

人原发性肺癌癌基因表达研究*

赵建升 孙芝琳

(华西医科大学生物化学教研室,成都 610041)

周青华 伍仁

(华西医科大学附院胸外科教研室,成都)

关键词 人原发性肺癌,癌基因,斑点杂交,基因表达

分子生物学的新近发展揭示某些癌基因与人类肿瘤的发生、发展、分化密切相关。目前认为,至少有两类癌基因,即 *myc* 家族基因与 *ras* 家族基因在肺癌的病理发生中起重要作用^[1,2]。但是有关肺癌基因表达的研究,国内迄今尚未见报道。

本研究以 *myc* 家族基因 (*c-myc*、*L-myc* 及 *N-myc*)、与肺癌关系密切的 *Ki-ras* 基因及蛋白产物定位于核内的 *c-fos* 基因为探针,对 24 例人原发性肺癌及 1 例正常人肺组织的总 RNA 进行斑点杂交分析,观察癌基因在转录表达水平的特点,为进一步研究肺癌的发病机理提供依据,同时探讨其在临床诊断上的应用前景。

材料与 方法

1. 正常肺组织及肺癌组织标本

正常肺组织及肺癌组织标本由华西医科大学附一院胸外科提供,均为病理确诊。手术标本经液氮冷冻后,置 -70°C 贮存。

2. 癌基因探针及标记

Ki-ras 及 *c-myc* 基因的重组质粒菌株由中日友好医院范慕贞教授赠, *L-myc* 及 *c-fos* 基因的重组质粒菌株由美国 Vermont 大学邱政夫教授赠, *N-myc* 基因的重组质粒菌株由华西医科大学方谦逊教授赠。质粒 DNA 按清亮裂解法^[3]制备,用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (北京福瑞公司, $\sim 3000\text{Ci}/\text{mmol}$), 按缺口翻译法^[4]标记探针。

3. 总 RNA 制备及斑点杂交分析

用酸性盐酸胍-酚-氯仿法^[5,6]制备总 RNA。将肺组织在 8mol/L 盐酸胍溶液制成匀浆,用 2mol/L 醋酸钠 ($\text{pH}4$) 将匀浆液调至酸性,再经酚-氯仿抽提,异丙醇沉淀,真空抽干后,溶于适量体积的 0.1% SDS 溶液或 0.1% DEP 处理的水中,采用紫外吸收法测定 RNA 含量。RNA 样品经 7% 甲醛变性后,按梯度顺序点于硝酸纤维素膜上, 80°C 烘烤 2h , 预杂交及杂交条件按 White 方法^[7]。将斑点杂交结果得到的放射自显影胶片于日本 Cs-910 薄层扫描仪上扫描,根据

扫描结果计算出肺癌总 RNA 相对于正常人肺总 RNA 表达增强的倍数。

用于提取 RNA 的试剂与器皿均经 0.1% DEP 及高压消毒处理。

结 果

1. 总 RNA 的纯化与鉴定

用酸性盐酸胍-酚-氯仿法 (AGPC 法) 所提总 RNA 见表 1 及图 1。

结果表明所提总 RNA 纯度高, RNA 无降解,将总 RNA 分别溶于 0.1% SDS 溶液及 0.1% DEP 处理的水中, -20°C 贮存半年,总 RNA 是稳定的。

表 1 AGPC 法制备总 RNA

	吸光比值 ¹⁾ (A_{260}/A_{280})	产率 ¹⁾ ($\mu\text{g RNA}/\text{mg 组织}$)
酸性盐酸胍-酚-氯仿 (AGPC) 法	1.79 ± 0.09	1.08 ± 0.3

1) 提取 20 例样品的统计结果。

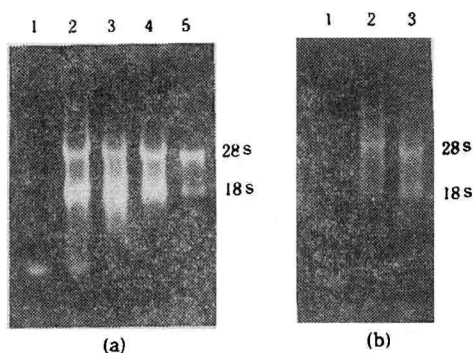


图 1 总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳

(a) 人肺癌总 RNA

1. 酵母 tRNA, 2—5. 人肺癌总 RNA

(b) 人肺癌总 RNA 在 -20°C 贮存半年

1. 酵母 tRNA, 2. 总 RNA 溶于 0.1% SDS 中, 3.

总 RNA 溶于 0.1% DEP 处理的水中

* 国家“七五”攻关资助课题。

表 2 人肺癌癌基因的表达

样品编号	病理诊断	基因表达(增强倍数)				
		c-myc	L-myc	N-myc	Ki-ras	c-fos
HLC1	腺癌	3	— ¹⁾	—	—	—
HLC2	鳞癌	4	—	—	—	—
HLC3	腺鳞癌	4	—	ND ²⁾	2	ND
HLC4	鳞癌	20—25	3	—	7	10
HLC5	腺鳞癌	2	—	—	2	—
HLC6	转移癌	8	4	—	4	10
HLC7	鳞癌	9	—	—	4	8
HLC8	鳞癌	—	—	ND	2	3
HLC9	腺癌	5	3	ND	3	ND
HLC10	腺鳞癌	—	—	ND	2	ND
HLC11	腺癌	—	—	ND	2	ND
HLC12	鳞癌	6	—	ND	3	ND
HLC13	鳞癌	—	—	ND	5	ND
HLC14	腺癌	3	2	—	—	ND
HLC15	鳞癌	3	2	—	1	3
HLC16	鳞癌	5	2	—	—	45—50
HLC17	鳞癌	8	—	2	—	8
HLC18	腺鳞癌	5	—	3	—	7
HLC19	腺癌	7	—	—	—	—
HLC20	肺癌	3	—	—	—	7
HLC21	肺癌	5	6	—	3	8
HLC22	鳞癌	3	—	—	1	—
HLC23	腺癌	—	—	—	—	3
HLC24	鳞癌	4	7	—	3	—
HLC25	鳞癌	—	—	3	—	8

1) 无表达增强;

2) 未检测。

2. RNA 斑点杂交结果

斑点杂交结果见表 2, 部分杂交图谱见图 2—6。

c-myc 基因的斑点杂交结果表明: 在 24 例原发性肺癌组织中(1 例转移癌除外), 有 18 例(75%)表达增强, 其中有 1 例(HLC4), c-myc 基因有过强表达(图 2)。L-myc 基因的表达增强占检测病例的 29%(图 3)。N-myc 基因表达增强的例数较少, 17 例中仅有 3 例(18%)表达增强(图 4)。Ki-ras 基因在 24

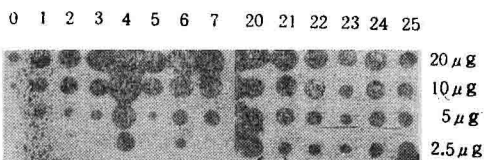


图 2 人肺癌总 RNA 的斑点杂交结果

探针为 c-myc, 0 为正常人肺 NHL, 1—7, 20—25 为人肺癌 HLC

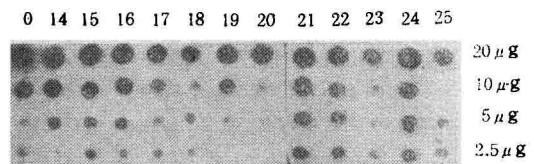


图 3 人肺癌总 RNA 的斑点杂交结果

探针为 L-myc, 0 为正常人肺 NHL, 14—25 为人肺癌 HLC

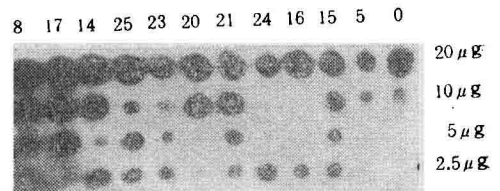


图 4 人肺癌总 RNA 斑点杂交结果

探针为 N-myc, 0 为正常人肺 NHL, 5, 8, 14—17, 20—21, 23—25 为人肺癌 HLC

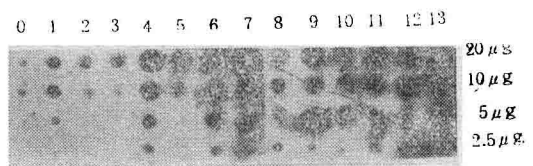


图 5 人肺癌总 RNA 斑点杂交结果

探针为 Ki-ras, 0 为正常人肺 NHL, 1—13 为人肺癌 HLC

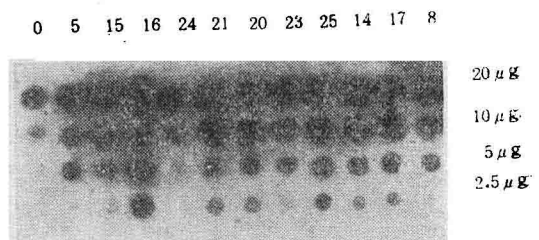


图 6 人肺癌总 RNA 斑点杂交结果

探针为 c-fos, 0 为正常人肺 NHL, 5, 8, 14—17, 20—21, 23—25 为人肺癌 HLC

例中有 15 例(58%)(图 5)。c-fos 基因在检测的 17 例中有 11 例(65%)表达增强, 其中有 1 例(HLC16)有过强表达(图 6)。

讨 论

实验结果发现, 在 myc 家族基因中, c-myc 基因表达增强较多, 而 L-myc 与 N-myc 基因表达增强较少。这一结果与 Nau^[8] 等研究小细胞肺癌 myc 基因表达的结果相似。

最近的研究表明^[9], 正常细胞发生癌变并非一种

癌基因起作用,可能涉及两种或多种癌基因的共同操纵与协同作用。本实验仅观察到有4例对一种癌基因表达增强,有4例 c-myc 与 Ki-ras 基因表达同时增强,有6例对三种癌基表达同时增强,有3例(HLC4, HLC15, HLC21)其 c-myc、L-myc、Ki-ras 及 c-fos 基因表达同时增强。这一结果提示, Ki-ras 与 c-myc 基因的协同作用,在肺癌的病理发生中有重要作用,在肺癌癌变中,不止一种癌基因发挥作用,可能是两种或多种癌基因共同作用。本实验还观察到有两例(HLC4 及 HLC16, 均为鳞癌)分别对 c-myc 和 c-fos 基因有过强表达。癌基因过强表达是否与其病理学特征有关尚待进一步研究,另外,本实验还对1例肺甲状腺转移癌(HLC6)进行了研究,结果发现癌基因有较高水平的表达,这一现象提示癌基因与甲状腺癌有密切关系。

已经有许多事实表明^[10-12],癌基因发挥作用最终是通过其蛋白表达产物实现的。目前的研究认为, myc 相关蛋白 p62 在细胞分裂过程中起重要作用。 ras 基因表达产物 p21 在传递细胞生长刺激的信号中起中枢作用。因此本实验的研究结果提示,应用抗 p62^{myc} 及抗 p21^{ras} 单克隆抗体进一步研究肺癌免疫组化特性,并用这些抗体检查癌组织及患者体液(血液、胸水等)中 p62^{myc} 及 p21^{ras} 蛋白的存在,具有重要

的临床意义和广阔的应用前景。

参 考 文 献

1 Takashi T, Yuichi O, Yoshitaka S *et al. Cancer Res*, 1989; 49: 2683
2 Bos J L. *Cancer Res*, 1989; 49: 4682
3 侯云德等. 病毒基因工程原理与方法. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 89
4 Rigby P W J, Dieckmann M, Rhodes C *et al. J Mol Biol*, 1977; 113: 237
5 Chomczynski P, Sacchi N. *Analytical Biochemistry*, 1987; 162: 158
6 孙宁, 孙芝琳. 生物化学杂志, 1990; 6(3): 238
7 White B A, Bancroft F C. *J Biol Chem*. 1982; 257: 8569
8 Nau M M, Little C D, Carney D N *et al. Nature* 1983; 306: 194
9 Weinberg R A. *Cancer Res*, 1989; 49: 3717
10 Doolittle R F, Hunkapiller M W, Devaer S G *et al. Science*, 1983; 221: 275
11 Downward J, Yarden Y, Mayes E *et al. Nature*, 1984; 307: 521
12 Sherr C J, Rettenmier C W, Sacca R *et al. Cell*, 1985; 41: 665

[本文于1990年9月25日收到, 1991年3月25日修回]

(上接第 478 页)

表 3 296 健康体检人的血清 HDL-C/Tch 比值

性别	年龄组	例数	HDL-C mg/dL (mmol/L)	HDL-C/Tch
			$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
男性	25—30	21	50.8±14.6 (1.321±0.426)	0.30±0.065
	31—40	21	49.4±10.1 (1.284±0.263)	0.31±0.09
	41—50	43	49.8±13.1 (1.295±0.341)	0.29±0.11
	51—60	58	49.8±13.1 (1.295±0.341)	0.31±0.08
女性	25—30	21	54.3±11.8 (1.412±0.307)	0.295±0.07
	31—40	27	48.4±11.6 (1.258±0.302)	0.31±0.07
	41—50	67	54.7±12.9 (1.422±0.335)	0.30±0.07
	51—60	28	53.2±11.3 (1.383±0.294)	0.29±0.08

相当于 30mg/dL); 8μl (相当于 40mg/dL), 并使其与标准管同体积, 再加入胆固醇试剂 500μl, 37℃ 水浴 15min 后, 比色、计算, 其结果见表 2。

HDL-C 的平均回收率为 101.3%, 说明本法的准确度很高。

(4) 实际应用价值 为了确定本法的实际应用价值, 我们用本法对 296 名 25 岁至 60 岁的健康人作了调查, 测定对象是机关干部、研究所工程技术人员及工厂工人, 其中男性 153 人, 女性 143 人, 空腹抽血, 当日检查, 其结果见表 3。

在我们测定的结果中, 男子组的 HDL-C 值略低

于女子组, 经过统计学处理后均无显著性差异 ($P > 0.05$), 男女各年龄组之间均无显著性差异, 与国内有关文献的报道基本一致。

2. 讨论 用中生生化试剂技术开发公司研制的胆固醇酶试剂及沉淀剂和测定血清 HDL-C 方法, 并对方法学进行了验证, 其精密度和准确度均较满意, 本法快速简便, 特异性强, 适合常规检验。

参 考 文 献

1 李健斋. 中华内科杂志, 1958; 1(1): 13
2 杨昌国. 中华医学检验杂志, 1979; 2(2): 85