

多重 PCR 对乳腺癌中 MTS₁ 基因外显子 2 缺失的研究

黄 健^{1,2} 胡春萍² 白 玲² 姚铁钧³

¹桂林医学院生物工程研究所 桂林 541004 ²桂林医学院生化教研室 ³桂林医学院病理科

摘要 为探索 MTS₁ 基因变异在乳腺癌的发生及恶性进程中的作用,作者应用多重 PCR 技术对 47 例原发性乳腺癌组织进行了检测。结果显示 17 例纯合性缺失,变异率为 36.2%,其中淋巴结转移组的变异率 60%(9/15)显著高于未转移组 25%(8/32, $P < 0.05$),浸润性导管癌变异率显著高于其它类型癌。本研究结果提示,MTS₁ 基因在乳腺癌组织中有变异存在,其变异的频率与肿瘤的恶性程度及组织分型密切相关。

关键词 PCR;乳腺癌;MTS₁ 基因

DELETION OF EXON 2 OF MTS₁ GENE IN BREAST CARCINOMAS BY MULTIPLEX-PCR

统已产生急性毒性,而抑制其回变发光,这与 Ames 试验相似,即待测化合物须配成不同浓度溶液,但最高不能超过该物的抑菌浓度。

发光细菌 T₉₁₇₁ 暗变种回变试验与 Ames 试验的比较:菌的内源激活作用;与鼠伤寒沙门氏杆菌相比,明亮发光杆菌 T₉₁₇₁ 暗变种在将供试化合物转为激活态时都不须添加外源代谢激活酶,而自身具有内源激活作用,可以把细菌萤光酶看成双功能氧化酶。这表明发光细菌可能具有一种或多种代谢激活酶,其功能类似哺乳动物微粒体中传递氧化酶系统的细胞色素 P450,而鼠伤寒沙门氏杆菌则无此种酶,苯并(a)比,9—10—二甲基—1,2—苯并蒽,黄曲霉素—B₁,在没有 S—9 存在下虽可提高 8SD18 暗种回变的发光度,但若添加 S—9,则可提高该菌株对移码剂的敏感性。

从表 2 看出,发光细菌暗变种试验对溴化乙锭,叠氮化钠致突变效应呈阳性,丝裂霉素—C 呈可疑阳性,二甲基亚砷呈阴性,而 Ames 试验对溴化乙锭、叠氮化钠呈阳性,对丝裂霉素—C 因急性干扰而妨碍了测定,可见,发光细菌暗变种试验测试化合物致突性的灵敏度高于 Ames 试验。

从引起致突的化合物浓度来看(见表 2),溴化乙锭引起发光细菌暗变种致突的浓度为 1.0 μ /ml,而对鼠伤寒沙门氏杆菌致突的浓度要提高到 50 倍。丝裂霉素—C 对发光细菌暗变种致突效应呈可疑阳性时的浓度为 0.0078125 μ g/ml,而对沙门氏菌当浓度低于 10 μ g/ml 仍不致突,但达到 10 μ g/ml 则由于产生急性毒性已难测定。

用明亮发光某些菌 T₉₁₇₁ 暗变种作的试验及其结果表明,“发光细菌暗变种试验”,作为一种测试化合物致突性的方法,其灵敏度总体上比 Ames 试验高。

(本实验方法由南京土壤所提供)

表 2 不同方法鉴别化合物的致突变性比较

化 合 物	Ames 试验(掺入法)		发光细菌暗变种试验	
	供试浓度 μ g \cdot ml ⁻¹	致突性	供试浓度 μ g \cdot ml ⁻¹	致突性
溴化乙锭	50	+	1.0	+
丝裂霉素—C	10	??	0.0078125	?
二甲基亚砷	原液	-	原液 \times 0.0078125	-
叠氮化钠		+	0.03125	+

“?”可疑阳性 “??”化合物(急性毒性妨碍)致突测定

参考文献

- 顾宗濂,等. 发光细菌对化合物的致突变效应检测研究. 环境科学学报,1993;13(4):42
- 顾宗濂,等. 发光细菌暗变种对土地处理的工业废渣的致突变效应. 环境科学学报,1994;14(3):350

(1999-07-15 收稿;1999-09-15 接受)

Abstract This study sought to address the relationship of breast carcinoma with deletion of MTS₁ gene. 17 of 47 cases showed MTS₁ gene was deleted by multiplex - PCR. The rate of deletion of MTS₁ gene was 36.2%. the rate of deletion in metastatic breast carcinoma of lymph node was 60%(9/15), that in nonmetastatic breast carcinoma of lymph node was 25%(8/32). There were significant differences in the rate of deletion of MTS₁ gene between them, and between the rate of infiltrating type of breast carcinoma and the others. These suggest that deletion of MTS₁ gene was associated with progression and type of breast carcinoma.

Key words PCR; Breast carcinoma; MTS₁ gene

近几年,分子生物学的进展很快,在分子水平上研究疾病的发生、发展和转归,已成为医学研究的一个更高层次。尤其是癌基因的激活和肿瘤抑制基因的失活与恶性肿瘤的发生之间的相关性,现已成为肿瘤分子生物学研究的热点。早在1994年,美国科学家 Kamb 克隆出一新的肿瘤抑制基因,由于该基因在很多类型的肿瘤中经常出现纯合性缺失及突变,因此将其命名为多肿瘤抑制基因(Multiple tumor suppressor gene, MTS₁)⁽¹⁾。

为探索 MTS₁ 基因变异在乳腺癌的发生及恶性进程中的作用,作者应用多重 PCR 技术对乳腺癌中的 MTS₁ 基因外显子 2 进行了研究。

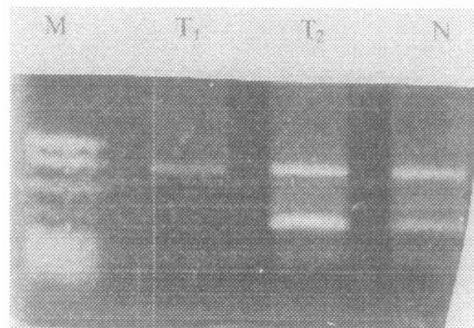
材料与方 法

1 病例来源及 DNA 提取 我院病理科采集的新鲜乳腺癌标本共 47 例,基因组 DNA 采用常规的酚 - 氯仿抽提,并经紫外分光光度计作 DNA 纯度及定量检测。

2 多重 PCR 扩增 MTS₁ 基因外显子 2 以乳腺癌及正常组织 DNA 为模板, Taq DNA 聚合酶及 dNTP 为华美生物工程公司产品,反应体积为 50μl, MTS₁ 基因外显子 2 及作为参照的 β -globin 基因的引物,反应体系组成及多重 PCR 扩增均按作者建立的方法进行⁽²⁾。

结 果

应用多重 PCR 技术从 47 例乳腺癌中检测到 17 例 MTS₁ 基因纯合性缺失,变异率为 36.2%。PCR 产物电泳图谱见附图。



附图:多重 PCR 扩增乳腺癌中 MTS₁ 基因外显子 2 电泳图谱
 M: Marker (PBR322/ Hind^{III})
 N: 正常组织
 T₁: MTS₁ 基因外显子 2 缺失的乳腺癌组织
 T₂: MTS₁ 基因外显子 2 未发生缺失的乳腺癌组织

MTS₁ 基因缺失与患者年龄,肿瘤大小无明显相关。但与淋巴结转移密切相关,淋巴结转移组的变异率 60%(9/15)显著高于未转移组 25%(8/32, P < 0.05)。MTS₁ 基因变异与组织分型的关系见附表。

附表 47 例乳腺癌 MTS₁ 基因变异与组织分型的关系

组 别	例数	MTS ₁ 基因扩增[例数(%)]	
		阴性	阳性
单纯癌	39	11	28
浸润性导管癌	7	6	1
髓样癌	1	0	1
合 计	47	17(36.2)	30(63.8)

讨 论

MTS₁ 基因定位于人染色体的 9P21 区位,由 3 个外显子组成,中间 307bp 的编码序列为外显子 2,是基因突变的热点之一。MTS₁ 基因表达的产物

生殖毒理试验程序的一般原则

王爱平

军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850

生物系统对化学刺激的反应与受试物的毒性、剂量水平、接触时间和给药途径有关。生殖毒理学与机体的发育阶段、性腺周期及成熟过程的关系尤为密切。当解释观察到的作用时必须考虑到化学物在机体中的吸收、分布、生物转运和清除。综合分析各方面的情况,才能获得对受试物相关的、有价值的毒理学知识。此外,无论评价何种化学物均需要建立严格统一的测试要求,并努力降低研究费用,使用于安全性评价方面的花费不大于被测试化合物潜在损害的上限。

选做何种生殖试验主要取决于研究目的,取决于研究结果用于何种需要。生殖毒理试验的主要目的有:

(1) 新产品的筛选;

(2) 新产品的审批;

(3) 对在人类生活环境中已使用和已存在的化学物进行安全性评价。

供测试的产品通常包括:食品添加剂、农用化学物、杀虫剂、药品、化妆品、环境污染物和工业化学物。有时,化学物的用途会影响试验方法的选择。因此,在某项既定测试程序中,试验方法的选择应根据接触途径、观察到的毒性、试验目的和受试物的用途而定。

1 试验方法的选择标准

评价程序中选用的生殖毒性试验,必须满足如下标准,并能有效地进行生殖危险度评价。

(1) 在单一种类动物中可重复。

(2) 一种实验动物中获得的结果在另一种或多种

P16 蛋白是依赖细胞周期素激酶 4 的抑制物 (CKIs), 通过抑制细胞周期 D/CDK4 活性参与并调节细胞从 G₀ 期进入 G₁ 期, 从而控制细胞异常增殖。目前研究表明, MTS₁ 基因在大多数人类原发性肿瘤组织和肿瘤细胞系中均有突变存在, 但前者较后者基因变异的频率低⁽³⁾。其中 60% 的乳腺癌细胞系可见基因纯合性缺失⁽¹⁾。有学者应用 PCR-SSCP 技术在 5 种乳腺癌细胞系中检测到 2 种 MTS₁ 基因纯合性缺失, 而 37 例原发性乳腺癌组织未发现变异⁽⁴⁾。MTS₁ 基因变异主要有等位基因的纯合性缺失、杂合性缺失、错义突变等, 但一般情况下缺失较点突变常见^(5,6)。作者应用多重 PCR 技术对 47 例原发性乳腺癌组织进行了检测, 结果显示 17 例纯合性缺失, 即 MTS₁ 基因变异率为 36.2%, 并且淋巴结转移组的变异率显著高于未转移组 ($P < 0.05$)。浸润性导管癌的变异频率显著高于其它类型癌。本组研究结果提示, MTS₁ 基因在乳腺癌组织中有变异存在, 其变异的频率与肿瘤的恶性程度及组织分型密切相关。MTS₁ 基因的

其它变异与乳腺癌的发生、发展及预后的关系以及 MTS₁ 基因与其它 CKIs 之间在乳腺癌的发生及发展中功能的差异仍有待深入探讨和研究。

参考文献

- 1 Kamb A, Gruis NA, Feldhaus JW, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 1994;264(15):436
- 2 黄健, 王国华, 姚铁钧, 等. 多重聚合酶链反应检测多肿瘤抑制基因初探. *中华医学检验杂志*, 1997;20(2):90
- 3 Kamb A, Liu QY, Harshman K, et al. Rates of P16 (MTS₁) mutation in primary tumors with 9P loss. *Science*, 1994;265(16):415
- 4 Xu L, Sgroi D, Sterner CJ, et al. Mutational analysis of CDKN2 (MTS₁/P16) in human breast carcinomas. *Cancer Res*, 1994;54(20):5262
- 5 Jen J, Harper JW, Bigner SH, et al. Deletion of P16 and P15 genes in brain tumors. *Cancer Res*, 1994;54(23):6353
- 6 Sill H, Aguiar RCT, Schmidt H, et al. Mutational analysis of the P15 and P16 genes in acute leukaemias. *Br J Haematology*, 1996;92(3):681

(1999-04-05 收稿; 1999-08-02 接受)