

大肠癌组织中 APC基因体细胞突变^①

余成仿^② 王吉甫

(中山医科大学附属第一医院外科; 广州, 510080)

主题词 大肠肿瘤 遗传学; 基因, APC; 突变

中图分类号 R 735.34

从癌基因到抑癌基因的研究,人们已认识到细胞癌变及恶性肿瘤的发生、发展是一个多因素、多阶段、多基因变异所致的病变过程和结果。近年来,抑癌基因的研究尤其引人注目,而且一些抑癌基因相继被分离和克隆,如 RB基因、P⁵³基因等。早在1986年, Herreara^[1]通过细胞遗传学研究首次报告1例GS(Garder综合征)患者第5号染色体长臂部份缺失。90年代初,APC基因即家族性腺瘤性息肉病(FAP)基因得到分离、克隆和鉴定,并发现APC为一抑癌基因,它的突变在大肠癌发生发展的起始阶段起重要作用^[2,3]。我们从国外APC基因研究现状和初步探讨它与散发性大肠癌的发生关系出发,采用聚合酶链反应-单链构象多态性技术(PCR-SSCP)对国人散发性大肠癌组织中APC基因第15号外显子突变集中区(MCR)进行了以下研究。

1 材料和方法

片段 A(299 bp) 5' TACAGAATTATTGTGTAGAAGA3'
3' CGCTCCTGAAGAAAATTCAACA3'

片段 B(295 bp) 5' CAGGGTTCTAGTTTATCTTC3'
3' TTCTGCTTGGTGCCATGGTT3'

片段 C(300 bp) 5' GGCATTATAAGCCCCAGTGA3'
3' AAATGGCTCATCGAGGCTCA3'

1.4 PCR扩增

在0.5 mL离心管中,加入10×PCR缓冲液3 μL, 2 mmol/L DNTP 3 μL,上下游引物各1 μL(12 pmol), 2 μL模板DNA, 2 U Taq DNA聚合酶(本校遗传教研室提供),加灭菌双蒸水至总体积

1.1 标本来源

收集我院胃肠外科手术切除的大肠癌标本36例,包括距肿瘤10 cm以上的正常粘膜作对照,标本离体后即置4℃生理盐水冲洗,取癌组织及正常粘膜各5 g, -80℃冻存备用。36例中男21例,女15例,年龄38~83岁,平均61.2岁。组织学分型,腺癌35例,绒毛状腺瘤恶变1例。分化程度,高分化12例,中等分化17例,低分化7例。Dukes分期,A期1例,B期17例,C期18例。

1.2 组织DNA制备

按蛋白酶K和酚/氯仿提取法制备^[4] DNA沉淀溶于0.1×TE中,样品-20℃冻存备用。

1.3 引物设计及扩增片段

根据APC基因MCR区的碱基序列,自行设计合成3对寡聚核苷酸引物,引物序列及扩增长度如下。

30 μL,混匀后稍离心,再加灭菌石蜡油30 μL覆盖,于DNA扩增仪(PE9600型,PE公司)进行扩增。反应条件,96℃变性6 min后加Taq DNA聚合酶;94℃变性45 s; 58℃退火45 s; 72℃延伸1 min,30个循环后72℃延伸5 min取PCR产物5 μL经1%

① 中山医科大学博士研究生经费资助课题; ② 第一作者, 1964年出生, 讲师

琼脂糖凝胶电泳鉴定,其余放 - 20°C 备用。

1.5 PCR产物 SSCP分析

取 PCR产物 4 μ L煮沸变性 5 min,加 10 μ L碱性变性液(含 9%去离子甲酰胺,0.1%溴酚蓝,0.1%二甲苯睛,5 mmol/L氢氧化钠)再煮沸 5 min,冰浴骤冷,即刻上样 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶,0.5 \times TBE缓冲体系下,室温恒流 18 mA电泳 20 h 电泳结束后按以下方法进行银染:置凝胶于 10%乙醇液中固定 5 min;1%硝酸氧化 3 min;双蒸水漂洗 1 min;0.012 mol/L硝酸银银染 25 min;双蒸水漂洗 1 min;0.28 mol/L无水碳酸钠含 0.019%甲醛液使胶还原显色至所需深度;10%冰醋酸 2 min终止还原反应;双蒸水漂洗 2 min,记录结果。

1.6 统计学处理

本组统计学分析采用方差分析和 *t* 检验。

2 结果

2.1 PCR-SSCP检测结果

PCR-SSCP技术是采用中性聚丙烯酰胺电泳分离变性的单链 DNA,利用单碱基突变可引起单链构象改变影响电泳迁移率,从而通过与正常对照比较单链带的位置及数量的差异来检测突变。由于各单链带可能有几种不同的构象,因此,SSCP的单链带并非仅 2条带。本实验的正常粘膜及无突变癌组织的 DNA单链通常为 3条带。突变时通常为多 1条带或少 1条带或单链带的泳动率有变化(图 1)。本组共检测到 11例癌组织有突变,占所检测病例的 30.6% (11/36),其中有 1例(C482406)分别在片段 A及 C均检测到有突变,说明存在两处突变。正常粘膜未见有突变。突变发生的分布情况列于表 1



图 1 APC基因 MCR扩增片段 B SSCP分析结果

T₁(C475281), T₇(C479114)突变, N(正常粘膜),

T(肿瘤组织)

表 1 PCR-SSCP分析 APC基因 MCR段突变分布

突变片段	突变 DNA
A	C480572 ¹⁾ , C476776, C477715, C482406, C9138297
B	C475281, C479114
C	C478625, C478550, C9141509, C482540, C482406

1)代表住院号,以下同

2.2 APC基因突变与临床病理学特征关系

分析本组 APC基因突变与肿瘤的临床病理学特征的关系,我们发现,突变发生在男 7例占 33.3% (7/21),女 4例占 26.7% (4/15),平均年龄 64.9岁,其差异无显著性意义。11例突变均为腺癌,其中高分化 4例占 33.3% (4/12),中等分化 5例占 29.4% (5/17),低分化 2例占 28.6% (2/7)。其差异无显著性意义。Dukes分期,A期 1例(1/1),B期 7例 41.2% (7/17),C期 3例占 16.7% (3/18),除 A期因仅 1例不宜作统计处理外,B期与 C期差异有显著性意义。

3 讨论

APC(adenomous polyposis coli)基因最早由 Herrera通过细胞遗传学研究,首先发现 1例 GS患者第 5号染色体长臂部分缺失,以后经连锁分析把与家族性腺瘤性息肉病(FAP)发生有关的基因定位于 5q²¹⁻²²,并证实它是一抑癌基因,于 90年代初才得到克隆和鉴定。目前,对其功能尚不十分清楚,有研究发现 APC基因产物与细胞间连接的结构成份有关,由于长期或短暂的分子机制,可使它与粘连蛋白(β -catenin)相互作用,使上皮细胞连接的完整性遭破坏,继而导致细胞浸润性生长^[5]。此外,还有研究表明,野生型 APC基因与细胞微管有关,并在体外促进微管的集合,由此认为 APC与细胞微管之间的相互作用是细胞的重要功能,如这种相互作用受破坏,则可能导致肿瘤的发生^[6]。

APC基因很大,编码序列长 8 538 bp,有 15个外显子,其中以第 15号外显子最大(6 571 bp),因其突变可位于各个外显子,所以对它的检测较为困难。Miyoshi^[7]报告,65%的体细胞突变集中在第 1 285~ 1 513号密码子之间,称为突变集中区(MCR)。Yashima等^[8]亦检测到 4%的突变位于 MCR区。我们采用 SSCP方法,国内首先报告散发性大肠癌组织中 APC基因 MCR区的突变情况,结

果发现 36例散发性大肠癌中有 11例存在异常,占检测病例的 30.6%,且检测到 1例存在 2处突变,但其突变的位置及性质需进一步序列分析来确定。由于我们仅检测了 APC基因很短的一段区域,相信实际突变率会更高。从突变的发生与肿瘤的生物学行为来看,其发生率与患者年龄、性别、组织学类型、分化程度无关,而 Dukes B期突变的发生占检测病例的 41.2%明显高于 C期的 16.7%。Dukes分期是目前反映病程进展的主要指标。所以,我们相信 APC基因突变在大肠癌的发生过程中起重要作用而且是一较早发生的分子事件。

对 APC基因的全面研究虽刚刚起步,但已成为大肠肿瘤发生机制中分子遗传学改变及临床应用研究的热点,近来,Grøden等¹⁹将 APC基因分别转染 3种不同的人结肠癌细胞株,即导致了细胞的形态改变和致瘤性的降低,结果令人鼓舞。

参 考 文 献

- 1 Herrera L. Cantner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5p. *Am J Med Genet*, 1986, 25: 473
- 2 Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, *et al.* Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 1991, 253: 61

- 3 Grøden J, Thliveris A, Samowitz W, *et al.* Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 1991, 66: 589
- 4 伍新尧,罗超权,杨英洁. 基因诊断原理与临床. 广州: 中山大学出版社, 1995. 14~ 15
- 5 Bircheier W, Hulsken J, Bebens J. Adherens junction proteins in tumor progression. *Cancer Surv*, 1995, 24: 129
- 6 Munemitsu S, Souza B, Muller O, *et al.* The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res*, 1994, 54: 3676
- 7 Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, *et al.* Somatic mutations of APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet*, 1992, 1: 229
- 8 Yashima K, Nakamori S, Murakami Y, *et al.* mutations of the adenomatous polyposis coli gene in the mutation cluster region: comparison of human pancreatic and colorectal cancer. *Int J Cancer*, 1994, 59: 43
- 9 Grøden J, Joslyn G, Samowitz W, *et al.* Response of colon cancer cell lines to the introduction of APC, a colon-specific tumor suppressor gene. *Cancer Res*, 1995, 57: 1531

(1996-09-05收稿 1996-11-06修回)

编 后 记

我国学位与研究生教育经过十多年的发展,至今已具有了相当的规模。立足国内培养博士研究生重点在于提高培养质量,已成为研究生教育战线的一个共识。对于研究生论文质量、培养质量的评价,以往的做法基本上集中于少数专家的评阅和评估上。为了鼓励博士研究生在校期间公开发表论文,以期其研究成果得到科学界的承认,并将我校研究生论文质量的评价引入社会评估机制,我们特地从一九九四年度博士研究生的论文,经过学报编委会 3次严格评审,精选出 26篇质量比较好的论文,以增刊的形式发表出来,供同行们指正。从本学年开始,我们规定全部博士研究生在校期间努力做出一流的科研成果的同时,积极撰写高质量的论文,必须在国家一级或国外杂志上发表 1篇以上与其研究方向相关的论文。

(中山医科大学研究生处)