

胃癌组织 ras 基因突变及其与幽门螺杆菌感染的关系

赵端仪¹, 钱崇宽¹, 陈明楷², 谭金华¹, 刘家盛¹, 岳奇俊¹

摘要: **目的** 初步探讨胃癌组织中 ras 基因突变与幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, Hp)感染的关系。**方法** 43 例胃癌组织新鲜标本及相应血清标本纳入研究。用 PCR-RFLP 法测定 ras 基因 12 密码子的突变; 用血清学方法检测 Hp 的感染状况。**结果** 43 例胃癌中有 28 例存在 ras 基因 12 密码子的突变, 突变率为 65. 12%; 43 例胃癌中, Hp 阳性 30 例, 阳性率为 69. 77%, 其中 CagA 阳性 24 例, 阳性率为 80%; 30 例 Hp 阳性的胃癌中, 有 19 例发生 ras 基因 12 密码子的突变, 发生率为 63. 33%, 13 例 Hp 阴性的胃癌中, 有 9 例发生 ras 基因 12 密码的突变, 发生率为 69. 23%, 二者比较无明显差异($P > 0. 05$)。**结论** ras 基因 12 密码子的突变可能与胃癌的发生有关, 胃癌中 ras 基因 12 密码子的突变与 Hp 及 CagA 阳性的 Hp 感染无明显相关性, Hp 感染可能不是其改变的唯一或必须因素。

关键词: 胃癌; ras 基因; 幽门螺杆菌

中图分类号: R 735. 2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000- 8578(2001)05-0372-03

Investigation of the Mutation of Ras Gene in Gastric Cancer and Their Relation to Helicobacter Pylori(HP) infection

Abstract: **Objective** To investigate the mutation of ras gene and their relation to Helicobacter pylori (Hp) in fection. **Methods** The carcinom atous tissues and serum samples of 43 patients with gastric cancer were studied. The mutation of the NO. 12 codon of ras gene was detected by PCR-RFLP. The status of Hp infection was detem ined by seriological tests. **Results** 28 of 43 cases had NO. 12 codon mutation, its mutation rate was 65. 12%. In the 43 patients with gastric cancer, Hp infection was confirmed in 30 patients, CagA⁺ was found in 24 cases(80%). Among the 30 cases with Hp infection, 19(63. 33%) presented with the NO. 12 codon of ras gene mutation and among those without Hp infection, 9(69. 23)% cases showed the NO. 12 codon of ras gene mutation, there is no significant difference between them ($P > 0. 05$). **Conclusion** The mutation of the NO. 12 codon of ras gene may related to gastric cancer and it hasn't significant relation to Hp infection.

Key words: Gastric cancer; ras gene; Helicobacter pylori

幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, Hp)是胃炎和消化性溃疡的重要致病因素之一^[1],近年来许多流行病学研究表明 Hp 感染与胃癌的发生有关^[2,3]。Hp 感染可能是通过促进细胞增殖,引发细胞关键基因的突变,进而产生胃癌^[4]。目前,有关 Hp 感染与胃癌中基因突变的关系国内外已有报道,有些研究认为 H-ras 53 基因改变与 Hp 感染有关^[5]。本研究通过 PCR-RFLP 等技术检测胃癌中 H-ras 的改变与 Hp 感染的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 43 例胃癌患者的新鲜癌手术标本及相应血清标本取自武警湖北总队医院、武汉大学人民医院,其中男 27 例、女 16 例,年龄 18~ 69 岁,平均 42.5 岁。手术切除标本及血清标本置于-70 冰箱中保存备用。

1.1.2 主要试剂及设备 饱和重蒸酚购自武汉亚法生物技术公司,蛋白酶 K、Tris 碱、丙烯酰胺、N-N'-亚甲 双丙烯酰胺为 GBCO BRL 公司产品,ED-TA、SDS、TaqDNA 聚合酶、dNTP 为 Promega 公司产品,PCR 引物为大连宝生物公司产品,PCR Marker、Msp I 购自华美生物工程公司, Hp-IgG 检测试剂盒购自中外合资华都医学科技发展公司,

收稿日期: 2000- 08- 27; 修回日期: 2001- 02- 15

作者单位: 1. 430061 武警湖北总队医院二外科; 2. 武汉大学人民医院消化内科

CagA-Hp-IgG 检测试剂盒购自上海晶莹生物技术有限公司。

MDF-381A T 超低温冰箱及 SR 1410 普通冰箱为日本 SANYO 公司产品, Hema 480C 基因扩增仪为珠海黑马医学仪器有限公司产品, DF-8 型垂直电泳槽为北京东方仪器厂产品。

1.2 方法

1.2.1 新鲜癌组织标本 DNA 提取及 ras 基因突变的测定 按常规方法提取癌组织标本 DNA^[6]。引物设计参考相关文献, H-ras 5' 5'GA GACCCTG-TA GGA GGA CCC 3'; H-ras 3' 5'GGGTGCTG-A GACGA GGGA GT 3'; 用 PCR-RLFP 法测定 H-ras 12 密码子的突变^[7]。

1.2.2 幽门螺杆菌感染状况的测定 幽门螺杆菌血清学试验及诊断标准依照试剂盒说明书。

1.2.3 统计学处理 χ^2 检验

2 结果

2.1 H-ras 基因 12 密码子突变检测结果 43 例胃癌中, 有 28 例发现 H-ras 基因 12 密码子的突变, 突变率为 65.12%。

2.2 Hp 感染状况 43 例胃癌有 30 例感染 Hp, 感染率为 69.77%, 其中 CagA 阳性 24 例, 阳性率为 80%。

2.3 胃癌中 H-ras 基因 12 密码子突变与 Hp 感染的关系 30 例 Hp 阳性的胃癌中, 有 19 例发生 ras 基因 12 密码子的突变, 发生率为 63.33%, 13 例 Hp 阴性的胃癌中, 有 9 例发生 ras 基因 12 密码子的突变, 发生率为 69.23%, 二者比较无明显差异 ($P > 0.05$); 30 例 Hp 阳性胃癌中, CagA 阳性与阴性组存在 ras 基因 12 密码子突变的各有 16 例和 3 例, 其突变率分别为 66.67% (16/24) 和 50% (3/6) 二者比较亦无明显差异。

3 讨论

有关 Hp 感染与胃癌的关系近十年来一直是人们关注的热点。有研究提示, Hp 可能通过下述机制参与胃癌的发生^[8]: (1) Hp 感染使胃酸分泌减少, 并能长期抑制胃粘膜分泌维生素 C, 导致胃内 pH 值升高, 利于分解硝酸盐的细菌生长, 使具有致癌作用的亚硝酸化合物形成增加。(2) Hp 的代谢产物特别是 Hp 产生的各种毒素可直接损害胃粘膜, 引起炎症反应, 导致细胞更新加速, 增加 DNA 损伤的机会。(3) 长期、慢性的 Hp 感染可使胃粘膜内自由基超氧化物生成增加, 引起细胞过氧化损伤而诱发癌变。(4) Hp 感染不仅可以诱导细胞有丝分裂加速, 导致细胞 DNA 损伤和非整倍体的危险性增高, 还可引起癌基因和抑癌基因的变异, 使细胞恶变。

有关 Hp 感染与癌基因和抑癌基因变异的研究尚无定论, 郝莹^[5]、徐肇敏^[9]的研究认为 p53、H-ras 的改变与 Hp 感染有关, Wu^[4,10]、Palli^[11]则认为 p53、c-erbB-2、c-met、p16 基因的改变与 Hp 感染无关。本研究结果显示: 30 例 Hp 阳性的胃癌中 H-ras 的突变率为 63.33% (19/30), 而 13 例 Hp 阴性的胃癌中 H-ras 的突变率为 69.23% (9/13), 两组突变率相比较无显著性差异 ($P > 0.05$); 在 30 例 Hp 阳性的胃癌中, CagA 阳性组与 CagA 阴性组的 H-ras 的突变率分别为 66.67% (16/24) 和 50% (3/6), 二者相比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。结果说明胃癌中 H-ras 的突变与 Hp 感染及 CagA 阳性 Hp 感染无明显相关性, Hp 感染可能不是其改变的唯一或必须因素, Hp 感染与胃癌之间的关系及其用机制尚有待今后的研究予以阐明。

参考文献

- [1] Eck M, Schmausser B, Haas R, et al. MALT-type lymphoma of the stomach is associated Helicobacter pylori strains expressing the CagA protein [J]. Gastroenterology, 1997, 112: 1482-1486
- [2] The Eurogast Study Group. An international association between Helicobacter pylori infection and gastric cancer [J]. Lancet, 1993, 341: 1359-1362
- [3] Nomura A, Stemmemann GN, Chyou PH, et al. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii [J]. N Engl J Med, 1991, 325: 1132-1136
- [4] Wu M S, Shun CT, Wang HP, et al. Genetic alterations in gastric cancer: relating to histological subtypes, tumor stage, and helicobacter pylori infection [J]. Gastroenterology, 1997, 112: 1457-1465
- [5] 郝莹, 张锦坤, 易粹琼. 胃癌癌旁组织中幽门螺杆菌感染及基因改变 [J]. 中华消化内镜杂志, 1997, 14: 24-25.
- [6] 伍欣星, 聂广. 医学分子生物学 [M]. 第 1 版. 武汉: 武汉大学出版社, 1996 228-232
- [7] 林万明. PCR 实用技术指南 [M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 443-444
- [8] Corra P. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis [J]. Am J Surg Pathol, 1995, 19(suppl): s37-s43
- [9] 徐肇敏, 李运红, 王亚东, 等. 江苏省胃癌高发区幽门螺杆菌感染与胃癌、基因突变之间的关系 [J]. 中华消化杂志, 1999, 19: 236-238
- [10] Wu M S, Shun CT, sheu JC, et al. Overexpression of mutant p53 and c-erbB-2 proteins and mutation of the p15 and p16 genes in human gastric carcinoma: with respect to histological subtypes and stage [J]. J Gastroenterol Hepatol, 1998 13, 305-310
- [11] Palli D, Caporaso NE, Shial YH, et al. Helicobacter pylori and p53 mutation in gastric cancer: a molecular

epidemiology study in Italy [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1997, 6: 1065-1069.

(贺文校对)

各种肝病患者血清层粘连蛋白测定的意义

官成浓¹, 银正民¹, 谢杰荣¹, 徐军发², 梁启廉¹

关键词: 肝癌; 层粘连蛋白; ELISA 法; 良性肝病

中图分类号: R735.7; R73-35⁺4 文献标识码: D

文章编号: 1000-8578(2001)05-0374-01

层粘连蛋白(Laminin, LN)是一种只存在于基底膜中的非胶原性糖蛋白,是细胞外基质的重要组成部分。正常情况下,其含量较低,如受肿瘤转移或其它疾病的刺激,基底膜被破坏或机体合成增加,则血清LN水平可上升。本文检测了188例各种肝病患者血清LN的含量,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 研究对象 对照组:40例均为健康体检者,符合健康标准,男女各20例,年龄18~58岁。肝癌组:85例均为原发性肝癌,38例有肝外脏器转移。男57例,女28例,年龄21~66岁。良性肝病组:103例均是近2年的住院患者,诊断符合1995年全国传染病与寄生虫病会议修订的诊断分型标准。部份病例经病理学证实。男73例,女30例。急性黄疸型肝炎22例,慢性肝炎49例,肝硬化F32例。

1.2 实验方法 健康人和各种肝病患者均清晨取血2ml,分离血清置-20℃保存待测。采用ELISA夹心法检测,试剂由上海海军医学研究所提供,所有标本的测定采用同一批试剂,由专人操作。

采用Σ960全自动酶标仪测定。

1.3 统计学处理 进行t检验。

2 结果

2.1 各种肝病患者血清LN含量见表1。

2.2 肝癌患者血清LN含量与肿瘤生物学行为关系 有肝外转移患者血清LN含量明显高于无肝外转移患者,相差显著($t=4.429, P<0.001$)见表2。

表1 各种肝病患者血清LN含量

组别	例数	LN (μg/L)	P值
对照组	40	95.32±15.20	
急性黄疸型肝炎组	22	100.80±16.53	<0.05*
慢性肝炎组	49	122.46±19.34	<0.001*
肝硬化组	32	127.55±22.55	<0.001*
肝癌组	85	175.37±67.32	<0.001*#

*与正常组对照组比较, #与各种良性肝病组比较

表2 有肝外转移肝癌患者血清LN含量

组别	例数	LN (μg/L)	P值
无肝外转移组	47	157.58±39.92	
有肝外转移组	38	203.56±55.67	<0.001

3 讨论

层粘连蛋白(LN)是重要的细胞外基质成份之一,它在体内通过与受体结合发挥生物学功能,不仅在维持细胞、器官的形态和调节体内细胞的分化、迁移、增殖中发挥重要作用,

而且在胚胎发育中起着关键作用,近年来研究还发现:肿瘤细胞对基底膜的粘附、降解及破坏是浸润及转移的重要环节,且这一过程与LN有关。我们应用酶联免疫检测方法,检测了140例各种肝病患者血清LN的含量,结果显示,各种肝病患者血清LN含量均高于健康人,呈急性黄疸型肝炎<慢性肝炎<肝硬化<肝癌的规律;有肝外转移肝癌患者高于无肝外转移患者。

正常肝脏窦内无基底膜存在, LN含量很少,当肝内发生炎症时,肝细胞、内皮细胞以及上皮细胞均参与合成LN,并在肝窦内大量沉积,随着肝病的慢性化,血清LN含量逐渐增高。肝癌患者血清LN含量比健康人及任何良性肝病患者都高,其确切机制尚未完全阐明。除肝癌与乙型肝炎、肝硬化密切相关,后两者和大部分肝癌患者合并有不同程度的慢性炎症,均可使正常肝细胞、内皮细胞以及上皮细胞参与合成LN外。还与肿瘤细胞对基底膜的降解、破坏和肿瘤细胞具有合成LN的能力有关。

LN与肿瘤的发生、发展及转移相关,目前多数学者认为:LN参与癌细胞浸润及转移的重要机理之一是利用LN与其受体的结合,介导癌细胞对基质的附着,然后由癌细胞再分泌蛋白溶解酶使基底膜结构破坏, LN降解,从而使癌细胞进一步浸润、扩散。本研究结果:原发性肝癌患者血清LN含量较正常人及各种良性肝病患者显著升高($P<0.05$ 或 0.001),而且随着病情的进一步恶化,其血清LN含量亦不断升高符合这一原理。

(刘红武校对)

收稿日期: 2000-04-10; 修回日期: 2000-07-25
基金项目: 广东省卫生厅医学科学青年基金资助项目(B1997120)
作者单位: 1. 524001 湛江, 广东医学院附属医院肿瘤科; 2. 广东医学院检验系