DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.06.001

论著

胃癌组织中癌基因激活和抑癌基因失活的研究

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

提 要 本文采用 Southern 杂交技术分析了 42 例胃癌及癌旁组织中癌基因 c-Ha-ras、K-ras、N-ras、c-myc、N-myc、hst、EGFR、c-erbB-2 和抑癌基因 p53 和 Rb 的变化；使用 PCR-RFLP 方法分析了 p53 基因第 248 和 249 位密码子的点突变。结果显示，胃癌组织中有多种癌基因激活和抑癌基因失活，但多集中在 c-Ha-ras、c-erbB-2、hst、EGFR 和 p53 基因。这些结果表明，多种癌基因和抑癌基因可能参与了胃癌的发生和发展。

关键词 胃肿瘤；癌基因；抑制，遗传

近年来研究显示：癌基因激活和抑癌基因失活是肿瘤发生的分子基础[1,2]。胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，目前对于癌基因和抑癌基因与胃癌发生、发展的关系以及癌基因和抑癌基因在胃癌形成过程中激活和失活的方式报道很少，且现有的研究分散，hst 基因和抑癌基因 p53、Rb 在胃癌中激活和失活的方式未见报道。到目前为止，尚未见在同一胃癌组织中同时进行多种癌基因和抑癌基因的研究。本实验使用 Southern 杂交技术首次对 42 例胃癌及癌旁组织同时进行多种基因(c-Ha-ras、K-ras、N-ras、c-myc、N-myc、hst、EGFR、c-erbB-2)和抑癌基因(p53 和 Rb)的研究；使用 PCR-RFLP 技术分析 p53 基因第 248 和 249 位密码子的点突变，以探讨癌基因和抑癌基因与胃癌发生、发展的关系以及癌基因和抑癌基因在胃癌形成过程中激活和失活的方式及变化规律。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本

1.1.1.1 胃癌组织标本：42 例胃癌和癌旁组织标本来自山东省威海市医院及北京市肿瘤所。

1.1.1.2 正常人血标本：28 例正常人血标本来自北京医科大学一院正常献血员。

1.1.1.3 胎盘组织：来自北京医科大学一院妇产科。

1.1.2 含基因探针的质粒(见表 1)

表 1 含基因探针的质粒

基因探针	载体 (kb)	插入中断 (kb)	酶切位点	来源
Ha-ras	pBR322 (4.3)	6.6	BamHI	北京市肿瘤所
c-N-ras	pSV2 (2.9)	6.1	Hind Ⅲ/sac I	Weinberg Lab
v-k-ras	pBR322 (4.3)	1.0	EcoR I	Merch Lab
c-myc	pBR322 (4.3)	8.5	Hind Ⅲ/EcoRI	Weinberg Lab
N-myc	pBR322 (4.3)	1.0	EcoRI/BamHI	ATCC
c-erbB-2	pBR322 (4.2)	4.4	Hind Ⅲ	Japan
hst	pGEM-3 (2.87)	0.557	Sac I /EcoRI	HIH/NCI
EGFR		1.87		NIH/NCI
Rb	pUC19 (3)	4.7	EcoRI	Harvard
p53	pGEM (2.8)	1.6	XbaI	NIH/NCI
G.γ-globin	pUC (3.55)	1.0	BamH	医科院基础所

* 北京市肿瘤研究所

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

1.1.3 PCR 引物：PC13 和 PC14 由北京大学合成。

1.1.4 主要试剂、酶及其它：限制性内切酶 EcoRI、Hind Ⅲ、Bgl Ⅰ、BamH Ⅰ、Hpa Ⅱ、Msp Ⅰ、Nae Ⅰ购自美国 BRL 和 Biolab 公司；Taq DNA 多聚酶购自 Cetus 公司；α-^{32}PdcTP 购自 NEN 公司。

1.2 方法

1.2.1 组织 DNA 的提取

1.2.1.1 正常人白细胞 DNA 的提取[3]

1.2.1.2 胃癌及癌旁组织 DNA 的提取：将组织剪碎后根据 Shih 法[4]提取组织 DNA。

1.2.2 探针制备及同位素标记[3]

1.2.2.1 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)。

1.2.2.2 迅速小量制备质粒 DNA(SDS 法)

1.2.2.3 大量制备质粒 DNA(碱裂解法)

1.2.2.4 基因探针片断的分离和纯化：含基因探针的质粒被扩增后，用相应的限制性内切酶消化，1.0%琼脂糖凝胶电泳。切下含所需片断的凝胶，用电洗脱的方法回收基因片断。

1.2.2.5 基因探针的标记：用 Nick Translation 的方法标记探针。将标记好的探针加到 Sephadex G50 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 分子杂交：根据 Miniatis 法稍加改进。

1.2.4 分析 p53 基因 248 和 249 位密码子点突变的引物。

PC13 5' CCCAAGGCGCACTGACCTCA 3'
PC14 5' GCTCCTGACCTGGAGTCTTC 3'

1.2.5 多聚酶 DNA 链延伸反应(PCR)：参照 Saiki 法加以改进。

1.2.6 限制性内切酶酶切片断长度多态性分析(RFLP)：PCR 扩增产物分别用 Hpa Ⅱ/Msp Ⅰ和 Nae Ⅲ消化，酶解产物用 4%聚丙烯酰胺电泳进行分离。

2 结果

2.1 胃癌组织中癌基因激活及抑癌基因失活的发生率(表 2)

表 2 胃癌组织中癌基因激活及抑癌基因失活发生率

	检查例数	异常例数	异常发生率(%)
c-Ha-ras	33	8	25.8
N-ras	33	0	0
K-ras	26	1	3.8
c-myc	35	1	2
N-myc	26	1	3.8
hst	42	11	26.2
EGFR	42	9	21.4
c-erbB-2	41	12	29.2
p53	30	9	30
Rb	15	2	13

2.2 癌基因扩增、重排及缺失

2.2.1 c-Ha-ras 基因：33 例胃癌及癌旁组织 DNA 用 BamHI 消化，Ha-ras 6.6 为探针，结果如下：

(1)c-Ha-ras 基因的扩增、重排：33 例胃癌组织中 7 例出现异常大小的片断，其中 5 例伴有基因的扩增。有两例癌旁组织也存在着基因的扩增或重排。

(2)c-Ha-ras 等位基因的缺失：7 例呈杂合状态的肿瘤组织中有 1 例丢失了一条等位基因(图 1)。

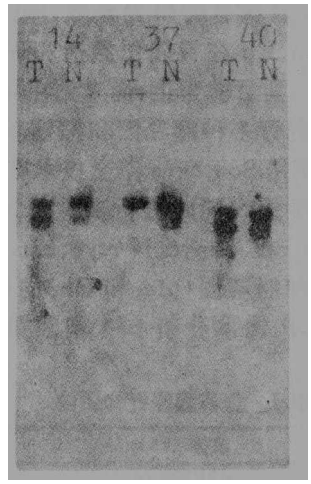


图 1 c-Ha-ras 等位基因的丢失

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

2.2.2 N-ras 基因：组织 DNA 用 BamH Ⅰ消化，N-ras 基因探针杂交。33 例癌及癌旁组织未见异常。

2.2.3 K-ras 基因：组织 DNA 用 Bal Ⅱ消化，K-ras 基因探针杂交，26 例胃癌组织中 1 例有此基因的扩增。

2.2.4 c-erbB-2 基因：组织 DNA 用 EcoRI 消化，c-erbB-2 基因探针杂交。41 例癌组织 11 例有扩增、1 例有重排(图 2)。

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

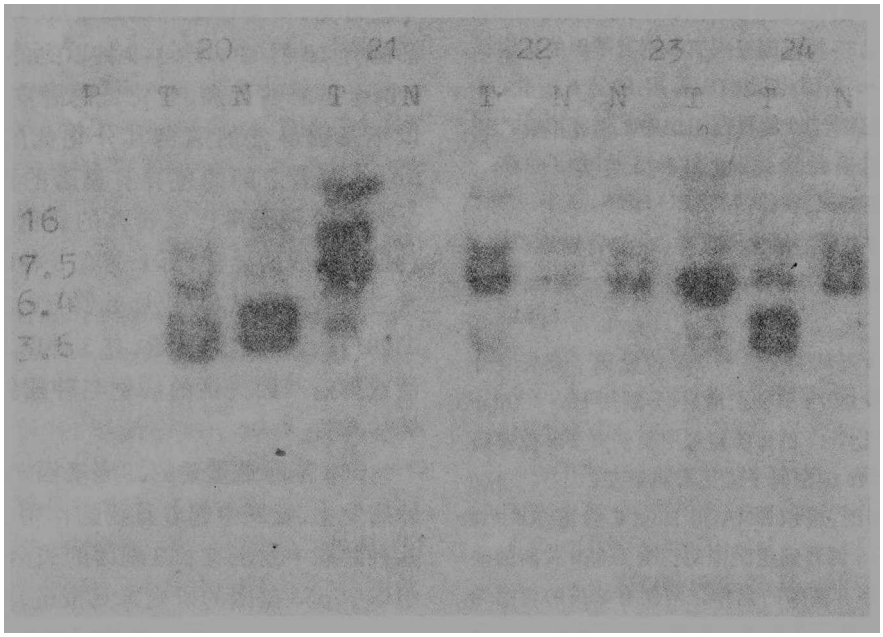


图 2 胃癌及癌旁组织中 c-erbB-2 基因的扩增

20 号、24 号癌组织和癌旁组织均有此基因扩增；21、22、23 号癌组织有扩增，癌旁组织正常

2.2.5 EGFR 基因：组织 DNA 用 EcoRI 消化，EGFR 基因探针杂交。42 例胃癌中 9 例(21.4%)有基因的扩增，且 EGFR 和 c-erbB-2 基因的共同扩增与肿瘤的转移有关。

2.2.6 hst 基因：组织 DNA 用 EcoRI 酶切、hst 基因探针杂交。26.2%(11/41)病例有扩增(图 3)。hst 基因扩增可能与肿瘤转移有关。

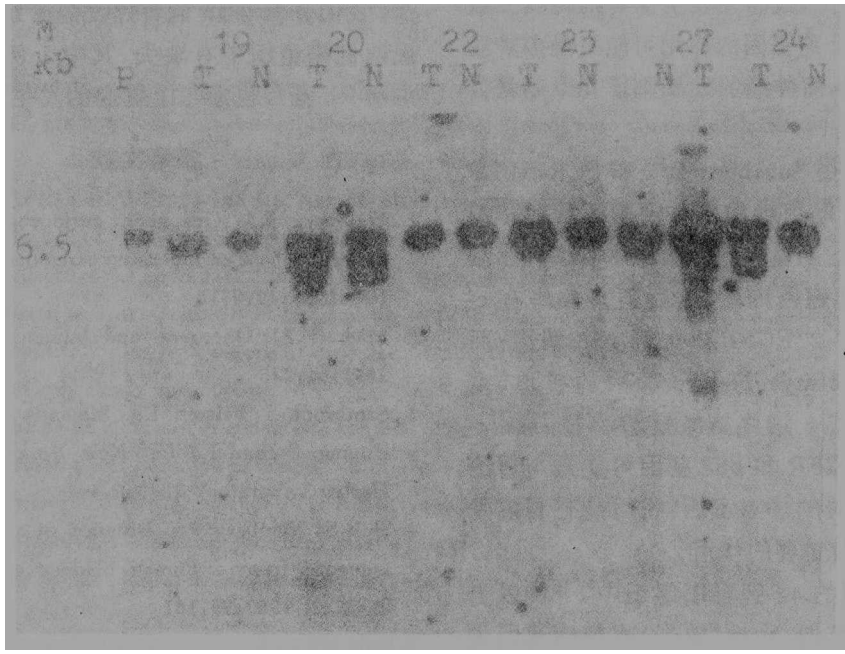


图 3 胃癌及癌旁组织中 hst 基因的扩增和重排

20 号癌组织及癌旁组织、24 号癌组织有 hst 基因的扩增和重排；23、27 号癌组织有 hst 基因的扩增

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

2.2.7 c-myc 基因：组织 DNA 用 Hind Ⅲ 消化，c-myc 基因探针杂交，35 例胃癌组织有 1 例有基因的扩增。

2.2.8 N-myc 基因：组织 DNA 用 Hind Ⅲ 消化，N-myc 基因探针杂交，26 例胃癌组织中 1 例有扩增。

2.3 抑癌基因的缺失、重排和点突变

2.3.1 p53 基因

2.3.1.1 p53 基因的缺失和重排：29 例胃癌组织中 7 例(24%)有 p53 基因的缺失或部分缺失；2 例(6.8%)有重排。

2.3.1.2 p53 基因第 248 和 249 位密码子点突变分析：用 PC13 和 PC14 引物扩增后，分别用 Hpa Ⅱ /Msp Ⅰ 和 Nae Ⅲ 酶切。42 例胃癌组织中两例有 248 位密码子的点突变；249 位密码子未见有点突变。

2.3.2 Rb 基因：组织 DNA 用 Hind Ⅲ 酶切，Rb 3.8 为基因探针。15 例胃癌组织中两例有 4.5kb 片断的缺失，其中 1 例伴有基因的重排。两例有缺失的胃癌为粘液腺癌。Rb 基因是否和粘液腺癌的发生有关，需进一步研究。

3 讨论

肿瘤的发生是一个多步骤的过程。已有一些实验显示[1,7,8]，致癌过程至少有两种以上癌基因参与。一个癌基因的作用可能只是多阶段中的一个阶段，而肿瘤的发展则需几个癌基因的协同作用。

本实验使用 Southern 杂交和 PCR-RFLP 方法研究了胃癌组织中多种癌基因激活和抑癌基因失活。结果显示胃癌组织中有多种癌基因的激活或抑癌基因的失活，但多集中在 c-Ha-ras、c-erbB-2、EGFR、hst 和 p53 基因；而 N-ras、K-ras、c-myc、N-myc 基因的扩增、重排、缺失则少见。这些结果显示，c-Ha-ras、c-erbB-2、hst、EGFR 和 p53 基因可能是与胃癌发生、发展有关的热点基因，很可能在胃癌发生、发展中起着重要的作用。

在所检测的 42 例胃癌组织中，一种以上癌基因激活(扩增、重排、缺失)或抑癌基因失活(缺失、重排或点突变)的有 26 例(63.4%)，说明癌基因的激活和抑癌基因的失活在胃癌中较常见。两种以上癌基因激活和抑癌基因失活的有 16 例(36.4%)，3 种以上的有 8 例，此 8 例全是恶性度高、分化低的肿瘤；而有两种以下基因异常的病例其分化低的肿瘤只占 50%，两者之间的差异有显著的意义($P<0.05$)。8 例无淋巴结转移的病例无一例有 3 种以上基因的异常；而 8 例有 3 种以上基因异常者全有淋巴结和/或远处器官的转移($P<0.001$)。这些数据显示，有 3 种以上癌基因激活或抑癌基因失活的病例与肿瘤的低分化高转移有关。

p53 基因是重要的抑癌基因，它的失活在肿瘤发生、发展中起着重要的作用。目前已在几种肿瘤中发现有 p53 基因的失活[9~12]。胃癌组织中 p53 基因的研究未见报道，本实验发现 30% (9/30)病例有 p53 基因的缺失、重排和点突变。这些表明，p53 基因的失活在胃癌中较常见。

已在多种肿瘤中发现 Rb 基因的失活[13~15]。胃癌组织中 Rb 基因的研究未见报道。我们分析了 15 例胃癌及癌旁组织标本，发现两例癌组织中有缺失，其中 1 例伴有重排，说明 Rb 基因也参与了胃癌的发生和发展。

参考文献

1. Weinberg RA. Oncogene, antioncogene and the molecular base of multistep carcinogenesis. Cancer Res, 1989; 49: 3713
2. Michael BJ. Oncogene and human cancer. Cell, 1991; 64: 235
3. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. Second Edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 9, 4
4. Shih S, Weinberg RA. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. Cell, 1982; 29: 161
5. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell

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

anemia. Science, 1985; 230: 1350
6. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 1988; 239: 487
7. Land H, Parada LP, Weinberg RA. Tumorigenic convesion of primary embrgofibroblasts requres at least two cooperating oncogenes. Nature, 1983; 304: 596
8. Land H, Parada LP, Weinberg RA. Cellular oncogene and multistep carcinogenesis. Science, 1983; 222: 771
9. Nigro JM, Barker SJ, Preisinger AC, et al. Mutation in the p53 gene occur in diverse huma cancer types. Nature, 1989; 244: 217
10. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. p53 mutation in human cancer. Science, 1991; 253: 149
11. Takahushi T, Nau MM, Chiba I, et al. A frequent target for genetic abnormalities in human lung cancer. Science, 1989; 46: 491
12. Mulligan LM, Atlashewski GJ, Scrable HJ, et al. Mechanism of p53 lose in human sarcoma. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 5863
13. Porta GD, Radica P, Scrable HJ, et al. Onco-suppressor genes in human cancer. Tumori, 1989; 86: 2403
14. Weinberg RA. The Rb gene and negative regulation of cell grouth. Blood, 1989; 74: 592
15. Hensel CH, Hsieh CL, Gazdar AF, et al. Altered structure and expression of the human retinoblastoma susceptibility gene in small lung cancer. Cancer Res, 1990; 50: 3067

(收稿: 1992-03-13; 修回: 1992-07-30)

A study on the activation of oncogene and inactivation of suppressor gene in human gastric cancer

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

Abstract The changes of several oncogenes and suppressor genes in the specimens of cancerous and juxtacancerous tissues of 42 cases of gastric cancer were studied with Southern blot hybridization and PCR-RELP method. The probes used were c-Ha-ras, K-ras, N-ras, N-myc, c-myc, hst, EGFR, c-erbB-2, p53 and Rb. Amplification, rearrangement, and deletion of c-Ha-ras were detected in 8/33 (25.8%) cases of gastric cancer; amplification or rearrangement of hst and c-erbB-2 in 11/42 (26.6%) and 12/42 (29.2%) cases respectively; amplification of EGFR in 21.4% of cases; deletion or rearrangement of p53 and Rb in 9/30 (30%) and 2/15 (13%) cases respectively; and amplification or rearrangement of N-ras (0/33), K-ras (1/26), N-myc (1/26), and c-myc (1/35) was only rarely encounted.

The point mutation in codon 248 and 249 of p53 in gastric cancer was analyzed. 2 cases of the 42 harbored point mutation in codon 248 of p53.

These findings suggest that c-Ha-ras, hst, c-erbB-2, EGFR and p53 may be the hot point genes in the occurrence and development of gastric cancer.

Key words stomach neoplasm; oncogene; suppression, genetic

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