

人小细胞肺癌 P⁵³ 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 P⁵³ 基因突变研究。结果显示:P⁵³ 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)。P⁵³ 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 P⁵³ 基因突变率,P⁵³ 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;P⁵³ 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)^[1]。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 P⁵³ 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》^[2]。选出其中 SCLC 14 例,占 11.2%,做为研究对象。

1.2 免疫组化 主要试剂:鼠抗人 P⁵³ 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 benzidin tetrahydrochloride (DAB)-H₂O₂ 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。切取石蜡癌组织 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 醋酸钠(pH5.2)和 2 倍体积的无水乙醇,混匀-20℃ 过液。离心 12000g×5' 弃上清,加入 300uL 70%乙醇,12000g×5',弃上清,室温干燥 15'后,加入 100uL TE 溶介 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 P⁵³ 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
T 3'

EXon 6: 5'GA TT GC TC TT AG GT CT GG
CC CC T 3' 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 A 3' 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 C 3'

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 5uL SSCP 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);北京医科大学(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。SCLC 14 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。

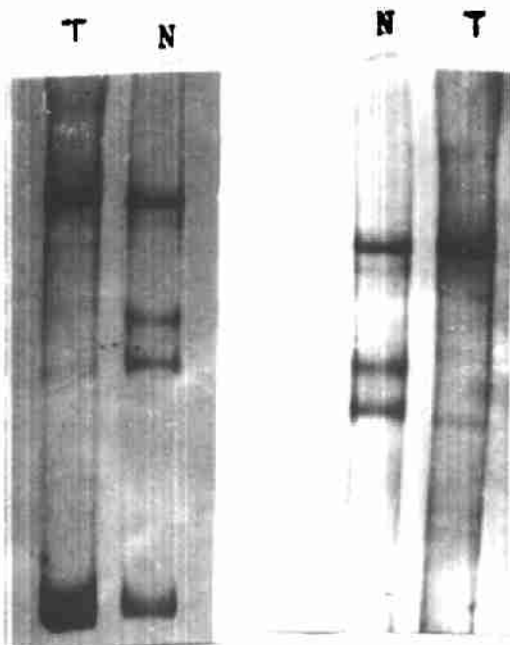


图 1 WM983A P⁵³ 基因第 5 外显子的 RPCR-SSCP 检测结果;N 表示正常对照,箭头所指为泳动变位(mobility shift)

图 2 SCLC P⁵³ 基因第 5 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^[21]。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^[4],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 NSCLC P535~8 外显子总突变率 52.0% 为高^[21],故认为 PCR-SSCP 技术对检测 SCLC P⁵³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 SCLC 生物学行为的主要标志物 P⁵³蛋白过度表达与临床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过表达予示着肺癌患者肿瘤的侵袭力强,预后差^[6,22]。Caaman 等人使用免疫组化技术研究 NSCLC^[6],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蛋白过度表达可做 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^[9],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^[10],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

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

