DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.04.025

大肠腺瘤及腺癌ras、P^{53}基因点突变的检测

梁智勇 柳凤轩 (第三军医大学附属西南医院病理科)重庆,630038
罗元辉 房殿春 (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆,630038

提 要 应用PCR-RFLP法检测了20例正常大肠粘膜、30例大肠腺瘤、74例大肠腺癌及74例癌旁粘膜ras、P^{53}基因点突变。结果显示,正常大肠粘膜及癌旁粘膜未检测到基因突变,大肠腺瘤及腺癌ras基因突变率分别为26.7%及41.9%,且ras基因突变率随腺瘤大小及不典型增生程度增高而增高。大肠腺瘤及腺癌P^{53}基因(第248位点)突变率分别为1.3%及14.9%。1例腺瘤、6例腺癌存在ras及P^{53}两种基因突变,并且存在两种基因突变的大肠癌患者预后差。提示ras、P^{53}基因突变对大肠癌的发生、发展均起一定作用。

关键词 大肠肿瘤;癌基因;点突变;PCR-RFLP
中图法分类号 R735.34

点突变是癌基因激活及抑癌基因灭活的一种方式,突变型ras基因及突变型P^{53}抑癌基因均具有转化细胞的能力,目前已在多种肿瘤中检测到ras、P^{53}基因突变,并且这两种基因突变与某些肿瘤的发生、发展相关[1,2]。本文旨在探讨ras、P^{53}基因突变在大肠癌发生、发展过程中的作用,为临床诊断与治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

标本选自本院病理科1987~1993年手术切除及活检病例,正常大肠粘膜20例,腺瘤30例,腺癌及癌旁粘膜各74例,经10%福尔马林固定,石蜡包埋。

ras基因引物由北京大学生命科学中心合成,P^{53}基因引物由中科院上海细胞生物研究所合成(表1)。蛋白酶K、Taq DNA聚合酶、四种脱氧核苷酸、DNA分子量标志、限制性内切酶HpaⅡ、HaeⅢ、BstNⅠ及HphⅠ购自华美生物工程公司及Sigma公司。

表1 PCR扩增引物

Tab 1 Primers of PCR

Gene	Sequence	Length of amplified
HR	5′CAGGGCCCTCCTTGGCAGG3′	170 bp
	5′GTCGTATTCGTCCACAAAATGG3′	
KR	5′ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT3′	157 bp
	5′TCAAAGAATGGTCCTGGACC3′	
NR	5′AACTGGTGGTGGTTGGACCA3′	98 bp
	5′CTCTATGGTGGGATCATATTC3′	
P^{53}	5′CCCAAGGCGCACTGACCTCA3′	164 bp
	5′GCTCCTGACCTGGAGTCTTC3′	

1.2 方法

1.2.1 提取DNA 将石蜡包埋组织块切成5 μm厚蜡片3~5片,经二甲苯、乙醇脱蜡,蛋白酶K消化、酚/氯仿抽提、乙醇沉淀,TE缓冲液溶解[3]。

1.2.2 多聚酶链式反应(PCR) 1~3 μl样本DNA加入50 μl标准反应体系中,置PCR循环仪上扩增。ras基因循环参数:94℃ 40 s,55℃ 40 s,72℃ 60 s,循环35个周期。P^{53}基因循环参数:95℃ 35 s,55℃ 40 s,72℃ 60 s,循环33个周期。

1.2.3 限制性片段长度多态性分析(RFLP) 扩增产物经酚/氯仿抽提后,加15 μl去离子水溶解,经相应的限制性内切酶(Ha-ras-12位点及P^{53-248}位点经HpaⅡ酶切,K-ras-12位点及N-ras-12位点经BstNⅠ酶切,K-ras-13位点经HphⅠ酶切,P^{53-249}位点经HaeⅢ酶切)消化12~24 h,消化产物经8%聚丙烯酰胺垂直电泳。

1.2.4 统计学分析 所有资料进行χ^2检验。

2 结果

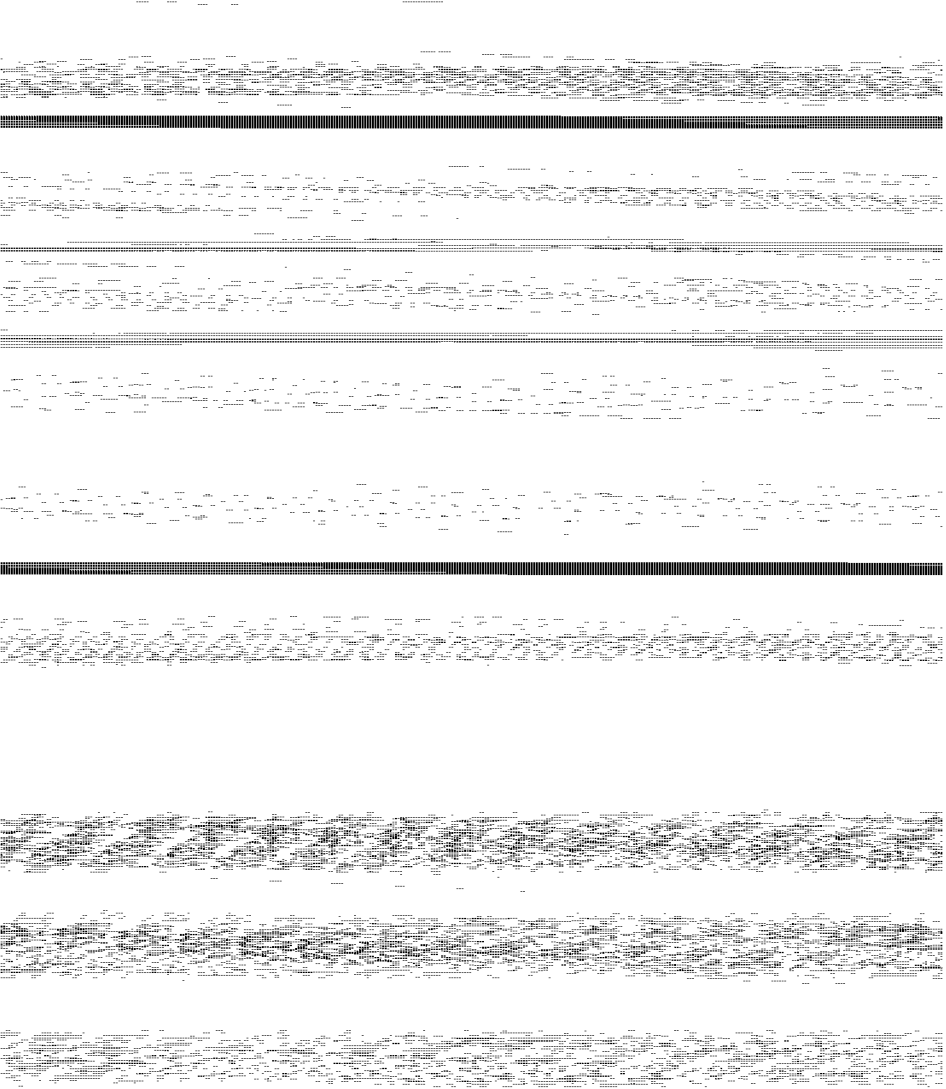
2.1 临床资料分析

30例大肠腺瘤中,男13例,女17例,平均年龄52.37岁。组织学类型:管状腺瘤17例,绒毛状腺瘤5例,管状绒毛状腺瘤8例。不典型增生程度:Ⅰ级12例,Ⅱ级14例,Ⅲ级4例。部位:直肠22例,左半结肠6例,右半结肠2例。大小:直径小于1 cm的8例,大于1 cm的22例。

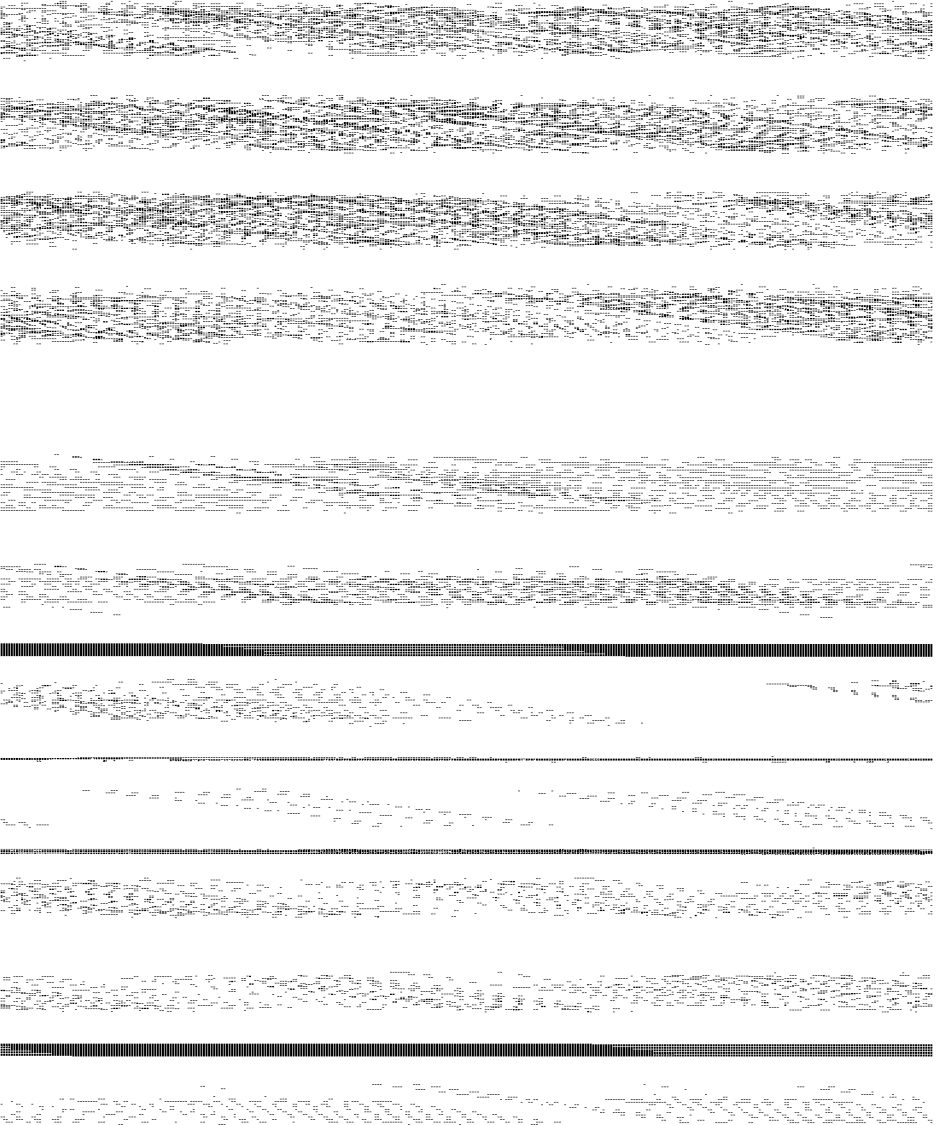
74例大肠腺癌中,男40例,女34例,平均年龄54.08岁。组织学类型:高分化管状腺癌19例,中分化管状腺癌24例,低分化管状腺癌9例,乳头状腺癌12例,粘液腺癌10例。部位:直肠40例,左半结肠11例,右半结肠23例。Duke's分期:A期36例,B期23例,C期15例。

2.2 ras、P^{53}基因突变结果分析(表2)

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



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



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

3 讨论

临床与实验研究表明，大多数大肠腺癌是由腺瘤演变而来的[4]，但这一转变过程的机制尚未完全阐明。我们在大肠腺瘤及腺癌中均检测到突变型 ras 基因，且主要为 K-ras 基因第 12 位点突变，提示 ras 基因突变参与了大肠癌的发生。本结果显示 ras 基因突变与腺瘤不典型增生程度显著相关，ras 基因突变率随腺瘤的增大也呈增高趋势，这同 Vogelstein 等[5]报道的结果相一致，但由于例数较少，无统计学意义。本组腺瘤Ⅰ级不典型增生与腺癌的 ras 基因突变率间差异有显著的统计学意义，而Ⅰ、Ⅱ级不典型增生与腺癌的 ras 基因突变率间差异无统计学意义，表明 ras 基因突变可能是大肠癌发生的早期事件，与腺瘤的恶性倾向有关，提示 ras 基因突变对于腺瘤转化为腺癌以及腺癌恶性表型的维持均起一定作用，其中以 K-ras 基因第 12 位点突变最为重要。

本组 30 例腺瘤中，仅在 1 例Ⅲ级不典型增生组织中检测到 P^{53}基因第 248 位点突变，大肠腺癌 P^{53}基因第 248 位点突变率为 14.9%，略低于 Baker 等[6]报道的 17%，表明 P^{53}基因 248 位点突变晚于 K-ras 基因基因 12 位点突变，提示 P^{53}基因突变对于腺瘤转化为腺癌以及腺癌恶性表型的维持也起一定作用。

突变型 ras 基因与突变型 P^{53}基因协同作用可以使鼠原代细胞发生转化，已被实验所证实[7]。本组 1 例腺瘤、6 例腺癌存在两种基因突变，表明 ras 基因与 P^{53}基因突变协同作用参与了大肠癌的发生、发展，但大部分腺瘤及腺癌仅存在一种基因突变，并且还有一部分组织不存在我们所检测的各位点的突变，提示 K-ras 基因第 12、13 位点突变，N-ras 基因第 12 位点突变及 P^{53}基因第 248 位点突变并非大肠癌发生、发展过程中必然出现的改变，部分组织可能发生的是 ras 或 P^{53}基因其它位点突变，也可能发生的是其它基因改变。研究表明，c-myc、Rb 及 nm23 等[8~10]多种基因改变参与了大肠癌的发生、发展过程，提示大肠癌可以是由不同种类的基因改变作用所致，这也可能就是大肠癌生物学特性不同的原因。

本组病例随访资料表明，孤立地分析 ras 基因或 P^{53}基因突变、不能明确其是否与大肠癌预后有关。将 ras、P^{53}基因突变结合起来分析，结果显示存在两种基因突变患者的 3 年生存率显著低于其他患者的 3 年生存率（$P<0.01$），表明 ras 基因与 P^{53}基因协同突变与大肠癌预后有一定关系，提示 ras 基因突变与 P^{53}基因突变的协同作用直接或间接促进了大肠癌的进一步发展。

参考文献

1 Bos JL. Ras oncogene in human cancer: a review. Cancer, 1989;49:4682

2 Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC et al. Mutations in the P^{53} gene occur in diverse human tumor types. Nature, 1989; 342:705

3 Jackson DP, Lewis FA, Tayler GR et al. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. J Clin Pathol, 1990;43:499

4 William AC, Harper SJ, Paraskeva C. Neoplastic transformation of a human colonic epithelial cell line: evidence for adenoma to carcinoma sequence. Cancer Res, 1990;50:4724

5 Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med, 1988;319:525

6 Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM et al. P^{53} gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. Cancer Res, 1990; 50: 7717

7 Hinds PW, Finlay C, Levine AJ. Mutation is required to activate the P^{53} gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. J Virol, 1989;63:739

8 Royds JA, Sharrard Rm, Wanger B et al. Cellular localisation of c-myc product in human colorectal epithelial neoplasia. J Pathol, 1992;166:225

9 Meling GI, Lothe RA, Borresen AL et al. Genetic alterations within the retinoblastoma locus in colorectal carcinomas. Relation to DNA ploidy pattern studied by flow cytometric analysis. J Cancer, 1991;64:475

10 Wang L, Patel V, Chosh L et al. Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer. Cancer Res, 1993;53:717

（收稿：1995-03-02；修回：1995-05-15）

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

Detection of point mutation of ras and P^{53} genes in colorectal mucosa, adenoma and carcinoma

Liang Zhiyong, Luo Yuanhui, Liu Fengxuan, Fang Dianchun (Department of Clinical Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The point mutation of ras and P^{53} genes was detected in 20 cases of normal colorectal mucosa, 30 cases of colorectal adenoma and 74 cases of colorectal carcinoma and its transitional mucosa. It was found that no mutation could be seen in the normal and t ransitionnal mucosa. The mutation rate of ras gene was 26.7% and 41.9% in adenoma and carcinoma respectively ad the mutation rate increased with the dysplastic severity of adenoma ($P<0.01$). The mutation rate of P^{53} at codon 248 was 1.3% and 14.9% in adenoma and carcinoma respectively. Mutation of both ras and P^{53} occurred to 1 case of adenoma and 6 cases of carcinoma and the synergism of the mutation of 2 genes resulted in the poor prognosis of the patient. The findings suggest that the point mutation of ras and P^{53} plays a role of the genesis of the neoplasms and the development of carcinoma.

Key words colorectal neoplasm; oncogen; point mutation; PCR-RFLP

****

直肠"脱垂"式切除术治疗直肠癌76例

"Prolapse" resection of the rectum for rectal cancenoma in 76 cases

甘 露 蔡志民 (第三军医大学附属西南医院普通外科) 重庆,630038

1987年以来,我院对76例直肠中上段癌患者施行了直肠"脱垂"式切除术,收到了良好的效果,现报告如下:

1 资料与方法

本组男41例,女35例;年龄18～71岁($\bar{x}$=46.2岁);病程1～18月($\bar{x}$=8月);肿瘤下缘距齿线3.5～10 cm ($\bar{x}$=5.5 cm);其中高分化腺癌与中分化腺癌56例,粘液腺癌12例,低分化腺癌8例;Ducks A 期8例,B 期32例,C 期28例,D 期8例;肿瘤直径1.5～5.1 cm,平均3.3 cm。全部行"脱垂"式切除术。

方法 持续硬膜外麻醉或静脉复合麻醉。病人取膀胱截石位,手术分两组进行。(1)腹腔组:从左下腹旁正中切口进腹,探查后按 miles 手术方式和要求游离乙状结肠、直肠及其系膜,直肠游离要充分,达提肛肌水平,彻底止血。(2)会阴组:充分扩肛后以一乙状结肠镜芯(硬式)从肛门插入至游离肠段的中点以上,并在中点作一环形扎,同时在乙状结肠预切断吻合处缝一标记线,然后将乙状结肠镜芯慢慢拉出,使直肠乙状结肠外翻出肛门呈"脱垂"状态。也可不用乙状结肠镜芯,而直接把游离肠管推肛门外,凭借游离肠管的自身重量造成"脱垂"状态。腹腔组检查系膜无扭转,有轻微张力,且入盆底后,会阴组以0.5‰洗必泰棉球擦净脱垂直肠,干纱布包裹(含肿瘤)作牵引,在距齿线0.5 cm 处行脱垂肠管切除,先切开直肠前壁,找到标记线后,切开乙状结肠壁,两断端全层一次缝合,边切边缝,吻合完后吻合口即自行缩回肛门内。重建盆底腹膜,骶前置双导管引流自肛旁另戳孔引出。

2 讨论

病理研究资料表明,大多数直肠癌向下轴向扩散很少超过2.0 cm,切除肿瘤下缘以下3 cm 肠管已足够安全[1,2]。由此许多保留肛门的新术式和改良术式不断推出,且报道 Ducks 各期此类手术与 Miles 术比较,其手术死亡率、局部复发率、5年及10年生存率均无明显差异[3～5]。本组全部病例无一例手术死亡。已随访的50例病人的局部复发率为14%(7/50),与 Hurst 等[3,5]报导相符,而3年及5年生存率则稍低于上述报导,分别为50%和38%(25/50,19/50)。我们施行手术有如下体会:(1)由于未损及肛门括约肌,患者排便功能均在术后1～3月恢复正常。(2)整个吻合过程(包括切除肠管)均在盆腹腔外进行。这样既减少肿瘤细胞种植转移的机会,又避免了细菌对盆腹腔的污染,从而降低了种植转移及腹盆腔和切口感染的发生率,吻合口瘘的发生率也明显减少。本组中75例术后顺利恢复无并发症按期出院,1例因手术不当(直肠前壁游离欠佳并损伤阴道未发现)造成直肠阴道瘘,后经修补治愈。(3)操作简单,尤其是肠管切除吻合方便、可靠,手术一次完成,缩短手术时间0.5～1 h。

(下转 337 页)

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