

# MDM2 基因扩增和蛋白表达与胃癌相关性的研究

孙利平, 李岩, 张宁, 姜乃佳, 付伟, 薛一雪

孙利平, 国医科大学附属第二医院 辽宁省沈阳市 110003  
李岩, 张宁, 中国医科大学附属第二医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004  
姜乃佳, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110001  
付伟, 薛一雪, 中国医科大学神经生物学教研室 辽宁省沈阳市 110001  
项目负责人: 李岩, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院消化内科.  
电话: 024-83956416  
收稿日期: 2003-01-18 接受日期: 2003-03-28

## 摘要

目的: 研究癌基因mdm2在胃癌中的基因扩增和蛋白表达状况, 揭示mdm2与胃癌发生发展的相关性.

方法: 用RT-PCR和Westernblot方法对胃癌细胞在mRNA、蛋白质水平上进行检测.

结果: mdm2的基因扩增阳性率在胃癌组织中较高, 其中低分化 12.5%、中分化 37.5%、高分化 87.5%, 与正常组织比较有显著性差异( $P < 0.05$ ), 且与病理分级有关( $P < 0.05$ ). mdm2的蛋白表达阳性率在胃癌组织中较高, 其中低分化 25%、中分化 37.5%、高分化 62.5%, 与正常组织比较有显著性差异( $P < 0.05$ ), 与病理分级无关( $P > 0.05$ ).

结论: mdm2的基因扩增和蛋白过表达参与胃癌的发生发展, 检测胃癌mdm2基因扩增对估计该肿瘤的预后可能有所帮助.

孙利平, 李岩, 张宁, 姜乃佳, 付伟, 薛一雪. MDM2基因扩增和蛋白表达与胃癌相关性的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(11):1800-1801  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1800.asp>

## 0 引言

胃癌是危害人类健康的主要恶性肿瘤之一, 基因异常表达是肿瘤发生的重要原因. 我们收集不同病理分类的胃癌标本, 检测mdm2在胃癌组织中的基因水平和蛋白表达, 进而分析mdm2与胃癌发生、发展及预后的关系, 为临床治疗胃癌提供分子生物学方面的依据.

## 1 材料和方法

1.1 材料 标本来源: 中国医科大学附属第二医院内镜室及一院肿瘤外科手术胃癌标本, 取高分化、中分化、低分化各8例. 取6例正常胃窦组织为对照组. 主要试剂: MDM2抗体为美国Neomarkers公司产品; ECL (enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒为美国Santa Cruz公司产品; RNA提取试剂TRIzol购自Invetrogen公司; PCR试剂盒为TAKARA公司产品; RT-PCR引物由上海生物工程公司合成.

## 1.2 方法

1.2.1 Western印迹杂交 提取组织蛋白, 采用考马斯亮蓝法测定样品中的蛋白质含量. 取等蛋白量的样品, 电泳分离, 转印, 加入抗体室温杂交2h, 用ECL试剂盒显色, X线片曝光, 并通过相应蛋白带的相对灰度值表示蛋白含量的变化.

1.2.2 RT-PCR 半定量测定 用TRIzol提取胃癌组织的RNA, 合成cDNA第一链. 应用primer Premier5软件设计引物, 取3  $\mu$ L cDNA用于PCR扩增, 扩增条件为: 建立25  $\mu$ L反应体系, 95  $^{\circ}$ C预变性90s, 循环28次, 循环条件为: 94  $^{\circ}$ C变性30s, 58  $^{\circ}$ C退火1min, 72  $^{\circ}$ C延伸1min. 循环结束后72  $^{\circ}$ C延伸10min. 取10  $\mu$ L PCR产物进行电泳, EB染色, 扫描分析. mdm2基因拷贝数 = mdm2电泳带相对灰度值 /  $\beta$ -actin电泳带相对灰度值.

统计学处理 采用 $\chi^2$ 检验判断统计结果.  $P < 0.05$ 具有统计学意义.

## 2 结果

2.1 Western免疫印迹杂交结果 经检测在胃癌中表达的MDM2高于对照组, 二者比较有显著性差异( $P < 0.05$ ). 基因蛋白的表达与癌组织分化程度有一定关系图1. 高、中分化癌MDM2阳性率较高, 在低分化癌中阳性率较低, 但组间无显著性差异( $P > 0.05$ ). 表达阳性率见表1.

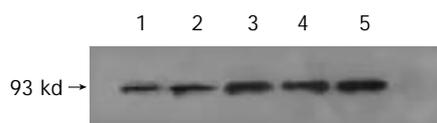


图1 Western免疫印迹杂交检测: 正常和胃癌组织中MDM2表达量的变化. 1: 正常胃组织; 2: 低分化胃癌; 3、4: 中分化胃癌; 5: 高分化胃癌.

表1 正常组织和胃癌组织中MDM2蛋白表达的阳性率

	正常	低分化胃癌	中分化胃癌	高分化胃癌
阳性	0	2	3	5
阴性	6	6	5	3
阳性率(%)	0	25	37.5	62.5

$P < 0.05$  vs 正常组织.

2.2 RT-PCR 半定量测定结果 在胃癌组织中mdm2基因扩增量明显高于对照组, 二者比较有显著性差异( $P < 0.05$ ). 基因的扩增与癌组织分化程度相关(图2). 高、中分化癌呈现出较高的扩增率, 在低分化癌中扩增率较低, 组间有显著性差异( $P < 0.05$ ). 扩增阳性率见表2.

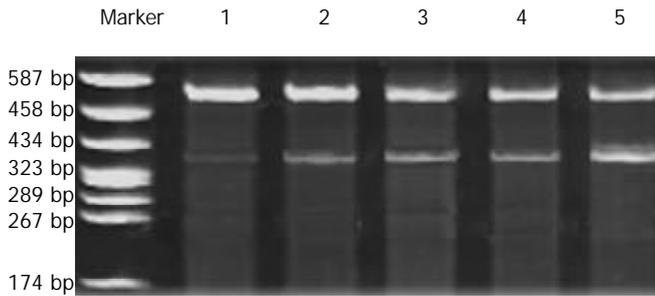


图2 RT-PCR检测:正常和胃癌组织中mdm2 mRNA扩增量的变化。1:正常胃组织;2:低分化胃癌;3、4:中分化胃癌;5:高分化胃癌。

表2 正常组织和胃癌组织中mdm2 mRNA扩增的阳性率

	正常	低分化胃癌	中分化胃癌	高分化胃癌
阳性	0	1	3	7
阴性	6	7	5	1
阳性率(%)	0	12.5	37.5	87.5

P < 0.05 vs 正常组织。

### 3 讨论

mdm2是近年来发现的癌基因,位于染色体12q13-14,mdm2体内最重要的作用是抑制野生型p53的激活转录功能和抗肿瘤活性。研究发现MDM2蛋白的过度表达导致同时表达的P53蛋白量减少,突变引起的MDM2作用障碍导致P53的集聚和活化<sup>[1]</sup>。mdm2可因野生型p53诱导而转录增强,其表达产物MDM2蛋白又转而可与P53蛋白形成复合物,封闭其转录活性,此即所谓P53/MDM2负反馈调节环。此外,P53蛋白只在核内发挥作用,其向核外转运可能以MDM2蛋白依赖的方式进行<sup>[2]</sup>,通过这两种机制,MDM2蛋白将野生型P53蛋白控制较低的无活性水平。Meltzer<sup>[3]</sup>提出,MDM2蛋白过表达和p53基因突变相似,均可使p53基因功能丧失。mdm2除抑制抑癌基因p53产生,其本身也有致癌作用。mdm2在细胞转化过程中起癌基因作用的证据很多<sup>[4]</sup>,部分肿瘤既有mdm2的过度表达又有p53的突变,此类患者的预后比仅有两种变化之一的患者差很多,另外在哺乳期mdm2转基因小鼠的乳房上皮中有其过度表达,使得细胞癌变也是证据。

有关胃癌相关基因扩增及表达的研究较多<sup>[5-13]</sup>,而在胃癌中mdm2的表达鲜有报道。本实验经Westernblot方法检测,MDM2蛋白表达的阳性率在胃癌中较高,与

正常组织相比有统计学意义,提示MDM2蛋白表达异常在胃癌中的作用也是不容忽视的,同时也进一步说明MDM2-P53功能异常是肿瘤发生中较为常见的分子机制。本实验经RT-PCR方法检测表明,mdm2基因的扩增与胃癌组织的分化程度有相关性,这一现象提示mdm2的基因扩增可能与胃癌的恶性程度及预后有关。另外,本实验结果可提示:通过阻断P53-MDM2二者的相互作用或者降低MDM2含量,或者将MDM2滞留于核内将会激活P53的肿瘤抑制功能,同样可以增强P53的功能。这种假设已在人类肿瘤得到证实,即恶性胶质瘤、人类颈部肿瘤<sup>[14,15]</sup>,国内亦有学者在肺癌细胞中得到证实<sup>[16]</sup>,但胃癌方面的治疗作用还是空白,有待进一步探索研究。

### 4 参考文献

- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 1997;387:299-303
- Almog N, Rotter V. An insight into the life of p53: a protein coping with many functions. *Biochim Biophys Acta* 1998;1378:R43-R54
- Meltzer PS. MDM2 and p53: a question of balance. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1265-1266
- Freedman DA, Wu L, Levine AJ. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:96-107
- 孙燕翔. C-erbB-2表达与胃癌的预后关系. *世界华人消化杂志* 2002;10:1115
- 孙喜文, 申宝忠, 石美森, 戴旭东. CD44v6基因表达与胃癌危险因素的关系. *世界华人消化杂志* 2002;10:1129-1132
- 朱华乔, 罗和生, 余保平. cFLIP基因表达与胃癌的关系研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:1329-1330
- 章希炜, 范萍, 杨宏宇, 杨力, 陈国玉. CK20 mRNA RT-PCR检测诊断胃癌微小转移. *世界华人消化杂志* 2002;10:1463-1464
- 肖鹏, 陈广斌, 贾宗智, 司斌团. 胃癌及转移淋巴结中P16和P15基因表达的意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:98-100
- 王维, 罗和生, 余保平. 胃癌及癌前病变中hTERT基因和c-myc蛋白的表达意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:258-261
- 杜建军, 窦科峰, 曹云新, 王中华, 王为忠, 高志清. 胃癌下调新基因CA11的功能研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:525-529
- 孔祥东, 张思仲, 胡建坤, 肖翠英, 孙岩, 夏庆杰. 原发胃癌中p15基因及蛋白表达的异常. *世界华人消化杂志* 2001;9:513-516
- 张晓梅, 沈守荣, 王晓艳, 王洁如, 李江. 胃癌和大肠癌中肿瘤相关基因NGX6的表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:873-876
- Arap W, Knudsen E, Sewell DA, Sidransky D, Wang JY, Huang HJ, Cavenee WK. Functional analysis of wild-type and malignant glioma derived CDKN2A beta alleles: Evidence for an RB-independent growth suppressive pathway. *Oncogene* 1997;15:2013-2020
- Liggett WH Jr, Sewell DA, Rocco J, Ahrendt SA, Koch W, Sidransky D. p16 and p16beta are potent growth suppressors of head and neck squamous carcinoma cell in vitro. *Cancer Res* 1996;56:4119-4123
- 高楠, 胡义德, 周决, 曹晓运, 曹也龙. 肺癌p14ARF和p16INK4a基因协同表达缺失及意义. *中国肺癌杂志* 2001;4:15-19