DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.06.012

胃癌组织 P^{53} 基因突变、蛋白产物的表达及与病人预后的关系

房殿春 罗元辉 鲁 荣 刘为纹 晋华源 门荣甫 周子成 王振华 (第三军医大学西南医院消化科) 630038

提 要 采用PCR－RFLP法对正常胃粘膜和胃癌组织中 P^{53} 基因第248和249编码区点突变进行分析，同时采用免疫组化方法对 P^{53} 蛋白的表达进行观察。结果表明，胃癌组织 P^{53} 第248编码区点突变率为7.2%，249编码区未发现有点突变。胃癌组织 P^{53} 染色阳性率为36.5%，肿瘤大于5 cm组，有淋巴结转移和浆膜侵犯及Ⅲ、Ⅳ期胃癌组 P^{53} 染色阳性率分别显著高于肿瘤小于5 cm、无淋巴结转移和浆膜侵犯及Ⅰ、Ⅱ期胃癌组（$P<0.01$）。P^{53} 染色阳性者5年存活率为21.1%，染色阴性者为50.0%，两组5年存活率差别非常显著（$P<0.01$）。以上提示检测胃癌组织 P^{53} 蛋白有助于判断胃癌患者预后。

关键词 胃肿瘤；致癌基因产物；基因表达；预后

中图法分类号 R735.2

随着癌基因研究的深入，发现机体内还存在着抑制细胞异常生长和肿瘤形成的基因——抑癌基因。P^{53} 基因即是其中重要的一种。研究表明，P^{53} 基因是许多恶性肿瘤常见的基因损伤靶位，它的结构改变与表达异常可能是这些肿瘤发生发展的分子基础[1,2]。关于肝癌、食道癌 P^{53} 基因突变和表达的研究国内已见报道，而在胃癌的研究却鲜见报道。本文采用PCR－RFLP法对胃癌组织中 P^{53} 基因第248和249位密码子点突变进行分析，并采用免疫组化方法对 P^{53} 蛋白的表达进行观察，探讨其与病人预后的关系。

1 材料与方法

1.1 组织标本

104例胃癌和35例非癌胃粘膜组织为我院1978～1988年外科手术切除标本，均经10%福尔马林固定，石蜡包埋。先连续切片3张，厚5 μm，1张行HE染色，用于病理诊断，余2张用于免疫组化染色。另切同样厚度蜡片5张备用。

1.2 DNA 提取

将胃癌组织蜡片放入1.5 ml Eppendorf管中，二甲苯脱蜡，95%乙醇水化，蛋白酶K(Sigma)消化，采用酚－氯仿抽提法提取DNA[3]。将提纯的DNA样品用TE缓冲液稀释，于紫外分光光度计上分别测定其在波长260 nm及280 nm时的吸收值，计算核酸的浓度及纯度。

1.3 引物设计

分析 P^{53} 基因248、249位密码子点突变的引物由中国科学院上海细胞生物研究所合成。引物顺序 P_1：5′-CCCAAGGCG-CACTGACCTCA-3′，为第7外显子正链上游内含子第23～44个核苷酸之间的序列；P_2：5′-GCTCCTGACCTGGAGTCTTC-3′，为负链下游最后11个核苷酸和内含子前9个核苷酸之间的序列。扩增片段长164 bp。248位野生型经Msp Ⅰ酶切，被成113＋51 bp两个片段，突变型则不能被酶切；249位野生型经Hae Ⅲ酶切，可切成27＋46＋90 bp三个片段，而突变型则切成27＋136二个片段。

1.4 PCR－RFLP 分析

取约1 μg胃癌组织DNA溶于50 μl PCR缓冲液(10 mmol/L Tris－HCl，50 mmol/L KCl，1.5 mmol/L $MgCl_2$，0.2 mmol/L dATP、dGTP、dTTP和dCTP、1 μM引物，1～3U Taq DAN多聚酶)中。在PCR扩增仪上(Perkin Elmer Cetus)操作：93℃变性40 s，55℃复性40 s，72 ℃延伸70 s，40个循环后72℃放置10 min。每例取10 μl PCR扩增产物，分别用Msp Ⅰ和Hae Ⅲ消化，酶解产物4%聚丙烯酰胺电泳分离，溴乙锭染色后在紫外光透视板上观察并照像。

1.5 免疫组化染色

组织切片应用抗 P^{53} 单克隆抗体(英国牛津大学病理科Kevin Gatter博士惠赠)进行ABC免疫组化染色，试剂盒购自美国Vector Lab。按常规操作，细胞核着棕色者为阳性。

1.6 病人随访

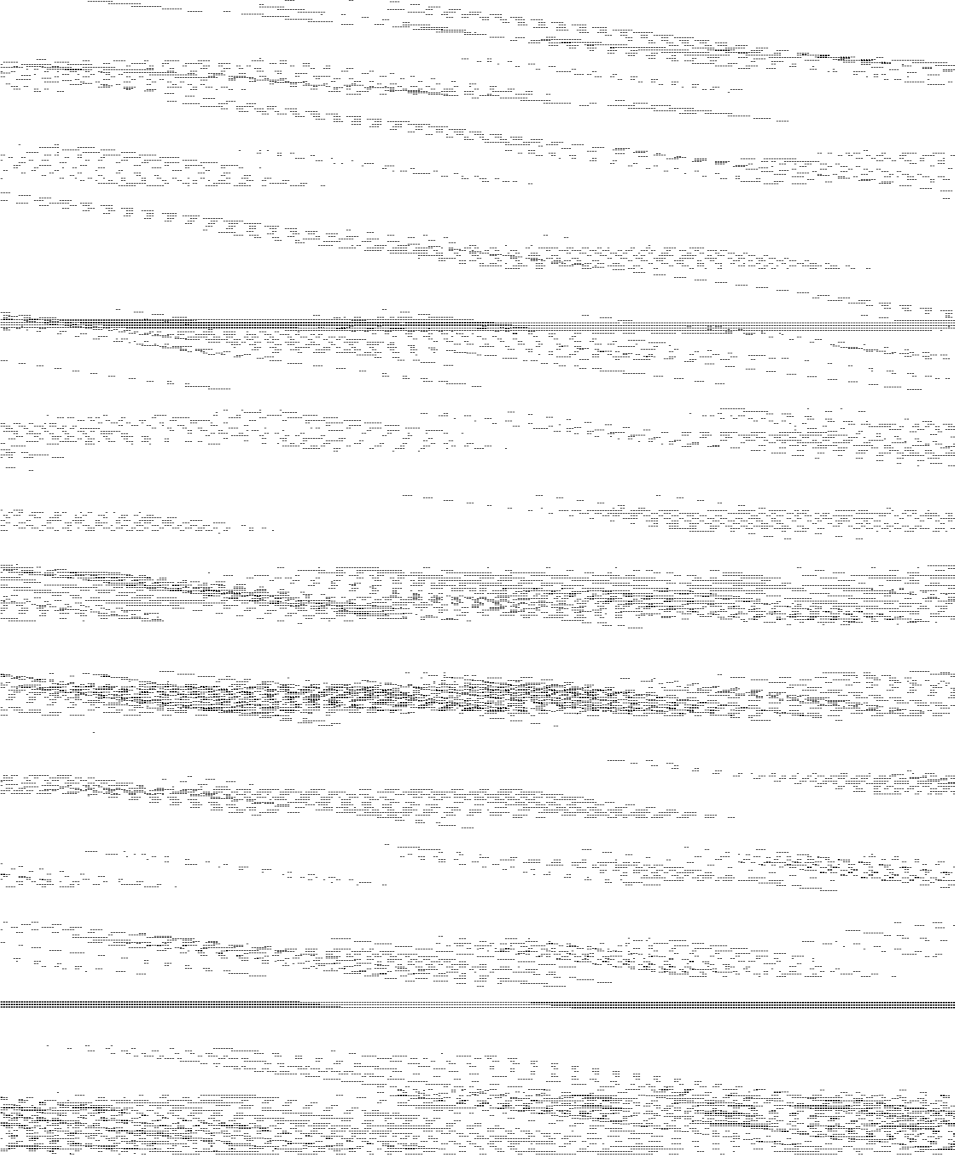
104例胃癌手术患者均获随访结果，随访时间最长者为14年。其中存活不到1年者30例，存活1年以上者74例，2年以上者57例，3年以上49例，4年以上45例，5年以上40例。

2 结果

2.1 P^{53} 第248、249编码区突变分析

经PCR扩增，4%聚丙烯酰胺凝胶电泳，35例非癌胃粘膜中有30例，104例胃癌组织有69例获得清晰扩增产物带型。PCR产物经Msp Ⅰ和Hae Ⅲ酶切后电泳观察，30例非癌胃粘膜未发现有点突变，69例胃癌有5例不能被Msp Ⅰ酶切(图1)，提示有248编码区的点突变，突变率为7.2%(5/69)，249编码区未发现有点突变。

?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

发展中起重要作用。点突变是P^{53}基因失活的重要方式。Imazeki 等采用 PCR 直接测序法分析P^{53}基因第5～8外显子点突变，发现突变率为50%[4]；Uchino 等检测胃癌组织第5～8外显子点突变，早期癌和晚期癌的突变率分别为37%和42%[5]；Tamura 等先将胃癌细胞分类为异倍体细胞和二倍体细胞，然后检测P^{53}第4～8外显子的点突变，发现异倍体胃癌的突变率高达64%，而二倍体胃癌未发现有突变者[6]。以上研究均提示P^{53}突变是胃癌发生发展过程中的常见之事。本文采用 PCR－RFLP 方法检测了P^{53}第七外显子 248、249 号密码子点突变发现，248 号密码子突变率为 7.2%，249 号密码子未发现有突变者，其它位点的突变情况有待进一步测序研究。

P^{53}基因编码一种 390 个氨基酸，分子量 53 kD 的核磷酸蛋白，其通过对 DNA 复制的影响而参与正常细胞的生长调控。正常情况下P^{53}蛋白的半衰期很短，而且极不稳定，用一般的组织学方法不能检出，当P^{53}基因发生突变时，其蛋白产物便在细胞核内大量积聚[7]。已有研究发现，在有P^{53}高表达的肿瘤中，常有P^{53}基因高度保守序列的点突变[8]。因此一般认为，用组织学方法检出P^{53}高表达即表示有P^{53}基因突变发生。本文 5 例点突变的病例中有 4 例P^{53}蛋白染色阳性，也提示P^{53}基因突变与蛋白产物的高表达可能有一定关系。

文献报告胃癌组织P^{53}染色的阳性率为 13.3～57.0%[9,10]，本文为 36.5%。P^{53}蛋白的异常表达与胃癌的某些生物学行为有关，从本组资料看，不同组织学类型胃癌P^{53}染色阳性率无明显差异，而肿瘤大于 5 cm 者染色阳性率显著高于小于 5 cm 者；有浆膜侵犯和淋巴结转移者染色阳性率显著高于无浆膜侵犯和淋巴结转移者；Ⅲ、Ⅳ期胃癌染色阳性率显著高于Ⅰ、Ⅱ期者，此与国际上一些关于肿瘤浸润和转移的分子机理研究结果相一致[11]。

研究表明，P^{53}蛋白的表达与病人预后有关。Martin 等研究发现P^{53}染色阴性胃癌者 5 年存活率为 56%，染色阳性者为 24%，两组 5 年存活率有显著差异[10]。从本文资料看，P^{53}染色阴性胃癌组 5 年存活率为 50.0%，染色阳性者为 21.1%，两组 5 年存活率亦有显著不同。因此，检测胃癌组织中P^{53}蛋白不仅有助于了解胃癌的某些分子生物学行为，而且有可能成为判断病人预后的有用指标。

参考文献

1 Frebourg T, Friend SH. The importance of P^{53} gene alterations in human cancer: Is there more than circumstantial evidence? JNCI, 1993, 85: 1554

2 Hsu HC, Peng SY, Sheu JC, et al. Allelotype and loss of heterozygosity of P^{53} in primary and recurrent hepatocellular carcinomas. Cancer, 1994, 73: 42

3 Sakamoto H, Mori M, Taira M, et al. Transforming gene from human stomach cancers and a non-cancerous portion of stomach mucosa. Proc Nat Acad Sci, 1986, 83: 3997

4 Imazeki F, Omata M, Nose H, et al. P^{53} gene mutations in gastric and esophageal cancers. Gastroenterology, 1992, 103: 892

5 Uchino S, Noguchi M, Ochiai A, et al. P^{53} mutation in gastric cancer: A genetic model for carcinogenesis is common to gastric and colorectal cancer. Int J Cancer, 1993; 54: 759

6 Tamura G, Kihana T, Nomuru K, et al. Detection of frequent P^{53} gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. Cancer Res, 1991, 51: 3056

7 Remvikos Y, Laurent-Puig P, Salmon RJ, et al. Simultaneous monitoring of P^{53} protein and DNA content of colorectal adenocarcinoma by flow cytometry. Int J Cancer, 1990, 45: 450

8 Bennett WP, Hollstein MC, He A, et al. Archival analysis of P^{53} genetic and protein alterations in Chinese esophageal cancer. Oncogene, 1991, 6: 1779

9 Seruca R, David L, Holm R, et al. P^{53} mutation in gastric carcinoma. Br J Cancer, 1992, 65: 708

10 Martin HM, Filipe MI, Morris RW, et al. P^{53} expression and prognosis in gastric carcinoma. Int J Cancer, 1992, 50: 859

11 Hill SA. Clonal heterogeneity, experimental metastatic ability, and P^{21} expression in H-ras transfformed NIH 3T3 cells. J Netl Cancer Inst, 1988, 80: 484

（收稿：1994-03-04；修回：1994-09-14）

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

Clinical study of the relationship of P^{53} mutation and expression with the prognosis of patients with gastric cancer

Fang Dianchun, Luo Yuanhui, Lu Rong, Liu Weiwen, Jin Huayuan, Men Rongpu, Zhou Zhicheng, Wang Zhenghua (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630037)

Abstract The mutation of P^{53} gene at codons 248 and 249 and its protein product expression were investigated in 104 formalin-fixed, paraffinembedded specimens of gastric canceer with PCR-RFLP analysis and immunohistochemistry. Mutation was found at codon 248 of P^{53} in 7.2% (5/69) of the gastric specimens but no mutation at codon 249. 36.5% (38/104) of gastric specimens expressed high level of P^{53} protein showing positive nuclear staining, which was related to the tumor size, serosal invasion, lymph node involvement and the stages of the cancer. The 5-year survival rate of the patients with positive expression of P^{53} was 21.1% and that with negative expression of P^{53} was 50% ($P<0.01$).

The data suggest that immunostaining of P^{53} is of great help to the evaluation of the patients with gastric cancer.

Key words stomach neoplasms; oncogene products; gene expression; prognosis

（上接 411 页）

2　护理措施及体会

2.1　预防和及早发现出血

由于重肝患者凝血机制障碍，部份患者有食道静脉曲张，存在胃肠粘膜弥漫渗血及食道静脉破裂出血的潜在危险，我科对于重肝患者均给予雷尼替丁、云南白药及补胃合剂等，同时静脉补充维生素 K 以预防出血，此外，加强饮食护理，给病人进食温热易消化软食，做到少量多餐，避免进食过硬或粗纤维的食物。

本组 32 例呕血前均有不同程度的心慌、上腹烧灼感、腹胀、频繁呃逆及出汗等。我们体会全体护理人员均应熟知上述上消化道出血的先兆表现，加强巡视，及早发现出血先兆，可为抢救争取时间。

2.2　迅速做好抢救的各种准备

一旦发现有出血先兆，应立即报告医生，在最短的时间内准备好各种抢救物品、急救药品、三腔管、吸痰器、气管切开包等，对已呕血的患者应立即进行急救，再让他人报告医生。

2.3　急救时的护理

发现大呕血后首先将患者头部偏向一侧，以防止窒息，同时用 12 号针（为输血作准备）建立静脉输液通道，抽血交叉配血，查电解质、血球压积等。在医生指导下快速、准确无误地进行各种操作，置胃管或三腔管时，操作应轻柔、敏捷，避免刺激加重出血，同时视呕血量及时给予吸出，必要时可行气管切开。

2.4　心理护理

患者病情严重，病死率高，其心理活动相当复杂，大出血时，多数病人产生恐惧、紧张的心理反应。因此，对此类病人需给予精神上的安慰与鼓励，护士要做到抢救时镇静、忙而不乱，在与病人接触时要讲究语言艺术和面部表情，并多关心、体贴病人，同时应消除病人的悲观情绪，鼓励其战胜疾病的信心，并做好家属工作，注意保护性医疗措施。

2.5　加强一般护理

2.5.1　加强基础护理：视病情定时监测体温、脉搏、呼吸、血压，注意观察患者有无神志改变，通过留置的三腔管或胃管观察出血的动态变化。

2.5.2　肠道护理：上消化道出血后，肠道氨的吸收大量增加，常随之出现肝性脑病。我们常灌肠以保护大便通畅，消除肠道积血。同时口服氟哌酸等抑制肠道菌生长，减少血氨来源，可预防或延缓肝性脑病的发生。

2.5.3　出血后的饮食护理：加强对病人的饮食管理，因慢重肝病人常伴有食道静脉曲张，要经常嘱咐或督促病人食少渣或无渣半流质饮食、软食，食物偏凉，做到少量多餐，不随便进食。饮食合理，有助于止血，促进康复，反之，可加重出血。

2.5.4　管道的护理：我们对 13 例上消化道出血的病人插胃管或三腔管，因此操作时动作要轻柔、敏捷，避免刺激加重出血。留置胃管或三腔管，既可作治疗手段，也可减轻呕吐、腹胀等症状，并可通过胃管观察出血的动态变化，此法止血效果较好。

2.5.5　纠正水、电解质的平衡：大量出血可引起病人水、电解质平衡失调，因此，应每日抽血查肾功，同时给予输血、输液等[2]。

（本文承蒙李梦东教授指导，谨此致谢！）

关键词　肝炎；出血，胃肠/护理

中图法分类号　R473.5

参考文献

1　谭小荣. 用凝血酶治疗重型肝病并发上消化道大出血的护理. 中华护理杂志，1991，5：206

2　顾长海，李梦东，主编. 传染病学新进展（Ⅰ）. 重庆：科学技术文献出版社重庆分社，1990：154～161

（收稿：1994-03-12；修回：1994-11-08）

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