果提示这些基因改变在肠化生中并非随机分布，可能与Ⅲ型肠化生密切相关，Ⅲ型肠化生较之Ⅰ、Ⅱ型肠化生具有更显著基因不稳定性。p53 与 K-ras 突变在Ⅲ型肠化生中同时检出，提示Ⅲ型肠化生可能存在基因改变累积现象，因而可能更具癌变倾向。因此Ⅲ型肠化生应属于重要癌前病变。而 p53 基因可能是Ⅲ型肠化生易感基因，检测 p53 基因异常将可能成为胃癌早期诊断重要指标。

比较癌旁肠化与良性胃病肠化基因突变发现，三种基因突变主要发生在癌旁肠化，仅有 1 例良性胃病肠化出现 p53 基因突变，尽管两组间差别无统计学意义，亦可能提示癌旁肠化可能更易发生基因改变，这与我们以往的研究相吻合[2]，进一步开展大样本肠化生基因改变的研究，可能会得出明确结论。

分析三种基因突变在肠化生中相互关系发现，三者并无显著相关性，提示三种基因可能通过各自不同途径参与了肠化生的演变。

既往对肠化患者胃镜随访证实Ⅲ型肠化容易癌变[6]，本文又发现Ⅲ型肠化中一部分已出现与肠型胃癌相近似的基因改变模式，因此加强对Ⅲ型肠化定期随访监测将可能有助于胃癌的早期发现。

参考文献

1 Shiao Y H, Rugge M, Correa, *et al*. p53 alteration in gastric precancerous lesions. Am J Pathol, 1994, 144(3): 511

2 房殿春，刘为纹. 胃粘膜肠上皮化生的分型及其与胃癌发生的关系. 第三军医大学学报，1990，12(3)：169

3 Tamura G, Maesawa C, Suzuki Y, *et al*. Mutations of APC gene occur during early stages of gastric adenoma development. Cancer Res, 1994, 64(3): 1149

4 房殿春，罗元辉，鲁　荣，等. 胃癌组织 K-ras 基因点突变研究. 新消化病杂志，1996，4(2)：80

5 郝　莹，张锦坤，易粹琼，等. p53、APC 基因缺失与胃癌关系的研究. 中华消化内镜杂志，1996，13(3)：330

6 房殿春，刘为纹. 胃粘膜不同类型肠化与胃癌 112 例临床内镜随访结果. 中华内科杂志，1990，29(8)：464

（收稿：1998-09-15；修回：1999-01-26）

（编辑　仇玉福）

Mutation of p53, APC and K-ras genes in different types of intestinal metaplasia of gastric mucosa*

Wang Dongxu, Fang Dianchun, Liu Weiwen, Luo Yuanhui, Lu Rong (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract　Objective: To investigate the role of the mutation of p53, APC and K-ras genes in different types of intestinal metaplasia (IM) of gastric mucosa. Methods: Exons 5 to 8 of p53, exon 15-6 of APC and codon 12 of K-ras were examined for mutation with PCR-SSCP and PCR-RFLP in 47 cases of IM. Results:

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39470332

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

Mutation of p53, APC and K-ras genes was found in 29.8% (14/47), 6.4%(3/47) and 6.4%(3/47) respectively. IM was classified into type Ⅰ, type Ⅱ (33 cases) and type Ⅲ (14 cases). The mutation rate of p53 gene was significantly higher in type Ⅲ IM(8/14) than in type Ⅰ and type Ⅱ (6/33)($P<0.05$). The mutation rate of APC and K-ras was also higher in type Ⅲ IM (2/14) than in type Ⅰ and type Ⅱ IM(1/33) but there was no statistical significance ($P>0.05$). In one case of type Ⅲ IM, mutation of p53 coexisted with mutation of K-ras. Conclusion: The mechanism of molecular changes in 3 types of IM are different. The mutation of p53 may be closely related to carcinogenic degeneration and can possible be a marker of early diagnosis of gastric carcinoma.

Key words intestinal metaplasia; mutation; p53; APC, K-ras

药敏试验管理系统的建立及应用

Establishment and application of administrative system for bacterial susceptibility test

顾长国* 陈 蔷** 王文祖 子建文 谢晓峰 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第一研究室) 重庆, 400042

为了合理筛选抗生素,避免滥用,我们建立了药敏试验计算机管理系统。

1 材料和方法

系统的建立和运行:486计算机,Windows 3.2平台,C语言。该系统设有患者姓名、科室、所患疾病、标本性质、培养结果和药敏结果等项目。可设定密码,对数据即时查询、修改和筛选。用图表和文本输出结果。本系统可以对任何一种细菌进行耐药性追踪及耐药率分析。

本文对1993年1月至1997年6月10 008例葡萄球菌培养阳性病例进行耐药性追踪,1997年1月至1997年7月877例葡萄球菌培养阳性病例进行耐药率分析。所有病例住院期间行血培养或伤口分泌物培养,结果均以云南省卫生质控中心组织发放的质控标准为依据。

2 结果

2.1 葡萄球菌对氨苄青霉素的耐药性追踪

1993年1月至1997年6月,每半年为单位。10 008例对氨苄青霉素的耐药率分别为:14%、23%、26%、30%、39%、40%、48%、54%、62%。随着时间的推移,其耐药率逐渐升高。

2.2 葡萄球菌对6种抗生素的耐药率分析

877例对菌必治、丁胺卡那、复方新诺明、先锋V的耐药率较低,分别为7%、9%、18%、25%;对氨苄青霉素、红霉素的耐药率高,分别为62%、45%。

3 讨论

细菌对抗生素的耐药性形成是一个逐渐适应的过程,因此,对过去和目前某些抗生素的耐药情况进行分析总结,筛选耐药率较低的抗生素,可协助临床医生合理选择药品[1]。抗生素是重要的抗感染药物,但滥用会引起细菌的耐药性,使感染的控制更加困难。耐药菌株多不易治疗,而且许多病原菌的耐药性存在着地区差异[2]。因此,每个医院都应当有药敏分析和反馈制度。虽然应当根据具体病例的药敏结果选药,但"经验性用药"往往在药敏结果出来前已经开始,多数是根据书本、文献或个人的经验,盲目性较大。而实验室定期分析和反馈药敏结果,能反映感染病原菌的总体耐药概率和发展趋势。既可降低药物的盲目选择,又可防止耐药菌的进一步发展。应用本系统定期分析药敏结果,及时反馈,可促进合理用药,防止耐药菌株的产生和发展。

关键词 药敏试验;药品管理

中图法分类号 R969.3

参考文献

1 Rodloff A C. Aspects of calculated and controlled antibiotics therapy. Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd, 1997,114(9):953

2 Salmon F. Antimicrobial susceptibility testing in progress. Am Vet Med Assoc,1997,210(2):145

(收稿:1998-09-23;修回:1998-12-19)

(编辑 冯崇英)

* 顾长国,男,28岁,实习研究员,学士

** 第六研究室

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