

国家“八·五”科技攻关汇报文集



中国医学科学院
协和医科大学 肿瘤研究所病因室

1995 年 8 月

目 录

一、序言	1
二、汇报内容	2
三、发表的论文	
1. 食管癌癌变过程中 c-myc 与 HER-1 癌基因表达的研究	10
2. 原发性及亚硝胺诱导的食管癌中 int-2 基因的扩增	13
3. Amplification and Expression of the Human Cyclin D Gene in Esophageal Cancer	16
4. Altered expression of the cyclin D1 and retinoblastoma genes in human esophageal cancer	20
5. 食管癌中五种不同基因改变的分析	25
6. 食管癌组织中 Rb 基因突变与表达的研究	29
7. 食管癌和贲门癌组织中 p53 基因突变的研究	35
8. 食管癌和癌旁上皮中 p53 癌基因的研究	39
9. p53 MUTATIONS IN ESOPHAGEAL TUMORS FROM HIGH-INCIDENCE AREAS OF CHINA	40
10. p53 蛋白在原发性及亚硝胺诱发的食管癌中的高表达	44
11. 食管癌组织中抑癌基因 APC、MCC 突变的研究	49
12. 人原发性食管癌组织中多种抑癌基因的研究	53
13. 食管癌 1 号染色体短臂等位基因丢失的研究	56
14. 亚硝胺对人食管上皮中癌基因的作用	57
15. NMBzA 对人胎儿食管上皮组织中多种抑癌基因作用的研究	61
16. NMBzA 对猴食管上皮癌基因和多种抑癌基因的作用	66
17. 人食管癌与 NMBzA 引起的人和猴食管上皮细胞中 多种抑癌基因变化的相关研究	72
18. PCR 直接测序方法及其在肿瘤研究中的应用	77
19. Detection of transforming genes by transfection of DNA from human fetal esophagus induced by NMBzA	81
20. 食管癌和癌旁上皮中乳头状瘤病毒的检测	83
21. 亚硝胺诱发的人食管癌细胞系的建立	87
四、参加国际会议的论文摘要	88
五、论文被国际 MEDLARS 检索的情况	95
六、综述	105
七、专著撰写情况	116

序 言

“食管癌化学病因致癌的分子机理研究”课题是国家“八·五”科技攻关委托项目，经几年的研究，较好地完成该项目的要求内容。为了便于向领导总结汇报，汇编了此文集。

本文集主要汇编了该项目“八·五”科技攻关总结学报的内容，“八·五”期间在国内、外发表的科学论文，论文综述，国际会议的论文摘要、MEDLARS 检索情况以及专著撰写的目录等，真实地反映了课题组完成国家“八·五”科技攻关的研究实践。

我们“八·五”科技攻关的圆满完成，应归功于我课题组全体科技人员的辛勤劳动和国家科委、计委、财政部、卫生部、全国肿瘤防治办公室以及中国医学科学院肿瘤所（院）各级领导（包括科管人员）的大力支持和帮助。我愿借此机会，向他们表示衷心感谢，并欢迎对我们的科研工作提出批评与指正。

此文集由中国麻风协会郭世忠同志协助印刷，特此致谢！

陆士新

1995 年 8 月

“八·五”科技攻关汇报

食管癌是我国常见的恶性肿瘤,“七·五”期间,我们明确了亚硝胺是林县食管癌的主要病因之一,“八·五”期间,重点研究食管癌的病因癌变机理。委托的课题为“食管癌化学病因致癌的分子机理研究”,经几年的努力,应用分子生物技术,从细胞遗传改变的结果,初步论证了林县食管癌病因癌变的机理(“七·五”期间部分工作未汇编在此文集内)如下:

- ①食管癌癌变是由多种癌基因和抑癌基因的改变而引起的,如:
c-myc,EGFr,int-2,cyclin D 等癌基因的激活和抑癌基因 Rb,p53,MCC,APC MTS 1 缺失与突变(附表)。
- ②癌基因与抑癌基因在食管癌癌变不同阶段起作用(附图)。
- ③林县环境中化学致癌物(如NMBzA)使原癌基因激活和抑癌基因失活、使食管上皮细胞产生癌变。
- ④化学致癌物引起的癌基因和抑癌基因的改变和人原发性食管癌中的相同。从分子水平验证食管癌病因与环境的关系以及癌变机理的相似性。
- ⑤反义p53基因导入正常细胞后,使细胞内p53基因功能失活,可引起细胞癌变,验证了抑癌基因功能变化,成为细胞癌变的基础。
- ⑥癌基因的调控:抑癌基因Rb在细胞癌变中起重要作用,Rb基因调控区高甲基化直接影响 Rb 基因的功能,Rb 基因的变化也能影响 cyclin D 与 p53 等基因的功能。
- ⑦食管癌组织中未发现乳头状病毒(HPV),因此,抑癌基因Rb, p53的失活与 HPV 关系不大。此外,也提示 HPV 在食管癌病因中的作用不是重要的。
- ⑧亚硝胺诱发的人食管癌细胞系的建立。

附表: 食管癌组织中癌基因和抑癌基因的改变

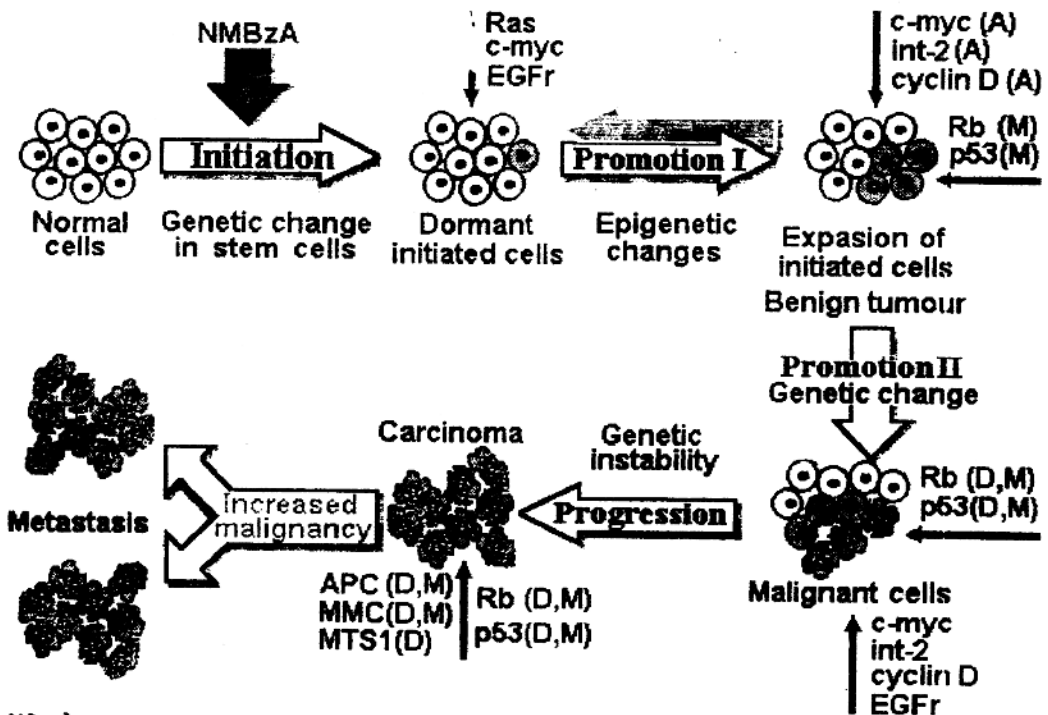
组	织	C-myc		EGFr		int-2		cyclin D		Rb	p53	APC		MCC	MTS1
		A	E	A	E	A	E	A	E	EDDM	EDDM	D	M	D	M
原发性食管癌(EC)		+	+	+	+	+		+	+	+++	+++	+	+	+	+
食管癌旁上皮			+		+	+				+	+				
NMBzA 诱发的 EC						+				+	+++			+	
NMBzA 处理胎儿															
食管上皮		+		+	+	+				++	++			+	
NMBZA 处理猴															
食管上皮										+	+	+			

A= 扩增

E= 表达

D= 缺失

M= 突变



附表. 食管癌多阶段致癌过程中癌基因的作用

现将研究结果，具体汇报如下：

一、食管癌中癌基因的变化：

1. *C-myc* 与 *EGFr* 癌基因的表达：

“七·五”期间，曾发现食管癌和癌旁上皮中由 *c-myc* 与 *EGFr* 基因扩增与高表达，现用原位杂交法观察 *c-myc* 与 *EGFr* 的表达与食管癌病理类型的关系。结果显示：食管癌旁正常上皮细胞中没有发现 *C-myc* 与 *EGFr* 基因表达增高。在食管上皮细胞增生期 *C-myc* 基因开始表达增高，且随细胞病变程度严重而 *C-myc* 表达也增高，并贯穿於癌变过程始终，*C-myc* 的活化是癌变的因素之一，而且可能在不同癌变阶段发挥重要作用。

EGFr 虽在食管癌和癌旁上皮有高表达，但频率较低，其在食管癌发生发展过程中的作用。尚待研究 (1)。

2. *int-2* 扩增：

int-2 基因属于纤维母细胞生长因子(EGF)基因家族，是位于染色体 11q13，它控制细胞正常生长，目前已在人类恶性肿瘤组织中发现 *int-2* 基因的扩增。我们在 52 例食管癌，18 例癌旁上皮分别发现 23 例和 7 例有 *int-2* 基因的扩增，并各有 1 例重排，食管癌与癌旁上皮中 *int-2* 基因扩张无差异。结果显示：*int-2* 基因的扩增可能是一个早期的遗传学改变。并持续存在於扩增后的整个肿瘤形成过程 (2)。

3. *Cyclin D* 基因的扩增与高表达：

Cyclin D 是一个基因族，也定位在 11q13，*Cyclin D* 被分 G1 *Cyclin* 或 M *Cyclin*。*Cyclin D* 在人食管癌组织中是扩增与表达的。林县 20 例食管癌组织中有 5 例 (25%) 有 *Cyclin D* 与 *hst* 共扩增，并在两株人食管癌细胞株中发现有 *Cyclin D* 基因的转录作用，是首次发现食管癌组织中有 *Cyclin* 基因的扩增。*Cyclin D* 水平的上升是食管癌病理形成的重要因素 (3)。

我们也检测了 50 例食管中的 36 例 *Cyclin D* 与 *Rb* 的蛋白表达，16/50 食管癌 *Cyclin D* 扩增。在 13 例 *Cyclin D* 扩增的食管癌中有 12 例有 *Cyclin D* 高表达。在 *Cyclin D* 扩增和高表达的肿瘤组织中 *Rb* 蛋白表达是正常水平，相反，食管癌组织中 *Rb* 蛋白不表达，*Cyclin D* 基因不扩增及 *Cyclin D* 表达水平较低。结果显示 *Rb* 对细胞周期的进程的抑制作用可能被取消，在食管癌发展过程中，*Rb* 基因表达的丢失或增加 *Cyclin D* 表达的 (4)。

4. 食管癌中多种不同基因改变的分析:

在 45 例食管癌标本中, 以 Southern 法分析 EGFr, C-myc, int-2, Rb 和 p53 基因的改变, 其中 29 例有上述基因的改变, 其发生率分别 15.6%, 31.1%, 35.6%, 22.2% 和 6.7%, 在有基因改变的患者中约 48.3% 有两种或两种以上基因改变, 而且多发生在病理分期的 II—III 期病人, 提示肿瘤分化和基因改变之间可能存在一定的相关性, 组织分化愈差, 基因改变发生的频率和数量亦愈多, 未发现淋巴结转移和基因改变之间有明显相关性 (5)。

二、食管癌组织中抑癌基因的改变:

1. Rb 基因表达与突变:

食管癌与癌旁组织中均发现有 Rb 基因 17 和 21 外显子缺失, 约 58% 食管癌组织中有 Rb 基因的表达异常, 用 PCR—直接测序方法, 首次证实食管癌中存在 Rb 基因的突变。NMBzA 诱发的人胎儿食管上皮癌有与人原发食管癌有相似 Rb 基因的缺失与突变。研究表明: 抑癌基因—Rb 基因的缺失、突变、表达异常等变化, 在食管癌的发生中起着重要作用。而 Rb 基因的突变、缺失和表达失活可能与环境中亚硝胺致癌物的作用有关 (6)。

2. p53 基因的改变:

林县 35 例原发性食管癌和 4 例贲门癌以及其 27 例癌旁上皮中抑癌基因 p53 发生结构的改变, 如缺失、突变、重排等改变, 用 PCR—直接测序方法, 发现 50% 的食管癌有 p53 基因的 5—9 外显子和相应内含子突变, 45% 的癌旁上皮也有 p53 基因的突变, p53 基因的突变谱为 G: C→A: T 的置换突变与颠换突变, 也发现有移码突变和插入性突变, 其突变位点较分散, 而 4 例在第 144 密码子。结果提示: p53 基因在食管癌和贲门癌癌变中起重要作用 (7, 8)。

另外, 林县 10 例食管癌和 14 例贲门癌用 PCR—直接测序法分析了 p53 基因的改变, 结果发现 50% 所检测标本中有 p53 基因突变有 3 例为 G→T 颠换突变, 12 例突变有 3 例为 C→T 突变, 结果和在北京所测结果相似 (9)。

用免疫组织化学方法, 检测出 p53 基因的高表达, 也反映 p53 基因的突变。林县 18 例食管癌及其相应的癌旁上皮, 免疫组织化学方法分析结果表明: 18 例癌旁有 7 例 p53 基因高表达, 对应的癌旁上皮中, 5 例有 p53 基因高表达 NMBzA 诱发的人胎儿食管上皮癌也有 p53 基因高表达, 而 NMBzA 处理人胎儿食管上皮 24 小时 1 周和 2 周, 未见 p53 基因的高表达, 上述结果说明: p53 基因可能在食管癌形成过程中的促进阶段(Promotion Stage)和 / 或

进展阶段(Progression Stage)起重要作用, 环境中亚硝胺引起 p53 基因的突变 (10)。

3. APC 和 MCC 基因的改变:

APC 和 MCC 分别是人家族性结肠腺瘤样息肉和结肠息肉的易感基因, 但是, APC 和 MCC 基因也与其他肿瘤有关, 我们有 PCR-直接测序方法在林县食管癌组织中, 发现 APC 基因的 11 外显子 A→G 突变, 而 MCC 基因为 12 外显子的 G→A 突变, 此外, 还发现 APC 与 MCC 基因有缺失改变 (11)。

4. 多重肿瘤抑制因子-1 基因(Multiple Tumor Suppressor1, MTS1) 的改变:

人类第 9 号染色体短臂上存在一个新的抑癌基因—MTS1, 基编码的产物称 p16, 它通过直接阻断细胞周期(G1→S, G2→M)的方式而抑制肿瘤生长, 我们对林县 30 例食管癌标本用 Southern 印迹法和 PCR 法分析 MTS1 基因, 发现 30% 食管癌组织中有 MTS1, 基因的杂合性或者纯合性缺失, 现正在进行食管癌组织中 MTS1 突变的研究。(此文待发表)

5. 多种抑癌基因的改变:

用 PCR-直接测序法, 分析了 10 例食管癌和癌旁组织中多个抑癌基因 p53, Rb, APC 和 MCC 的突变与丢失。6/10 有 p53 突变, 5/10 有 Rb 基因改变, 3/10 有 APC 基因的改变, 3/10 有 MCC 改变。8 例 EC 中至少有一种抑癌基因有改变, 6 例至少有两种抑癌基因的变化, 1 例癌旁组织中也两个抑癌基因改变, 食管癌癌变与多个抑癌基因遗传变化有关 (12)。

三、食管癌 1 号染色体短臂等位基因丢失的研究:

我们用 1 号染色体上 3 个 RFLP 探针, 研究了 46 例林县食管癌和 30 例癌旁组织, 结果发现 1pter-31 部分丢失者 9 例 (19.6%), 1p32 部分丢失者 7 例 (15.2%), 重排 2 例 (4.3%); 癌旁组织中 1pter-31 和 1p32 部分丢失者分别为 3/30 (10%) 和 2/30 (6.7%)。这种丢失位点与食管癌核型分析中常见的染色体脆性部位相一致, 也是 jnn, L-myc, fgr 基因定位的部位。在这些部位内也可能有抑制癌基因的失活, 引起食管癌的发生 (13)。

四、亚硝胺类化合物对食管组织中癌基因的作用

1. 亚硝胺对人食管上皮中癌基因的作用

用甲基苄基亚硝胺 (NMBzA) 处理胎儿食管上皮 (HFE) 组织, 通过

Southern 杂交和免疫组织化学分析发现: NMBzA 诱导 24 小时的 HFE 中即有 EGFr 基因的扩增和高表达; 随着诱导时间的延长, 在 NMBzA 诱导 1 周和 3 周的 HFE 中分别发现 c-myc 和 int-2 基因的扩增, 组织学观察可发现这些组织中有局部乳头状增生; 在 NMBzA 诱导的胎儿食管上皮癌中发现 Rb 基因的完全丢失及 p53 基因的部分丢失和高表达。将 NMBzA 体外诱导 3 周的 HFE 组织接种至裸鼠体内, 连续观察 5 个月未发现接种处有肿瘤形成, 病理切片亦未找到恶性细胞。提示仅有 EGFr、c-myc 或 int-2 等少数几种癌基因的改变尚不足以导致食管癌完全恶性状态的形成, 食管癌的最后形成可能还需 p53 和 Rb 等抗癌基因的丢失和失活 (14)。

2. NMBzA 对人胎儿食管上皮组织中多种抑癌基因的作用

流行病学研究表明: 食管癌与环境中亚硝胺致癌物有密切关系。为了从分子水平阐明亚硝胺致癌物诱发食管癌癌变机制, 作者用 PCR 扩增分析发现甲基苄基亚硝胺 (NMBzA) 诱发的人胎儿食管癌组织有抑癌基因 Rb, p53, APC 和 MCC 缺失。NMBzA 处理 24 小时和 3 周的人胎儿食管上皮细胞中未发现这些基因的缺失; 但 PCR 直接测序分析发现 NMBzA 体外处理 3 周的人胎儿食管上皮组织有 p53, Rb 和 MCC 基因突变。以上体外实验首次证明: 亚硝胺致癌物能引起人食管上皮细胞多种抑癌基因改变。亚硝胺致癌物引起的食管癌癌变中抑癌基因在早期阶段发生突变, 在晚期阶段发生丢失, 这对于从分子水平论证食管癌的亚硝胺病因具有重要意义 (15)。

3. NMBzA 对猴食管上皮抑癌基因的作用

应用 PCR 扩增和直接测序方法, 分析致癌物甲基苄基亚硝胺 (NMBzA) 对猴食管上皮细胞中癌基因 Ha-ras 和多种抑癌基因 p53, Rb, APC 的作用。结果未发现 Ha-ras 第 12 密码子突变; 给猴灌喂 NMBzA 24 和 48h, 食管上皮有 p53 基因突变指纹; 灌喂 NMBzA 48h, 存在 Rb 与 APC 基因突变指纹。实验证实: 化学致癌物 NMBzA 能引起多种抑癌基因改变, NMBzA 对细胞中抑癌基因的遗传性突变影响可能需要多次作用。这些基因突变指纹与过去报道的部分原发性食管癌中的 p53, Rb 和 APC 基因的突变相同 (16)。

4. 人食管癌与 NMBzA 引起的人和猴食管上皮细胞中多种抑癌基因变化的相关性研究

为了研究人原发性食管癌组织中多种抑癌基因突变谱与甲基苄基亚硝胺 (NMBzA) 引起的人和猴食管上皮细胞中多种抑癌基因突变谱的相关性。我

们应用 PCR 扩增与直接测序技术分析人原发性食管癌和 NMBzA 处理的人和猴食管上皮细胞中多种抑癌基因 p53, Rb, APC 和 MCC 的突变谱; 发现 40.9% (9/22) 的人原发性食管癌 p53 基因突变与 NMBzA 处理的人和猴食管上皮细胞中 p53 基因的突变相同, 也发现 NMBzA 引起的人和猴食管上皮细胞中多种抑癌基因 Rb, APC, MCC 的突变谱与部分人原发性食管癌多种抑癌基因突变谱相同。首次从分子水平证明: NMBzA 引起的多种抑癌基因突变谱与人原发性食管癌的突变谱有相关性, 从而验证了 NMBzA 是我国食管癌的致病因子之一 (17, 18)。

5. NMBzA 处理人胎儿食管上皮 DNA 中转化基因的检测

用 NMBzA 处理人胎儿食管上皮 24 小时, 然后提取 DNA, 以磷酸钙转染方法将 DNA 导入 Rat-1 细胞, 有细胞克隆形成, 软琼胶锚状生长, 裸鼠致瘤实验阳性, 成瘤的 DNA 经核酸杂交有 Alu 和 Ras 基因阳性, 证明 NMBzA 处理人胎儿食管上皮 DNA 中的 Ras 基因被激活 (20)。

上述 NMBzA 处理的人和猴食管上皮 DNA 中 p53, Rb, APC, MCC 基因缺失和突变的形式和特点与原发性食管癌中的变化相似, 首次证明 NMBzA 能引起同一食管上皮中 Rb, p53, APC, MCC 多个抑癌基因的丢失或突变, 为食管癌亚硝胺病因从分子机制上提供重要证据。

五、NMBzA 对猴食管上皮 Rb 基因调控的研究:

给猴喂 NMBzA 24, 48 和 72 小时, 猴食管上皮中 Rb 基因启动区 Hpa II 类型甲基化程度明显高。NMBzA 影响基因启动区甲基化程度的升高, 可能是 Rb 基因表达失活的重要原因之一。

六、抑癌基因功能失活与细胞癌变的研究

肿瘤的发生是参与细胞生长增殖或细胞分化调控基因功能失活而引起的。p53 基因是阻止肿瘤生长的抑制因子。正常 p53 基因的功能象分子警察 (Molewear police Man) 监视着细胞不过度增殖 (G1→S) 防止细胞癌变。为了验证食管癌组织中 p53 抑癌基因功能失活和食管上皮细胞癌变的关系, 我们用构建的反义 p53 基因导入 NIH 3T3 细胞, 经 G418 筛选, 3T3 细胞形成克隆, 裸鼠致瘤实验呈阳性。瘤细胞经 Southern blot 证明反义 p53 基因的存在。Northern blot 证实正常 p53 基因不表达。目前还在将反义 p53 基因导入人胎 II 食管上皮以观察 p53 功能失活在人食管上皮细胞癌

中的作用。

七、食管癌中 HPV 的分析

Rb 和 p53 抑癌基因结构与功能的改变,除了与环境中致癌物有关外,一些病毒如 SV40, HPV 的 E6, E6 编码蛋白与 p53, Rb 基因结合,使 Rb 和 p53 基因与失去正常功能引起细胞癌变。为了探索食管癌组织中 Rb 和 p53 基因的突变和功能失活与 HPV 的关系以及 HPV 和食管癌发生的关系,我们用 PCR 方法检测了 32 例食管癌和 57 例癌旁上皮,均未发现 HPV,因此,食管癌中 Rb 和基因的改变和 HPV 关系不大,此外,HPV 在食管癌的发生发展中的作用尚待阐明 (20)。

八、食管癌易感基因的筛选研究

食管癌组织中多种癌基因的激活和多种抑癌基因的失活与食管癌癌变过程有密切关系。但是,未能确定食管癌的易感基因,我们用食管癌高癌家族的食管癌组织与正常人食管上皮的 RNA 进行差异显示法进行筛选,已发现高癌家族食管癌病人与正常人食管上皮有不同的条带,现正在进一步作克隆,筛选功能等方法鉴定。

九、建立了亚硝胺诱发的人食管癌细胞系

我们曾用甲基苄基亚硝胺 (NMBzA) 成功的诱发出人胎儿食管上皮鳞癌,为进一步研究亚硝胺诱发的人胎儿食管上皮鳞癌组织裸鼠体内传代,传至 14 代时将该组织进行体外培养,经过近 3 年的努力,我们成功地建立了一株能体外连续传代的,该细胞系的建立为深入研究食管癌的化学癌变机制和药物治疗提供了一个很好的实验模型,具有很好的应用前景。

发表的论文

食管癌癌变过程中c-myc与HER-1
癌基因表达的研究

中国医学科学院肿瘤研究所* 梁苑苑 陆士新

摘要 我们应用细胞原位杂交的方法,对食管癌变过程中c-myc和HER-1基因的表达进行了分析研究,结果显示,食管癌旁正常上皮细胞中没有发现c-myc与HER-1基因表达的增高。c-myc癌基因表达的增高起始于食管上皮细胞的增生期,30例处于增生期的癌旁组织中,7例有c-myc基因不同程度的表达增高;30例癌组织中,c-myc癌基因表达增高为6例,其中浸润的癌细胞中c-myc表达水平最高。c-myc的高表达可能作为食管癌癌变的原因之一而不是癌变的结果。25例食管癌组织和25例癌旁组织中,HER-1表达增高分别为2例和1例,其表达频率低于c-myc基因。HER-1基因在食管癌上皮细胞癌变过程中的作用目前还不甚了解。

关键词 杂交,原位 c-myc HER-1 基因表达 食管肿瘤

原癌基因的激活在人类肿瘤的发生发展过程中起重要作用。已有大量证据表明:在某些肿瘤中,某些癌基因的改变如扩增、异位、过表达、缺失等是非随机的^[1-5]。在食管癌高发区河南林县的食管癌和癌旁组织中已发现有HER-1和c-myc基因的扩增和过表达^[6],但所用的方法是从组织块中提取DNA或RNA后进行核酸杂交,这种方法存在一个问题,即细胞的不均一性。细胞成分的不均一性影响了结果分析的准确性。细胞原位杂交的方法则可避免上述问题,它可同时提供基因表达与组织病理细胞类型相关的数据。我们利用细胞原位杂交定性、定量、定位的特点对高发区食管上皮细胞从正常转变到恶性肿瘤细胞的各阶段c-myc和HER-1的表达作了分析研究。

材料与方法

一、制备组织切片:林县县医院食管癌术后的标本立即放入液氮贮存运回本所。载玻片用poly-L-lysine(100μg/ml)液处理后,在-17℃制备冰冻切片,厚度为5μm。

二、探针的制备:按照Maniatis^[7]方法提

取含有c-myc和HER-1探针的DNA(质粒由IB.Weinstein赠送)。用Sac I和EcoRI限制性内切酶分别消化c-myc与EHR-1 DNA,分别得到c-myc 1.4 kb和HER-1 0.767 kb插入序列。于1.5 ml塑料离心管中加入³H-dATP(89ci/mmol)、³H-dCTP(69ci/mmol)、³H-dGTP(40ci/mmol)各40μl,加入探针DNA 0.2μg, 0.05 mM TTP 1μl, 缺口翻译缓冲液 2.5μl, 50pg/ml DNase I 1μl, 5 u/μl DNA polymerase I 1μl, 消毒去离子水 16.5μl, 15℃水浴中保温2小时,加0.5 M EDTA终止反应,过Sepadex G-50柱分离纯化标记的探针。c-myc和HER-1探针放射性活性均达到 1.5×10^7 cpm/μg DNA。

三、细胞原位杂交:切片经蛋白酶K和70%甲酰胺/2×SSC中处理后,与探针进行原位杂交。杂交液含:5×Denhardt液、100μg/ml³²P-标记DNA、100μg/ml poly A、600 mM NaCl、10 mM Tris HCl(pH 7.4)、1 mM EDTA和50%甲酰胺。每片加入标记探针的放

* 邮政编码 100021

活性为 5×10^6 cpm, 于湿盒内 40°C 保温 48 小时, 冲洗切片并均匀地浸沾经 600 mM 乙酸铵 1:1 稀释的乳胶 (NTB-3; Kodak), 置密暗盒中 4°C 曝光二周。显影定影后用 HE 染色。

四、计算结果: 原位杂交切片在油镜下观察、计数某一种类型细胞银颗粒分布及数量。癌基因转录产物按下式用标记指数定量:

标记指数 = $\frac{\text{实验组银颗粒数/细胞}}{\text{对照组银颗粒数/细胞}}$, 标记指数

大于 1.5 即为阳性杂交。标记指数 1.5~2.5 定为 +, 标记指数 2.6~3.5 为 ++, 标记指数 > 3.5 为 +++。对照组的切片经 RNase 处理后作原位杂交, 其每个细胞银颗粒数的平均数作为本底。

将显微镜镜头对准杂交阳性区域, 在所要计数的细胞类型中 (如粘膜内癌细胞、粘膜增生的细胞、癌细胞或浸润入粘膜下的癌细胞) 随机地选取视野, 计数 250 个细胞中阳性细胞所占的百分比及每个阳性细胞中的银颗粒数后, 进行结果计算。为了便于定量分析, 我们

还规定: 标记率 = $\frac{250 \text{ 个细胞杂交阳性细胞数}}{250} \times 100\%$

平均标记率 = $\frac{\text{某种类型细胞标记率之和}}{\text{某种组织例数}} \times 100\%$

结 果

一、c-myc 癌基因在食管癌及癌旁组织的表达: 30 例食管癌组织与 c-myc 癌基因探针杂交 6 例阳性 (图 1), 阳性率 20% (表 1)。其标记率最高为 76.4%, 最低为 10%。癌细胞的平均标记率为 20.1%; 浸润的癌细胞平均标记率 55.6% (图 2), c-myc 的表达在浸润的癌细胞中的表达高于未浸润 (原位) 的癌细胞 (图 2, 表 2)。

c-myc 与 30 例癌旁组织的原位杂交, 7 例阳性 (图 3), 阳性率 23%, 其中 4 例增生细胞的平均标记率为 35.8%, 3 例重度增生细胞的平均标记率为 50.1% (表 3); 此结果表明: 在食管上皮细胞处于癌变前期, 即增生期时, c-

表 1 c-myc 和 HER-1 基因在食管癌和癌旁组织中的表达

细胞类型	c-myc	表达百分率 (%)	HER-1	表达百分率 (%)
正常	0/3	0	0/3	0
癌旁	7/30	23	1/25	4
癌	6/30	20	2/25	8

表 2 c-myc 基因在食管癌组织中的表达

细胞类型	c-myc 表达			标记率 (%)	平均标记率 (%)
	+	++	+++		
癌	18	6	32	22.4	20.1
癌	17	18	35	28	
癌	25	0	0	10	
癌 (浸润)	191	0	0	76.4	55.6
癌 (浸润)	50	17	85	60.8	
癌 (浸润)	19	25	30	29.6	

表 3 c-myc 在食管癌旁组织中的表达

细胞类型	c-myc 表达			标记率 (%)	平均标记率 (%)
	+	++	+++		
增生	19	35	15	27.6	35.8
增生	26	9	21	22.4	
增生	47	29	16	36.8	
增生	83	54	4	56.4	
重度增生	27	35	61	49.2	50.1
中度增生	59	28	38	50	
重度增生	33	22	73	51.2	

myc 癌基因已被激活, 其表达增高贯穿于整个癌变过程中, 它有可能是食管癌癌变的前提之一, 而不是细胞癌变的结果。

二、HER-1 基因在食管癌及癌旁组织中的表达: 25 例食管癌组织与 HER-1 基因探针杂交, 2 例显示阳性, 阳性率为 8%; 25 例癌旁组织中 1 例显示阳性杂交, 阳性率为 4% (表 1, 图 4)。正常食管粘膜组织没见到 HER-1 表达增高。

讨 论

一、c-myc 基因激活与癌变的因果关系: c-myc 癌基因的异常表达与癌变的因果关系一

直存在两种观点：其一认为 c-myc 表达增高是细胞癌变的结果。如 Beer 和 Pitot^[8] 等提出在致肝癌过程晚期观察到的 c-myc 表达的增高，不过是晚期的一种特征，它反映了细胞持续增生的结果。而另一些实验数据则表明：细胞生长速率和 c-myc 表达水平之间无任何联系^[9]。根据本文的结果，我们认为：食管癌变前增生的组织中即检测到 c-myc 表达的增高，且随细胞病变程度增高，c-myc 表达也有增高，并贯穿于癌变过程始终。提示：c-myc 癌基因的活化不是癌变的结果而可能是癌变的因素之一，并可能在不同的癌变阶段发挥着重要作用。

二、食管癌中 HER-1 基因的表达：根据癌基因致癌的假说，至少需要二个以上活化的癌基因协同作用才能使正常细胞发生恶性转化^[10]。HER-1 基因编码生长因子受体，这类基因的结构改变，如扩增导致表达增高，产生大量的生长因子或生长因子受体，从而增强有丝分裂，在癌瘤启动阶段的后期，这种机制使某些不正常的细胞获得不受机体控制而独立生长的能力^[11]。在本实验中，HER-1 在食管癌和癌旁组织中虽都发现有增高的表达，因频率较低，目前还不能确定它在食管癌发生发展过程中所起的作用。

(我院林培中教授为本文鉴定病理切片，特志谢)

(本文图 1~4 见插图第 9 页)

EXPRESSION OF C-MYC AND HER-1 GENES IN THE DEVELOPMENT OF HUMAN ESOPHAGEAL CANCER

Liang Yuan-Yuan, et al

Cancer Institute, CAMS, Beijing

To understand the possible role of oncogenes in the development of human esophageal cancer, the expression of c-myc and HER-1 genes was studied by in situ hybridization. The results showed that: (a) The c-myc and HER-1 protooncogenes were transcriptionally activated (b) Activation of c-myc gene was observed in hyperplastic cells and carcinoma cells. (c) The degree of pathological changes of the esophageal epithelium was related to the level of c-myc transcription, the highest level of c-myc expression was seen in invasive carcinoma cells. (d) Expression of HER-1 gene in carcinoma cells is higher than that in normal and adjacent non-tumor cells, but its frequency is lower than that of c-myc gene.

参 考 文 献

1. Hirai H, et al. A point mutation at codon 13 of the N-ras oncogene in myelodysplastic syndrome. *Nature* 1987; 327:430.
2. Seeger RC, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985; 313:1111.
3. Slamon DJ, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 325:117.
4. Dryja T, et al. Molecular detection of deletions involving band q14 of chromosome 13 in retinoblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:7391.
5. 陆士新, 等. 人食管癌组织中 H-ras, EGFR 和 c-myc 基因的表达与扩增. *中华肿瘤杂志* 1978; 9:98.
6. Shih-Hsin Lu, et al. Amplification of the EGF receptor and c-myc genes in human esophageal cancers. *Int J Cancer* 1988; 42:502.
7. Maniatis T, et al. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 1st ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
8. David GB, et al. Expression of H-ras and c-myc protooncogenes in isolated r-glutamyl transpeptidase-positive rat hepatocytes and in hepatocellular carcinomas induced by diethyl nitrosamine. *Cancer Res* 1986; 46:2435.
9. Cote, GJ, Chiu JF. The expression of oncogenes and liver-specific genes in Morris hepatomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 143:624.
10. Land H, et al. Tumorigenic conversion of primary embryofibroblasts requires at least two cooperation oncogenes. *Nature* 1983; 304:596.
11. Sporn MB, et al. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 1985; 313:745.

(1989年9月20日收稿 11月21日修回)

原发性及亚硝胺诱导的食管癌中 int-2基因的扩增

郭永军 陆士新 梁苑苑 何立珍 王 辉

摘要 用 Southern 杂交方法, 对林县 52 例原发性食管癌、18 例癌旁上皮、NMBzA 诱发的人胎儿食管鳞癌及 NMBzA 处理 24 小时~3 周的人胎儿食管上皮组织中 int-2 基因的存在情况进行了检测。结果发现, 23 例(44.2%)食管癌和 7 例(38.9%)癌旁上皮组织中有 int-2 基因的扩增, 其中各有 1 例重排。 X^2 检验, 癌及癌旁上皮组织中 int-2 基因的扩增频率与强度无显著性差异。NMBzA 体外处理人胎儿食管上皮 3 周, 可发现 int-2 基因的扩增, 这种扩增亦可见于 NMBzA 诱发的胎儿食管癌组织。上述结果表明, NMBzA 诱发的食管癌和 NMBzA 处理的食管上皮组织中, int-2 基因的扩增与原发性食管癌相似, 提示 NMBzA 可能直接作用于食管上皮组织中的 int-2 基因, 成为林县食管癌重要病因因素。

主题词 食管肿瘤/化学诱导 亚硝胺类 基因扩增 肿瘤基因

肿瘤发生是一个涉及原癌基因激活和抗癌基因失活等诸多遗传学改变的多步骤过程。原癌基因的激活方式可以是点突变所致蛋白功能的改变, 也可以是基因扩增和表达的增高, 二者均能导致细胞的生长失控。int-2 基因是在鼠基因组中发现的一个邻近于小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)插入位点的原癌基因, 通过插入突变激活, 目前已在许多常见的人类恶性肿瘤组织中发现 int-2 的扩增^[1]。食管癌在我国北方是一种常见病、多发病, 为研究 int-2 基因在食管癌发生中的作用, 我们检查了食管癌高发区河南林县的 52 例食管癌标本中 int-2 基因的存在情况, 并同时检查了当地环境中常见的 NMBzA 诱发的人胎儿食管上皮癌变过程中 int-2 基因的改变, 以探讨亚硝胺对食管癌的作用机理。

材料和方法

一、食管癌标本: 52 例原发性食管癌标本均来自河南林县外科手术切除之肿瘤组织, 同时收集了 18 例同组病人的癌旁非癌组织。

二、胎儿食管上皮的体外诱导: 人胎儿食管上皮(HFE)取自中期正常妊娠水囊引产胎

儿, HBsAg 阴性。上皮组织的分离和培养同参考文献[2]。实验组加 10 mmol/ml 的 NMBzA (本室合成, 纯度大于 99%), 对照组加 1% 的 DMSO(Merck 公司产品), 分别于处理后 24 小时、1 周和 3 周收取上皮组织块, -70℃ 保存。NMBzA 诱发的人胎儿食管上皮鳞癌组织取自本实验室^[3]。

三、DNA 提取和 Southern 杂交: 食管癌及其癌旁上皮和 NMBzA 诱发的食管鳞状上皮癌等组织, 按 Gattoni 等^[4]方法提取高分子量 DNA, 其光密度(OD)260/280 比值在 1.8~1.9 之间。上述样品的 10 μ g DNA, 分别用 EcoRI 与 BamHI 酶切, 然后按 Wahl 等^[5]法进行 Southern 杂交。

四、探针制备: int-2 基因探针(SS 6, 0.9 Kb 片段)由日本 JCRB 惠赠, 按 Maniatis^[6]方法制备。用 α -³²Pd CTP(Du PONT 公司产品)缺口翻译标记探针, 放射比活性约为 1×10^8 cpm/ μ g DNA。

结 果

一、原发性食管癌及癌旁上皮组织中 int-

本文作者单位: 100021 北京中国医学科学院肿瘤医院研究所

2 基因的扩增, 10 ug 高分子量 DNA 用限制性内切酶 *EcoRI* 消化后, 用 SS6 探针杂交, 在 10 Kb 片段处发现 44.2% (23/52) 的食管癌标本和 38.9% (7/18) 的癌旁上皮中有 *int-2* 基因的扩增(密度扫描仪检测, 与正常尸检食管上皮相比, 扩增均在 2 倍以上), 两组标本中均发现 1 例重排(图 1)。

用 *BamHI* 酶切, 杂交后显示一个限制性多态性片段, 纯合子显示单一的 8.4 Kb 带或显示 5.6 Kb 和 2.8 Kb 两条带; 杂合子则显示所有三条带或 8.4 Kb 和后两条带中的一条带。我们在

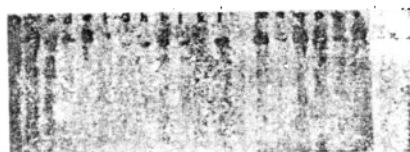


图 1 *int-2* 探针 Southern 杂交, *EcoRI* 酶切。a~l 为原发性食管癌标本, a、b、h、i、l 示扩增, e 示重排; m~q 为癌旁组织, m、o 示扩增; r 为正常尸检食管标本



图 2 *int-2* 探针 Southern 杂交, *BamHI* 酶切。a~m 为原发性食管癌标本; c、g、h、i、m、n 示扩增; o~s 为癌旁组织, p、q 示扩增; t 为正常尸检食管标本

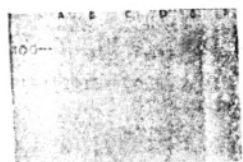


图 3 *int-2* 探针 Southern 杂交结果, *EcoRI* 酶切。A 为 DMSO 对照组 DNA, B 为正常 HFE, C、D、E 分别为 NMBzA 作用 24 小时、1 周、3 周的 HFE, F 为 NMBzA 诱导的胎儿食管癌



图 4 *int-2* 探针 Southern 杂交, *BamHI* 酶切。A~F 编号同图 3

52 例食管癌标本中, 发现 8 例杂合子扩增和 13 例纯合子扩增(图 2)。

二、NMBzA 诱导的 HFE 及胎儿食管鳞状上皮癌组织中 *int-2* 基因的扩增: 我们发现 *int-2* 基因的扩增存在于 NMBzA 诱导的胎儿食管鳞状上皮癌组织及 NMBzA 体外处理 3 周的 HFE 中, 而 NMBzA 处理 24 小时和 1 周的 HFE 及 DMSO 对照组中, 均无 *int-2* 基因的扩增(图 3, 4)。

讨 论

int-2 基因属于纤维母细胞生长因子(FGF)基因家族, 与 *hst-1* 基因在染色体上同处于一个相同的扩增单位, 均定位于 11q13, 其扩增或与 *hst-1* 基因的共扩增已见于许多人类恶性肿瘤^[7]。我们在 52 例食管癌标本中发现 23 例有 *int-2* 基因的扩增, 表明 *int-2* 基因的扩增在食管癌中是一种常见的遗传学改变。Tsumi^[8]和 Tsuda 等^[9]分别在 60% (3/5) 和 52% (10/36) 的食管鳞癌标本中, 发现 *int-2* 和 *hst-1* 基因的共扩增, 而且这种共扩增与肿瘤的恶性程度(原发肿瘤 47%, 转移瘤 100%)、病人性别(男多于女, $P < 0.05$) 以及临床分期有着潜在的相关倾向。最近, Katagawa 等^[10]也在食管鳞癌标本中发现有 *int-2* 和 *hst-1* 基因共扩增者, 其存活率比无扩增者要低 ($P < 0.001$), 而且前者的远处器官转移率也高于后者。这些结果提示, *int-2* 和 *hst-1* 基因的扩增可能参与了食管癌的发生和发展, 特别是转移。

我们在同组病人的 18 例癌旁上皮中发现 7 例 (38.9%) 有 *int-2* 基因的扩增(与癌组织相比, χ^2 检验, 两组间差异无显著性意义)。提示 *int-2* 基因的扩增在食管癌的发生中可能是一个相对早期的遗传学改变, 并持续存在于扩增后的整个肿瘤形成过程, 对肿瘤进展特别是转移起着一定的促进作用。

以往的大量研究表明, 林县环境中高水平的亚硝胺类化合物的存在是其致病因素之一。我们在 NMBzA 体外处理 3 周的 HFE 及胎儿食管上皮鳞癌组织中发现 *int-2* 基因的扩增, 表明 *int-2* 基因的扩增与 NMBzA 诱导的食管

癌发生直接相关,而且这种改变发生于肿瘤形成的相对早期,可能是一种促进期和进展期的改变,这与在原发性食管癌及其癌旁上皮中的发现相吻合,从而更进一步验证了int-2基因扩增在食管癌的发生中的可能作用。我们的结果为食管癌的亚硝胺病因在分子水平上提供了更进一步的理论依据。

(日本ICRB Dr. Hashimoto 惠赠int-2探针,特志谢)

参 考 文 献

1. Proctor AJ, et al. Amplification of chromosome 11q13 in transitional cell tumors of the bladder. *Oncogene*, 1991, 6:789.
2. 郭永军,等. P 53蛋白在原发性及亚硝胺诱导的食管癌中的高表达. *中华肿瘤杂志*, 1992, 14(4):241.
3. 陆士新,等. N-甲基-N-苄基亚硝胺诱发人胎儿食管上皮癌. *中华肿瘤杂志*, 1989, 11(6):401.
4. Gattoni S, et al. Cellular moloney murine sarcoma

(c-mos) sequences are hypermethylated and transcriptionally silent in normal and transformed rodent cells. *Mol Cell Biol*, 1982, 2:42.

5. Wahl GM, et al. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76:3683.
6. Maniatis T, et al. Molecular cloning -A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, :93
7. Yoshida MC, et al. Human HST1 (HSTF1) gene maps to chromosome band 11q13 and coamplifies with the int-2 gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85:4861.
8. Tsutsumi M, et al. Coamplification of hst-1 and int-2 genes in human cancer. *Jpn J Cancer Res*, 1988,79:428.
9. Tsuda T, et al. High incidence of coamplification of hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinomas. *Cancer Res*, 1989, 49:5505.
10. Katagawa Y, et al. Significance of int-2/hst-1 coamplification as a prognostic factor in patients with esophageal squamous carcinoma. *Cancer Res*, 1991, 51:1504.

(收稿, 1992-07-01 修回, 1992-09-28)

AMPLIFICATION OF int-2 GENE IN PRIMARY ESOPHAGEAL CARCINOMA AND FETAL ESOPHAGEAL CARCINOMA INDUCED BY N-METHYL-N-BENZYLNITROSAMINE (NMBzA)

Guo Yong-Jun, et al

Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021

Amplification of int-2 gene in primary esophageal carcinomas and adjacent tissues, fetal esophageal carcinoma induced by NMBzA and in fetal esophageal epithelium treated with NMBzA was detected. Amplification of int-2 gene was observed in 23 of 52 esophageal carcinoma (44.2%), 7 of 18 adjacent tissues (38.9%). We also found that the amplification of int-2 in fetal esophageal carcinoma induced by NMBzA and in fetal esophageal epithelium treated with NMBzA for 1 month. These results demonstrate that NMBzA activates possibly the int-2 in human esophageal epithelium to induced the esophageal carcinoma, indicating that the NMBzA may play an important role in the development of esophageal cancer.