

# 人小细胞肺癌 P<sup>53</sup>基因突变的研究

杨廷桐 张 骏 郑 杰 吴秉铨

**摘要** 为探讨小细胞肺癌(SCLC)发生的分子机制,应用免疫组化和聚合酶链反应——单链构象多态性(PCR-SSCP)技术,对 14 例 SCLC 的石蜡切片标本进行了 P<sup>53</sup>基因突变研究。结果显示:P<sup>53</sup>蛋白免疫组织化学反应有 9 例出现阳性,其中 2 例为+,7 例为++,阳性率为 64.3%(9/14)。P<sup>53</sup>基因第 5、6、7、8 外显子突变率分别为 21.4%(3/14);14.3%(2/14);14.3%(2/14);7.1%(1/14),总突变率为 57.1%(8/14)。提示:SCLC 中存在较高的 P<sup>53</sup>基因突变率,P<sup>53</sup>基因突变在人类肺癌的发生发展过程中起着重要的作用。

**关键词** 小细胞肺癌;聚合酶链反应——单链构象多态性;P<sup>53</sup>基因;点突变

肺癌是当今世界各国常见的恶性肿瘤之一,也是最常见的死亡原因。尽管近十几年来在癌症的诊治方面已有许多新方法、技术的问世,但肺癌的疗效仍很差,尤其是小细胞肺癌(SCLC)<sup>[1]</sup>。为进一步探讨 SCLC 发生的分子机理,及其在生物学行为上的意义,我们应用免疫组织化学和聚合酶链反应——单链构象多态性(PCR-SSCP)分析的方法,对 14 例 SCLC 的石蜡包埋组织的 P<sup>53</sup>基因进行研究,为临床早期诊断,提高疗效提供资料。

## 1 材料与方法

1.1 材料 源于湖北肿瘤医院 1988~1993 年临床手术切除的 125 例肺癌石蜡包埋组织标本,经 2 位病理专家重新诊断分类,诊断标准参照《诊断病理学》<sup>[2]</sup>。选出其中 SCLC14 例,占 11.2%,做为研究对象。

1.2 免疫组化 主要试剂:鼠抗人 P<sup>53</sup>单克隆抗体(DO-7,Dako 公司),生物素标记的兔抗鼠 IgG(Link,Reagent 公司)。染色方法:按试剂盒说明书采用 LSAB 法。3,3-Diamino benzidine tetrahydrochloride (DAB)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色,苏木素复染。每次实验均设阳性及阴性对照,以肺癌组织表达阳性片做阳性对照,正常肺组织为阴性对照,以 PBS 替代一抗做空白对照。阳性标准:10%~25% 细胞核着色(+),25~50% 细胞核着色(++)>50% 细胞核着色(++)。

1.3 DNA 制备 采用酚~氯仿提取法。切取石蜡瘤组织 10um 厚 5~10 片,放入 1.5mL 离心管中,脱蜡及脱水后加入 400uL Lysis buffer 8uL 20mg/mL 蛋白酶 k,

37℃ 彻底消化,离心 12000g×10'。吸上清于另一离心管中,加等体积酚/氯仿(1:1)混匀,离心 12000g×10'。肯上清于另一离心管中后再加入氯仿/异戊醇(24:1),混匀离心 12000g×10',吸上清于另一离心管中,加入 1/5 体积 3M 酪酸钠(pH5.2)和 2 倍体积的无水乙醇,混匀 -20℃ 过夜。离心 12000g×5',弃上清,室温干燥 15'后,加入 100uL TE 溶液 DNA,用紫外分光光度仪测 OD 值,以了解所提 DNA 的纯度和浓度。

### 1.4 PCR~SSCP 检测

1.4.1 PCR 扩增 P<sup>53</sup>基因 5~8 外显子,应用 4 对引物(由北京医科大学病理系分子生物室合成)其序列如下:

EXon 5:5'TA CT CC CC TG CC CT CA AC  
AA GA 3' 5'CG CT AT CT GA GC AG CG CT CA  
T3'

EXon 6:5'GA TT GC TC TT AG GT CT GG  
CC CC T3' 5'CA GA CC TC AG GC GG CT CA TA  
GG 3'

EXon 7:5'CT GG GT TG GC TC TG AC TG  
TA CC A3' 5'TG AC CT GG AG TC TT CC AG TG  
TG 3'

EXon 8:5'GT AG TG GT AA TC TA CT GG  
GA CG GA 3' 5'CT CG CT TA GT GC TC CC TG  
GG GG C3'

1.4.2 PCR 扩增反应条件 95℃ 2',95℃ 40",55℃ 40",72℃ 30",30 个循环,72℃ 延伸 5'。

1.4.3 PCR-SSCP 分析 取 5uL PCR 扩增产物加 5uLSSCP 上样液,100℃ 水浴 10',立即上样于垂直电泳槽中的 SSCP 胶孔中,恒压 50V、恒温 15℃,电泳液为

卫生部基金资助课题

作者单位:453003 新乡医学院病理教研室(杨廷桐);北京大学(张骏、郑杰、吴秉铨)

0.5×TBE 约 800ml, 电泳的肿瘤标本与正常相比较出现条带增多、减少或位置变动, 即说明该样品存在基因突变。

## 2 结果

2.1 P53蛋白免疫组化反应 镜下见P53蛋白阳性颗粒呈棕黄色, 位于细胞核内。SCLC14例中有9例为阳性, 其中2例为(+), 7例为(+)~(++), 阳性率为64.3%(9/14)。对照组, 正常肺组织染色为阴性。

2.2 P53基因PCR-SSCP分析谱 14例SCLC中, PCR-SSCP分析P53基因第5~8外显子, 阴性者有6例占42.9%(6/14)。阳性者8例, 其中第5外显子突变者3例占21.4%(3/14), 第6、7外显子突变者各2例占14.3%(2/14), 第7外显子突变者2例占14.3%(2/14)第8外显子突变者1例占7.1%(1/14)。总突变率为57.1%(8/14)。见图1, 2。

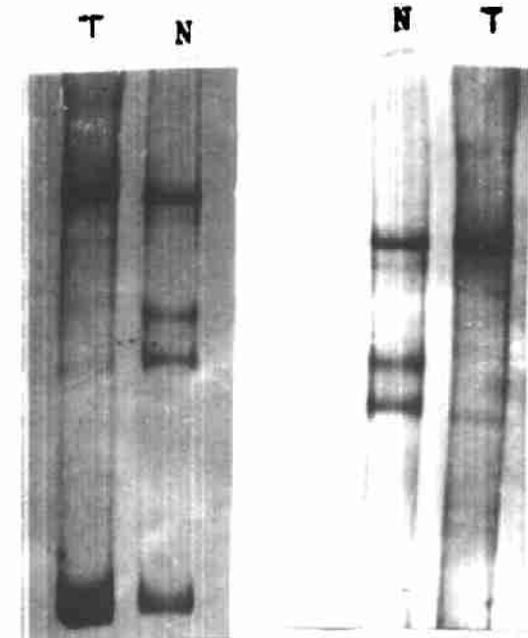


图1 WM983A P53基因第5外显子的PCR-SSCP检测结果; N表示正常对照, 箭头所指为泳动变位(mobility shift)

图2 SCLC P53基因第6外显子PCR-SSCP检测结果; N表示正常对照, 箭头所指为泳动变位(mobility shift)

2.3 P53蛋白的免疫组化反应和P53基因突变谱与SCLC患者年龄、性别、肿瘤大小等无明显的相关性。

## 3 讨论

3.1 人类SCLC中P53基因突变是最常见的基因变异之一 人类基因片段外显子的长度多在200bp以内, 在应用PCR扩增的片段小于200bp时, PCR-SSCP检

测基因突变的敏感性可达90%以上<sup>[3]</sup>。因此, 该方法已渐成为人们用于检测人类基因突变的常用方法之一。有研究认为<sup>[4]</sup>, P53基因突变是肺癌最常见的基因变异之一。P53基因突变广泛分布在第5~8外显子, 我们应用PCR-SSCP技术对14例SCLC的P53基因5~8外显子进行检测, 其突变率达57.1%, 比Kishimoto等采用的PCR-SSCP技术检测NSCLCP535~8外显子总突变率52.0%为高<sup>[3]</sup>, 故认为PCR-SSCP技术对检测SCLCP53基因突变是一种非常显著和实用的方法, P53基因的突变在SCLC的发生中作为一种关键性基因, 已引起我们的极大关注。

3.2 P53蛋白过度表达可做为SCLC生物学行为的主要标志物 P53蛋白过度表达与临幊上肺癌病理的相关性, 已有较多报道, 大多数的研究结果认为P53过表达示着肺癌患者肿瘤的侵袭力强, 预后差<sup>[5, 6]</sup>。Caaman等人使用免疫组化技术研究NSCLC<sup>[7]</sup>, 发现P53过度表达者占50.0%。我们应用识别P53蛋白第18~26位氨基酸表位的单克隆抗体DO-7对14例SCLC进行免疫组化染色, 其阳性率达64.3%。因此, P53蛋白过表达可做为SCLC诊断的主要指标和SCLC生物学行为的主要标志物, 这说明了SCLC高的侵袭力、高转移力和差的预后与P53基因存在突变率有密切关系。

3.3 P53蛋白与P53基因阳性率的不一致性 在检测的14例SCLC中, 免疫组化阳性率为64.3%, 而PCR-SSCP分析P53基因, 阳性率为57.1%, 二者之间存在着不平行性。我们认为除突变型P53蛋白被免疫组化方法检出外, 近来研究认为, 一些细胞基因产物, 如MDM2蛋白也可与野生型P53蛋白结合, 多种病毒癌蛋白也可与野生型P53蛋白结合, 使其降解下降<sup>[8]</sup>, 故可使免疫组化的阳性率高于PCR-SSCP检测的阳性率。另外, 位于5~8以外的外显子没有被检测, 也是其原因之一。

肺癌的P53基因突变率居人类各肿瘤之首<sup>[9, 10]</sup>。P53基因突变谱的变化与人类癌症的病因和发病学密切相关。P53功能的失活在肺癌的发生发展过程中起着非常重要的作用。因此, 进一步阐明P53的生物学特性和作用机理对于肺癌的早期诊断、生物学行为的判断、发生学等都具有重要的意义, 而揭示肺癌中P53基因的突变位点至关重要, 这方面的工作, 有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- Lin Ay, Ihed DC. Recent developments in the treatment of lung cancer. JAMA, 1992, 267:1661
- 刘彤华. 诊断病理学. 北京: 人民卫生出版社, 1994:183
- Spagnole DV, Turbett GR, Dix B, et al. Polymearse chain

- reaction and single-strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP), a novel means of detecting DNA mutation. *Adv Anat Pathol*, 1994, 1:61
- 4 Ryberg G, Kure, E, Lystad S, et al. *P<sup>53</sup>* mutation in lung tumor relationship putative susceptibility markers for cancer. *Cancer Res*, 1994, 54:1551
- 5 Kishimoto Y, Murakami Y, Shiraishi M, et al. Aberration of the *P<sup>53</sup>* tumor suppressor gene in human non-small cell lung carcinomas of the lung cancer. *Cancer Res*. 1992, 52: 4799
- 6 Fontanini G, Bigini D, Vignati S, et al. *P<sup>53</sup>* expression in NSCLC: clinical and biological correlations. *Anticancer Res*, 1993, 13:737
- 7 Quinlan DC, Davidson AG, Summres CL, et al. Accumulation of *P<sup>53</sup>* protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res*, 1992, 52:4828
- 8 Gaaman J, Ruggen B, Momiki S, et al. Detection of *P<sup>53</sup>* in primary lung tumors and non-small cell lung carcinoma cell line. *Am J Pathol*, 1991, 139:839
- 9 Hall Pa, Lane Dp. *P<sup>53</sup>* in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? *J Pathol*, 1994, 172:1
- 10 Greenbatt MS, Bennett Wp, Hollstein M, et al. Mutation in the *P<sup>53</sup>* tumor suppressor gene clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 1994, 54: 4855

## The Study of *P<sup>53</sup>* Gene Mutation in Human Small Cell Lung Cancer

Yang Tingtong, et al

*Department of pathology Xinxang Medical College, Xinxang 453003*

To discuss the molecuar mechanism of the small cell lung cancer (SCLC). *P<sup>53</sup>* gene mutation in SCLC of 14 paraffin embedded tissue section was observed by immunohistochemical staining (LSAB method) and polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorsphism (pcr-SSCP) analysis. The results showed that the positive rate of immunohistochemical reaction was 64.3% (9/14), of which 2 cases are +, 7 cases are ++~+++. *P<sup>53</sup>* gene point mutation in exon 5, 6, 7 and 8 are respectively: 21.4% (3/14); 14.3% (2/14); 14.3% (2/14); 7.1% (1/14). The total mutation rate is 57.1% (8/14). It was suggested that Comparatively high mutation rate of *P<sup>53</sup>* gene exists in SCLC, which might be the crucial gene of cause of the human lung carcinoma.

**Key words:** SCLC; PCR-SSCP; *P<sup>53</sup>*Gene; Point mutation

## 喉恶性颗粒细胞瘤 1例

彭斌黎辉 王则胜 彭善友

患者女,25岁。声嘶3个月,呼吸困难1个月于1997年11月9日入院。检查:声音嘶哑,呼吸困难,颈部未触及包块及肿大淋巴结。X光片显示:左喉室后部有3cm×4cm密度增高阴影向右前突出,该段气道变窄向右前移位;其余未见异常。纤维喉镜见左侧喉室后部有3.5cm×3cm×3cm肿瘤一个,淡红色,表面高低不平,界限不清;吸气时声门为2~3mm裂缝。1997年12月1日在全麻下行肿瘤及全喉切除。术中见肿瘤侵犯双侧喉室,上至左侧声带下到环状软骨上缘。病理检查:全喉标本,喉腔后侧有灰白色肿瘤填塞,以左侧为甚,喉腔变窄,形状不规则。中线矢状切开见肿瘤为3cm×2.7cm×2.5cm,中等硬。光镜见瘤细胞体积较大呈圆形、卵圆形或多边形,少数为梭形,胞浆丰富含嗜酸性颗粒。细胞核多数为中等大小圆形或卵圆形,着色较淡或呈空泡状;核仁大而明显呈嗜酸性;少数组细胞核明显

增大,大小不等,形状不规则,可见巨核、双核和核分裂。间质内纤维组织较丰富。血管较少,瘤细胞被分隔成大小不等的片状或条索状。特殊染色PAS(+),免疫组织化学S-100(+),NSE(+),EMA(-)。病理诊断:(喉部)恶性颗粒细胞瘤。讨论:喉恶性颗粒细胞瘤较少见,男女发病率之比为1:8。良、恶性颗粒细胞瘤鉴别比较困难。良性颗粒细胞瘤细胞核多呈固缩状态。若细胞核有异型或呈空泡状见有核仁或有坏死或有核分裂则是诊断恶性颗粒细胞瘤的相对指标。若发现转移才是确诊指标。近来通过免疫组化和超微结构研究证明颗粒细胞瘤是变异的雪旺氏细胞瘤。治疗:目前主要是手术切除必要时可加用放射治疗。预后:确诊后5年生存率45%。

作者单位:430060 武汉,湖北医科大学附一医院