DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.06.002

胃癌及癌旁组织中 ras 癌基因扩增、重排和缺失的研究

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

提 要 本文使用 Southern 杂交技术研究了 33 例胃癌及癌旁组织中 c-Ha-ras、K-ras、N-ras 癌基因的扩增、重排和缺失。结果显示：25.8% (8/33)病例有 c-Ha-ras 基因的扩增、重排和缺失；3.8%(1/26)病例有 K-ras 基因的扩增；N-ras 基因无上述改变。

关键词 胃肿瘤；ras 基因；基因增强；重组，基因；染色体缺失

ras 基因家族是重要的真核基因家族，由 c-Ha-ras、K-ras、N-ras 3 种基因组成，在细胞生长和分化中起着重要的作用。近来发现，多种肿瘤中有 ras 基因的激活，激活主要为点突变[1]。邓国仁等已在胃癌细胞株和胃癌组织中发现 ras 基因的点突变，并显示点突变和病人预后有关[2,3]。为了解 ras 癌基因家族在胃癌组织中其它的激活方式、探索 ras 基因激活在胃癌发生、发展中的作用，我们使用 Southern 杂交的方法在胃癌和癌旁组织中同时进行 c-Ha-ras、K-ras、N-ras 3 种癌基因的研究。

1 材料与方法

1.1 组织标本

33 例胃癌及癌旁(距癌组织 5cm 远)组织来自山东省威海市医院和北京市肿瘤所。手术后马上将组织放入液氮或－70℃冰箱内冻存。所有标本均经病理医生诊断。将 0.5～1g 组织剪碎，按 Shih 法[4]制备高分子量的 DNA。

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。血液中白细胞 DNA 的提取按 Maniatis 法[5]进行。

1.3 基因探针质粒

c-Ha-ras 基因探针质粒为邓国仁教授从 BGC823 胃癌细胞株中克隆出的重组质粒；v-K-ras 基因探针质粒为美国 Weinberg 实验室赠送；c-N-ras 基因探针质粒为美国 Merch 实验室赠送。

1.4 探针的制备及同位素标记[5]

1.4.1 用已插入基因探针的质粒转染大肠杆菌(用氯化钙转化程序)。

1.4.2 迅速小量制备质粒 DNA(SDS 法)。

1.4.3 大量制备质粒 DNA(碱裂解法)。

1.4.4 基因探针片断的分离和纯化

c-Ha-ras 基因探针长 6.6kb，载体长 4.3kb。含 c-Ha-ras 基因探针的质粒被扩增后，用 BamHl 酶消化，琼脂糖凝胶电泳，切下含 6.6kb 的片断；c-N-ras 基因探针长 6.1kb，载体长 2.9kb。含 c-N-ras 基因探针的质粒被扩增后，Hind Ⅲ/Sac I 酶消化、琼脂糖凝胶电泳，切下 6.1kb 的片断；v-K-ras 基因探针长 1.0 kb，载体长 4.3 kb。质粒扩增后用 EcoRI 酶切、琼脂糖凝胶电泳，切下 1.0 kb 的片断。所有切下的凝胶用电洗脱的方法回收基因探针片断。

1.4.5 基因探针标记

用随机引物法标记基因探针。将标记好的探针加到 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%。

1.5 Southern 杂交

取胃癌和癌旁组织、正常人白细胞 DNA12μg，用限制性内切酶 BamHl、Bgl Ⅰ消化。待消化完全后，0.8%琼脂糖凝胶电泳。电泳完毕，琼脂糖凝胶板变性、中和，用 Southern 法将 DNA 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粒袋中，加入预杂交液(6xSSC、0.5% SDS、5xDenhardt 溶液、100μg/ml 变性的鱼精 DNA、50%甲酰胺)，42℃保温过夜。然后加入 α-^{32}pdCTP 标记的变性探针，42℃保温过夜。洗膜、放射自显影。

2 结果

2.1 c-Ha-ras 基因

2.1.1 c-Ha-ras 基因的多态性

* 北京市肿瘤研究所

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

不同个体的胃癌组织和其相对应的癌旁组织DNA有限制性片断长度多态性(RFLP),其长度从5.7～7.5kb不等,但多分布在5.9～6.3kb之间(图1)。28例正常人白细胞DNA也存在着RFLP,长度在6.3～7.7kb之间,大多数分布在6.6～6.8kb之间。胃癌组织DNA杂交片断的长度≤6.3kb的占84.6%(22/26);正常人白细胞DNA杂交片断≥6.6kb的占95.8%(23/24),$P<0.001$;这些结果显示,人的基因组中有c-Ha-ras基因的RFLP;癌组织DNA c-Ha-ras基因片断和正常人有明显差异。

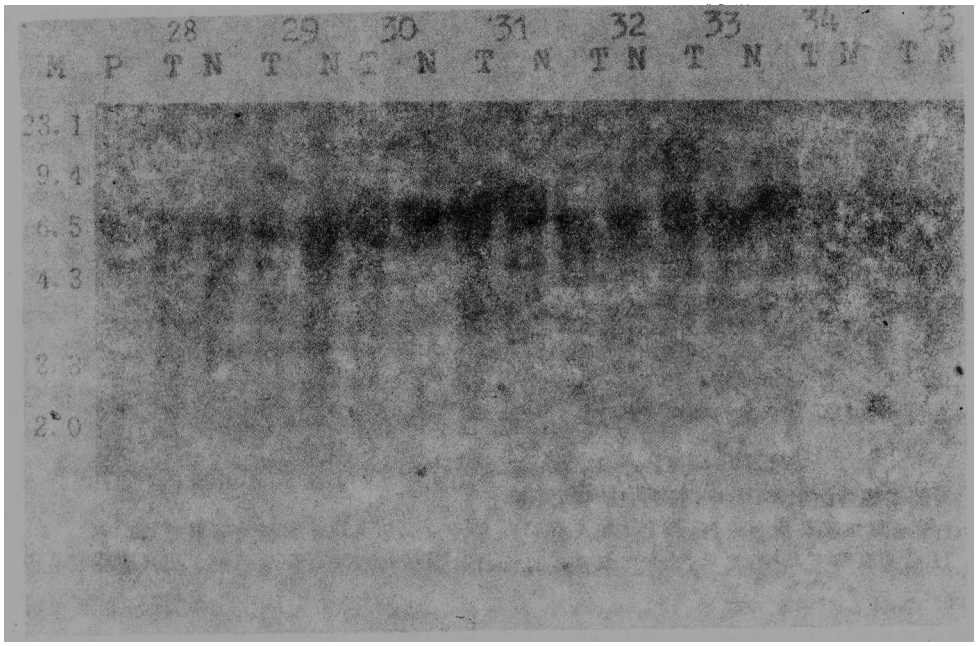


图1 胃癌及癌旁组织c-Ha-ras基因限制性内切酶酶切片断长度多态性分析
M:标准分子量标记为λDNA+Hind Ⅲ(以下同); P:胎盘DNA作为正常对照(以下同); T:肿瘤DNA(以下同); N:癌旁正常组织DNA(以下同); 胎盘DNA、28、29、30、32、和33为纯合子;31、34和35为杂合子。

2.1.2 c-Ha-ras基因的两种遗传型

从结果还可以看到人的c-Ha-ras基因有两种遗传型,一种是杂合状态,一种是纯合状态。肿瘤患者的杂合子占26.9%、纯合子占73.1%,和正常人白细胞DNA无明显的差异($P>0.05$)。

2.1.3 c-Ha-ras等位基因的缺失

7例有杂合状态的肿瘤组织中有一例癌组织丢失了一条等位基因,而癌旁组织正常(图2)。

2.1.4 c-Ha-ras基因的扩增、重排

在所检测的33例胃癌组织中有7例出现异常的基因片断,其中5例伴有基因的扩增。1例癌旁组织也同相对应的癌组织一样存在着基因的扩增;1例癌旁组织存在着基因的重排(图3)。

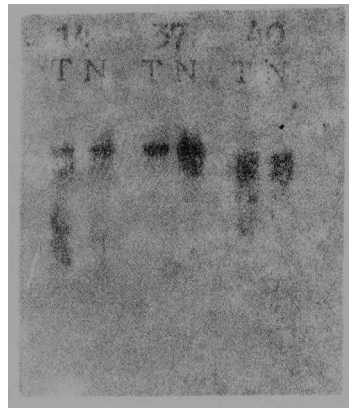


图2 c-Ha-ras等位基因的丢失
37号肿瘤组织中丢失了一个等位基因,而癌旁组织中两个等位基因存在

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

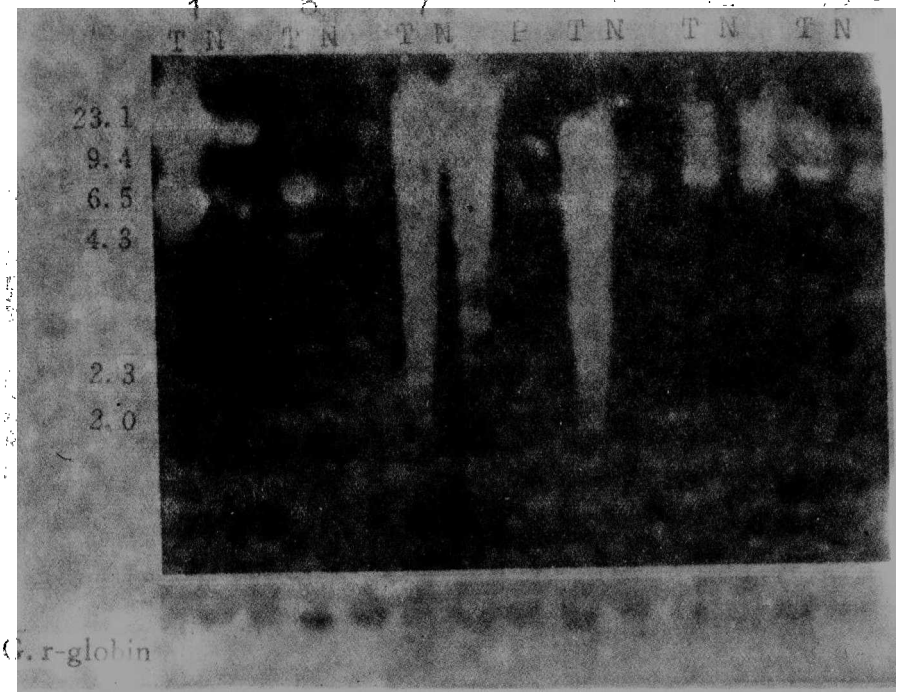


图 3 胃癌及癌旁组织 c-Ha-ras 基因的扩增、重排
1 号癌组织有扩增和重排，癌旁组织有重排； 7 号癌组织及癌旁组织均有扩增、重排；
11 号癌组织有扩增、重排，癌旁组织正常； 6、12、13 癌组织及癌旁组织无扩增及重排。

2.2 N-ras 基因

将硝酸纤维素膜上的 c-Ha-ras 基因探针洗掉，用 N-ras 基因探针杂交，可在 7.2kb 处见到杂交信号。33 例癌组织及癌旁组织 DNA 未见异常(结果未显示)。

2.3 K-ras 基因

将胃癌及癌旁组织 DNA 用 Bgl Ⅱ 消化，Southern 转移，以 K-ras 基因探针杂交，可在 11kb 处见到杂交信号。26 例胃癌组织中 1 例有扩增，且相对应的癌旁组织也有扩增(图 4)。



图 4 胃癌及癌旁组织 DNA K-ras 基因 Southern 杂交分析
21 号癌及癌旁组织 DNA 均有 K-ras 基因的扩增。其余癌及癌旁组织正常

3 讨论

c-Ha-ras 基因的 RFLP 主要是由于其基因的 3' 端 1.5kb 处有一串联的重复核苷酸区域，称为 VTR[6]。Ishii 等[7]报道，c-Ha-ras 基因中的 VTR 可能作为一种增强子起着加强基因表达的作用。国外的一些结果显示[8]，正常人和肿瘤患者 c-Ha-ras 基因的 RFLP 分布不同，这可能和肿瘤的易感有关。本研究也观察到正常人和胃癌患者 c-Ha-ras 基因 RFLP 不同，这是否与胃癌的易感有关，作者认为还需加大样本数和用 Msp Ⅰ/Hpa Ⅱ 限制性内切酶将 VTR 片断切下，Southern 杂交进行分析。

ras 基因激活的主要方式是点突变，但等位基因的缺失在许多肿瘤中都可见到，如在头颈部癌约 22%病例有 c-Ha-ras 等位基因的缺失[9]。而基因的扩增、重排相对比较少见。本实验中发现 3.8%(1/33)胃癌有 c-Ha-ras 基因

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

的缺失、21.2%(7/33)有上述基因的重排和扩增，结合我们以前的研究表明，在胃癌组织中 c-Ha-ras 基因除了第 12 位密码子点突变外，还有基因的扩增、重排和等位基因的缺失等激活方式，而且基因的扩增和重排也可能是其重要的激活方式。

日本人胃癌中主要是 K-ras 基因的激活，而 c-Ha-ras、N-ras 基因激活少见，如 Fujita 等人[10]在 43%胃腺瘤和 9%胃癌中发现 K-ras 基因的点突变；Ranzahi 等[11]在 10%胃癌中发现有 K-ras 基因的扩增。而中国人胃癌主要是 c-Ha-ras 基因的点突变，K-ras、N-ras 基因的点突变发生率很低。本文使用 Southern 杂交的方法分析了 3 种 ras 基因在胃癌中的变化，发现主要是 c-Ha-ras 基因的激活(25.8%)，而 K-ras 基因、N-ras 基因激活较少见。中国人和日本人胃癌有不同 ras 基因的激活，提示胃癌的致癌原可能不同，但也可能和地理环境的不同或种族差异有关。

在 3 例癌旁组织中也发现与相对应的癌组织一致的 ras 基因的扩增或重排，这提示 ras 基因的扩增或重排可能发生在肿瘤的早期。此外也给我们一些启示：有些癌旁组织学正常的粘膜实际上在分子水平已经发生了改变，这可能是肿瘤切除后复发的根源。

参考文献

1. Bos JL. ras oncogene in human cancer. Cancer Res, 1989;49:4682
2. Deng G, Lu Y, Shen S, et al. Activated c-Ha-ras oncogene with a guanine to thymine transversion at the twelfth codon in a human stomach cancer cell line. Cancer Res, 1987;47:3195
3. Deng Gouren, Liu Xuihuai, Wang Junru. Correlation of mutations of oncogene c-Ha-ras at codon 12 with metastasis and survival of gastric cancer patients. Oncogene Res, 1991;6:33
4. Shih C, Weinberg RA. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. Cell, 1982;29:161
5. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis J. Molecular Coloning. Cold spirng harbor laboratory New York, 1989:9,31
6. Capon DJ, Chen EY, Levinson AD. Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. Nature, 1983;302:33
7. Ishii S. Second Annual Meeting on Oncogénes Frederick, Maryland, 1986:111
8. Vineis P, Caporaso N. The analysis of restriction fragement length polymorphism in human cancer: a review from an epidemiological perspective. Int J Cancer, 1991;47:26
9. Sheng ZM, Barrois M, Klijanienko J, et al. Analysis of the c-Ha-ras-1 gene for deletion, mutation, amplification and expression in lymph node metastases of human head and neck carcinomas. Br J Cancer, 1990;62:398
10. Kihana T, Tsuda H, Hirota T, et al. Point mutation of c-Ki-ras oncogene in gastric adenoma and adenocarcinoma with tubular differentiation. Jpn J Cancer Res, 1991;82:308
11. Ranzani GN, Pellegata NS, Previdere C, et al. Heterogenous proto-oncogene amplification correlate with tumor progression and presence metastases in gastric patients. Cancer Res, 1990;50:7811

(收稿：1992-09-29；修回：1992-10-29)

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

A study on the amplification, rearrangement and deletion of ras-oncogenes in gastric cancerous and juxtacancerous tissues

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

Abstract The amplification, rearrangement and deletion of c-Ha-ras, K-ras and N-ras were studied in 33 cases of gastric cancerous and juxtacancerous tissues. It was found that the amplification, rearangement, and deletion of c-Ha-ras were shown in 25.8% (8/33) of cases and the amplication of K-ras in 3.8% (1/26). No such changes was found for N-ras.

Key words stomach neoplasms; ras genes; gene amplification; recombination, genetic; chromosome deletion

个案与短篇

一起由输液器引起的输液反应爆发流行

府伟灵 时凤丽 邹 英 薛国文* (第三军医大学西南医院感染研究室) 630038

1 流行情况与实验检查

1990 年 5 月 1 日至 5 日，西南医院普外科、传染科、肿瘤科、消化科等 4 个科室报告输液反应突然增多，平均每科每天有 2～4 人发生输液反应。以上 4 科的 168 例输液病人中共发生输液反应 26 例，发生率 15.5%。病人输液后感到头痛、寒战和发热(38.5～40℃)，使用药物治疗均无效，停止输液后反应自行消失，体温下降至正常。调查中发现上述科室均在 5 月份开始使用了一次性输液器(江苏金坛输液器厂生产，批号：890806-0)，其它未使用这批一次性输液器的 5 个科室，调查了 168 例，发生 2 例输液反应，发生率 1.2%，无暴发现象。

使用厦门鲎试剂厂生产的试剂，对一次性输液器进行热原检查。操作及结果判定均按说明书进行，结果抽样 20 份，阳性 6 份，阳性率 30%。对输液后余下的液体及输液采样做细菌培养 36 份，结果均为阴性。

2 讨论

输液作为治疗手段，广泛应用于临床病人，预防和控制输液反应是医疗工作中一个重要环节，除了注意严格执行输液过程中的消毒、灭菌程序外，输液器的质量及灭菌情况也要考虑。近年来市场上出现了许多粗制滥造，不合格的一次性输液器，未经临床应用试验而大量出售，以致引起输液反应，给病人带来痛苦，也影响医院的信誉。此次输液反应经流行病学调查以及实验室检验证实是因使用了江苏金坛县输液厂生产的一次性输液器引起的。医院已将这批产品退回生产厂家。国家医药局重申[1]，我国一次性输液(血)器生产布局失衡，非法经营现象严重，必须加强管理。由于其利润高，诱使不少企业和个体户无证生产，无证经营。仅江西省进贤县一度有近万名农民非法生产伪劣产品，严重危害人民健康和生命安全。因此我们建议医院在采购此类产品时应协同专业人员进行检查，合格产品方能购进。同时建议有关部门应立即对生产一次性输液器的厂家进行检查，防止不合格产品流入市场。

关键词 输液疗法/副作用

参考文献

1. 人民日报。国家医药局重申：严禁无证生产一次性输液器。1990.12.4 第二版。

(收稿：1992-03-27；修回：1992-08-27)

* 第三军医大学卫生防疫系流行病学教研室

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