

66 例肠癌中 P₅₃基因异常、BAX 基因突变与化疗敏感性关系

翟晓波 林晓敏 顾海晴 陈志东 沈炜明(上海 200233 上海市第六人民医院药剂科)

1 材料和方法

1.1 肿瘤标本、手术切除的肠癌原发灶或转移灶新鲜标本共 66 例。

1.2 抗癌药物:所有药物用生理盐水溶解成工作液, -20℃保存。药物终浓度分别为(1)丝裂霉素(MMC) 10mg/L;(2)环磷酰胺(CTX) 300mg/L;(3)卡铂(CBDCA)50mg/L;(4)更生霉素(DTC)0.8mg/L;(5)甲氨喋呤(MTX)10mg/L;(6)阿糖胞苷(Ara - C)250mg/L;(7)长春新碱(VCR)10mg/L;(8)鬼臼乙叉甙(VP - 16)100mg/L;(9)5 - 氟尿嘧啶(5 - Fu)100mg/L;(10)柔红霉素(DNR)4mg/L;(11)表阿霉素(EDR)50mg/L;(12)阿霉素(DXR)10mg/L;(13)氮芥(HN₂)10mg/L;(14)平阳霉素(BLM)30mg/L;(15)鬼臼噻吩甙(VM - 26)100mg/L;(16)阿克拉霉素(ACM)4mg/L;(17)顺氯氨铂(DDP)100mg/L^[1]。

1.3 方法:将同一肠癌标本经病理学检查明确诊断后分成 2 份,一份用 RPMI₁₆₄₀培养液制成一定浓度的癌细胞悬液,加入 96 孔培养板中,设空白、对照、用药 3 组,用药组加入抗癌药工作液,对照组不加抗癌药,空白组只加培养液。37℃,5% CO₂ 培养 72 ~ 96h 后 MTT 显色,微量盘读数仪 570nm 波长处读出各孔光密度(OD)值。抗癌药抑制率 = $\frac{1 - OD_{用药组}}{OD_{对照组}} \times 100\%$ 。另一份肠癌标本提取 DNA,方法见文献[2]。用聚合酶链反应(PCR)扩增 P₅₃基因第 5 ~ 8 外显子和包含(G)₈段的 BAX 基因。P₅₃基因 4 对引物由中科院上海细胞所合成,反应条件为 94℃ 10min,94℃ 40s,60℃ 30s,70℃ 45s,30 个循环,70℃ 延伸 5min。BAX 基因引物由美国赛百盛生物工程公司合成,反应条件为 95℃ 3min,94℃ 40s,55℃ 30s,72℃ 45s,30 个循环。引物序列及扩增片段大小见表 1。将 PCR 产物热变性后骤冷,予聚丙烯酰胺凝胶电泳,用银染法染色。

2 结果

66 例肠癌中,有 29 例存在 P₅₃基因突变、缺失,占 43.9%,有 14 例存在 BAX 基因突变,占 21.2%,反映 P₅₃基因、BAX 基因突变,见表 2。P₅₃基因、BAX 基因正常组共 25 例,P₅₃基因异常、BAX 基因正常组共 27 例。P₅₃基因正常、BAX 基因突变组共 12 例。与 P₅₃基因、BAX 基因正常组比较,其余两组抗癌药抑制率较小,其

表 1 P₅₃基因、BAX 基因引物序列及扩增片段大小

P ₅₃ 基因 外显子	引物序列	片段大小
5	5' - TACTCCGCTGCCCTCAACAAGA - 3' 5' - ATCGCTATCTGAGCAGCGCTCATG - 3'	181bp
6	5' - GATGCTCTTAGGTCTGGCCCTCTCAGC - 3' 5' - AACAGACCTCAGGCGGCTCATAGG - 3'	132bp
7	5' - CTAGCTTGCTCTGACTGTACCACCATCC - 3' 5' - TCCTGACCTGGAGTCTTCCAGTGTG - 3'	119bp
8	5' - GTAGTGTAATCTACTGGGACGGAACAGC - 3; 5' - TACCTCGCTTAGTCTCCTCGGGCC - 3'	143bp
BAX 基因	5' - ATCCAGGATCGAGCAGCGCC - 3' 5' - ACTCGCTCAGCTCTGTGTG - 3'	94bp

中 P₅₃基因异常、BAX 基因正常组有丝裂霉素、卡铂、甲氨喋呤、阿糖胞甙、鬼臼乙叉甙、5 - 氟尿嘧啶、柔红霉素、表阿霉素、阿霉素、氮芥、鬼臼噻吩甙、阿克拉霉素与正常组比较存在显著差异,对 P₅₃基因正常、BAX 基因突变组,则有丝裂霉素、甲氨喋呤、阿糖胞苷、鬼臼乙叉甙、5 - 氟尿嘧啶、柔红霉素、表阿霉素、氮芥、平阳霉素、阿克拉霉素、顺氯氨铂存在显著差异。将 P₅₃基因异常、BAX 基因正常组与 P₅₃基因正常、BAX 基因突变组进行比较,除柔红霉素抑制率前者显著大于后者外,余无显著差异。另外还有 2 例同时存在 P₅₃基因异常和 BAX 基因突变,因病例数很少未做统计。

表 2 肠癌中 P₅₃基因异常、BAX 基因突变与抗癌药抑制率(%)关系

抗癌药	P ₅₃ 基因正常、 BAX 基因 正常组(25 例)	P ₅₃ 基因异常、 BAX 基因 正常组(27 例)	P ₅₃ 基因正常、 BAX 基因 突变组(12 例)
MMC	57.1 ± 37.7	37.5 ± 29.1* ¹	29.1 ± 26.2* ¹
CTX	12.5 ± 13.1	7.5 ± 9.7	12.8 ± 11.7
CBDCA	41.8 ± 32.2	19.6 ± 17.6* ²	28.5 ± 21.1
DTC	16.5 ± 17.1	12.0 ± 14.0	13.7 ± 12.3
MTX	19.6 ± 16.2	7.1 ± 9.6* ²	6.4 ± 8.2* ¹
Ara - c	23.3 ± 20.9	12.5 ± 13.7* ¹	8.8 ± 9.6* ¹
VCR	9.5 ± 10.8	8.4 ± 9.5	11.8 ± 12.8
VP - 16	21.2 ± 19.6	11.4 ± 12.0* ¹	8.3 ± 9.4* ¹
5 - Fu	47.4 ± 34.7	23.1 ± 19.3* ²	22.2 ± 20.7* ¹
DNR	30.5 ± 27.6	12.1 ± 12.8* ²	2.3 ± 3.8* ²
EDR	36.1 ± 29.7	15.0 ± 14.3* ²	11.1 ± 13.4* ²
DXR	27.3 ± 23.8	11.2 ± 12.4* ²	14.5 ± 10.1
HN ₂	26.0 ± 23.2	10.2 ± 12.5* ²	8.7 ± 10.3* ¹
BLM	61.4 ± 36.1	43.0 ± 36.5	31.9 ± 21.5* ¹
VM - 26	19.1 ± 20.8	9.4 ± 11.8* ¹	16.9 ± 17.5
ACM	22.9 ± 21.6	11.0 ± 14.1* ¹	9.3 ± 9.5* ¹
DDP	51.8 ± 30.0	42.9 ± 35.5	26.2 ± 25.6* ¹

注: *¹P < 0.05; *²P < 0.01

3 讨论

在分子水平上探讨抗癌药耐药机制是近年来提出的新课题,目前国内外此方面报道较少。Iwadate 证实当恶性胶质瘤细胞中存在 P_{53} 基因突变或缺失时,抗癌药耐药性增加。Paola P 的研究结果显示对顺氯氨铂耐药的卵巢癌细胞株的 BAX mRNA 水平下降,为深入研究 P_{53} 基因、BAX 基因与抗癌药耐药性之间的关系,我们用聚合酶链反应-单链构象多态性分析法检测 P_{53} 基因、BAX 基因突变,此方法检测结果与 DNA 测序高度符合,我们用 MTT 法测肿瘤药敏,此方法有快速、简便、成功率、准确性高的优点。我们的实验结果证实了当肠癌中存在 P_{53} 基因异常或 BAX 基因突变时,抗癌药

耐药性增加,并且此两种基因对抗癌药耐药性的影响程度基本相同。这为设想今后在耐抗癌药肠癌细胞中同时植入野生型 P_{53} 基因和 BAX 基因以提高化疗疗效提供了实验基础。

参考文献

- 1 翟晓波,李炳生,张毅,等.MTT 法和双琼脂 MTT 法测肿瘤药敏及其临床应用.中国临床药理学杂志,1996,5(3):102.
- 2 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 1988, 16(1):1215.

收稿日期:1998-04-21