DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.06.007

胃癌组织中 ras 基因点突变和病人预后关系的研究

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

提 要 本文使用 PCR-RFLP 方法分析了 42 例福尔马林固定、石蜡包埋胃癌组织中 c-Ha-ras 基因第 12 位和 61 位密码子、N-ras 基因第 12 位密码子、K-ras 基因第 12 位和第 13 位密码子的点突变。发现 14 例(33.3%)有 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子的点突变、2 例(4.8%)有 K-ras 基因第 12 位密码子的点突变,且点突变与胃癌患者的预后有关。我们认为,ras 基因点突变的检测可成为临床医生判断胃癌病人预后有价值的指标。

关键词 胃肿瘤;癌基因蛋白 P_{21} 突变;PCR-RFLP*

分类号 R730.23;R735.2

点突变是 ras 基因激活的主要方式。ras 基因第 12 位、13 位和 61 位密码子的点突变可使其获得转化细胞的能力。目前已在多种肿瘤中发现有 ras 基因的点突变,且点突变的存在与某些肿瘤的发生或预后有关[1,2]。胃癌组织中 ras 基因点突变研究较少,且病例分散,未见在同一组织中同时进行 3 种 ras 基因点突变的研究。本文使用 PCR-RFLP 方法对福尔马林固定、石蜡包埋的胃癌组织同时进行 c-Ha-ras 基因第 12 位和 61 位密码子、N-ras 基因第 12 位密码子、K-ras 基因第 12 位和 13 位密码子点突变的研究,探讨 ras 基因点突变在胃癌发生、发展中的作用,为指导临床工作提供帮助。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 胃癌组织标本:42 例(1983 年~1985 年)经福尔马林固定、石蜡包埋的、随访资料完整的胃癌组织标本来自北京市肿瘤所病理科。病人的临床资料见表 1。

表 1 42 例福尔马林固定、石蜡包埋组织临床资料(83~85 年)

Tab 1 Clinical characteristics of 42 patients with gastric cancer (83~85 year)

Age		28~73
Sex (M/F)		29/13
Disease stage	Ⅰ	1
	Ⅱ	16
	Ⅲ	18
	Ⅳ	7
Tumor differentiation		
Poorly differentiated		30
Moderately, Well differentiated		12

1.1.2 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 含 c-Ha-ras 基因的质粒:含原癌基因 c-Ha-ras 的质粒 pbcN I 为美国国立癌症研究所 Barbacid 博士赠送;含第 12 位密码子点突变的 c-Ha-ras 基因质粒 pGC 6.6 为北京市肿瘤研究所邓国仁教授从 BGC 823 胃癌细胞 DNA 中克隆出的重组质粒[3]。

1.1.4 PCR 引物 PC1A、PC2B、PC3、PC4、PC7、PC8、PC9、PC10 由北京大学生命科学中心合成。

1.1.5 工具酶类:限制性内切酶 Hpa Ⅱ、Msp I、BstN I、Hph I 购自美国 BRL 公司和华美生物工程公司;Taq DNA 多聚酶购自美国 Cetus 公司。

* 北京市肿瘤研究所

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

1.2 方法

1.2.1 从福尔马林固定、石蜡包埋组织中提取DNA：将石蜡块切成5μm的切片、二甲苯脱蜡、蛋白酶K消化、酚/氯仿抽提、乙醇沉淀、TE溶解[1]。

1.2.2 血液中白细胞DNA的提取：将10ml新鲜血液加入含有1.7ml ACD(0.48%柠檬酸、1.32%柠檬酸钠、1.47%葡萄糖)溶液的试管内。用1倍体积的PBS稀释，离心去上清，加入裂解缓冲液和蛋白酶K。然后分别用酚、酚/氯仿、氯仿/异戊醇抽提。

1.2.3 多聚酶链延伸反应(PCR)：按Saiki等人[5]的方法加以改进。取1μg DNA溶于60μl PCR缓冲液(10mmol/L Tris-HCl，50mmol/L KCl，1.5mmol/L MgCl，0.2mmol/L dATP、dGTP、dCTP、dTTP、1μm引物、1～3U Taq DNA多聚酶)中，溶液上层加50μl液体石蜡。将试管置于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。移去上层液体石蜡，取10μl用4%聚丙烯酰胺电泳进行分析。

1.2.4 限制性片段长度多态性分析(RFLP)：将PCR扩增产物用酚/氯仿抽提后，加入相应的限制性内切酶消化12～28 h。消化产物用4%聚丙烯酰胺电泳进行分离。

1.2.5 PCR引物的设计

PC1A	5'	CAGGCGCCTCCTTGGCAGG	3'
PC2B	5'	CTCGTATTCGTCCACAAAATGG	3'
PC3	5'	ACGTGCCTGTTGGACATCCT	3'
PC4	5'	CACACAGGAAGCCTCCCCG	3'
PC7	5'	ACTGAATATAAAACTTGTGGTAGTTGGACCT	3'
PC8	5'	TCAAAGAATGGTCCTGGACC	3'
PC9	5'	AACTGGTGGTGGTTGGACCA	3'
PC10	5'	CTCTATGGTGGGATCATATTC	3'

PC1A和PC2B为分析c-Ha-ras基因第12位密码子点突变的引物；PC3和PC4是分析c-Ha-ras基因第61位密码子点突变的引物；PC7和PC8是分析K-ras基因第12位和第13位密码子的引物；PC9和PC10为分析N-ras基因第12位密码子点突变的引物[6]。

1.3 统计学分析

计数资料采用四格表精确概率法分析；计量资料采用t检验。

2 结果

2.1 c-Ha-ras基因第12位密码子点突变的分析

用引物PC1A和PC2B扩增的片段长170bp(图1)。用Hpa Ⅱ/Msp Ⅰ酶切后，如c-Ha-ras基因第12位密码子存在着点突变则形成两个片段(48bp、122bp)；如无突变；形成3个片段(48bp、56bp和66bp)。42例福尔马林固定、石蜡包埋的胃癌组织经PCR-RFLP方法分析，发现14例(33.3%)有c-Ha-ras基因第12位密码子的点突变，有点突变的胃癌组织DNA经4%聚丙烯酰胺电泳时形成4个片段122bp、66bp、56bp、48bp。这可能是杂合突变或胃癌组织中有正常细胞的污染(图2)。

除了扩增片段中设立了内对照外，我们还设立了外对照。质粒pbcN Ⅰ中的c-Ha-ras基因第12位密码子是野生型的，可被Hpa Ⅱ/Msp Ⅰ酶切成3个片段，此作为第12位密码子点突变的阴性对照；pGC 6.6中的c-Ha-ras基因第12密码子是突变型的，可被Hpa Ⅱ/Msp Ⅰ酶切成两个片段，作为点突变的阳性对照(图3)。

我们同时分析了10例正常献血员白细胞DNA中c-Ha-ras基因第12位密码子的点突变，作为阴性对照。将白细胞DNA用PC1A和PC2B扩增后，用Hpa Ⅱ/Msp Ⅰ酶切，全部形成3个片段，未发现有点突变(图4)。

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

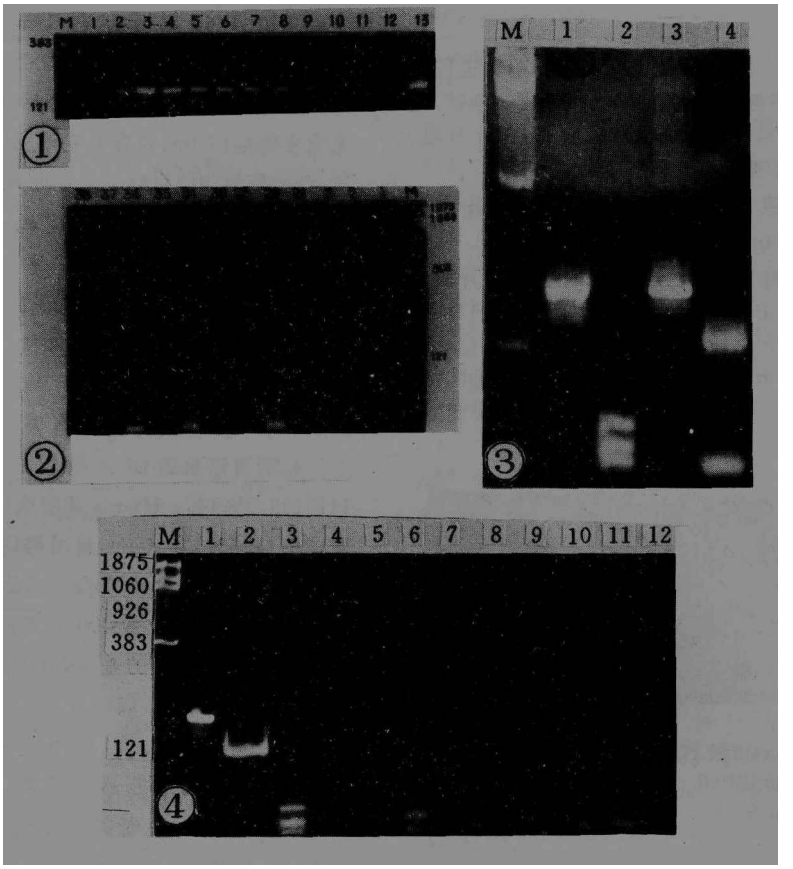


图1 石蜡包埋组织 DNA 用 PC1A 和 PC2B 扩增产物

Fig 1 Products amplified DNA from paraffin embedded tissue by PC1A and PC2B

图2 石蜡包埋组织 c-Ha-ras 第12位密码子 PCR-RFLP 分析

Fig 2 Analysing the c-Ha-ras codon 12 point mutation by PCR-RFLP

M:pBR322+BstN1; 1:扩增后产物(未酶切); 1～38:扩增后产物(酶切后); 2:pbc N I; 3:pGC 6.6; 21、23、33、37、38为野生型; 22、30、31、34为突变型

M: pBR322 digested by BstN1; 1: Amplified products (undigested); 1 ～ 38: Amplified products (digested); 2:pbc N I; 3:pGC 6.6; 21、23、33、37、38 are wild type; 22、30、31、34 are mutation type

图3 含 c-Ha-ras 基因的质粒 PCR-RFLP 分析

Fig 3 Analysing the plasmids containing c-Ha-ras gene by PCR-RFLP

M:pBR332+BstN I; 1:pbc N I 扩增后片段; 2:pbc N I 扩增后经 HpaⅡ/Msp I 酶切; 3:pGC 6.6扩增后片段; 4:pGC 6.6扩增后经 HpaⅡ/Msp I 酶切

M:pBR322 digested by Bst N I; 1:amplified pbc N I (undigested); 2:amplified pbc N I (digested by HpaⅡ/Msp I); 3:amplified pGC 6.6 (undigested); 4:amplified pGC 6.6 (digested by HpaⅡ/Msp I)

图4 正常人白细胞 DNA 使用 PC1A 和 PC2B 进行 PCR-RFLP 分析

Fig 4 Analysing the point mutation of c-Ha-ras codon 12 in normal WBC DNA by PCR-RFLP

M:pBR322+Bst N I; 1:扩增后片段; 2:pGC 6.6酶切后; 3:pbc N I 酶切后; 4～12:正常白细胞 DNA 酶切后

M:pBR322 digested by BstN I; 1:amplified products; 2:amplified pGC 6.6 digested by HpaⅡ/Msp I; 3:amplified pbc N I digested by HpaⅡ/Msp I; 4～12:amplified WBC DNA digested by HpaⅡ/Msp I

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

2.2 c-Ha-ras 基因第61位密码子点突变的研究

42例胃癌组织DNA用PC3和PC4引物进行扩增，4%聚丙烯酰胺电泳后在95bp处形成一条带，经Bst N I酶消化后，形成60bp、20bp、15bp三个片段。说明胃癌组织中无第61位密码子的点突变。

2.3 K-ras 基因第12位和第13位密码子点突变的研究

使用PC7和PC8引物进行PCR扩增的片段长157bp(图5)，经Bst N I酶切后，野生型形成114bp、29bp、14bp三个片段，突变型形成143bp、114bp、29bp和14bp四个片段(图6)。42例胃癌组织DNA经PCR-RFLP分析，发现40例为野生型，两例为突变型。



图5 使用PC7和PC8引物扩增后片段

Fig 5 Amplified products using primer PC7 and PC8

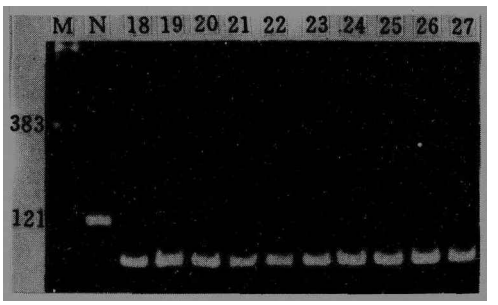


图6 K-ras基因第12位密码子点突变的PCR-RFLP分析(29bp、14bp未显示)

M：pBR322用Bst N I消化；N：扩增后片段(酶切前)；18～27：扩增后片段(酶切后)；26：为突变型，余为野生型

Fig 6 Analysing the point mutation of K-ras codon 12 by PCR-RFLP

M：pBR322 digested by Bst N I；N：amplified products (undigested)；18 ～ 27：amplified products (digested)；26：mutation type

K-ras基因第13位密码子的突变常发生在第二个碱基由G→T转换，这样K-ras基因第12位核苷酸和第13位的前两个核苷酸构成GGTGA-Hph I的酶切位点。用PC7和PC8扩增后，Hph I酶消化，如无突变仍是157bp，如有突变形成114和43bp两个片段。经分析第13位密码子未发现有点突变。

2.4 N-ras 基因第12位密码子点突变分析

用引物PC9和PC10扩增的片段为98bp，经BstN I酶消化后，野生型可形成79bp和19bp两个片段，突变型为98bp，经分析42例石蜡包埋的胃癌组织未见有点突变。

2.5 ras 基因点突变与胃癌患者的预后

42例胃癌组织DNA经PCR-RFLP分析，发现14例(33.3%)有c-Ha-ras基因第12位密码子的点突变；2例(4.8%)有K-ras基因第12位密码子的点突变。16例有ras基因点突变者术后生存期为19.2±17.9个月；26例点突变阴性者术后生存期为42.6±25.3个月，两者之间的差异有非常显著的意义($P<0.001$)。手术后5年，16例有ras基因点突变的病人仅一例存活(6.2%)；而26例无点突变者13例(50%)存活，两者之间的差异有非常显著的差异($P<0.001$)(图7)。有ras基因点突变的病例全部有局部淋巴结的转移(100%)；而26例无ras基因点突变的病人69%有淋巴结的转移($P<0.001$)。16例ras基因点突变者25%(4例)在Ⅰ～Ⅱ期；而无ras基因点突变者50%(13例)在Ⅰ～Ⅱ期($P<0.05$)(表2)。

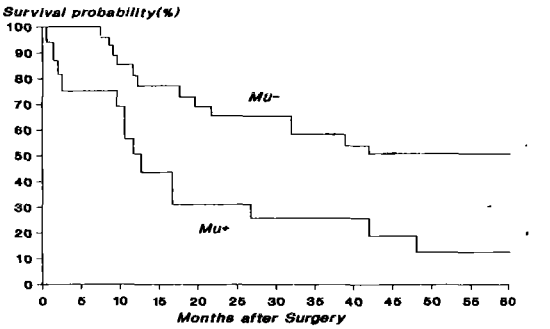


图7 42例胃癌病人手术后存活情况

Fig 7 Survival of 42 patients after surgery for gastric cancer

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

表2 ras 基因点突变阳性和阴性病人临床资料

Tab 2 Gastric cancer patients' clinical material in both point-mut-positive and negative groups

	Cases with point-mut-position (n =16)	Cases with point-mut-negation (n =26)
Age (year±SD)	48.4±11.5	58.4±10.4
Survival time postoperation (month±SD)	19.2±17.9	42.6±25.3
	No. of patients	
Sex (male/female)	8/8	21/5
Stage of gastric cancer Ⅰ		1
Ⅱ	4	12
Ⅲ	3	10
Ⅳ	4	3
Tumor differentiation poorly differentiated	13	17
moderately differentiated, well-differentiated	3	9
6 years' survive postoperation	1	13

3 讨论

ras 基因是一个普遍存在的真核基因家族，由 c-Ha-ras、K-ras 和 N-ras 组成。3种 ras 基因编码高度相似的21KD 的蛋白质，称为 p21。p21蛋白位于细胞浆膜内面，具有与鸟苷酸结合的能力和 GTP 酶的活性，参与膜的信号传递，在细胞生长、分化中起重要的作用[7]。在正常情况下，细胞的 ras p21蛋白与 GDP 结合，以非激活状态存在。当信号传递通路某一蛋白被激活后，可使 GDP 转为 GTP，呈活化形式。活化的 ras 蛋白与效应分子相互作用，随之 GTP 立即水解失活回到非激活状态。目前认为 GAP(GTP 酶激活蛋白)在 ras 蛋白活性调节上起重要的作用[8,9]。GAP 可以促进 ras p21-GTP 向 GDP 的转换，使 ras 基因保持在灭活状态，即与 GDP 结合状态。但 GAP 不能使和突变 p21 结合的 GTP 水解成 GDP，因此使 ras p21蛋白一直处于激活状态，信号持续流动，自发地刺激生长，最后导致细胞的恶性转化。

点突变是 ras 基因激活的主要方式。目前已在多种人类肿瘤中发现有 ras 基因的点突变。ras 基因点突变的检测对监测某些肿瘤的早期发生有帮助，如骨髓增殖综合征，有 ras 基因点突变的病人有较多的机会发展成急性白血病[10]。某些点突变的检测对判断预后有指导意义，如肺腺癌，有 K-ras 基因点突变的病人术后存活期比无突变的病人短、死亡率高、预后差[11]。

胃癌是常见的肿瘤。提高胃癌治疗效果的关键在很大程度上依靠诊断、分型和判断预后方法的改进。多年来人们从酶学、生化、免疫等方面进行了研究，但前景不甚乐观。近年来分子生物学的发展使人们有可能从分子水平探索胃癌发生、发展的机制以及寻找对胃癌诊断、分型和判断预后有帮助的分子探针。本文对42例福尔马林固定、石蜡包埋的胃癌组织使用 PCR-RFLP 的方法同时进行了3种 ras 基因点突变的研究，发现33.3%的病例有 c-Ha-ras 基因第12位密码子的点突变，4.8%的病例有 K-ras 基因第12位密码子的

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

点突变。有点突变的病人术后生存期缩短、存活率降低，并和淋巴结转移及较晚的临床分期有关。因此，ras 基因点突变的检测可成为临床医生判断病人预后的有用指标，为拟定有效的治疗方案提供帮助。

参考文献

1. Barbacid M. ras oncogenes: their role in neoplasia. European J Clin Invest, 1990; 20(1): 225～234
2. Bos JL. ras oncogene in human cancer. Cancer Research, 1989; 49: 4682～4689
3. 邓国仁 吕有勇 陈世明，等。人胃癌细胞株转化基因克隆。中国科学 B 辑，1987; 1(1): 69～72
4. 王俊茹 刘为纹 邓国仁，等。从福尔马林固定、石蜡包埋组织中提取 DNA 的研究。第三军医大学学报，1993; 15(2): 160～161
5. Saiki RK, Sharf S. Primer-directed enzymatic amplification of DNA polymerase. Science, 1988; 239: 487～492
6. 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): 91～94
7. Glman AG. G proteins and dual control of adenylate cyclase. Cell, 1984; 36(3): 577～579
8. Wigler MH. GAPs in under standing ras. Nature, 1990; 346(6185): 696～691
9. Parsons ST. Closing the GAP in a signal transduction pathway. Comment, 1990; 6(6): 169～171
10. Junis JJ, Boot AJA, Mayer MG, et al. Mechanism of ras mutation in myelody splastic syndrome. Oncogene, 1989; 4: 609～614
11. Slebos RJC, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic maker in adenocarcinoma of the lung. N Engl J Med, 1990; 323(9): 561～565

（收稿：1993-05-27；修回：1993-09-10）

A study on the relationship of point mutation of ras oncogenes with prognosis of patients with gastric cancer

Wang Junru, Liu Weiwen, Deng Guoren, Li Youyong, Wang Xin (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract Point mutation of c-Ha-ras at coden 12 and 61, of N-ras coden 12, and of K-ras at coden 12 and 13 was observed in the formalin-fixed, parraffin-embedded tissue specimens of 42 cases of gastric cancer with PCR-RFLP. It was found that point mutation of c-Ha-ras at coden 12 was found in 14 cases out of the 42 (33.3%) and that of K-ras at coden 12 in 2 cases (4.8%). Statistical analysis showed that the point mutation of ras oncogenes plays an important role in the prognosis of the patients with gastric cancer.

Key words stomach neoplasms; oncogene protein P_{21}(ras); mutation; PCR-RFLP

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