DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.05.012

原发性肝癌组织癌基因ras和抑癌基因P53点突变研究

房殿春 罗元辉 鲁 荣 肖文华 刘为纹 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 应用多聚酶链延伸反应——限制性片段长度多态性分析法(PCR-RFLP)对43例福尔马林固定、石蜡包埋肝癌组织癌基因ras和抑癌基因P53点突变进行分析。结果表明,ras基因总突变率为41.9(18/43),其中N-ras第12位密码子突变率为37.2%(16/43),c-Ki-ras第12位密码子突变率为6.9%(3/43),c-Ki-ras第13位、c-Ha-ras第12和61位密码子未发现有突变者。P53基因第249密码子突变率为20.9%(9/43),第248密码子未发现有突变者。结果提示N-ras第12密码子和P53第249密码子突变参与了肝癌的发生和发展。

关键词 肝肿瘤;ras基因;抑癌基因P53;肿瘤基因产物;碱基顺序

中图法分类号 R735.7

业已证明,癌基因ras和抑癌基因P53是许多恶性肿瘤常见的基因损伤靶位,它们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P53基因突变和表达的研究国内已有报道,而关于肝癌ras族癌基因点突变的研究国内却鲜见报道。本文采用PCR-RFLP技术对肝癌组织中ras和P53基因的点突变进行分析,探讨其在肝癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 组织标本

原发性肝细胞癌43例、非癌肝组织15例为我院1992~1993年手术切除标本,均经10%福尔马林液固定,石蜡包埋,连续切片。先切片1张,厚5 μm,行HE染色,用于病理诊断;另切10 μm厚蜡片20张备用。

1.2 PCR引物设计

分析ras基因点突变引物由北京大学生命科学中心合成[3],分析P53点突变引物由中国科学院上海细胞生物研究所合成。引物序列如下:

P1A 5′-CAGGGCCCTCCTTGGCAGG-3′
P1B 5′-GTCGTATTCGTCCACAAAATGG-3′

P2A 5′-ACGTGCCTGTTGGACATCCT-3′
P2B 5′-CACACAGGAAGCCCTCCCCT-3′

P3A 5′-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3′
P3B 5′-TCAAAGAATGGTCCTGGACC-3′

P4A 5′-AACTGGTGGTGGTTGGACCA-3′
P4B 5′-CTCTATGGTGGGATCATATTC-3′

P5A 5′-CCCAAGGCGCACTGACCTCA-3′
P5B 5′-GCTCCTGACCTGGAGTCTTC-3′

P1A和P1B为分析c-Ha-ras第12密码子引物,扩增片段长170 bp,经限制性内切酶Hpa Ⅱ或Msp Ⅰ酶切,野生型被切为66+56+48 bp三个片段,突变型则切成122+48 bp两个片段。P2A和P2B为分析c-Ha-ras第61密码子引物,扩增片段长95 bp,经限制性内切酶BstN1酶切,野生型被切成60+20+15 bp三个片段,突变型则切成75+20 bp两个片段。P3A和P3B为分析c-Ki-ras第12和13密码子引物,扩增片段长157 bp,分析第12密码子用BstN1酶切,野生型被切为114+29+14 bp三个片段,突变型则切成143+14 bp两个片段;分析第13密码子用Hph Ⅰ酶切,野生型仍为157 bp,突变型则被切成114+43 bp两个片段。P4A和P4B为分析N-ras第12密码子引物,扩增片段长98 bp,经BstN1酶切,野生型被切成79+19 bp两个片段,突变型则仍为98 bp片段。P5A和P5B为分析P53基因第248和249密码子引物,扩增片段长164 bp,分析第248密码子用Hpa Ⅱ或Msp Ⅰ酶切,野生型被切成113+51 bp两个片段,突变型则仍为164 bp片段;分析249密码子用Hae Ⅲ酶切,野生型被切为90+46+27三个片段,突变型则切为136+27 bp两个片段。

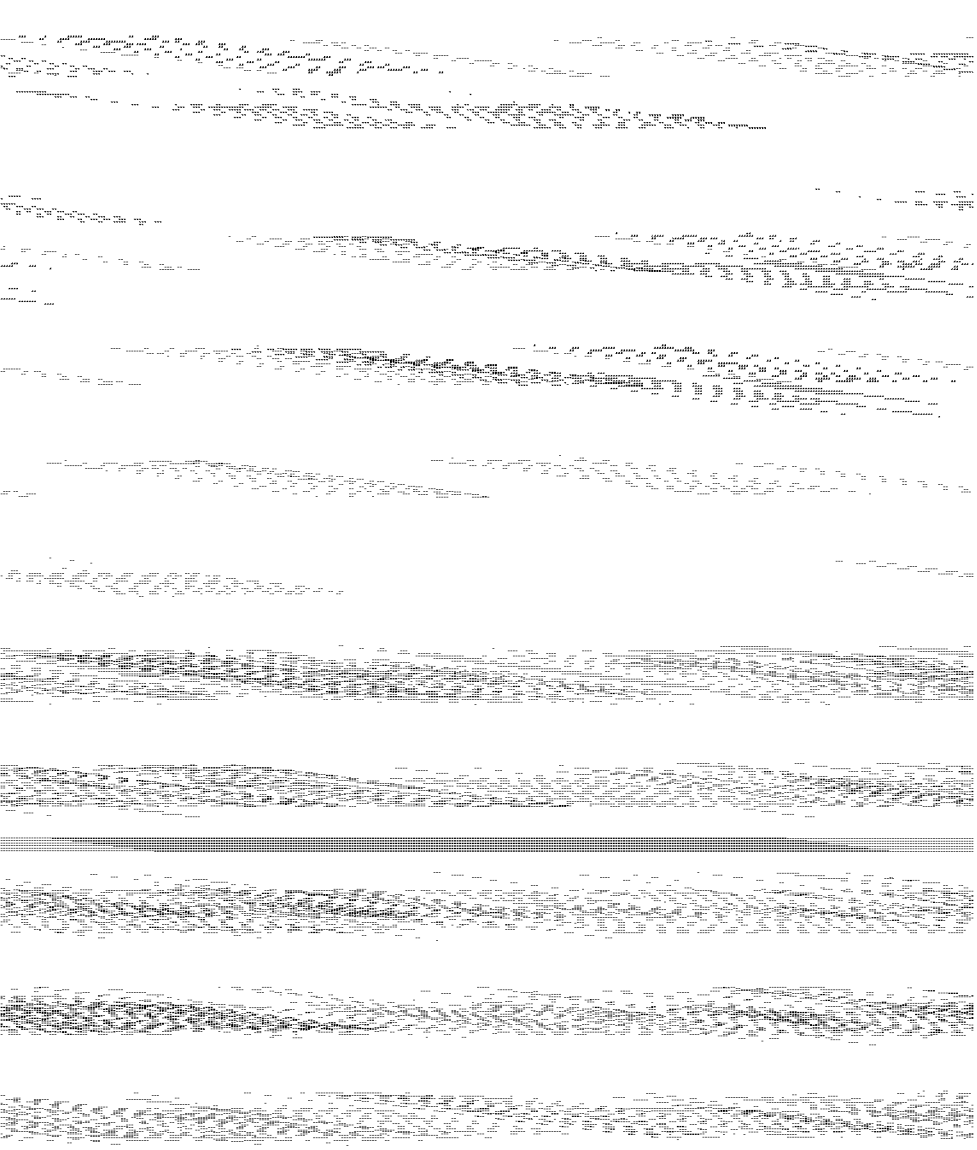
1.3 DNA提取

将胃癌组织蜡片放入Eppendorf管中,二甲苯脱蜡,95%乙醇水化后,蛋白酶K消化,采用酚/氯仿抽提法提取DNA。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和280 nm时的吸收值,计算核酸的浓度和纯度。

1.4 PCR-RFLP分析

取约1 μg组织DNA,溶于40 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、dCTP和dTTP,1.0 μmol/L引物,1~3 U Taq DNA多聚酶)中,PCR扩增仪(Perkin Elmer Cetus)上操作:95℃变性40 s,55℃复性40 s,72℃延伸70 s,35个循环后72℃放

?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

由附表可见，根据肝癌患者血清HBsAg和AFP阳性与否及基础病变、肿瘤大小、分化程度和有无转移的不同进行分组，血清HBsAg阳性组ras基因突变率(53.6%)显著高于HBsAg阴性组(20.0%)($P<0.05$)；低分化肝癌组ras基因突变率(70.0%)显著高于高分化癌组(26.7%)($P<0.05$)；有转移组阳性率(83.3%)显著高于无转移组(35.1%)($P<0.05$)，其它组间ras基因突变率则无显著差异($P>0.05$)。不同组别中P^{53}基因的突变率均无显著差别($P>0.05$)。

3 讨论

肝癌的发生是多病因和多阶段的过程，在其发生发展过程中可能有多种癌基因和抑癌基因的参与。国外研究发现，经黄曲霉毒素B_1(AFB_1)诱发的大鼠肝癌中均有c-Ki-ras第12密码子的点突变，提示c-Ki-ras第12密码子突变是AFB_1引起的肝癌最常见的改变[4]。有关肝癌组织ras族癌基因突变的研究国内尚未见明确报道，本研究对43例人原发肝癌ras族基因点突变进行分析，c-Ha-ras第12和61密码子未发现有突变者，c-Ki-ras第12密码子突变率仅为6.9%，13密码子未发现有突变，提示重庆地区人原发肝癌c-Ki-ras第12密码子突变并不常见。

国内顾建人等从mRNA水平对原发肝癌N-ras的表达进行研究，21例肝癌中发现17例有N-ras mRNA的过量表达[5]。林月珍等亦发现，在二乙基亚硝胺诱发大鼠实验性肝癌的早期，N-ras mRNA的表达明显增高[6]。本研究进一步对N-ras基因第12密码子点突变进行分析，发现有突变者16例，突变率为37.2%。提示N-ras第12密码子突变是人原发肝癌基因突变热点之一。引起突变的原因尚不十分明了，从本组资料看，血清HBsAg阳性组ras基因突变率为53.6%，阴性组为20%，两组突变率有明显不同，提示乙肝病毒感染可能与突变有关，但引起突变的确切机制尚有待进一步研究。

关于肝癌组织P^{53}基因突变国内外已有不少研究，但结果不尽一致。Hsu等报道启东和南非地区的肝癌P^{53}基因第249密码子突变率高达50%[7,8]；Hayward等检测澳大利亚肝癌第249密码子未发现有突变者[9]；晚近，Unsal等综合分析莫桑比克、南非、中国和德国肝癌P^{53}第5～9外显子点突变，突变率分别为69%、15%、19%和37.5%，且突变位点分布在多个编码区[10]。本文检测了43例原发肝癌248和249密码子点突变，249密码子突变主为20.9%，248密码子未发现有突变者。这种突变率和突变位点的不同可能与地理环境、病原和检测方法的不同有关。

突变型ras基因和突变型P^{53}基因的协同作用可以使鼠原代细胞转化已被实验所证实[11]。本组43例肝癌组织同时有ras和P^{53}基因突变者5例，占11.6%，说明肝癌的发生发展过程可能有这二种突变型基因的协同作用参与。但从本文资料看，大部分肝癌并未发现有ras和P^{53}基因的突变，说明这二种基因突变并非肝癌发生发展中必然出现的改变，可能还有其它基因或因素参与，需进一步研究。此外，本研究还发现ras基因突变与肝癌的某些生物学行为有关，低分化肝癌组ras基因突变率显著高于高分化组；有转移组ras基因突变率显著高于无转移组，提示有ras基因突变肝癌患者预后不良，其在预测肝癌患者预后方面的意义尚需进一步随访来证实。

参考文献

1 Koh EH, Chung HC, Lee KB, et al. Point mutation at codon 12 of the c-Ha-ras gene in human gastric cancers. J Korean Med Sci, 1992, 7: 110

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

3 王俊茹，邓国仁，刘为纹，等. ras癌基因点突变的研究. 第三军医大学学报，1993，15(2)：91

4 Soman NR, Wogan GN. Activation of the c-Ki-ras oncogene in aflatoxin B_1-induced hepatocellular carcinoma and adenoma in the rat: detection by denaturing gradient gel electrophoresis. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 2045

5 顾建人，陈渊卿，蒋惠秋，等. 人原发性肝癌的癌基因谱. 肿瘤，1988，8：289

6 林月珍，丁 濂，陈晋彦. 癌前变异肝细胞c-myc、N-ras mRNA的表达及其与分化的关系. 中华肿瘤杂志，1993，15：97

7 Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, et al. Mutational hotspot in the P^{53} gene in human hepatocellular carcinomas. Nature, 1991, 350: 429

8 Scorsone KA, Zhou YZ, Butel JS, et al. P^{53} mutations cluster at codon 249 in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinomas from china. Cancer Res, 1992, 52: 1635

9 Hayward NK, Walker GJ, Cooksly WGE. Hepatocellular carcinomas mutation. Nature, 1991, 352: 764

10 Unsal H, Yakicier C, Marcais C, et al. Genetic heterogeneity of hepatocellular carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 822

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

(收稿：1994-07-02；修回：1994-09-16)

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

Studies of the point mutation of ras oncogene and suppressor gene P^{53} in 43 cases of hepatocellular carcinoma

Fang Dianchun, Luo Yuanhui, Lu Rong, Xiao Wenhua, Liu Weiwen, Men Rongpu, Jin Huayuan (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The point mutation of ras oncogenes and suprressor gene P^{53} were studied in 43 formalin-fixed and paraffin embedded specimens of primary hepatocellular carcinoma with polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). It was found that the overall rate of the point mutation of ras genes was 41.9% (18/43). Mutation at codon 12 of N-ras and codon 12 of c-Ki-ras were identified in 37.2% (16/43) and 6.9% (3/43) of cases but no mutation could be detected at codon 13 of c-Ki-ras and codon 12 and 61 of c-Ha-ras. Mutation at codon 249 of P^{53} was found in 20.9% (9/43) of cases but none at codon 248. These findings suggest that the point mutation at codon 12 of N-ras and codon 249 of P^{53} is common in hepatocellular carcinoma.

Key words hepatoma; oncogene ras; suppressor gene P^{53}; point mutation

（上接 339 页）

2　护理要点及其依据

2.1　严密观察大便状况

观察病人腹泻开始时间、大便性状、次数。由于腹部放疗多累及肠道，肠上皮是放射敏感组织，肠上皮干细胞尤易受损，轻者分裂抑制，重者细胞坏死，绒毛上皮失去来源而裸露，肠粘膜通透性增高，液体以至红细胞渗出，粘液分泌也可增加，加以肠蠕动亢进，故发生腹泻，大便呈现不同的性状。如损伤特别严重，大片粘膜上皮脱落，即大便内出现膜样物。大量纤维蛋白渗出物排出时可含有伪膜。护理时要不厌脏臭亲自观察大便性状，并将大便标本及时送检，协助有关部门做好大便涂片，染色观察和细菌（包括厌氧菌）培养。如腹泻次数在每日5次以上，并带血、含膜样物、奇臭，要特别注意并发症的发生，主要包括肠源性感染、肠道大出血，以至肠穿孔。

2.2　注意病人的全身状况

严重的放射性肠炎，多引起全身反应。特别要注意病人的一般状态（虚弱），体温、脉搏、血压和水电解质等变化。由于肠粘膜屏障功能的削弱以至破坏，多引起肠腔毒性物质（如内毒素）和细菌的入侵，引起毒血症、败血症[1]。发烧往往是感染的先兆。由于严重腹泻，丢失大量肠液和水分，易发生脱水和电解质紊乱，甚至发生休克。因此，护理时要密切注意病人的全身状况，水与电解质平衡[2]。及时监测这些指标，要严格记录出入量，及时合理补充液体，先盐后糖，并观察病人有无不良反应。

2.3　及时正确送检各种标本

各种标本应及时送检，尤其是留取厌氧菌感染标本。应在病人大便后立即将大便装在留取标本的容器内，装满严加盖及时送检，否则会影响化验结果。普通培养大便和涂片标本用清洁大便盒送检，如果确有肠粘膜坏死脱落要涂片检查，每日至少送2～3次，协助医师观察病情的动态变化。

2.4　重视人工肛门的护理

对结肠造瘘患者，由于腹泻，便液不能自控常粘污刺激瘘口周围皮肤，引起皮肤炎症。因此，周围组织要用凡士林油纱布保护，并在周围皮肤涂氧化锌软膏，要保持造瘘口周围清洁、干燥、粪袋及时清洗干净，晾干后勤更换。

2.5　注重饮食护理

腹部放疗伴有肠道反应的病人应特别注意饮食护理。一般肠炎病人给予高蛋白清淡饮食，多吃一些苹果，苹果有收敛作用可以防止腹泻，并嘱注意少食多餐及饮食卫生。每日腹泻5次以上者，应给予半流质饮食，最好每天喝1～2杯酸牛奶。这样可增加肠道内革兰氏阴性杆菌生长，抑制革兰氏阳性杆菌的生长，有利于病情的恢复。厌食或不能进食者，应增加体外营养液的补充。

2.6　做好心理护理

肿瘤病人常情绪低落，放疗又增加病痛，使病人在心理上发生不良反应。护理人员必须从全心全意为伤病员服务的精神出发，耐心细致地做好心理护理。一是鼓励病人同肿瘤和放疗反应作斗争的意志，增强信心，坚强乐观；二是讲清放疗可能引起的不良反应，但这是治疗肿瘤所必须的，要忍受，放疗反应本身是暂时的、可以治疗、恢复的，因而一定要配合医疗，坚持疗程；三是组织安排好适合于病情的其它配合活动，如开展适当的体育锻炼，文娱活动，以增加生活乐趣，调节病员的情绪；四是要主动关心、体贴病人，视病人为亲人，谈心交友，尽可能满足他们的合理要求；五是密切地注意病人情绪变化，有针对性地做好思想稳定工作，防止病人出于悲观绝望而发生事故。

关键词　腹部肿瘤/放射疗法；护理

中图法分类号　R735.5

参考文献

1　程天民. 防原医学. 上海：上海科学技术出版社，1986：226

2　徐采朴，袁爱力，江正辉，等. 实用消化病诊疗手册. 成都：四川科学技术出版社，1985：180

（收稿：1994-06-15；修回：1994-09-20）

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