

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2000.01.10

肺癌组织和支气管切缘 p53 基因突变研究

许林 程梅 俞明锋 黄建峰 薛开先 王毓三

【摘要】 目的 检测肺癌组织和支气管切缘 p53 基因突变,以预测肺癌手术切除的效果和局部复发。方法 用 PCR-SSCP 方法,检测 50 例肺癌和 7 例肺部良性疾病手术切除标本的支气管切缘(切缘病理无癌残留)、病灶组织和正常肺组织中的 p53 基因突变,并随访了解术后切缘癌复发与癌复发转移情况。结果 14 例(28%)肺癌支气管切缘和 28 例(56%)肺癌组织存在 p53 基因突变,正常肺组织和良性病变肺组织未发现 p53 基因突变。肺癌组织 p53 基因突变以小细胞癌(100%)最高,次为鳞癌(65%),腺鳞癌(60%),腺癌(38.9%)。p53 基因突变以 TNM 分期的 I 期(72.7%)最高,次为 II 期(58.3%),III 期(25%)。支气管切缘 p53 阳性者术后随访 3~16 月,6 例(42.9%)发生支气管残端癌复发;而 p53 阴性者术后无残端癌复发。肺癌组织 p53 阳性者中有 17 例(60.7%)在随访中发现癌复发转移;p53 阴性者中 5 例(22.7%)发现癌复发转移,两组复发率有显著差异($P < 0.05$)。结论 检测支气管切缘 p53 基因突变能确诊支气管切缘异常的“分子边界”,从而早期预测部分肺癌的术后残端癌复发。肺癌组织 p53 基因突变者术后癌复发转移率高。

【关键词】 肺肿瘤 切缘 p53 基因

Detection of mutant p53 gene at resection margin of the bronchus and cancer tissues to predict lung cancer recurrence XU Lin*, CHEN Mei, YU Mingfeng, HUANG Jianfeng, XUE Kaixian, WANG Yusan. * Department of Thoracic Surgery, Jiangsu Cancer Institute and Hospital, Nanjing 210009, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the mutations of p53 gene at the resection margins of the bronchus and cancer tissues, and to predict lung cancer recurrence. **Methods** PCR-SSCP technique was used to detect mutation of p53 gene at the resection margin of the bronchus (no cancer cells remained by gross pathological examination), cancer tissue and normal tissue of the lungs in 50 patients with lung cancers and 7 patients with non-cancerous pulmonary diseases. Local recurrence at the resection margin of bronchus and distant metastasis were investigated. **Results** Of the 50 patients, 14 cases (28%) had p53 gene mutation at the resection margin of bronchus, and 28 cases (56%) had p53 gene mutations in their cancer tissue. The mutations were not found in normal tissues of the 50 patients and in tissues of the 7 control patients. The mutation rate of p53 gene in cancer tissue was 100% (2/2) for small cell lung cancer, 65% (13/20) for squamous-cell carcinoma, 60% (6/10) for adenosquamous cell carcinoma, 38.9% (7/18) for adenocarcinoma. Mutation rate of p53 gene was 72.7% (16/22) in stage I lung cancer, 58.3% (7/12) in stage II, 25% (4/16) in stage III. During follow-up (ranged from 3 months to 16 months), 6 of 14 patients (42.9%) with mutant p53 gene at the resection margin had local recurrence. There was no recurrence in patients without mutant p53 gene at the resection margin. Seventeen of 28 patients (60.7%) with mutant p53 gene in cancer tissue had recurrence or metastasis, but only 5 of 22 patients (22.7%) without mutant p53 gene had local recurrence ($P < 0.05$). **Conclusion** By testing mutations of p53 gene at the resection margins of bronchus, we may predict local recurrence of lung cancer. Patients with mutant p53 gene in cancer tissue appear to have a substantially increased risk of recurrence and metastasis of lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms Resection margin p53 gene

This work was supported by Social Science and Technology Development Plan Funding of Jiansu Province (to Xu Lin) (No. 97043).

肿瘤抑制基因 p53 的突变是人类恶性肿瘤最常见

本课题受江苏省社会发展科技计划项目基金(97043)资助
作者单位:210009 南京,江苏省肿瘤医院胸外科(许林、俞明锋、黄建峰);江苏省临床检验中心(程梅、王毓三),细胞遗传室(薛开先)

的遗传学改变^[1,2]。p53 突变也常见于各类肺癌,80%~100%的小细胞肺癌(SCLC)和 50%~70%的非小细胞肺癌(NSCLC)中有 p53 突变^[2~5]。我们通过检测肺癌组织和支气管切缘 p53 基因突变,确定其异常的“分子边界”,以预测肺癌手术切除的效果和局部复发情

况。

1 材料与方法

1.1 临床资料 自 1998 年 2 月至 1999 年 3 月间对 57 例肺部手术切除标本进行 p53 基因突变检测。57 例病例中男性 43 例,女性 14 例,年龄 30~77 岁,平均年龄 54.5 岁。肺癌 50 例,肺部良性疾病 7 例;鳞癌 20 例,腺癌 18 例,腺鳞癌 10 例,小细胞癌 2 例,肺结核球 3 例,炎性假瘤 3 例,硬化性血管瘤 1 例。按 UICC 1997 肺癌分期标准分期: A 期 3 例, B 期 13 例, A 期 8 例, B 期 4 例, A 期 16 例, B 期 6 例。

1.2 标本 取肺癌患者手术切除的肿瘤组织和支气管切缘组织(病理检测切缘无癌细胞残留),同时取相应的正常肺组织(距离癌组织 5 cm 以上),取肺部良性疾病病变组织。所有标本均保存于 -70℃ 冰箱中。

1.3 试剂 根据文献设计 4 对寡核苷酸引物,引物由中国科学院上海细胞所合成,引物序列见表 1,分别扩增 p53 基因外显子 5~8。Taq 酶为 Promega 公司产品, dntp 为华美生物工程公司产品。

表 1 引物序列
Tab 1. Primer sequence

Primer	Primer sequence(5' → 3')	Size of amplification product (bp)
P5A	TACTCCCTGCCCTCAACA	183
P5B	CATCGCTATCTGACGACGCC	
P6A	GICTGGCCCTCCTCAGCAT	113
P6B	CTCAGCCGCTCATA GGGCA	
P7A	GTTGGCTCTGACTGTACCAC	110
P7B	CTGGA GICTTCCA GIGTGAT	
P8A	TGGIAATCTACTGGGACGG	137
P8B	CTCGCTTAGTGCTCCCTGG	

1.4 方法

1.4.1 提取组织 DNA 用常规酚氯仿法提取组织 DNA。

1.4.2 PCR 扩增和 PCR-SSCP 分析 PCR 反应总体积为 50 μl,其中含 DNA 约 0.1 μl(合组织提取液 10 μl),4 对引物各 0.2 μmol/L,4 种 dntp 各 250 μmol/L, Taq 酶 1 U,97℃ 预变性 7 min,然后 94℃ 55 s → 60℃ 40 s → 70℃ 40 s,循环 30 次。取 PCR 产物 10 μl,加入等体积的 SSCP 变性液(95%甲酰胺,20 mmol/L EDTA)。沸水浴 5 min,冰上骤冷,立即上样于 8%中性聚丙烯酰胺凝胶,在 0.5 TBE 中 100 V 电泳 6 h,凝胶经 EB 染色并在紫外灯下观察,根据切缘样品 PCR 产物单链带泳动位置与正常对照的差异来判断样品中是否有突变。

1.5 临床研究 所有患者于术后第 3~6 月做纤维支气管镜和胸部 CT 检查,了解支气管残端和胸内有无

癌复发及转移。观察癌复发及转移情况与 p53 基因突变之间的关系。

2 结果

2.1 p53 基因突变和复发的关系 随访所有患者,随访期为 3~16 月。50 例肺癌患者中 14 例支气管切缘为 p53 阳性,阳性率为 28%,随访期内有 6 例切缘癌复发,其中 2 例 A 期腺鳞癌,1 例 B 期腺鳞癌,1 例 A 期小细胞癌,1 例 B 期鳞癌,1 例 A 期腺癌;36 例切缘 p53 阴性者无癌复发。在 50 例肺癌患者的癌组织中,28 例为 p53 阳性,随访期内 17 例癌复发,复发率为 60.7%,其中 6 例为支气管残端癌复发,11 例为癌转移复发, B 期 1 例(鳞癌), A 期 2 例(腺癌、腺鳞癌各 1 例), B 期 2 例(腺鳞癌、小细胞癌各 1 例), A 期 8 例(腺癌 3 例,鳞癌、腺鳞癌各 2 例,小细胞癌 1 例), B 期 4 例(腺癌 2 例,鳞癌、腺鳞癌各 1 例),转移复发的部位主要为同侧或对侧纵隔淋巴结转移、锁骨上淋巴结转移或/和恶性胸腔积液;22 例 p53 阴性者中 5 例癌复发,复发率为 22.7%,其中 B 期 1 例, A 期 2 例, B 期 2 例。癌组织 p53 阳性的癌复发率与癌组织 p53 阴性的相比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。而在癌旁正常肺组织和 7 例肺部良疾病的病灶及支气管切缘组织中均未发现有 p53 基因突变。14 例支气管切缘 p53 基因突变者的癌组织 p53 均为阳性。

2.2 p53 基因突变与病理类型、TNM 分期的关系 50 例肺癌患者中鳞癌的 p53 基因突变率在支气管切缘和癌组织中各为 20% (4/20) 和 65% (13/20),腺癌为 16.7% (3/18) 和 38.9% (7/18),腺鳞癌均为 60% (6/10),小细胞癌为 50% (1/2) 和 100% (2/2)。随病情的进展,肺癌患者的 p53 基因突变表达亦显著增加。期, 期, 期肺癌支气管切缘 p53 基因突变率分别为 12.5% (2/16), 25% (3/12), 40.9% (10/22);癌组织分别为 25% (4/16), 58.3% (7/12), 72.7% (16/22)。

3 讨论

目前,人们已发现在肿瘤发病过程中有多种癌基因和抑癌基因的改变,其中突变的 p53 基因起了十分重要的作用。近年来的研究表明 p53 抑癌基因是“分子警察”,是细胞生长的“监控器”。当细胞受到外源性理化因素影响,DNA 受损伤时,它能使细胞分裂停止在 G1/S 期,让细胞修复损伤,恢复正常,如损伤不能修复,p53 便促进细胞凋亡,这样使有癌变倾向的细胞自我消亡。但在多种致癌因子如吸烟等因素长期作用下,p53 抑癌基因可发生结构和功能上的改变,致使

p53 基因突变,失去抑癌的功能,反而促进细胞癌变^[1,2]。p53 突变在肺癌中发生的频率很高,可达到 60%~90% 的突变率^[2~5],而 myc, ras, erbB 和 Rb 等癌基因和抑癌基因的突变或扩增、失活没有超过 44% 的^[6],但在正常肺组织中未发现 p53 突变^[7]。我们应用高灵敏的分子生物学技术(PCR-SSCP 法),从分子水平检测了 50 例肺癌支气管切缘 p53 突变情况,发现 28% 的患者切缘 p53 突变,而常规病理组织学检查显示支气管切缘无癌细胞残留。此外,在检测到切缘 p53 突变的患者中有 42.9% 在术后 3~10 月中出现切缘癌复发,而未检测到切缘 p53 突变者无一例出现切缘癌复发,这提示 p53 突变可预测切缘癌复发,且分子学诊断早于临床诊断 3~10 月,与 Brennan 等^[8]报道的相似,证实检测支气管切缘 p53 基因突变能确认支气管切缘异常的“分子边界”,对于预测肺癌手术切除的效果和局部复发有重大的意义,并能为处于“亚临床”即肿瘤负荷较小的癌基因突变的患者进行化学预防治疗提供分子学依据。

近来一些国内外学者认为肺癌组织 p53 突变与病理类型、病期及生存率有关^[8~10],本组结果显示小细胞肺癌组织 p53 突变率为 100%,鳞癌为 65%,腺癌为 38.9%,腺鳞癌为 60%,与大宗病例报道相似。而一期、二期、三期的肺癌组织 p53 突变率分别为 25%, 58.3%, 72.7%, p53 突变率随期别增高而增加,与廖美琳等^[9,10]报道的一致。28 例肺癌组织 p53 阳性者中除 6 例为支气管残端癌复发外,另 11 例为术后转移复发,该类患者肿瘤复发率较癌组织 p53 阴性者有显著

增高,提示肺癌组织 p53 阳性者术后癌转移复发的可能性大,生存率低。所以我们认为,对肺癌组织 p53 阳性者术后应该进行及早的、有计划的综合治疗,以提高这类患者的生存率。

参 考 文 献

- 1 Lane DP. p53 guardian of the genome. *Nature*, 1992, 358(6381): 15-16.
- 2 Hollstein M, Sidransk D, Vogelstein B, et al. p53 mutation in human cancer. *Science*, 1991, 253(5): 49-53.
- 3 Levine AJ, Perry ME, Chang A, et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumor suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer*, 1994, 69(3): 409-416.
- 4 Theodora R, Devereux MS, Jack A, et al. Molecular mechanisms of lung cancer. *Chest*, 1996, 109(1): 14-19.
- 5 Mao Li, Hruban RH, Boyle JO, et al. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res*, 1994, 54(7): 1634-1637.
- 6 Horio Y, Takahashi T, et al. Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 1993, 53(1): 1-4.
- 7 Ryberg D, Kure E, Lystad E, et al. p53 mutations in lung tumors: relationship to putative susceptibility markers for cancer. *Cancer Res*, 1994, 54(6): 1551-1555.
- 8 Brennan JA, Mao L, Hruban RH, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 1995, 332(7): 429-435.
- 9 Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV, et al. Apoptosis: its significance in cancer therapy. *Cancer*, 1994, 73(8): 2013-2026.
- 10 廖美琳,林振群,周允中,等.非小细胞肺癌生物学特性检测的临床意义. *中华结核和呼吸杂志*, 1998, 21(1): 30-33.

(收稿:1999-11-09 修回:2000-02-03)

(本文编辑 张世雯)

· 书 讯 ·

《组织工程基础与临床》新书征订

组织工程学是应用工程学和生物学的基本理论、原理及技术,在体外预先构建有生命的种植体,植入体内修复组织缺损,重建功能,或构建体外装置,替代组织(器官)一部分或全部功能的新兴研究领域。由于这一研究对生命科学的巨大影响和潜在的经济效益,已被世界各国所重视。在这一领域的研究中,我国与世界研究水平的差距较小,若能进行有效的组织,更多的经费投入,在某些领域有可能赶上或超过国外研究水平。然而有关组织工程研究的中文专著很少。在华西医科大学有关领导的支持下,由杨志明教授组织了一批实际从事组织工程研究的青年学者,编写了《组织工程基础与临床》一书,全书大约 53 万字,90 幅图,定于 2000 年元月由四川科技出版社正式出版发行。书中介绍了“组织工程学”的发展、基础理论、最新研究进展、临床应用前景及尚需解决的问题等。适合于临床医生、研究生及科研工作者阅读,欢迎广大读者踊跃订购。该书每册定价 138 元(含邮购费)。联系人:俞军、张元芬。地址:四川成都华西医科大学附属第一医院,《中国修复重建外科杂志》编辑部。邮政编码:610041。电话:028-5422431, 028-5422432。