DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.03.003

胃癌及癌旁组织中p53基因和Rb基因的研究

王俊茹 刘为纹 王 冰* 吕有勇* 邓国仁* (第三军医大学西南医院消化科) 630038

提 要 本文使用Southern杂交方法分析了胃癌组织中p53基因和Rb基因的缺失和重排;使用PCR-RFLP技术分析了p53基因第248位、249位密码子的点突变。研究结果显示:30例胃癌组织中9例有p53基因的缺失或重排;42例胃癌组织中两例有p53基因第248位密码子的点突变;15例胃癌组织中两例有Rb基因的缺失和重排。

关键词 胃肿瘤;致癌基因;p53基因;Rb基因

p53基因和Rb基因是重要的抑癌基因,它们在肿瘤发生、发展中起着重要的作用[1,2]。目前已在多种人类肿瘤中发现p53基因和Rb基因的失活[3,4]。胃癌组织中此两种基因的研究国内、外尚未见报道。本文使用Southern杂交方法分析了胃癌组织中p53基因和Rb基因的缺失和重排;使用PCR-RFLP方法分析了p53基因第248位、249位密码子的点突变,以探索p53基因和Rb基因在胃癌发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本:42例胃癌及癌旁组织(距癌组织5cm)标本来自山东省威海市医院和北京市肿瘤所。手术后立即将组织放入液氮或-70℃冰箱内冻存。所有标本均经病理医生诊断。

1.1.2 正常人血标本:28例正常人血标本来自北京医科大学附属一院正常献血员。

1.1.3 细菌、质粒:大肠杆菌HB101来自北京市肿瘤所;含Rb cDNA基因探针的质粒pUC_{19}由Harward赠送;含p53 cDNA基因探针的质粒pGEM由NIH/NCI赠送;含人珠蛋白单拷贝基因的质粒pUC由医科院基础所赠送。

1.1.4 主要试剂、酶及其它:琼脂、胰蛋白胨、酵母粉(DiFCo. Oxioid)、琼脂糖(BRL公司)、小牛血清白蛋白(Sigma公司)、Nick Translation Kit(BRL公司)、[α-^{32}P]dCTP(NEN公司)、Sephadex G_{50}(Sigma公司)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、TEMED(Sigma公司)、硝酸纤维素膜(Schleicher-Schuell公司)、Taq DNA多聚酶(Cetus公司)、限制性内切酶Hind Ⅲ、Bgl Ⅱ、Hpa Ⅰ、Msp Ⅰ、Hae Ⅲ(BRL公司、华美生物工程公司)。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取

1.2.1.1 组织DNA的提取:将0.5~1g的组织剪碎,按Shih等的方法[5]制备高分子量的DNA。

1.2.1.2 白细胞DNA的提取:按Maniatis等的方法[6]进行。

1.2.2 探针的制备及同位素标记

1.2.2.1 用已插入基因探针的质粒转染大肠杆菌(氯化钙转化程序)。

1.2.2.2 迅速小量制备质粒DNA(SDS法)。

1.2.2.3 大量制备质粒DNA(硷裂解法)。

1.2.2.4 基因探针片段的分离和纯化:p53 cDNA基因探针长1.6kb,载体pGEM长2.8kb。含p53基因探针的质粒被扩增后,用Xba Ⅰ酶切、1.0%琼脂糖电泳,切下含1.6kb片断的凝胶,用电洗脱的方法回收基因片段。Rb cDNA探针全长4.7kb,内有一个限制性内切酶EcoRI的识别位点,所以当用EcoRI将其从pUC_{19}质粒上切下时,也将RbcDNA探针切成两个片段:0.9kb和3.8kb,我们以3.8kb作为基因探针。

2.2.5 探针的标记:用Nick Translation方法标记探针。将标记好的变性探针加到Sephadex G_{50}柱内,TE缓慢冲洗。收集第一峰,记录参入效率,本实验的参入效率为30%~50%。

1.2.3 Southern杂交[7]:取胃癌、癌旁组织、正常人白细胞DNA 12μg,分别用限制性内切酶Bgl Ⅰ、Hind Ⅲ消化。消化完全后,0.8%琼脂糖凝胶电泳。以Hind Ⅲ消化的λ DNA作为分子量标准。电泳完毕、琼脂糖凝胶变性、中和、Southern转移到硝酸纤维素膜上、80℃烤膜2 h。将硝酸纤维素膜放入塑料袋中,加入预杂交液(6×SSC、0.5% SDS、5×Denhardt溶

* 北京市肿瘤研究所

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

液、100μg/ml 变性鱼精 DNA、50%甲酰胺)，42℃保温过夜。然后加入同位素标记的变性探针，42℃保温6～18 h。洗膜、放射自显影。

1.2.4 多聚酶 DNA 链延伸反应(PCR)：参照 Saiki 的方法[8,9]加以改进。取1μg 胃癌组织 DNA，溶于60μl 缓冲液中(缓冲液含10mM Tris-HCl pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl、0.2mM dATP、0.2mM dGTP、0.2mM dCTP、0.2mM dTTP、1μM 引物，1～3单位 Taq DNA 多聚酶)，溶液上层加液体石蜡。将试管置 PCR 扩增仪上，95℃变性70s、57℃复性70s、72℃延伸70s。重复以上循环30次。在最后一次延伸锅内放置10min，移去上层液体石蜡，取10μl 用4%聚丙烯酰胺电泳进行分析。

1.2.5 限制性片段长度多态性分析：将 PCR 扩增产物分别用 Hpa Ⅱ/Msp Ⅰ和 Hae Ⅲ消化12～24 h，酶解产物用4%聚丙烯酰胺电泳进行分离。

1.2.6 分析 p53基因第248位、249位密码子点突变引物：p53基因第247位密码子最后一个核苷酸 C 和248位密码子 CGG 构成 CCGG——Hpa Ⅱ或 Msp Ⅰ的酶切位点；第249位密码子后两个核苷酸 GG 和第250位密码子前两个核苷酸 CC，形成 GGCC，这正好是限制性内切酶 Hae Ⅲ的识别位点。PC13的序列为 p53基因第七外显子正链上游内含子第23～44个核苷酸之间的序列；PC14为第七外显子负链下游最后11个核苷酸和内含子前9个核苷酸之间的序列。使用 PC13和 PC14进行 PCR 扩增后产物分别用 Hpa Ⅱ/Msp Ⅰ和 Hae Ⅲ酶消化，可测定248位和249位密码子的点突变(图1)。

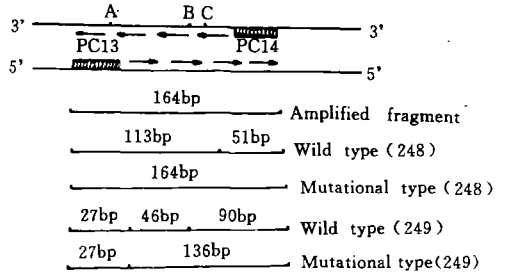


图1 分析 p53基因248、249位密码子点突变引物设计原理

A：Hae Ⅲ内对照位点；B：Hae Ⅲ249密码子位点；C：248位密码子 Hpa Ⅱ或 Msp Ⅰ位点

Fig 1 Schematic diagram of the p53 codon 248 and 249 assays

A: control cleavage site of the restriction endonuclease hae Ⅲ; B: Hpa Ⅱ or Msp I cleavage site at dodon 248; C: Hae Ⅲ cleavage site at codon 249.

2 结果

2.1 p53基因

2.1.1 p53基因的多态性：30例癌及癌旁组织 DNA 经 Bgl Ⅰ消化，Southern 杂交，发现 p53基因存在着多态性。多态性有3种类型：12kb、9kb 以及12和9kb，癌旁组织和癌组织多态性一致(图2)。为了解胃癌组织 p53基因多态性和正常人分布是否一致，对28例正常献血员白细胞 DNA 进行 Southern 杂交分析。发现正常人也存在着 p53基因的多态性。其多态性分布和肿瘤患者无明显差异($P>$)

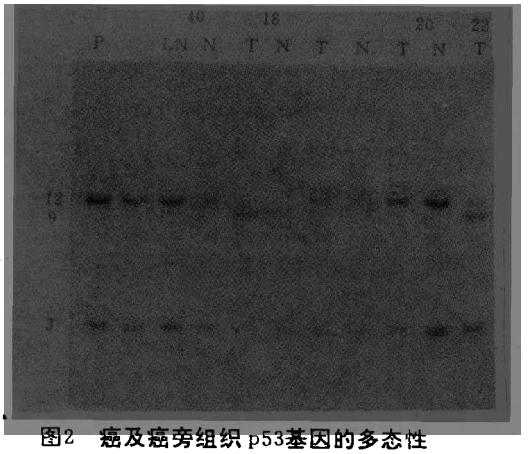


图2 癌及癌旁组织 p53基因的多态性

T：肿瘤组织；ML：转移的淋巴结组织；N：癌旁组织

Fig 2 Bgl Ⅰ restriction site polymorphism in the human p53 gene in gastric cancer tissue

T: tumor tissue; ML: metastatic lymphaden; N: juxtacancerous tissues

2.1.2 p53基因的缺失、重排：组织 DNA 用 Bgl Ⅰ酶切、Southern 转移、p53 cDNA 探针杂交后，发现30例胃癌组织中7例(23.3%)在12或9kb处杂交信号减弱或消失，而下边3kb的杂交信号存在(图3)。将硝酸纤维素膜上的探针洗掉，用单拷贝的人珠蛋白基因探针杂交，显示杂交信号的强弱较一致，说明 p53基因有缺失或部分缺失(图3)。另有2例胃癌组织出现了异常 kb 的杂交信号，而人胎盘组织和癌旁组织杂交信号正常，说明 p53基因有重排(图4)。

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

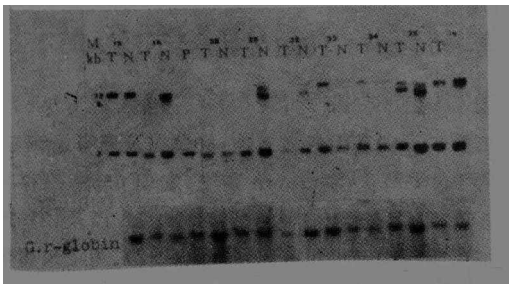


图3 胃癌及癌旁组织中 p53基因的缺失

16号癌组织有等位基因的缺失；28号癌及癌旁组织均有缺失；29号、32号癌组织有部分缺失

Fig 3 Deletion of p53 gene in gastric cancer tussues

16: tumor tissue with deletion; 28: tumor tissue and juxtacancerous tissue with deletion; 29: tumor tissue with partial deletion; 32: tumor tissue with deletion.

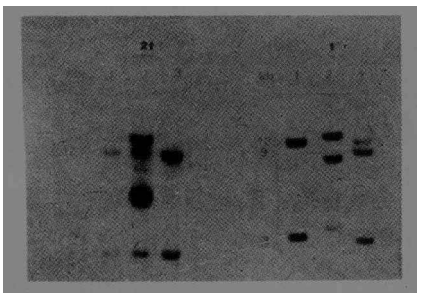


图4 胃癌组织中 p53基因的重排

1. 胎盘组织；2. 胃癌组织；3. 癌旁组织

1号胃癌标本：正常的12kb片段增大，约14.5kb。正常的9kb变小，约7kb，3kb的杂交信号消失，代之出现的是3.3kb。而癌旁组织片段大小正常。

21号胃癌标本：正常的12kb、3kb杂交信号存在，但多出一条16.8kb和一条5.0kb的杂交信号，而且多出的两条信号增强，说明基因重排后有扩增。

Fig 4 Rearrangement of p53 in gastric cancer tissues

Lanes: 1. DNA obtained from normal placenta tissue; 2. DNA obtained from gastric cancer; 3. DNA obtained from juxtacancerous tissues.

2.1.3 p53基因第248位、249位密码子点突变分析：用 PC13和 PC14引物对42例胃癌组织 DNA 进行 PCR 扩增后，取1/6进行4%聚丙烯酰胺电泳鉴定。确定是所需片断后，1/2用 Hpa Ⅱ/Msp Ⅰ 酶切、1/2用 Hae Ⅲ 酶切。酶切产物用4%聚丙烯酰胺电泳分离。第248位密码子如无突变切成113和51bp 两个片断；如有突变 CCGG 切点不能切开，仍是164bp。PCR 扩增产物用 Hae Ⅲ 酶切后，野生型被切成99bp、46bp、27bp 三个片断，突变型切成136bp 和27bp 两个片段。经分析，42例胃癌组织中两例有248位密码子的点突变；249位密码子未见有突变。

2.2 Rb 基因

Rb 基因全长200kb，由27个外显子构成，当用 Hind Ⅲ 酶将基因组 DNA 酶切后，用 Rb 3.8kb 基因探针杂交，可在9.8kb、7.5kb、6.2kb、5.3kb、4.5kb、2.1kb、1.5kb 处见到杂交信号。在人类肿瘤中常见的缺失片段是7.5kb 和4.5kb。15例胃癌及癌旁组织 DNA 用 Rb 基因探针 Southern 杂交后发现2例有4.5kb片断的缺失。1例除有4.5kb片段缺失外，在1.8kb 处有一异常的杂交信号，而癌旁组织正常，这可能是 Rb 基因缺失后发生了重排(图5)。此2例有 Rb 基因缺失的病例全是粘液腺癌。

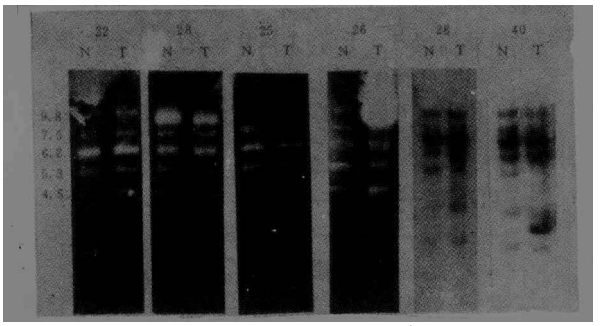


图5 胃癌组织中 Rb 基因的缺失和重排

22号、23号、25号、26号无 Rb 基因缺失；28号：肿瘤组织缺失一条4.5kb 片段，癌旁组织正常；40号：肿瘤组织缺失一条4.5kb片段，同时在1.8kb 处有一异常片段。

Fig 5 Deletion and rearrangement of Rb gene in gastric cancer tissues

There are not deletion or rearrangement in number 22, 23, 25 and 26; Number 28: deletion in 4.5kb; Number 40: deletion in 4.5kb with abnormal fragment in 1.8kb.

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

3 讨论

3.1 p53基因和胃癌

p53基因是重要的抑癌基因，目前已在多种肿瘤中发现 p53基因的失活[1~4]。点突变是p53基因失活的一种方式[10]。最近在50%(5/10)启东肝癌中发现 p53基因第249位密码子的点突变，南非的肝癌中也有50%(8/16)发生点突变，而且大多数也是发生在249位密码子[11]。249位密码子如此高的突变率表明，这个位点可能是与肝癌发生有关的热点区。为了解胃癌组织中是否存在 p53基因第248位和249位密码子的点突变，我们使用 PCR-RFLP 方法分析了42例胃癌组织，发现2例有248位密码子的点突变，而在249位密码子内未发现点突变，说明这两个位点的突变在胃癌中不常见。

通过对成骨肉瘤、慢性白血病急变、肺癌、横纹肌肉瘤[12~15]等肿瘤的研究发现，p53基因的缺失或重排很常见，占5%～30%。我们首次使用 Southern 杂交的方法对胃癌及癌旁组织进行了研究，发现23.3%(7/30)的病例有 p53基因的缺失；6.7%(2/30)有 p53基因的重排。这些结果显示，p53基因的失活在胃癌组织中较常见，很可能在胃癌的发生发展中起着重要的作用。

3.2 Rb 基因和胃癌

Rb 基因即视网膜母细胞瘤敏感基因，它的失活可导致视网膜母细胞瘤的发生。目前已在骨肉瘤、软组织肉瘤、小细胞肺癌、膀胱癌和乳腺癌等肿瘤中发现 Rb 基因的失活，因此认为 Rb 基因是一广泛的抑癌基因[1~3]。Rb 基因失活的方式有缺失、重排和点突变等。本实验使用 Southern 杂交的方法对15例胃癌组织及癌旁组织进行了研究，发现2例胃癌组织有 Rb 基因的缺失，其中1例伴有 Rb 基因的重排；而且有缺失或重排的病例全是粘液腺癌。Rb 基因的异常是否和粘液腺癌的发生或发展有关，值得进一步研究。

参考文献

1. Levine AJ, Momand J. Tumor suppressor genes: the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and gene products. Biochemica Biophysica, 1990; 1032:119
2. Hallingsworth RE, Lee Wenhua. Tumor suppressor genes: new prospects for cancer research Natl Cancer Inst, 1991; 83:91
3. Porta GD, Radice P, Pierotti MA. Onco-suppressor genes in human cancer. Tumori, 1989; 75:3
4. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. Mutation in the p53 gene occur in diverse human tumour types. Nature, 1989; 342:705
5. Shih C, Weinberg RA. Isolation of a transforming sequence from a human bladdercarcinoma cell line. Cell, 1982; 29:161
6. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Isolation of DNA from mamalian cell. Molecular coloning. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 9.16
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Analysis of genomic DNA by Southern hybridization. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 9.31
8. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel SJ, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 1988; 239:487
9. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. p53mutation in human cancer. Science, 1991; 253: 49
10. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, et al. Mutational hotspot in the p53 gene in humanhepatocellular carcinomas. Nature, 1991; 350:427

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

11. Masuda H, Miller C, Koeffler HP, et al. Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84: 7716
12. Kelman Z, Prokocimer M, Peller S, et al. Rearrangement in the p53 gene in philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemla. Blood, 1989; 74: 2318
13. Mulligan LM, Matlashewski GJ, Scrable HJ, et al. Mechanisms of p53 loss in human sarcomas. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 5863
14. Takahashi T, Nau MN, Chiba I, et al. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. Science, 1989; 246: 491

(收稿: 1992-11-05; 修回: 1993-05-12)

A study on p53 and Rb genes in gastric cancer and juxtacancerous tissue

Wang Junru, Liu Weiwen, Wang Bing, et al (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The deletion and rearrangement of p53 and Rb genes were studied in gastric cancer with Southern blot hybridization and the point mutation in 248 and 249 codons of p53 was studied with PCR-RFLP. It was found that deletion or rearrangement of p53 was seen in 9 cases out of 30 cases of gastric cancer and point mutation at 248 codon of p53 in 2 cases out of 42 cases, and deletion and rearrangement of Rb gene were seen in 2 cases out of 15 cases.

Key words stomach neoplasms; oncogenes; p53 genes; Rb genes

(上接 197 页)

组相比差异无显著意义($P > 0.05$);脑出血与正常对照组相比有显著性差异($P < 0.01$)。

3 讨论

以上结果表明:闭塞性脑血管病和正常对照组测得的数值均在正常参考值以内;而脑出血组测得的总活性均明显地超过正常参考值。脑出血 CSF-LDH 显著增高,而闭塞性脑血管病则正常。当脑出血 CSF 清亮而不易与脑血栓鉴别时,若测定 CSF-LDH,则有助于二者的区别。有的作者认为脑血管病和脑出血 CSF-LDH 的总活性增高[2];也有作者认为闭塞性脑血管病的 CSF-LDH 总活性基本正常[3]。本文资料说明 CSF-LDH 总活性增高可作为诊断出血性脑病的一项诊断指标。

关键词 脑髓脊液;乳酸脱氢酶类

参考文献

1. 王同明,主编。生物化学及检验技术。南京:江苏科学技术出版社,1986:340
2. 夏 强。脑脊液检查的某些新进展。脑电图学与神经精神疾病杂志,1986;2(2):107
3. 袁光厚。脑、脊髓肿瘤脑脊液乳酸脱氢酶同功酶的改变。中华神经精神科杂志,1987;20(2):116

(收稿:1993-03-19;修回:1993-05-10)

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