

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2001.01.11

# 肺癌患者吸烟量与痰液细胞 p53 和 K-ras 基因突变的关系

韩宝惠 廖美琳 包国良 冯久贤 董强刚

**【摘要】**目的 了解痰液细胞癌基因突变是否与肺癌患者的吸烟量有相关性。方法 将痰液 0.5 毫升加入痰处理液制备细胞沉淀液,酚氯仿提取 DNA;应用 SSCP-PCR 银染和 RFLP-PCR 方法对痰液中 p53、K-ras 突变情况进行检测。统计肺癌患者的香烟消耗量,分析 p53、K-ras 突变与吸烟量的关系。结果 在确诊的 110 例肺癌中,存在 p53 或 K-ras 基因突变者有 76 例,突变率达 69.1%,其中 16 例为 p53 和 K-ras 基因均有突变。全组中有 71 例重度吸烟者吸烟指数(400 支·年),71 例中 55 例有 p53 或 K-ras 基因突变,突变率达 77.5%,显著高于非吸烟组( $P < 0.001$ );p53 和 K-ras 突变患者的平均吸烟指数分别达到 861 和 630 支·年;而未突变的平均吸烟指数为 284 和 554 支·年,二者之间有显著性差异( $\chi^2 = 36.56, P = 0.002$ ,双尾检验)。结论 痰液细胞癌基因突变检测具有简便、实用、可行的特点,吸烟的肺癌患者中癌基因突变率显著高于非吸烟的肺癌患者,提示吸烟尤其是重度吸烟可能是支气管癌基因突变的主要原因之一,值得临床进一步开展深入的研究。

**【关键词】** 肺癌 p53 K-ras 诊断 痰液 吸烟

**【中图分类号】** R734.2;R349

## The relationship between smoking and p53 and K-ras gene mutations in sputum cells of patients with lung cancer

HAN Baohui\*, LIAO Meiling, BAO Guoliang, FENG Jiuxian, DONG Qianggang. \* Department of Pulmonary Diseases, Shanghai Chest Hospital, Shanghai 200030, P. R. China

**【Abstract】 Objective** To study the relationship between gene's mutation in sputum cells and smoking consumption of patients with lung cancer. **Methods** Sputum dispose liquid was added into 0.5 ml sputum, DNA was extracted twice with saturated phenol-chloroform and ethanol precipitate; p53 and K-ras gene mutations were detected by using SSCP-PCR and RFLP-PCR methods. **Results** Seventy-one of 110 patients with lung cancer were heavy smokers (index of smoking 400), 55 of 71 (77.5%) patients with heavy smoking were detected with gene alterations of p53 or K-ras ( $P < 0.05$ ). Average indexes of smoking in the patients with p53 or K-ras were 861 and 630 respectively, whereas those in non-smokers were 284 and 554 ( $\chi^2 = 36.56, P = 0.002$ ). **Conclusion** Detection of oncogene alterations in sputum is a simple method to practice. Oncogene alteration in smoking patients with lung cancer is higher, especially in heavy smokers, than those with no smoking. The results show that heavy smoking is one of the causes in oncogene mutations of bronchus and further investigation is necessary.

**【Key Words】** Lung cancer p53 K-ras Diagnosis Sputum Smoking

This study was supported by a grant from Shanghai Municipal Public Health Bureau Scientific Foundation for Youth (to HAN Baohui) (131954Y1).

吸烟是肺癌的危险因素已被人们所熟知,但吸烟是如何导致支气管上皮细胞发生癌变仍不清楚。近年来分子生物学研究认为:各种理化致癌因素所致的原癌基因突变、重组,抑癌基因失活、功能缺失与肺癌的发生、发展有极其密切的关系<sup>[1]</sup>。其中吸烟是较为明

确的相关因素,从这一过程的启动到临床可探测病灶的出现往往要经历数年乃至 10 余年的时间,也就是说原癌基因的突变是肺癌发生的“早期事件”。在肿瘤发生过程中,突变基因是维持肿瘤持续生长的特异性标志物,利用现代分子生物学技术有可能对吸烟所致的支气管上皮癌基因突变检测提供帮助,为肺癌的早期诊断及高危人群筛选提供帮助<sup>[2-5]</sup>。为此我们应用现代分子生物学技术,对 110 例诊为肺癌的患者痰液进行了前瞻性的研究,以期明确痰液细胞原癌基因突变

本研究受上海市卫生局青年科研基金项目(131954Y1)资助

作者单位:200030 上海市胸科医院肺内科(韩宝惠、廖美琳);胸部肿瘤研究所(包国良、冯久贤、董强刚)

与肺癌吸烟是否具有相关性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 研究对象 本院自 1996 年 5 月至 1997 年 5 月期

间共收治 110 例肺癌患者,其中男性 85 例,女性 25 例,平均年龄 59.7 岁;痰液标本同时行癌基因及病理细胞学检测,痰脱落细胞学检测阴性者行纤支镜检查或行剖胸探查获得病理诊断。患者详细资料见表 1。

表 1 110 例肺癌患者一般情况

Tab 1 Clinical characteristics of 110 patients with lung cancer

Histology	Average age	Sex M/F	Index of smoking		Stage*				Total
			<400	400					
Squamous cell carcinoma	61.5	44/4	11	37	6	11	23	8	48
Adenocarcinoma	58.1	11/15	15	11	4	8	11	3	26
Adenosquamous carcinoma	62.4	25/4	10	19	6	8	10	5	29
Other type	58.7	5/2	3	4	0	0	5	2	7
Total	59.7	85/25	39	71	16	27	49	18	110

\* TNM stage is based on UICC 1997 standard.

1.2 对照组 包括健康献血者外周血淋巴细胞(PBL)、SPC-A1(p53 未突变肿瘤细胞)、A549(p53、K-ras 突变肺癌细胞株,由本院肺癌研究室提供)。

1.3 痰液细胞 DNA 提取方法 收取患者晨痰 2 ml 转移至 50 ml 塑料离心管中,加 5 ml 痰液处理液(本院实验室配制),37℃ 水浴振荡 4 小时。于 1 000 r/min 下离心 5 分钟并清洗二次,制备单细胞悬液,沉积物加入 DNA 提取液(浓度 20 mg/ml) 10 μl、10% SDS 10 μl、含 1% Triton 的 TE 缓冲液 200 μl,37℃ 过夜,饱和酚氯仿抽提二次,乙醇沉淀,干燥的 DNA 悬浮于 25~50 μl 的 TE 中,-20℃ 冰箱保存。

用紫外分光光度仪测定抽提的 DNA 光密度值 OD260 和 OD280,以鉴定其 DNA 含量,要求 DNA 总量 >1 μg。OD260/OD280 比值要求在 1.6~1.85 之间。

提取 DNA 总产量 μg = 测定 OD 值 / OD260 × 稀释倍数 × 总体积

#### 1.4 痰液细胞 p53、K-ras 基因扩增、检测

1.4.1 DNA 引物合成 p53 基因外显子 5-6、7、8-9, K-ras 基因外显子 12 由中科院上海细胞所合成。引物核酸序列见参考文献 1。p53 基因外显子及引物序列如下:

范围	密码子	长度	序列
Exon 5-6	126-201	325 bp	TTCCTCTTCCTGCAGTACTC GCAAATTTCCCTTCCACTCGG
Exon 7	225-261	139 bp	GTGTTGICTCCTAGGTTGGC CAAGTGGCTCCTGACCTGGA
Exon 8-9	262-331	330 bp	CCTATCCTGAGTAGTGGTAA CCAAGACTTAGTACCTGAAG

K-ras 第 12 外显子(143 bp)及其扩增引物序列(5'→3')如下,其酶切位点位于第 11、12 密码子处:

A: ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTGGIC

B: TGCACCA GTAATATGCATAT

1.4.2 PCR 扩增 参照 Sozzi 方法并加以改良,扩增过程略。

1.4.3 PCR 扩增产物的检测 p53 检测采用 PCR-SSCP 方法, K-ras 检测采用 PCR-RFLP 方法。取 PCR 扩增产物 6 μl 与加样缓冲液 4 μl 混合于 2% Agarose 中进行水平电泳,以 PBR 322 为参照物,观测所扩增 DNA 条带。

1.4.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳 按 Bio-RAD 公司 Protean Slab Cell 方法,配制 8% 非变性 PAG 胶。PCR 产物与变性液相混,97℃ 变性 8 分钟,转入冰浴降温,再加样,100V 电泳约 3 小时,卸下胶后立即行银染。

1.4.5 银染 10% HAC 固定 10 分钟,去离子水洗 3 遍,暗室内加入染色液,染色 30 分钟,弃去染色液,去离子水洗 10 分钟,加入冷显色液,染色至条带清晰,迅速加入 10% HAC 终止显色,固定 2 分钟。水洗后置于玻璃板上,保鲜膜覆盖保存。

1.5 健康人外周血淋巴细胞、肿瘤细胞株 DNA 提取 取健康人外周血 5 ml,制备 DNA 及 p53、K-ras 扩增、检测与痰液细胞的相同。

1.6 统计学方法 全部资料输入计算机内建立数据库,SPSS 软件分析统计结果。

## 2 结果

### 2.1 痰液细胞 p53、K-ras 基因突变与病理、分期关系

110 例肺癌患者中有 47 例患者存在 p53 基因突变,突变率为 42.7%;其中 p53 外显子 5-6 突变有 16 例,7 外显子突变 31 例,8-9 外显子突变有 30 例。有 45 例存在 K-ras 基因突变,突变率为 40.9%,p53 和 K-ras 基因均有突变的有 16 例,而 p53 或 K-ras 基因任一突变者 76 例。本组 期病例 p53 突变率为 31.3% (5/16),

期突变率 40.7% (11/27), 期突变率 46.9% (23/49), 期突变率 44.4% (8/18)。测定结果显示肺癌病期愈晚 p53 基因突变率愈高, 但各病期 p53 基因突变率经统计学处理未见显著性差异。鳞癌的 p53 和 K-ras 基因突变率分别为 41.7% (20/48) 和 47.9% (23/48), 腺癌的 p53 和 K-ras 基因突变率分别为 42.3% (11/26) 和 38.5% (10/26), 腺鳞癌的 p53 和 K-ras 基因突变率分别为 48.3% (14/29) 和 37.9% (11/29), 其他类型的 p53 和 K-ras 基因突变率分别为 28.6% (2/7) 和 14.3% (1/7)。

有 35 例患者经过 6 次 (最多 12 次) 痰脱落细胞学检测均呈阴性, 或可疑恶性, 而痰液细胞 p53 或 K-ras 基因突变阳性, 后经纤支镜刷检、活检或手术病理证实为肺癌, 其中 14 例为 期。

**2.2 痰液细胞 p53、K-ras 基因突变与吸烟的关系** 重度吸烟 (吸烟指数 400 支·年) 者中 55 例有 p53 或 K-ras 基因突变, 突变率达 77.5% (55/71), 显著地高于非吸烟组 (53.8%, 21/39) ( $P < 0.001$ )。对香烟消耗量的统计中观察到 p53 和 K-ras 基因突变患者的平均吸烟指数分别达到 861 和 630 支·年; 而基因未突变的平均吸烟指数为 284 和 554 支·年, 二者之间有显著性差异 ( $\chi^2 = 36.56, P = 0.002$ , 双尾检验)。

47 例 p53 突变的病例中重度吸烟者有 38 例 (80.9%), 其外显子突变的情况为第 5-6 外显子 11 例; 第 7 外显子有 22 例; 第 8-9 外显子有 27 例。45 例 K-ras 基因突变的病例中重度吸烟者为 36 例 (80%)。

### 3 讨论

吸烟是导致肺癌的高危因素已被人们广泛认识, 肺癌发病率与烟草消耗量之间有明显的相关性, 烟草中的联胺、氧化乙烯、喹啉、亚硝胺 (NNK) 等可通过不同的机制诱发 DNA 的损坏, 导致 DNA 错误的复制和突变, 如苯并芘, 它可以与鸟嘌呤结合形成芽孢状的 DNA, 可特异性地导致 G→T 的突变; NNK 是一种非常强的致癌物质, 对肺组织有高度的特异性, 而 p53 基因突变与苯并芘和 NNK 有关<sup>[6,7]</sup>。Suzuki 等<sup>[8]</sup>对 30 例非小细胞肺癌的 p53 基因进行研究, 发现有 14 例有基因突变, 利用 COX 多变量分析发现“吸烟指数”是 p53 基因突变的惟一相关因素。Mitsudomi 等<sup>[3]</sup>对不同类型肺癌 p53 基因检测, 发现 p53 在非小细胞肺癌突变率为 40%~60%, 而在小细胞肺癌则高达 70%~100%; K-ras 基因在非小细胞肺癌中有 15%~30% 的突变率。研究证实 p53 和 K-ras 基因在肺癌发生的早期即可出现, 肿瘤愈是晚期、肿瘤负荷愈大, 癌基因突变的种类,

突变的位点也就愈多<sup>[5]</sup>, 我们的实验结果也支持上述观点。

肺癌基因检测多数报告应用手术标本作为检测对象, 从痰液细胞中检测原癌基因突变的报告不多, 但痰液细胞癌基因检测具有方便、无创、患者易于接受等优点, 而且国内对吸烟尤其是吸烟指数对呼吸道支气管粘膜细胞基因水平突变的影响报告不多, 因此我们对 110 例肺癌患者基因突变进行检测, 其中有 71 例为重度吸烟患者, 其痰液细胞 p53 或 K-ras 突变达 77.5%, p53 突变者吸烟平均指数达 861 支·年, 而 p53 未突变者吸烟指数为 284 支·年; K-ras 突变者吸烟指数达 630 支·年, 而 K-ras 基因未突变者吸烟指数为 554 支·年, 这一结果与国外的研究结论是一致的。检测结果表明应用 SSCP-PCR/RFLP-PCR 方法从痰液中检测吸烟所致的支气管粘膜细胞基因突变是直接、简便、无创的方法。

本实验结果表明肺癌患者痰液细胞 p53、K-ras 突变率为 69.1% (76/110), 癌基因突变率在重度吸烟患者中明显增加, 提示重度吸烟是导致支气管粘膜基因突变的主要原因之一。

### 参 考 文 献

- 1 Kishimoto J, Murakami Y, Shiraiishi M, et al. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res*, 1992, 52(9): 4799-4804.
- 2 Tocknan MS, Gupta PK, Myers JD, et al. Sensitive and specific monoclonal antibody recognition of human lung cancer antigen on observed sputum cell: a new approach to early lung cancer detection. *J Clin Oncol*, 1988, 6(11): 1685-1716.
- 3 Mitsudomi T, Oyama T, Kusano T, et al. Mutation of the p53 gene as a predictor of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1993, 85(4): 2018-2023.
- 4 Li Mao, Hruban RH, Boyle JO, et al. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res*, 1994, 54(3): 1634-1637.
- 5 Strass Gn, Kwiatkowski DJ, Harpote DH, et al. Molecular and pathologic markers in stage non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 1995, 13(5): 1265-1269.
- 6 Kindo K, Tsuzuki H, Sasa M, et al. A dose response relationship between the frequency of p53 mutations and tobacco consumption in lung cancer patients. *J Surg Oncol*, 1996, 61(1): 20-26.
- 7 Husgarver PK, Ridanpaa M, Anmia S, et al. p53 and ras gene mutations in lung cancer: implications for smoking and occupational exposures. *J Occup Environ Med*, 1995, 37(1): 69-76.
- 8 Suzuki H, Takashi T, Kuroishi T, et al. p53 mutations in non-small-cell lung cancer in Japan: association between mutations and smoking. *Cancer Res*, 1992, 52(2): 734-736.

(收稿: 1999-11-23 修回: 2000-02-24)

(本文编辑 张世雯)