

甲状腺癌组织中 H-ras 和 p53 基因突变

李晓曦^{1,①} 陈国锐¹ 赵国华² 赵国强²

(中山医科大学 1 附属第一医院外科 2 病理学教研室; 广州, 510080)

主题词 甲状腺肿瘤/遗传学; 基因, ras; 基因 p53; 突变

中图分类号 R 736.1

为研究 H-ras 癌基因和 p53 抑癌基因突变是否与甲状腺癌的发生和发展有关, 我们用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)法对 H-ras 基因第 12 密码子和 p53 基因第 248 密码子突变分别进行了检测。

1 材料与方 法

1.1 材 料

80 例手术切除甲状腺标本, 常规石蜡包埋。其中乳头状癌 31 例, 滤泡性癌 13 例, 髓样癌 7 例, 未分化癌 3 例, 滤泡性腺瘤 10 例, 结节性甲状腺肿 10 例, 慢性淋巴细胞性甲状腺炎 6 例。所有组织均经光镜切片观察, 病理诊断无误。

1.2 DNA 提取

石蜡组织块切片, 经二甲苯脱蜡, 无水酒精脱苯和蛋白酶 K 消化后, 用苯酚和氯仿、异戊醇抽提, 乙醇沉淀后溶于 TE 缓冲液中待用。

1.3 PCR

PCR 引物由中山医科大学遗传室合成(表 1)。取 DNA 模板 0.5 μ g, 1.25 mmol/L dNTPs 5 μ L, 0.05 μ mol/L 引物各 1 μ L, 10 \times Taq 酶缓冲液 5 μ L, 3U Taq DNA 聚合酶(Genda 公司), 总反应体系 50 μ L。40 μ L 矿物油覆盖后在 PCR 扩增仪(Pharmacia LKB Gene ATAQ Controller)上进行 PCR 扩增。首轮循环为 95 $^{\circ}$ C 5 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 然后按 95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 进行 30 次循环。

1.4 RFLP 分析

20 μ L RFLP 酶切分析体系中含: 10 μ L PCR 产

物, 2 μ L 10 \times MSP I 酶切缓冲液, 32 U MSP I 核酸内切酶(华美生物公司)。37 $^{\circ}$ C 酶切消化过夜。8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 用 0.5 mg/L 溴化乙锭染色, 紫外光下观察结果。

表 1 PCR 引物序列, 扩增片段和用途

基 因	引物序列	产物片段	用 途
H-ras	5'-GAG ACC CTGTAG GAG ACC C-3'		检测 Codon
(Exon 1)	5'-CGTCC ACA AAT GCTTC TGG-3'	134 bp	12 突变
p53	5'-GT TGG CTCTGA CTGT ACC AG-3'		检测 Codon
(Exon 7)	5'-CTGG AGTCTTCCA GTGTGAT-3'	110 bp	248 突变

1.5 统 计

实验数据的处理用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 甲状腺癌组织中 H-ras 基因突变率

对 H-ras 基因第 12 密码子突变检测发现, 33.3%(18/54 例)甲状腺癌和 15.3%(4/26 例)良性甲状腺病变有突变(图 1), 两者差异有显著性($P < 0.05$)。其中乳头状癌 25.8%(8/31), 滤泡性癌 38.4%(5/13), 髓样癌 42.8%(3/7), 未分化癌 66.6%(2/3), 突变率在乳头状癌 < 滤泡性癌 < 髓样癌 < 未分化癌, 各组间差异有显著性($P < 0.05$)。

2.2 甲状腺癌组织中 p53 基因突变率

p53 基因第 248 密码子突变在良性甲状腺病变未检出(0/26), 在甲状腺癌为 27.7%(15/54 例)(图 2), 两者间差异有显著性($P < 0.05$)。其中乳头状

① 第一作者, 1957 年出生, 男, 博士, 讲师

癌 22.5%(7/31 例), 滤泡性癌 30.7%(4/13 例), 髓样癌 28.5%(2/7 例), 未分化癌 66.6%(2/3), 各组差异有显著性($P < 0.05$)。

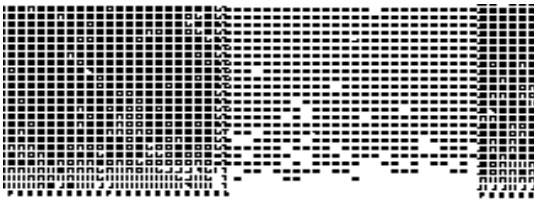


图1 H-ras 基因外显子 1 扩增片段酶切图谱

M: pBR 322/ *Hae* III 的 DNA 片段标准, 1、2、5、6 为甲状腺癌, MSPI 酶切后仍为 134 bp, 3 为滤泡性甲状腺腺瘤, 4 为结节性甲状腺肿, MSPI 酶切后 134 bp 泳动带消失, 出现 76 bp 和 58 bp 产物

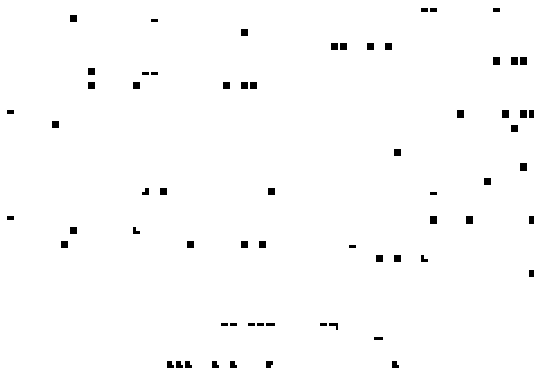


图2 p53 基因外显子 7 扩增片段酶切图谱

M: pBR 322/ *Hae* III 的 DNA 片段标准, 1、2、5、6 为甲状腺癌, MSPI 酶切后仍为 110 bp, 3 为滤泡性甲状腺腺瘤, 4 为结节性甲状腺肿, MSPI 酶切后 110 bp 泳动带消失, 出现 70 bp 和 40 bp 产物

2.3 甲状腺癌组织中 H-ras 和 p53 基因突变的关系

分析 H-ras 基因第 12 密码子和 p53 基因第 248 密码子突变之间的相互关系时发现, 24%(13/54) 的病例同时存在 H-ras 基因和 p53 基因的点突变, 占检出 H-ras 基因第 12 密码子突变例数的 72.2%(13/18) 和 p53 基因第 248 密码子突变例数的 86.5%

(13/15), 即在发生点突变的甲状腺癌中, 大部分同时存在 H-ras 基因和 p53 基因突变, 两种突变之间密切相关($r = 0.70$, $P < 0.01$)。

3 讨论

本文发现甲状腺癌中 H-ras 癌基因第 12 密码子的突变率为 33.3%, p53 抑癌基因第 248 密码子的突变率为 27.7%, 与文献[1~4]报道基本一致。同时还发现 H-ras 和 p53 基因突变率与甲状腺癌中各亚型的分化程度有关, 未分化癌中突变率最高。这说明在甲状腺癌的多阶段发生过程中存在着基因异常累积的过程, 基因异常加速了细胞转化的过程。

本研究还表明, 在发现 H-ras 基因或 p53 基因突变的 20 例甲状腺癌中, 65%(13/20) 的病例同时存在两种基因突变, 有很好的相关性($r = 0.7$, $P < 0.01$), 提示在甲状腺癌的发生发展过程中可能存在癌基因 H-ras、抑癌基因 p53 突变的协同作用。Suwa 对胰腺癌细胞株的研究中也有类似的发现, 有 46.6% 的病例同时存在两种基因突变^[5]。本实验发现 15.3% 的良性甲状腺病变有 H-ras 癌基因第 12 密码子突变, 这是否标志着甲状腺滤泡性腺瘤、结节性甲状腺肿的部分病例在分子水平上发生了恶性转化, 还需要进一步证实。

参 考 文 献

- 1 Namba H, Gutman R A, Matsuo K, *et al.* H-ras protooncogene mutations in human thyroid neoplasm. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990, 71:223
- 2 Goretzki P E, Lyons J, Stacy-Phillips S, *et al.* Mutational activation of ras and GSP oncogenes in differentiated thyroid cancer and their biological implications. *World J Surg*, 1992, 16:576
- 3 Zou M, Shi Y, Farid N R. p53 mutation in all stages of thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 77:1054
- 4 Simon D, Goretzki P E, Gorelev V, *et al.* Significance of p53 in human thyroid tumor. *World J Surg*, 1994, 18:535
- 5 Suwa H, Yoshimura T, Yamaguchi N, *et al.* H-ras and p53 alterations in genomic DNA and transcripts of human pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res*, 1994, 85:1005

(1996-08-02 收稿 1997-01-10 修回)