

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2000.01.06

# 人非小细胞肺癌组织 p73 基因转录表达研究

何勇 范士志 蒋耀光 陈建明 李志平 张华

**【摘要】** 目的 探讨 p73 基因转录表达与肺癌发生、发展的关系。方法 采用逆转录多聚酶链反应技术 (RT-PCR) 检测 32 例非小细胞肺癌组织、癌旁组织和 7 例肺良性病变组织,及其对应正常肺组织 p73 mRNA 的表达。结果 32 例肺癌组织中 28 例 p73 表达明显升高,肺癌组织中 p73 mRNA 阳性表达率明显高于癌旁肺组织和肺良性病变组织 ( $P < 0.01$ )。肺癌组织中 p73 mRNA 的阳性表达率与组织学类型、细胞分化程度和 P-TNM 分期无明显关系 ( $P > 0.05$ )。结论 肺癌组织中存在 p73 基因的过度转录表达,它可能参与调控非小细胞肺癌的发生、发展过程。

**【关键词】** p73 基因 肺肿瘤 过度表达 PCR

**Study on the transcript expression of p73 gene in human non-small cell lung cancer tissues** HE Yong, FAN Shizhi, JIANG Yaoguang, CHEN Jianming, LI Zhiping, ZHANG Hua. Department of Thoracic Surgery, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, P. R. China

**【Abstract】 Objective** To explore the relationship among the p73 gene transcript expression and the oncogenesis, development of human non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** The expression of p73 mRNA was detected in 32 human NSCLC tissues, para-cancer tissues, 7 lung benign lesion tissues and matched non-cancer lung tissues by semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Overexpression of p73 mRNA was found in 28/32 NSCLC tissues. The positive expression rate of the p73 mRNA in the cancer tissues was significantly higher than that in the para-cancer tissues and benign lesion tissues either ( $P < 0.01$ ). No significant relationship was observed among p73 expression and differentiated grades, histoclassification and P-TNM stages of the cancer ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The results suggest that there is an overexpression of p73 mRNA in lung cancer tissues and it may play an important role in the tumorigenesis and development in NSCLC.

**【Key words】** p73 gene Lung neoplasms Overexpression PCR

This work was supported by the Applied Basic Fund of Chongqing (to Chen Jianming) (No. 99-5658).

p73 是近来发现的 p53 基因家族的新成员,其产物与 p53 蛋白具有非常相似的结构和功能,被认为是一个候选抑癌基因<sup>[1,2]</sup>。目前,有关肺癌组织中 p73 基因的转录表达研究,国内外均仅有少数报道。本研究应用逆转录多聚酶链反应技术 (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR),对 32 例非小细胞肺癌 (NSCLC) 癌组织、癌旁组织和 7 例良性病变肺组织的 p73 mRNA 表达水平进行分析,并以相同病例的远癌肺组织作对照,以探讨 p73 基因转录表达水平改变与肺癌发生、发展的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象 全部标本取我科和重庆医科大学附

本课题受重庆市应用基础基金 (99-5658) 资助

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所胸心外科

一院胸心外科 1999 年 1 月至 4 月住院患者的手术切除肺组织,并经病理学检查确诊。肺癌患者 32 例,肺良性疾病患者 7 例。肺癌病例中,男 23 例,女 9 例;年龄 41~72 岁,平均 57.5 岁;其中鳞癌 17 例,腺癌 13 例,腺鳞癌 2 例;病理分期采用 1997 年 UICC 肺癌国际分期标准, A + B 期 10 例, A + B 期 13 例, A + B 期 9 例。肺良性疾病中男 3 例,女 4 例,年龄 48~62 岁,平均 53.7 岁;炎性假瘤 5 例,结核 2 例。

**1.2 组织标本** 全部标本均在手术时收集,取材后立即放入液氮待检。肿瘤均在原发灶取材;癌旁组织取自相应肿块旁 2 cm,远癌肺组织取自距肿块 5 cm 以上之肺组织,并经病理学检查未见癌细胞。

**1.3 引物** 参照 Ming Mai<sup>[3]</sup> 的序列合成一对 p73 基因的引物,由美国 Mayo 研究所 Wanguo Liu 教授合成后惠赠。引物序列:上游引物:5'-AACGCTGCCCAAC-CACGAG3';下游引物:5'-GCCGGTTCATGCCCCCTACA-

3。PCR 产物片段为 231 bp。为保证逆转录效率和确定 cDNA 的完整性,将  $\beta$ -actin 做为参照。 $\beta$ -actin 引物购自英国 Stratagene 公司,PCR 产物片段为 661 bp。

**1.4 实验方法** 组织总 RNA 的提取采用 Trizol 分离试剂(B. M 公司),按试剂盒说明书操作。用紫外分光光度计定量,计算吸光度(A)值 260 与 280 比值,检测 RNA 的纯度,比值均在 1.80 以上。经 1% 琼脂糖甲酰胺变性凝胶电泳,可见有 28S 和 18S 两条清晰的 rRNA 电泳条带。

应用 AMV-RTase 和 Oligo (dT) 15 引物(均为 Promega 公司产品),先将以上所提取的总 RNA 反转录成 cDNA。PCR 扩增反应:取 4  $\mu$ l 反转录 cDNA 作 PCR 扩增,反应体系为 20  $\mu$ l,含 10  $\times$ PCR buffer 2  $\mu$ l,  $Mg^{2+}$  2 mmol/L, dNTP 各 200  $\mu$ mol/L, Taq DNA 聚合酶(Perkin-Elmer 公司) 0.5 U,引物各 0.3  $\mu$ mol/L。并按以下参数在 PCR 扩增仪(Perkin-Elmer 公司 9600 型)上进行。p73 反应条件:95 变性 60 s,60 退火 60 s,72 延伸 90 s,经 33 个循环周期后,取 10  $\mu$ l PCR 产物经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳、溴化乙锭染色后,紫外灯下观察结果,照相。以 PCR-Marker 为标准,在 231 bp 位置出现条带为 p73 表达阳性。 $\beta$ -actin 反应条件:94 变性 70 s,60 退火 70 s,72 延伸 115 s,经 35 个循环周期后,1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 溴化乙锭)电泳,在 661 bp 位置出现条带为  $\beta$ -actin 表达阳性。

**1.5 结果判断**<sup>[3]</sup> 阴性结果只有 661 bp 位置的  $\beta$ -actin 内标带出现,阳性结果除内标带外尚有 p73 基因 231 bp 的阳性带。将底片置密度扫描仪下分析,以两条带的积分吸光度比值反映 p73 基因的相对表达。根据 p73/ $\beta$ -actin 大小判断 p73 表达水平高低,p73/ $\beta$ -actin <0.1 时为阴性,>0.1 为阳性,病变组织 p73/ $\beta$ -actin 大于对应正常肺组织为过量表达。

**1.6 统计学处理** 计数资料采用  $\chi^2$  检验。

**2 结果**

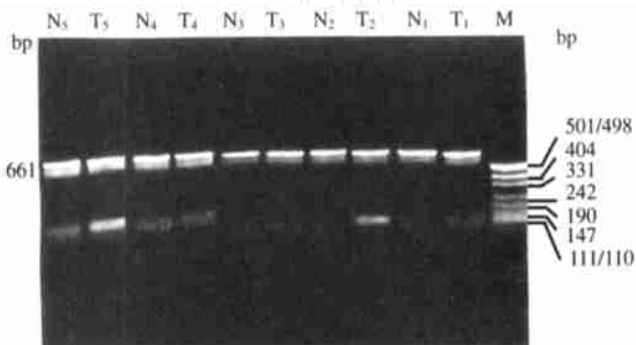
**2.1 PCR 扩增**(图 1、2) 32 例肺癌组织中 28 例 p73 表达阳性,癌旁组织中 5 例表达阳性,远癌肺组织 4 例表达阳性。肺癌组织和癌旁组织中 p73 过量表达者分别为 28 例和 2 例。7 例良性病变肺组织及其对应正常肺组织均未见阳性表达(表 1)。

**2.2 肺癌组织、癌旁组织、良性病变肺组织中 p73 转录表达比较** 以  $\beta$ -actin 作内参照,肺癌组织与癌旁组织、良性病变肺组织及对应正常肺组织之间 p73 mRNA 阳性表达率具有非常显著差异( $P$  均 <0.01),而后三者之间 p73 mRNA 表达无显著差异( $P$  >0.05)(表 1)。

**表 1** 不同肺组织中 p73 表达的比较

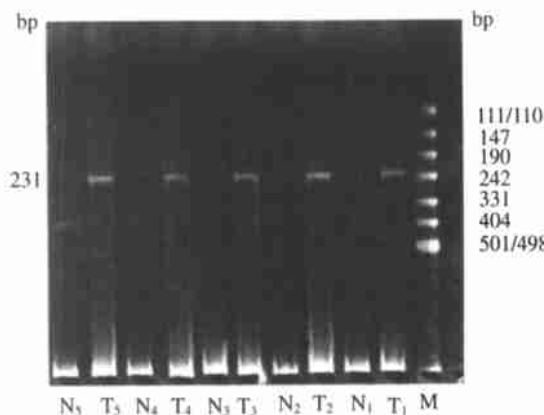
**Tab 1** Comparison of p73 expression in the different pulmonary tissues

Groups	n	No. of positive	Positive rate
Lung cancer tissues	32	28	87.5
Lung tissues adjacent to cancer	32	5	15.6
Non-cancer lung tissues	32	4	12.5
Benign lung lesion tissues	7	0	0
Normal lung tissues	7	0	0



**图 1** RT-PCR 分析  $\beta$ -actin 的表达,作为 p73 基因表达的参照 M:DNA 分子量标志;T:肺癌组织标本;N:远癌肺组织标本

**Fig 1** RT-PCR analysis of  $\beta$ -actin expression in different lung tissues It was used as an internal control. M:Markers;T:Lung cancer tissues;N:Non-cancer lung tissues



**图 2** RT-PCR 分析 p73 表达

M:DNA 分子量标志;T:肺癌组织标本;N:远癌肺组织标本

**Fig 2** RT-PCR analysis of p73 expression in different lung tissues M:Markers;T:Lung cancer tissues;N:Non-cancer lung tissues

**2.3 p73 mRNA 表达与肺癌临床病理特征之间的关系** 一期 p73 基因的表达率分别为 90% (9/10)、84.6% (11/13) 和 88.9% (8/9)。肺癌不同细胞分化程度 p73 基因的表达率为:低分化 90% (9/10)、中分化

85.7% (12/14)、高分化 87.5% (7/8)。鳞癌、腺癌和腺鳞癌 p73 基因的表达率分别为 82.4% (14/17)、92.3% (12/13) 和 100% (2/2)。统计学分析表明, p73 mRNA 阳性表达率与 TNM 分期、细胞分化程度及组织学类型无明显关系 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

p53 是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因, 并且与肺癌尤为相关, 大约 50% 的 NSCLC 和 70% 的 SCLC 都有 p53 基因突变。p53 作为经典的抑癌基因具有“基因组卫士”的作用, 能通过调控 p21<sup>Waf-1</sup> 等靶基因而引起细胞周期停滞及细胞凋亡。p73 不但结构与 p53 具有高度的同源性, 而且能象 p53 一样调控细胞周期进程及诱导细胞凋亡<sup>[2]</sup>。p73 基因定位于染色体上一个在多种人类肿瘤中发生缺失频率非常高的区域——1p36.33<sup>[4]</sup>, 目前认为 p73 基因就是该区一个极具希望的候选抑癌基因。因此, p73 一被发现便成为肿瘤分子生物学和遗传学领域的一个研究热点。但是, p73 的生理功能以及在肿瘤中的作用等问题均有待进一步研究。

目前, p73 在一些肿瘤如神经母细胞瘤、膀胱癌、前列腺癌、大肠癌和脑膜瘤中的转录表达研究国外已有报道, 但结果不太一致。研究发现在神经母细胞瘤<sup>[5]</sup>、脑膜瘤<sup>[6]</sup>和前列腺癌<sup>[7]</sup>中 p73 mRNA 的表达并不升高, 而在大肠癌、乳腺癌<sup>[8]</sup>和膀胱癌<sup>[9]</sup>中 p73 mRNA 的过量表达却十分明显。Senoo<sup>[10]</sup>认为, p73 mRNA 在不同肿瘤中明显的表达差异提示 p73 的作用或许具有组织特异性。本研究以组织学分型、分化程度及临床 TNM 分期为基础, 比较了人 NSCLC 各组间 p73 基因的阳性表达率, 发现差异均无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 提示 p73 的表达是独立于上述临床病理学特征之外的分子参数。本研究观察到, 肺癌组织中 p73 mRNA 表达水平较良性病变肺组织有明显升高, 提示肺癌中确实存在 p73 的过度转录表达, p73 基因可能参与调控肺癌的发生。此外, 肺癌中 p73 的转录表达较癌旁肺组织和远癌肺组织明显增高, 癌旁组织虽发现有 2 例过量表达, 但与远癌肺组织间无统计学差异, 且两例过量表达者不排除因癌旁组织距肿瘤过近取材受污染或存在普通病检未发现的肿瘤细胞浸润。这一观察结果提示 p73 过量表达可能是肺癌发生过程后期才发生的分子事件, 与 Ichimiya<sup>[8]</sup>对神经母细胞瘤的研究结果较一致。或许可以推测, 对于正常肺组织来说, p73 基因是一种肿瘤防御或应激基因, 只有当组织发生癌变才能

触发 p73 基因应激性地增强表达, 执行其防御功能, 这有利于解释 p73 的表达特点与其功能的关系。

迄今, 在已检测的细胞株和人类肿瘤如肺癌、前列腺癌、大肠癌和膀胱癌等肿瘤中均未发现 p73 基因的突变<sup>[11]</sup>, 研究者认为: p73 在肿瘤发生机制中或许并不象 p53 一样是一个抑癌基因<sup>[12]</sup>。但 Jack 认为即使 p73 并非抑癌基因, 但如能找到一个方法开启 p53 缺失的肿瘤细胞中 p73 基因的功能, 将使癌症治疗成为可能<sup>[13]</sup>。有关 p73 是不是一种抑癌基因、p73 在肿瘤中为什么很少突变、它的活化调节机制以及与 p53 的关系都有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997, 88(3) 323-331.
- 2 Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, 1997, 22, 90(4) 809-819.
- 3 Broxterman HJ, Lankelma J, Pinedo HM. How to probe clinical tumour samples for P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein. *Eur J Cancer*, 1996, 32A 1024-1033.
- 4 Thompson FH, Taetle R, Trent JM, et al. Band 1p36 abnormalities and t(1;17) in ovarian carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 1997, 96(2) 106-110.
- 5 Kovalev S, Marchenko N, Swendeman S, et al. Expression level, allelic origin, and mutation analysis of the p73 gene in neuroblastoma tumors and cell lines. *Cell Growth Differ*, 1998, 9(11) 897-903.
- 6 Loiseau H, Arsaut J, Demotes Mainard J. p73 gene transcripts in human brain tumors: overexpression and altered splicing in ependymomas. *Neurosci Lett*, 1999, 263(3) 173-176.
- 7 Yokomizo A, Mai M, Bostwick DG, et al. Mutation and expression analysis of the p73 gene in prostate cancer. *Prostate*, 1999, 39(2) 94-100.
- 8 Ichimiya S, Nimura Y, Kageyama H, et al. p73 at chromosome 1p36.3 is lost in advanced stage neuroblastoma but its mutation is infrequent. *Oncogene*, 1999, 18(4) 1061-1066.
- 9 Yokomizo A, Mai M, Tindall DJ, et al. Overexpression of the wild type p73 gene in human bladder cancer. *Oncogene*, 1999, 18(8) 1629-1633.
- 10 Senoo M, Seki N, Ohira M, et al. A second p53-related protein, p73L, with high homology to p73. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 248(3) 603-607.
- 11 Han S, Semba S, Abe T, et al. Infrequent somatic mutations of the p73 gene in various human cancers. *Eur J Surg Oncol*, 1999, 25(2) 194-198.
- 12 Mihara M, Nimura Y, Ichimiya S, et al. Absence of mutation of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 1999, 79(1) 164-167.
- 13 Dickman S. First p53 relative may be a new tumor suppressor. *Science*, 1997, 277(5332) 1605-1606.

(收稿:1999-09-05 修回:2000-01-06)

(本文编辑 李蓓兰)