

胃癌及癌旁组织中 Rb 基因缺失和重排的研究*

王俊茹* 吕有勇 刘为纹* 王冰 邓国仁

(北京市肿瘤所生化室, 北京 100034) (* 第三军医大学西南医院消化科, 重庆 630038)

Rb 基因即视网膜母细胞瘤敏感基因, 被认为是一种抑癌基因。它在正常细胞中存在, 而在视网膜母细胞瘤中有缺失^[1]。将正常的 Rb 基因导入有 Rb 基因缺失的视网膜母细胞瘤和骨肉瘤细胞内, 可以抑制上述两种肿瘤细胞的生长^[2]。目前已在多种人类肿瘤中如骨肉瘤、纤维肉瘤、小细胞肺癌、乳腺癌等发现有 Rb 基因的缺失^[3,4]。胃癌组织中 Rb 基因丢失的研究未见报道。本实验使用 Southern 杂交方法在胃癌及癌旁组织中进行 Rb 基因缺失和重排的研究, 探索 Rb 基因在胃癌发生、发展中的作用。

材料和方法

一、组织标本

15例胃癌及癌旁组织(距癌组织 5cm)标本来自山东省威海市医院。手术后立即将组织放入液氮或 -70℃冰箱冻存。所有标本均经病理医生诊断。

二、细菌、质粒

大肠杆菌 HB 101 来自北京市肿瘤所生化室。
含 Rb cDNA 的质粒 pUC 19 由 Harward 赠送。

三、主要试剂、酶及其它

琼脂、胰蛋白胨、酵母粉 (DiFCo, Oxoid)、琼脂糖 (BRL 公司)、小牛血清白蛋白 (Sigma 公司)、Nick Translation Kit (BRL 公司)、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (NEN 公司)、硝酸纤维素膜 (Schleicher-Schuel 公司)、限制性内切酶 Hind III、EcoRI (华美生物工程公司)。

四、组织 DNA 的提取

将 0.5—1g 的组织剪碎后按 Shih 法^[5]制备高分子量的 DNA。

* 本研究系“863”国家高技术研究发展计划生物技术领域资助项目
收稿日期: 1991-12-31, 修回日期: 1992-06-16

五、探针制备及同位素标记^[6]

1. 用含 Rb cDNA 的质粒转染大肠杆菌（氯化钙转化程序）。
2. 迅速小量制备质粒 DNA(SDS 法)。
3. 大量制备质粒 DNA（碱裂解法）。
4. 基因探针片段的分离和纯化。

Rb cDNA 探针全长 4.7kb，内有一个限制性内切酶 EcoRI 的识别位点，当用 EcoRI 将其从 pUC 19 质粒上切下时，也将 Rb cDNA 探针切成两个片段：0.9kb 和 3.8kb。以 3.8kb 为基因探针。

5. 探针标记用 Nick Translation 方法。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。本实验参入效率为 30—50%。

六、Southern 杂交

取胃癌及癌旁组织 DNA 12 μ g，用限制性内切酶 Hind III 消化 18—24h。待消化完全后乙醇沉淀、TE 溶解。0.8% 琼脂糖凝胶电泳。以 Hind III 消化的入 DNA 为分子量标准。琼脂糖凝胶板变性、中和、Southern 转移到硝酸纤维素膜上，80 $^{\circ}$ C 烤膜 2h。将硝酸纤维素膜放入塑料袋中，加入预杂交液（6 \times SSC、0.5% SDS、5 \times Denhardt 溶液、100 μ g/mL 变性鱼精 DNA、50% 甲酰胺），42 $^{\circ}$ C 保温过夜。然后加入同位素标记的变性探针，42 $^{\circ}$ C 保温 6—18 h。洗膜、放射自显影。

结 果

Rb 基因全长 200kb，由 27 个外显子组成。当用 Hind III 将基因组 DNA 酶切后，可形成数个片段。用 Rb 3.8kb 基因探针杂交，可在 9.8kb、7.5kb、6.2kb、5.3kb、4.5kb、2.1kb 和 1.5kb 处见到杂交信号。

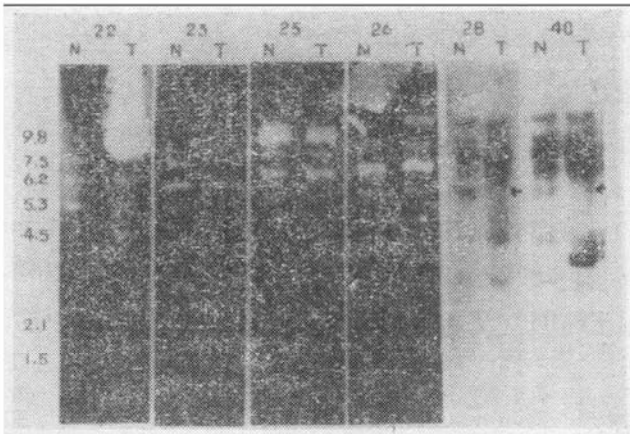


Fig.1 Deletion and rearrangement within the Rb gene in the gastric cancer
28: deletion of the 4.5-kilobase in cancer tissue
40: deletion of the 4.5-kilobase and rearrangement in cancer tissue
(N: normal tissue T: cancer tissue)

胃癌及癌旁组织 DNA 经 Hind III 酶消化、Southern 转移、Rb 3.8kb 探针杂交，15 例癌组织中两例有 Rb 基因片段杂交信号的缺失，缺失的片段均为 4.5kb，其中有一例在 1.8kb 处出现异常的杂交信号，而癌旁组织正常 (Fig. 1) 说明癌组织中有 Rb 基因的重排。两例有 Rb 基因缺失或重排的病例全是粘液腺癌。

讨 论

视网膜母细胞瘤的幸存者常发生第二种肿瘤如成骨肉瘤、软组织肿瘤等^[7]。

这些现象提示,除视网膜母细胞瘤外,Rb基因在其它肿瘤的病因上也可能是非常重要的。在成骨肉瘤、软组织肉瘤、乳腺癌及小细胞肺癌中已发现有Rb基因的缺失^[3,4]。Rb基因失活的方式有缺失、重排、点突变或发生在翻译、翻译后产物加工阶段。本实验使用Southern杂交方法首次研究了胃癌组织中Rb基因丢失的情况,发现15例胃癌中两例有Rb基因的缺失和或重排,说明Rb基因的丢失参与了胃癌的发生和发展。两例有Rb基因缺失或重排的病例全是粘液腺癌,因此Rb基因是否和胃粘液腺癌的发生有关,值得进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Weinberg R A. *Blood*, 1989, 74: 529—532
- 2 Huang HTS, et al. *Cell*, 1989, 56: 67—73
- 3 Porta GD, et al. *Tumori*, 1989, 75: 329—336
- 4 Levine A J. *BioEssays*, 1990, 12: 60—66
- 5 Shih C, Weinberg RA. *Cell*, 1982, 29: 161—170
- 6 Maniatis J, et al. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Second Edition 1989

Deletion and Rearrangement within Rb Gene in Human Gastric Cancer

Wang, Jun—ru Liu, Wei—wen Lu, You—yong Wang, Bin Deng, Guo—ren

(Beijing Institute for Cancer Reseach, Beijing 100034, Third Military Medical College Southwest Hospital)