

胃癌 c-Ha-ras 基因突变分析方法的建立及临床应用研究 *

北京医科大学第一医院外科 杨定成 徐文怀 李通 黎家庆
北京市肿瘤防治研究所 吕有勇

摘要 本文应用多聚酶 DNA 链延伸反应产物限制性酶切片段多态性分析 (PCR-RFLP) 和单链构象多态性分析 (PCR-SSCP) 两种方法同时检测了 20 例胃癌中 c-Ha-ras 基因突变。本文显示 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 均是检测 c-Ha-ras 基因突变的简便、快速和敏感的方法，适用于临床大批量肿瘤标本的检测。

关键词： 胃癌；c-Ha-ras 突变；PCR-RFLP；PCR-SSCP

c-Ha-ras 原癌基因编码一种 P_{21} 蛋白，此蛋白分子量是 21,000 道尔顿，分布在细胞膜的内侧，它可以作为一种传导器接受和修饰细胞外的刺激信号^[1,2]。在许多实体瘤中 c-Ha-ras 基因的扩增导致 P_{21} 过度表达，干扰和破坏细胞的正常代谢活动，使细胞生长和分化脱离正常轨道。近年来人们发现在化学致癌动物模型中以及人类多种恶性肿瘤中存在 ras 基因 12,13 或 61 位密码子突变^[3,4]，并且诱导突变 ras P_{21} 蛋白的表达，以前检测基因突变的手段十分复杂，胃癌发生和演进过程中 ras 基因激活的机制尚未明确。本文旨在建立简便、可靠和灵敏的方法检测胃癌组织中 c-Ha-ras 基因点突变，从分子水平探讨我国胃癌病因学以及癌变机制，探索胃癌基因学诊断的可行性。

材料和方法

一、材料

(一)、临床资料：本组病员 20 例，于 1991 年～1992 年期间在北京医科大学第一医院外科进行胃癌根治性切除手术，其中男性 14 例，女性 6 例，年龄 31—71 岁。本研究采用第一届全国胃癌协作会议通过的胃癌临床病理分期标准，本实验组中无 I 期，Ⅰ 期 8 例，Ⅱ 期 5 例，Ⅲ 期 7 例；低分化癌 11 例，高分化癌 9 例；有淋巴结恶性转移 11 例，无淋巴结转移 9 例。切取的胃癌组织标本和相对应的癌旁组织，正常胃粘膜标本置于 -70℃ 冰箱中冷藏。

(二)、含 c-Ha-ras 基因的质粒：含原癌基因 c-Ha-ras 的质粒 pbcN1 为美国国立癌症研究所惠赠，含 12 位密码子点突变的 c-Ha-ras 质粒 PGC6. 6

为北京市肿瘤防治研究所从 BGC823 胃癌细胞中克隆出的重组质粒^[5]。

(三)、PCR 引物：分析 c-Ha-ras 基因突变的引物 PC1A 和 PC2B 由北京大学生命科学中心合成，引物的碱基序列为：

PC1A 5' CAGGGCCCTCCTGGCAGG 3'

PC2B 5' GTCGTATTCGTCCACAAATGG 3'

PC1A 的序列为自 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子正链上游非编码区的第 52—71 个核苷酸之间的序列，PC2B 为负链第 12 位密码子下游第 46—66 个核苷酸之间的序列。

(四)、主要试剂、酶及同位素：限制性内切酶 MspI、Taq DNA 多聚酶购自 Promega 公司， $\alpha^{32}P$ -dCTP 购自福瑞公司。

二、方法

(一)、多聚酶 DNA 链延伸反应 (PCR)：1ug 组织 DNA，和质粒 DNA 溶于 50ul 缓冲液中，缓冲液含 10mM Tris·HCl, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 1uM 引物和 1—3u Taq 酶，试管置于 PCR 扩增仪上，94℃ 变性 10 分钟后 94℃, 60 秒、54℃, 60 秒以及 72℃, 60 秒重复循环 30 次，72℃ 继续延伸 10 分钟，取 6ul 反应液于 6% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳。

(二)、PCR 产物限制性酶切片段多态性分析 (PCR-RFLP) c-Ha-ras 基因第 12 位密码子前两个核苷酸 GG 和第 11 位密码子后两个核苷酸 CC，构成了限制性内切酶 MspI 的酶切位点 CCGG，PC1A 和 PC2B 扩增片段中包含了另一个 CCGG 酶切位点，将此作为内对照，本文根据扩增产物 MspI 酶切多态性，确定有无 c-Ha-ras 十二位密码子点突变。

(三)、PCR 产物单链构象多态性分析 (PCR-SS-

* 本文为“863”基金资助项目

CP): 0.5ug 组织 DNA 及其 c-Ha-ras 质粒 DNA 置于 10ul PCR 缓冲液中, 同时加入 α -³²P-dCTP3uCi, 将反应管先置于 94℃ 变性 5 分钟, 然后在 94℃, 1 分钟、55℃, 1 分钟和 70℃, 1 分钟, 循环 30 次, 于 72℃ 继续延伸 10 分钟, 取反应液 4ul 混入 6ul 终止液中(含 10uM NaOH, 95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanole), 94℃ 下变性 10 分钟, 于 6% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 功率 30W, 电泳 2~6 小时, -20℃ 放射自显影 0.5~1.5 小时。

(四)、统计方法: 采用多元逐步回归方法分析, 当 P 值 ≤ 0.15 时, 认为差异有显著意义。

结 果

一、PCR-RFLP 检测 c-Ha-ras 基因突变

图 1 显示应用 PC1A 和 PC2B 引物扩增的片段长 170bp, 图 2 显示扩增产物可以被 MspI 酶切成 66bp、56bp 和 48bp 3 个片段, 提示这些样本基因组 DNA 中不存在 c-Ha-ras 基因 12 位密码子点突变。图 3 显示扩增产物经 MspI 酶消化后形成 121bp 和 48bp 两个片段, 提示这些样本存在 c-Ha-ras 基因 12 位密码子突变。

二、PCR-SSCP 检测 c-Ha-ras 基因突变

图 4 显示单链 DNA 在非变性中性聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 放射自显影后, X 光胶片上显示二条带, 有时形成三条带, 根据癌组织和对应的癌旁组织单链 DNA 在凝胶上游动带的位置和数目进行对照, 以及与 c-Ha-ras 原癌基因 (pbCN1)、c-Ha-ras 突变型 (PGC6. 6) 质粒 DNA 的单链在凝胶上的带型进行比较, 判断有无 c-Ha-ras 基因靶序列突变, 应用 PCR-SSCP 检测, 发现 8 例胃癌组织在 c-Ha-ras 基因突变。

三、c-Ha-ras 基因 12 位密码子点突变的临床意义

应用 PCR-RFLP 方法检测了 20 例胃癌组织和相对应的癌旁组织、正常胃粘膜标本 DNA, 发现其中 7 例胃癌组织基因组 DNA 中存在 c-Ha-ras 基因十二位密码子点突变, 突变率为 35%; 男性胃癌病员癌组织突变率高于女性病员 ($P=0.065$); 分化程度差的肿瘤突变率高于分化程度好的肿瘤 ($P=0.093$); 随着胃癌临床病程的进展, 肿瘤组织中 c-Ha-ras 12 位密码子突变逐步升高 ($P=0.145$), 癌旁组织中未发现 c-Ha-ras 十二位密码子点突变。

四、PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 两种方法测定结

果比较

两种方法检测结果不完全一致, 20 例胃癌组织中, 有 5 例肿瘤用两种方法检测均发现存在 c-Ha-ras 基因突变, 2 例肿瘤用 PCR-RFLP 检测发现存在点突变, 而 PCR-SSCP 方法未能发现; 3 例肿瘤用 PCR-RFLP 检测未发现点突变, 而 PCR-SSCP 方法发现存在 c-Ha-ras 基因突变, 10 例肿瘤用两种方法均未发现 c-Ha-ras 基因突变, 两种方法检测结果符合率为 75%。

讨 论

胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤, 胃癌的治疗效果的改善在很大程度上依靠早期诊断和判断预后方法的改进, 本文设计和建立的两种检测 c-Ha-ras 基因突变的方法简便, PCR-RFLP 实验周期 2~3 天, 不需要应用同位素, 但是仅能分析已知序列中有限制性内切酶酶切位点处的碱基置换, 本文设计的一对引物包含了一个内对照 MspI 酶切位点, 避免了因酶或酶切体系有问题而造成的假阳性结果。PC1A 和 PC2B 扩增产物尽管包含了 c-Ha-ras 基因十三位密码子序列, 但是采用 PCR-RFLP 方法仅能识别十二位密码子突变。PCR-SSCP 用于检测

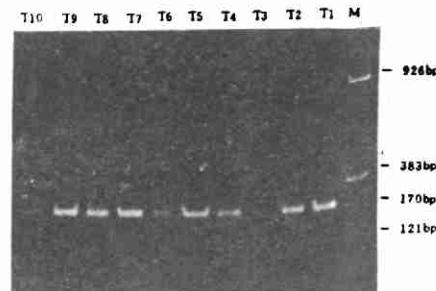


图 1. 应用 PC1A PC2B 引物扩增胃癌组织 c-Ha-ras 基因, PCR 扩增产物分子量为 170bp

M: Marker-pBR322/pstN1 T: 肿瘤组织

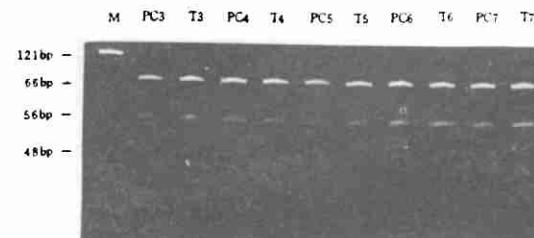


图 2. 应用 PCR-RFLP 方法检测胃癌组织中 c-Ha-ras codon 12 点突变 PC3-T7 均无点突变

表：c-Ha-ras 基因点突变和临床病程的关系

	总例数	癌组织,例数	阳性率(%)
性别 男 *	14	6	42.8
女	6	1	16.7
年龄(岁) <60	5	2	40.0
>60	15	5	33.3
淋巴结浸润 阳性	11	4	36.4
阴性	9	3	33.3
组织分化程度 分化好 *	9	2	22.2
分化差	11	5	45.5
临床病期 I	0	0	0
II	8	2	25.0
III	5	1	20.0
IV	7	4	57.1

c-Ha-ras codon 12 点突变和病员性别、组织分化程度以及临床病期密切相关 P 值均小于 0.5

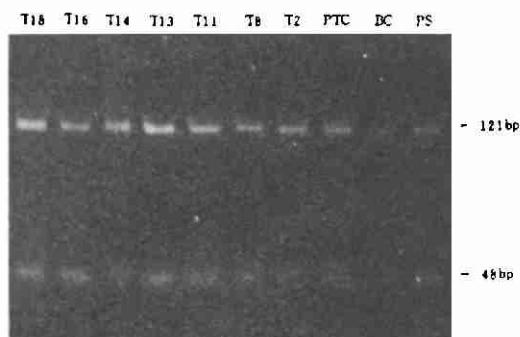


图 3. 应用 PCR-RFLP 方法检测胃癌组织 c-Ha-ras codon 点突变 PS-T18 均有点突变；PS, PGC66 质粒 DNA；BC, BGC823 细胞 DNA；MC, MGC803 细胞 DNA

C3 PC13T13P12T12PC11T11PC9 T9 PC8 T8 PGC6.6 pbcN1 T1 PC1T2 PC2 T3 PC3 T4 PC4 C1 C2

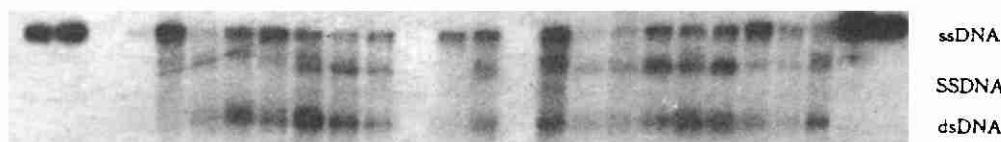


图 4. 应用 PCR-SSCP 方法检测胃癌组织 c-Ha-ras 点突变 T2, T8, T11 和 T13
均存在点突变 C1, C2 和 C3 为双链 DNA

基因突变是根据在不含变性剂的中性聚丙烯酰胺胶中电泳时，DNA 单链的迁移率除了 DNA 链的长短有关外，更重要的是取决于 DNA 单链所形成的构象，相同长度的 DNA 单链因其顺序不同，包括单个碱基不同，所形成的构象不同，电泳迁移率也不同^[6]。本文显示有 3 例胃癌用 PCR-RFLP 未发现存在 c-Ha-ras 十二密码子点突变，而用 PCR-SSCP 检测，发现存在 c-Ha-ras 基因突变，推测这三例肿瘤可能存在 c-Ha-ras 基因 13 位密码子或其它位点碱基置换、缺失或颠换的改变。有 2 例胃癌用 PCR-RFLP 方法发现存在 c-Ha-ras 基因十二位密码子突变，而 PCR-SSCP 未能检出，提示 PCR-SSCP 的检测结果可出现假阴性。

本文显示胃癌组织中 c-Ha-ras 基因十二位密码子突变率达到 35%，提示 c-Ha-ras 基因突变是胃癌发生和演化过程中又一个重要遗传学事件，临床早期识别 c-Ha-ras 基因突变有助于早期预测肿瘤的发生；组织学分化程度差以及晚期胃癌患者 c-Ha-ras 基因十二位密码子突变率较高，因此在预测

胃癌细胞的恶性程度，肿瘤细胞浸润状态时，检测 c-Ha-ras 基因突变具有较大的参考价值，有利于指导临床选择合理的治疗方案；由于极少量的肿瘤细胞就可以用 PCR 技术检测其基因组 DNA 中 c-Ha-ras 基因是否存在点突变，因此通过胃镜下刷检细胞就可以用于检测，对判断手术后癌细胞残留和肿瘤的复发也具有重要价值。

BOS 提出 ras 基因第 12 位密码子突变可使得其编码产物 P21 蛋白的 GTP 酶活性降低，使其水解 GTP 的速率大为降低，因此使 P21 蛋白维持于活化状态，不断激活靶分子，导致细胞大量增殖和恶性转化^[7]。c-Ha-ras 基因点突变诱导胃粘膜细胞恶变机制尚有待于进一步探讨。

参 考 文 献

- Vogel US, Dixon RAF schaber MD, et al. Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras P21. Nature, 1988, 335: 90-93
- McCormick F. Ras GTPase activating protein: signal

- transmitter and signal terminator. *Cell*, 1989, 56 : 5—8
- 3 Fujita J, Srivastava SK, Kraus MH, et al. A frequency of molecular alterations affecting ras protooncogenes in human urinary tract tumors. *PNAS*, 1985, 82 : 3849—3853
- 4 Janssen JWG, Steenvoorden ACM, Lyons J, et al. Ras gene mutations in acute and chronic myelocytic leukemias, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes. *PNAS*, 1987, 84 : 9228—9232
- 5 陈世明, 苗晶, 蔡红, 等. 人胃癌细胞株 BGC-823 DNA 二轮转化细胞基因组主库的构建及其转化基因的克隆. *遗传学报*, 1987, 14 : 155—162
- 6 Murakami Y, Hayashi K and Sekiya T. Detection of aberrations of the P53 alleles and the gene transcript in human tumor cell lines by single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Research*, 1991, 51 : 3356—3361
- 7 Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research*, 1989, 49 : 682—4689

Establishment and Clinical Application Study of C-Ha-ras Gene Mutation Analysis Methods in Gastric Cancer

Yang Ding Cheng, et al

In this work, mutations of c-Ha-ras gene in 20 cases of primary gastric cancer were investigated by using restriction fragments length polymorphism (RFLP) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of the polymerase chain reaction product. We found that these two methods were highly simple, rapid and sensitive assay system for detecting c-Ha-ras gene mutations of large number of tumor samples and PCR-SSCP could also detect c-Ha-ras point mutations in several codons at same time.

Key words: *gastric carcinoma; c-Ha-ras mutation; PCR-RFLP; PCR-SSCP*

肺泡细胞癌并转移性及原发性鳞癌 1 例报告

湖北医科大学病理教研室 陈德基 邹祖玉 王 敏 杨大珍*

王某,男,56岁,1992年5月因低热、咳血,胸透见右上肺模糊阴影,疑为结核,在门诊抗结核治疗。治疗期间咳血不止,进一步作CT照片,见右肺上叶3×2×2cm大小、境界不清、靠近胸膜之阴影,考虑周边型肺癌。同年7月收入我院行右上肺叶切除。巨检:右肺上叶前壁肺膜直下见2×2×2cm灰白色结节,境界不清,胸膜增厚,肺门淋巴结肿大,直径约1cm。肿块组织切片见肺泡道、肺泡扩张,内壁被覆单层或多层细胞,形成腺腔样癌巢,细胞大小不等,圆形、梭形或多边形,核深染,核分裂象易见,诊断肺泡细胞癌。肺门淋巴结组织切片,见有大量癌巢浸润,癌巢边缘细胞小而密集,似基底细胞样细胞,癌巢中心区细胞胞浆丰富,核空泡状,似棘层细

胞样细胞,其中见有角化样物及角化不全细胞,诊断为肺门淋巴结内转移性角化鳞状细胞癌。

术后一个月行放射治疗,五天后,发现右侧耳上部头皮长一蚕豆大肿块,半月左右肿块向表面生长,约枣大,呈角状突起。再行头皮肿块切除,组织切片见表皮破坏,部分表皮呈不典型增生,真皮内有大量角化鳞状细胞癌巢浸润,有的癌细胞与表皮基底层细胞相移行,形成原发性鳞状细胞癌特点。病理报告头皮原发性角化鳞状细胞癌。

肺泡细胞癌在肺内常呈弥漫性生长,少有局灶性结节形成,一般只在肺内沿肺泡道蔓延扩展,形成淋巴道或血道转移者很少见,转移癌常与原发癌组织象相似。本例无上述规律,另本例又并发头皮原发癌则更为罕见。

* 湖北医科大学附属二医院皮肤科