DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.05.018

膀胱移行细胞癌 ras p53基因点突变检测及其临床病理学意义

于冬梅 柳凤轩 梁智勇 陈意生* 罗元辉** 鲁 荣** (第三军医大学附属西南医院病理科) 重庆, 630038

提 要 为探讨基因的改变在膀胱移行细胞癌发生过程中的意义,应用聚合酶链反应—— 限制性片段长度多肽性(PCR-RFLP)法,检测50例膀胱移行细胞癌 ras p53基因突变。结果显示:正常膀胱粘膜未检测到基因突变,膀胱移行细胞癌 Ha-ras基因第12位密码子突变为16例(32%),p53基因突变为9例(18%),均系248位点突变。Ha-ras-12位点突变率随病理分级增高而增高,与膀胱移行细胞癌分级显著相关($P < 0.05$)。ras基因、p53基因突变患者死亡率高于无突变患者。4例膀胱移行细胞癌存在 ras 基因及 p53基因共同突变。

关键词 移行细胞癌;膀胱肿瘤;癌基因;抑癌基因;预后

中图法分类号 R737.14

目前一些研究表明,ras基因激活及 p53基因失活与多种肿瘤的发生、发展有密切关系,点突变是 ras基因激活及 p53抑癌基因失活的主要方式。我们采用 PCR-RFLP法检测膀胱移行细胞癌 ras基因、p53基因点突变,旨在探讨基因改变在膀胱移行细胞癌发生过程中的意义,并为其临床诊断及判断预后提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

取自我校三所附属医院 1979年~ 1994年间,有随访资料的手术切除膀胱移行细胞癌标本共50例,其中 10% 福尔马林固定、石蜡包埋组织 43例,新鲜组织 7例 (液氮贮存)。取切除标本残端正常粘膜 10例作为对照 (石蜡包埋)。

ras基因引物由北京大学生命科学中心合成,p53基因引物由中科院上海细胞生物研究所合成。引物序列如下:

HR 5′-CAGGGCCCTCCTTGGCAGG-3′
5′-GTCGTATTCGTCCACAAAATGG-3′
p53 5′-CCCAAGGCGCACTGACCTCA-3′
5′-GCTCCTGACCTGGAGTCTTC-3′

蛋白酶 K Taq DNA多聚酶、4种脱氧核苷酸、DNA分子量标记物、限制性内切酶 MSPI HaeIII等,均购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 提取 DNA 将石蜡包埋组织连续切成 5μm~ 10μm 厚蜡片 3~ 5片,放入 Eppendorf 管中,经二甲苯、乙醇脱蜡,蛋白酶 K消化,酚/氯仿抽提,乙醇沉淀,用 TE溶解提取 DNA。新鲜组织 0.5 g~ 1.0 g,剪碎,放入 50 ml离心管中,同上方法提取 DNA。

1.2.2 聚合酶链反应(PCR) 1μl~ 2μl样本 DNA加入 20μl标准反应体系中(10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dATP、dGTP、dCTP、dTTP, 1.0 μmol/L引物, 1 U~ 3 U Taq DNA多聚酶),置 PCR循环仪上扩增。ras基因循环参数: 94℃ 40 s, 58℃ 40 s, 72℃ 60 s,循环35周期, 72℃放置 10 min; p53基因循环参数: 94℃ 40 s, 54℃ 40 s, 72℃ 60 s,循环 35周期, 72℃放置 10 min。

1.2.3 限制性片段长度多肽性分析(RFLP) 取 10μl扩增产物加相应的限制性内切酶(Ha-ras-12位点及 p53-248位点经 MSPI酶切, p53-249位点经 HaeIII酶切),消化 12 h~ 28 h,酶解产物用 4% 聚丙烯酰胺垂直电泳分析。

1.3 统计学分析

所有资料进行 χ 检验。

2 结果

2.1 临床资料分析

50例膀胱移行细胞癌中,男性 41例,女性 9例,男女之比为 4.56:1。年龄最小 35岁,最大 89岁,平均年龄 61.7岁。术前病程最短 1 d,最长 17年。随访结果最短 6个月,最长 14年。组织学分级: Ⅰ级 9例、Ⅱ级 20例、Ⅲ级 21例。肿瘤发生部位: 膀胱颈 6例、膀胱壁(前、后、侧) 14例、三角区 6例、顶部 8例、输尿管 3例、多部位 13例。肿瘤大小: 最大直径 20 cm,最小为 0.5 cm,肿瘤小于 5 cm者 38例,大于 5 cm者 12例。

2.2 膀胱癌 ras p53基因突变结果分析

Ha-ras基因第12位密码子引物扩增片段长 170 bp,经 MSPI酶切,野生型形成 48 bp、56 bp、66 bp 3个片段,突变型形成 48 bp、122 bp两个片段。

p53基因引物扩增片段长 164 bp, p53-248位点经 MSPI酶切,野生型切成 113 bp, 51 bp两个片段,突变型酶切为 164 bp。p53-249位点经 HaeIII酶切,野生型被切成 27 bp、46 bp、90 bp 3个片段,突变型被切成 27 bp、136 bp两个片段。

本组50例膀胱移行细胞癌中,16例存在 Ha-ras-12位点突

* 基础部病理解剖学教研室 重庆, 630038
** 消化内科 重庆, 630037

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

变见图 1, 9例存在 p53-248位点突变见图 2, 4例存在 ras基因、p53基因共同突变, p53-249位点没有发现点突变见图 3,膀胱正常粘膜未检测到 ras基因及 p53基因突变见表 1. ras基因突变率随膀胱移行细胞癌分级增高而增高, Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级之间差异显著($P < 0.05$)。

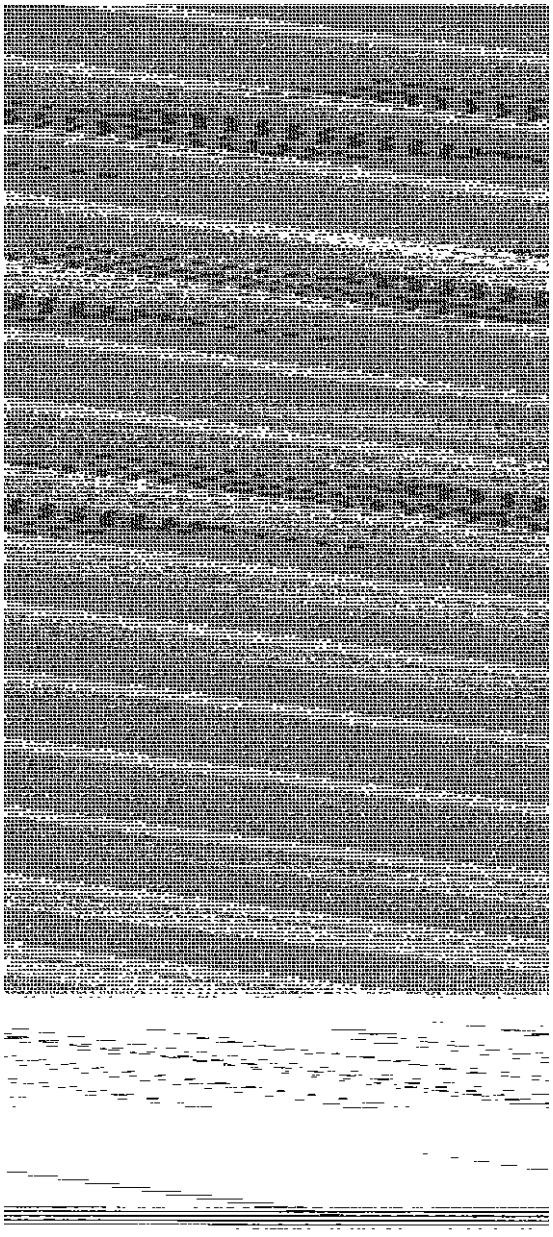


图 2 p53第 248密码子 RFLP分析

Fig 2 RFLP analysis of codon 248 of p53 gene

M: Marker (PBR 322+ HaeⅢ); 1, 2, 3, 4, 6: Wild type; 5: Mutant type; 7: Amplified band

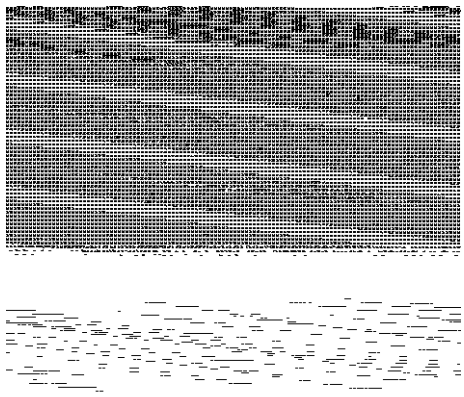


图 3 p53第 249位密码子 RFLP分析

Fig 3 RFLP analysis of codon 249 of p53 gene

M: Marker (PBR 322+ HaeⅢ); 1~5: Wild type; 6: Amplified band

表 1 膀胱移行细胞癌 ras p53基因突变结果

Tab 1 Result of ras and p53 genes mutation of transitional cell carcinoma of bladder

Histotype	Cases	ras gene	p53 gene	
		Ha-ras-12	p53-248	p53-249
Normal mucosa	10	0	0	0
Bladder transitional cell carcinoma	50	16	9	0

50例膀胱移行细胞癌, 有 ras基因突变者死亡率为 50%, 高于无 ras基因突变患者死亡率 11.8% ($P < 0.05$)。p53-248位点突变患者死亡率 55.6%, 高于无突变患者死亡率 17.5% ($P < 0.05$)。ras p53基因共同突变患者死亡率为 75%, 高于无 ras p53基因突变患者死亡率 19.6% ($P < 0.05$), 见表 2.

表 2 50例膀胱移行细胞癌患者死亡率 (%)

Tab 2 Mortality of patients in transitional cell carcinoma of bladder (%)

	ras		p53-248		Both ras and p53	
	M (16 cases)	N (34 cases)	M (9 cases)	N (41 cases)	M (4 cases)	N (46 cases)
Recurrence	18.8 (3/16)	5.9 (2/34)	11.1 (1/9)	9.8 (4/41)	0 (0/4)	10.9 (5/46)
Death	50.0 (8/16)	11.8 (4/34)	55.6 (5/9)	17.5 (7/41)	75 (3/4)	19.6 (9/46)

M: Mutation; N: No mutation

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

3 讨论

迄今已发现 ras基因通过各种机理参与多种肿瘤的发生,并在多种肿瘤中发现 ras基因点突变,其中胰腺癌中 k-ras突变率为 90%,甲状腺癌和大肠癌 k-ras突变率为 50%,髓性白血病中 N-ras突变率为 30%,胃癌中 Ha-ras突变率为 40%[1]。近年来国内外一些学者采用不同检测方法对人类膀胱移行细胞癌的 Ha-ras基因突变进行分析,发现膀胱移行细胞癌 Ha-ras突变率为 30%左右[2,3]。本组检测膀胱移行细胞癌 Ha-ras-12位点突变阳性率 32%,且在组织分化差的III级膀胱移行细胞癌中,Ha-ras基因 12位点突变率高于高分化的I 级膀胱移行细胞癌,与 Czerniak等[4]结论相一致,因此在预测膀胱移行细胞癌恶性程度时,检测 ras基因突变具有参考价值。有关 ras基因突变与肿瘤预后的关系也越来越受到关注,杨清浩等[5]检测 ras基因在膀胱移行细胞癌中点突变的结果表明:有 Ha-ras基因点突变的病人膀胱移行细胞癌的复发率和淋巴结转移率明显高于无点突变患者。本组检测膀胱移行细胞癌有 ras基因突变患者死亡率明显高于无 ras基因突变患者,与文献[5]报道相一致。因此我们认为 ras基因突变的检测对于膀胱移行细胞癌预后判断有一定指导意义。

随着分子生物学技术发展,人们对 p53基因与膀胱癌的发生、发展与预后的关系进行了研究。Fujimoto等[6]对 25例膀胱癌标本采用 PCR-SSCP法检测 p53基因变异,结果 8例突变均发生在III级膀胱癌中,表明分化差的膀胱癌中 p53突变率高。本组采用 PCR-RFLP法检测膀胱移行细胞癌 p53-248位点突变阳性率 18%,检测结果显示与病理分级无明显差异,这可能与 p53基因点突变较多,且分散有关。目前检测 p53基因突变已被广泛用于判断病人预后,研究表明:p53基因突变与病人预后有关,有突变的 p53表达,预后不良[7,8]。本组检测结果表明:p53基因突变患者死亡率高于无突变患者,提示 p53基因突变对膀胱移行细胞癌判断预后有一定指导意义。我们对 249位点突变检测没有发现点突变,说明 249位点在膀胱移行细胞癌中可能不常见。

Slingerland等[9]研究中发现 p53基因突变与活化的 ras基因在细胞转化过程中具有协同作用。有关 ras基因与 p53基因共同突变在膀胱移行细胞癌的检测,尚未见报告。我们检测结果表明:4例膀胱移行细胞癌中存在 ras基因与 p53基因共同突变,且与膀胱移行细胞癌预后有关,ras基因与 p53基因共同突变患者死亡率(75%)高于无 ras、p53基因突变患者死亡率(19.6%)。说明突变型 ras基因与突变型 p53基因协同在膀胱移行细胞癌诊断及判断预后方面具有重要意义。

参考文献

1 Bos J L. ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res, 1989; 49(17): 4682

2 Visvanathan K V, Pocock K D, Summerhayes I C. Preferential and novel activation of Ha-ras in human bladder carcinomas. Oncogence Res, 1988; 3(1): 77

3 Malone P R, Visvanathan K V, Ponder B A *et al*. Oncogene and bladder cancer. Br J Urol, 1985; 57(6): 664

4 Czerniak B, Cohen G L, Etrind P *et al*. Concurrent mutations of coding and regulatory sequences of the Ha-ras gene in urinary bladder carcinomas. Human Pathol, 1992; 23(11): 1199

5 杨清浩,杨唐俊. Ha-ras癌基因点突变与膀胱癌生物学行为关系的研究.中华泌尿科杂志, 1994; 15(2): 122

6 Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E *et al*. Frequent association of p53 gene mutations in invasive bladder cancer. Cancer Res, 1992; 52(6): 1393

7 Lipponen P K. Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional cell bladder cancer and its prognostic value. Int J cancer, 1993; 53(3): 365

8 谢晓冬,于茂生,伍秋生等.突变型 p53基因在人膀胱肿瘤中的表达及临床意义.中华外科杂志, 1995; 33(4): 229

9 Slingerland J M, Benchimol S. Transforming activity of mutant p53 alleles. J Cell Physiol, 1991; 148(3): 391

(收稿: 1996-03-25;修回: 1996-09-02)

(编辑　汪勤俭)

Detection of the point mutation of ras and p53 in bladder transitional cell carcinoma and its clinical significance

Yu Dongmei, Liu Fengxuan, Liang Zhiyong, Chen Yisheng, Luo Yuanhui, Lu Rong (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Mutation of ras and p53 in 50 cases of bladder transitional cell carcinoma (BTCC) was detected with PCR-RFLP to explore the role played by gene changes in the occurrence of BTCC. It was found that

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

(1) No mutation was seen in the normal bladder mucosa while the point mutation at codon 12 of Ha-ras gene was found in 16 and that of p53 gene found in 9 cases of BTCC; (2) The point mutation in codon 12 of Ha-ras gene increased with progression of the pathological grade ($P < 0.05$); (3) The mortality of the patients with mutation of ras and p53 was higher than those without; (4) Four cases of BTCC exhibited mutation of both ras and p53 genes.

Key words bladder transitional cell carcinoma; oncogen; onco-suppressor gene; prognosis

(上接 386页)

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

超声雾化器(上海合力医疗器械厂,402型),分光光度计(四川分析仪器厂,721型),Ⅲ型肺炎球菌(S. Pneumoniae,北京药品生物检验所)。

1.2 实验动物与分组

Wistar大鼠36只(四川中药研究所动物室提供),雌雄不拘,体重 115 g~ 125 g,随机分为两组:① 假手术组;② 脾切除组。分组术式参照文献[1],术后在同等条件下喂养6个月,进行实验观测。

1.3 制备肺炎球菌悬液

按常规方法培养肺炎球菌,离心弃上清,再用 PBS(0.01 mol/L, pH7.2)洗两次,用分光光度计测 A 值,调整细菌悬液浓度为 5×10^9 /ml,并倍比稀释作血平皿培养计数菌落形成单位(CFU)值验证。

1.4 肺炎球菌雾化吸入

将细菌悬液加入超声雾化器中,以 1 ml/min的速度雾化送入汽雾箱,动物置于汽雾箱中自主呼吸吸入肺炎球菌 30 min,吸入结束后:① 立即在无菌条件下取全肺组织,作组织匀浆,倍比稀释后血平皿 37℃培养 18 h,计数 CFU 克组织值;② 6 h和 24 h取肺组织,10% 福尔马林血管内固定,石蜡包埋,常规切片,HE染色后组织学观察;③ 24 h外周血培养,计数 CFU /ml 值。

2 结果

2.1 肺组织培养 CFU值结果

假手术组动物肺中活菌量为 $6.03\times 10^5\pm 158$ 克组织,脾切除组为 $5.97\times 10^5\pm 245$ 克组织,两组间差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 肺组织学观察

大鼠在吸入肺炎球菌后,均有精神差,活动少,呼吸急促等表现,脾切除组动物症状呈进行性加重,体毛竖立,呼吸时伴有"咕咕"声;组织学观察可见假手术组动物肺组织呈典型肺炎球菌肺炎病变过程,肺泡中有纤维素性渗出,中性粒细胞浸润,红细胞数量少;而脾切除组动物肺泡中充满大量红细胞,中性粒细胞相对较少;尸检还发现有一侧或双侧肾上腺出血。

2.3 外周血培养 CFU值结果

假手术组动物外周血中活菌量仅 (9.14± 15.30) /ml,脾切除组动物外周血中活菌量达 ($1.62\times 10^5\pm 142$) /ml,两组间比较差异非常显著($P < 0.01$)。

3 讨论

肺炎球菌常存在于正常人的口腔及鼻咽腔,在一定条件下可在呼吸道感染致病,有一些实验经腹腔或静脉注射建立感染模型,不符合该菌正常侵入途径,忽略了呼吸道防御机制,特别是经静脉注射直接形成菌血症,不容易控制剂量,致使动物迅速死亡;而经鼻腔或气管内注射,菌液不能散布于气道内均匀进入肺泡中,而且菌液容易自然流出或通过反射喷出,使每个动物接受的菌量不恒定,影响实验结果。采用超声雾化器能将肺炎球菌悬液雾化成直径 0.1 μm~ 0.3 μm 的汽雾颗粒,使动物在自主呼吸过程中吸入细菌,模拟肺炎球菌正常侵入方式,结果表明两组动物吸入的细菌量差异无显著性;采用 5×10^9 /ml的肺炎球菌悬液按 1 ml/min的速度雾化,大鼠在汽雾箱中吸入 30 min后,脾切除组大鼠 24 h后外周血中活菌量达到 10^5 /ml,肾上腺有出血,肺泡中充满大量的红细胞,表明成功建立OPSI的动物模型。

关键词 肺炎球菌;动物模型;脾切除后凶险性感染

中图法分类号 R657.7

参考文献

1 冷建军,陈维佩.脾切除和自体脾组织移植对肺泡巨噬细胞产生过氧化氢功能的影响.第三军医大学学报,1995;17(4):336

2 戴植本,杨 镇.脾脏疾病的外科处理.见:黄志强主编.现代腹部外科学.长沙:湖南科学技术出版社,1994:392~396

(收稿:1995-12-17;修回:1996-08-04)

(编辑 冷怀明、汪勤俭)

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