

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2000.05.14

肺癌患者癌组织和痰液细胞中 p53 和 K-ras 基因突变的研究

李清泉 吴小军 胡克 丁续红 杨炯

【摘要】 目的 检测肺癌组织和肺癌患者痰液脱落细胞中 p53、K-ras 基因突变情况,比较联合检测 p53、K-ras 和单一检测 p53 或 K-ras 基因在肺癌诊断中的价值。方法 应用 PCR-SSCP-银染法检测了 59 例肺癌组织、癌旁肺组织、14 例肺部良性病变肺组织及患者痰液脱落细胞中 p53 基因第 5~8 外显子、K-ras 基因第 1 外显子突变。结果 肺癌组织中 p53 基因突变率为 37.3%(22/59),痰液脱落细胞为 33.9%(20/59),两组间比较无显著性差异($P > 0.05$)。肺癌组织和患者痰液脱落细胞中 K-ras 基因突变率分别为 23.7%(14/59)和 20.3%(12/59)。肺良性病变肺组织和肺良性疾病患者痰液脱落细胞中均未检测到 p53 和 K-ras 基因突变。肺腺癌组织 K-ras 突变率(44%,11/25)显著高于其它类型的肺癌(8.8%,3/34)($P < 0.01$)。吸烟肺癌患者 p53 突变率(48.7%,19/39)显著高于非吸烟肺癌患者(15%,3/20)($P < 0.01$)。联合检测肺癌患者痰液脱落细胞 p53 和 K-ras 基因突变率为 54.2%(32/59),显著高于痰脱落细胞中 33.9%的 p53 突变和 20.3%的 K-ras 突变率。结论 联合检测肺癌患者痰液脱落细胞中 p53 和 K-ras 基因突变,有助于提高肺癌的检出率和诊断。

【关键词】 肺肿瘤 痰脱落细胞 p53 基因 K-ras 基因

【中图分类号】 R734.2

Study on the mutations of p53 and K-ras gene in the cancer tissues and sputum cells of patients with lung cancer

LI Qingquan, WU Xiaojun, HU Ke, DING Xuhong, YANG Jiong. Respiratory Department, First Affiliated Hospital of Hubei Medical University, Wuhan, Hubei 430060, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the mutations of p53 gene and K-ras gene in cancer tissues and sputum cells of patients with lung cancer, and to evaluate their values on detection of lung cancer. **Methods** The mutation of exon 5-8 of p53 gene and exon 1 of K-ras gene in cancer tissues and sputum cells was detected in 59 patients with lung cancer and in 14 patients with benign pulmonary lesions as control by PCR-SSCP-AgNO₃ staining method. **Results** The mutation rate of p53 was 37.3%(22/59) in cancer tissues, and 33.9%(20/59) in sputum cells. No significant difference was observed between the two groups ($P > 0.05$). The mutation rate of K-ras gene was 23.7%(14/59) and 20.3%(12/59) in cancer tissues and sputum cells respectively. No mutation of p53 and K-ras was detected both in benign pulmonary lesion tissues and sputum cells in patients with benign pulmonary diseases. The mutation rate of K-ras in adenocarcinoma (44%, 11/25) was significantly higher than that in other histological classification of the cancer (8.8%, 3/34) ($P < 0.01$). p53 mutation (48.7%) in smokers with lung cancer was significantly higher than that (15%) in nonsmokers with lung cancer ($P < 0.01$). The mutation rate (54.2%) of combination detection of p53 and K-ras in sputum cells was significantly higher than that of p53 (33.9%) or K-ras (20.3%) alone ($P < 0.05$). **Conclusion** Combined detection of p53 and K-ras mutation in sputum cells of patients with lung cancer may help the diagnosis of lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms Sputum cells p53 gene K-ras gene

This work was supported by a grant from Ninth-five-year Key Task Project of Hubei Province (to LI Qingquan) (961P1801).

p53 基因为目前最热门的抑癌基因之一,作为“分子警察”的 p53 基因在众多的肿瘤中突变率高,成为众

多肿瘤的分子标志物。K-ras 基因在肺癌特别是肺腺癌中出现较高的突变率,众多的资料表明其为肺癌发生的早期事件,可能成为肺癌早期诊断的标志物。痰液中含有支气管肺组织的脱落细胞,肺癌或癌前病变更产生的癌细胞或非典型细胞会随痰液咯出。本研究试

本研究受湖北省“九五”攻关项目(961P1801)资助
作者单位:430060 武汉 湖北医科大学附属第一医院呼吸内科

图通过检测肺癌患者癌组织及痰液脱落细胞中 p53 和 K-ras 基因的突变情况,明确痰液中脱落细胞的遗传学改变能否反映组织癌变情况以及两种基因的联合检测是否更有利于肺癌的早期诊断,从而为肺癌高危人群的大量筛查提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 资料 收集湖北医科大学附属第一医院胸外科和湖北省肿瘤医院胸体科 1997 年 5 月至 1998 年 10 月的肺癌手术标本及相应痰液各 59 份,患者中男 48 例,女 11 例,年龄 35 ~ 72 岁,平均 59.3 岁,鳞癌 22 例,腺癌 25 例,腺鳞癌 2 例,小细胞和大细胞及支气管肺泡癌各 3 例,类癌 1 例。另取肺结核 2 例、肺脓疡 1 例的病变组织及痰液与癌旁正常肺组织 11 例作为对照。标本取下后放入液氮罐中,再放入 -70℃ 冰箱中,肿瘤分期按 1997 年制定的 TNM 系统进行,Ⅰ期 12 例,Ⅱ期 30 例,Ⅲ期 16 例,Ⅳ期 1 例。

1.2 痰液留取和 DNA 的提取 按参考文献 1 方法进行痰液和组织中 DNA 的提取。

1.3 PCR 扩增

PCR 引物:

p53 exon 5 5' 5' TTCCTCTCCTGCAGTACTCC 3'
 3' 5' GCCCCAGCTCTGCACCATCG 3'
 exon 6 5' 5' CACTGATTGCTCTTAGGTCT 3'
 3' 5' AGTTGCCAAACCAGACCTCAGG 3'
 exon 7 5' 5' TCTCCTAGGTTGGCTCTGAC 3'
 3' 5' CAAGTGGCTCCTGACCTGGA 3'
 exon 8 5' 5' CCTATCCTGAGTAGTGGTAA 3'
 3' 5' GTCCTGCTTGCTTACCTCG 3'

以上引物分别扩增产生 204、144、133、168 bp 产物。

K-ras 引物:

5' 5' ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT 3'
 3' 5' TCAAAGAATGGTCCTGCACC 3'

扩增产物为 157 bp。

反应程序 94℃ 变性 1 分钟,58℃ 1 分钟,72℃ 2 分钟,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 分钟,4℃ 保存。

1.4 SSCP 分析 (single strand conformation polymorphism)

非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备按参考文献 2 方法进行。取 4 μl PCR 产物与等体积的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳加样缓冲液混合。混合液置于 96℃ 水浴 10 分钟后,取出后快速放于已预冷的无水乙醇中。将上述混合液加入加样孔中,在电压 150 V、4℃ 下电泳 3 ~ 4 小时后行硝酸银染色。

1.5 结果判定 经变性后扩增产物双链变成两条单链,两条单链的泳动位置与正常对照的两条单链位置有差异即认为存在点突变。

1.6 统计学方法 采用 *u* 检验。

2 结果

p53 基因在肺癌组织中突变率为 37.3% (22/59),在痰液脱落细胞中为 33.9% (20/59),无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 1)。K-ras 基因在肺癌组织和痰液脱落细胞中的突变率分别为 23.7% (14/59) 和 20.3% (12/59),肺腺癌组织和痰液脱落细胞中的突变率分别为 44% (11/25) 和 36% (9/25),也无显著性差异 ($P > 0.05$) 而在其它类型肺癌组织中 K-ras 突变率仅为 8.8% (3/34)。全组中 p53 或 K-ras 任一基因突变者共计 32 例,占 54.2%,显著高于两基因单独检测的阳性率 ($P > 0.05$)。良性病变组织及相应痰液脱落细胞与癌旁正常组织中两基因均无突变。

表 1 肺癌组织和相应痰液 p53 基因突变

Tab 1 The mutation of p53 in lung cancer tissues and sputums

Histology	p53 gene mutation	
	in cancer tissue	in sputum
Squamous cell carcinoma	9 (40.9%)	9 (40.9%)
Adenocarcinoma	7 (28%)	6 (24%)
Large cell carcinoma	3 (100%)	2 (66.7%)
Small cell carcinoma	3 (100%)	3 (100%)
Total	22 (37.3%)	20 (33.9%)

Ⅰ、Ⅱ期肺癌 p53 基因突变率为 35.7% (15/42),Ⅲ、Ⅳ期肺癌 p53 基因突变率为 41.2% (7/17),两者无显著性差异;Ⅰ、Ⅱ期肺腺癌 K-ras 基因突变率为 45.5% (10/22),Ⅲ、Ⅳ期肺腺癌 K-ras 基因突变率为 33.3% (1/3)。

吸烟肺癌患者的 p53 突变率为 48.7% (19/39),明显高于非吸烟患者 15% (3/20) 的突变率 ($P < 0.01$);吸烟肺腺癌患者的 K-ras 突变率为 62.5% (10/16),明显高于非吸烟患者 11.1% (1/9) 的突变率 ($P < 0.01$)。

3 讨论

p53 基因定位于 17p13,突变的 p53 蛋白失去了 G₀/G₁ 期的细胞停滞作用,对细胞增殖失去控制,它还能灭活野生型 p53 蛋白并诱导遗传不稳定。这些改变导致了细胞的恶性转化^[3]。p53 基因在各型肺癌中突变率均较高,在以往报道中肺鳞癌约为 33% ~ 68%;肺腺癌为 28% ~ 41%;小细胞癌为 61% ~ 87%^[4]。p53 基因以 5 ~ 8 外显子突变最为多见。本研

究中肺部良性组织无 1 例出现 p53 基因突变,而肺癌组织中突变率为 37.3% (22/59),相应的痰液脱落细胞中突变率为 33.9% (20/59),其中 1 例腺癌和 1 例大细胞癌患者的癌组织中 p53 基因发生突变,而痰液脱落细胞中 p53 未突变;痰液脱落细胞和肺癌组织中 p53 基因突变率比较,无统计学差异。有文献^[3,5]认为 SSCP 法与直接测序法相比,约有 10% 的假阴性,这也许是本研究中阳性率较低的原因之一。本研究中各期之间 p53 基因突变无显著性差异,提示 p53 基因突变可能是肺癌发生的早期事件。我们研究还发现吸烟的肺癌患者 p53 突变率与非吸烟肺癌患者有显著性差异。这说明吸烟在致 p53 基因突变中起着重要的作用。

K-ras 基因若出现点突变,将引起基因扩增,从而导致了细胞的转化,最终引起肿瘤的发生。K-ras 基因突变以第 1 外显子的 12、13、61 密码子为多见。在肺癌中,以 12 密码子点突变为主。其突变主要在肺腺癌中,突变率为 30% ~ 70%。Yakubouskaya 等用增强 PCR (EPCR) 检测了 37 例肺癌患者,发现有 18 例 (49%) 痰液中 K-ras 基因突变^[6],本研究中肺部良性组织无 1 例出现 K-ras 基因突变,25 例肺腺癌中有 11 例出现突变,而痰中有 9 例出现突变,其它类型肺癌突变率仅为 8.8% (13/34),与文献报道基本相似^[7]。此外,吸烟肺腺癌患者的 K-ras 基因突变率显著高于未吸烟的患者,这说明吸烟与 K-ras 基因突变存在着密切的关系。

在我们的研究中,肺癌组织中 p53 基因点突变率

为 37.3%, K-ras 基因的突变率为 23.7%,任一单一基因检测在肺癌诊断中的价值均不大。但若将两种基因联合检测则阳性率达 54.2% (32/59),明显高于单一基因的检测。

综上所述,我们认为检测痰液中 p53 和 K-ras 基因改变能反映其在肺组织中的改变情况,从而为肺癌高危人群的大量筛查提供理论依据。

参 考 文 献

- 1 吴小军,戴宝生,胡克,等.不同的液化方法对痰液 DNA 提取的影响.湖北医科大学学报,1999,20(3):210-211.
- 2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 金冬雁,黎子枫主译.分子克隆实验指南.第 2 版.北京:科学出版社,1996.325-330.
- 3 Liloglou T, Ross H, Prime W, et al. p53 gene aberrations in non-small-cell lung carcinomas from a smoking population. Br J Cancer, 1997, 75(8):1119-1124.
- 4 Murakami L, Fujiwara Y, Yamaoka N, et al. Detection of p53 gene mutations in cytopathology and biopsy specimens from patients with lung cancer. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154(6):1117-1123.
- 5 Top B, Mool WS, Klaver SG, et al. Comparative analysis of p53 gene mutations and protein accumulation in human non-small-cell lung cancer. Int J Cancer, 1995, 64(1):83-91.
- 6 Yakubouskaya MS, Spiegelman V, Luo FC, et al. High frequency of K-ras mutations in normal appearing lung tissues and sputum of patients with lung cancer. Int J Cancer, 1995, 63(5):810-814.
- 7 Li ZH, Zheng J, Weiss LM, et al. C-K-ras and p53 mutations occur very early in the adenocarcinoma of lung cancer. Am J Pathol, 1994, 144(2):303-309.

(收稿 2000-01-25 修回 2000-05-05)

(本文编辑 张世雯)