

# 苯作业工人白细胞Ki-ras癌基因点突变分子检测初探

夏昭林<sup>1</sup> 金锡鹏<sup>1</sup> 袁弥满<sup>2</sup> 陆培康<sup>1</sup> 顾学箕<sup>1</sup>

**提 要** 本文应用PCR技术和寡核苷酸探针检测苯作业工人外周血白细胞中 Ki-ras 癌基因第12位密码子点突变。41名接触苯工人和41名对照工人中只有1例接触苯工人发生 GGT→TGT(Gly→Cys)突变,该女工苯作业工龄6年,连续三次(均间隔三个月)白细胞计数均呈低下状态,但其他血液学指标未见明显异常。初步探讨了Ki-ras基因点突变检测作为苯白血病的生物标志和职业人群早期监护指标的可能性。

**关键词** 苯接触 Ki-ras癌基因 PCR扩增 寡核苷酸探针 点突变

人类ras基因包括Ha-Yas,Ki-ras和N-ras三个成员,但三者的基因结构大致相同,均有4个内含子,碱基序列长约30kb<sup>[1]</sup>。ras基因可通过点突变和过度表达两种途径激活,但更常见于点突变,主要发生在第12,13,61位密码子上,尤以12位多见<sup>[2,3]</sup>。已有报道 Ki-ras 基因在重度吸烟者的肺腺癌<sup>[4]</sup>,ras癌基因家族和其他癌基因在白血病<sup>[5,6]</sup>均有较高的点突变率。在苯作业工人中检测Ki-ras基因点突变的报道尚少。本文应用 PCR 技术和寡核苷酸探针检测41名在乡镇工业工作的苯作业工人和41名针织工人白细胞Ki-ras基因第12位密码子的点突变,并结合多次白细胞计数和血液学检查资料进行了分析,探讨Ki-ras基因点突变作为职业性致癌物的生物标志和特定职业人群早期监护的可能性。

引物 1(PKA-I1) 5'GACTGAATATAAACTTGTGG 3'

引物 2(PKB-I2) 5'CTATTGTTGGATCATATTTCG 3'

探针 1. 5'GTTGGAGCTGGTGGCGTAG 3' Gly(GGT)

2. 5'GTTGGAGCTAGTGGCGTAG 3' Ser(AGT)

3. 5'GTTGGAGCTTGTGGCGTAG 3' Cys(TGT)

探针: 1 为野生型(正常) 2,3为12位密码子突变型

按上述序列合成正副链引物一对,三种探针,由中科院上海细胞生物所用 DNA合成仪合成,并经高效液相层析纯化。

## 1.3 PCR DNA扩增

## 1 材料和方法

### 1.1 对象

调查对象是上海某郊县的乡镇工业中的苯作业工人,全部是女性;对照为具有可比性的女性针织工人,基本情况见下表。无菌操作抽取静脉血5ml,分离白细胞,常规提取DNA,并经1%琼脂糖凝胶电泳证实后用于PCR(Polymerase Chain Reaction)扩增。

苯暴露人群和对照人群的基本情况

| 厂号 | 人数 | 年龄(岁)    | 工龄(年)   | 现场空气苯测定结果(mg/m <sup>3</sup> ) |     |
|----|----|----------|---------|-------------------------------|-----|
|    |    |          |         | X                             | S   |
| 1  | 13 | 36.2±3.9 | 7.3±2.4 | 17.0                          | 2.3 |
| 2  | 28 | 35.2±5.6 | 6.0±3.4 | 80.9                          | 2.1 |
| 3  | 41 | 39.6±8.9 | 9.4±4.7 |                               |     |

### 1.2 引物及探针合成

用XLP-100A型DNA扩增仪按华美公司PCR试剂盒说明书进行。在50μl反应体系中含

1. 上海医科大学公共卫生学院(200032)

2. 上海医科大学中山医院

引物3 $\mu$ l, 4 $\times$ dNTP 5 $\mu$ l, 模版 DNA 即样品白细胞 DNA 2 $\mu$ l, 10 $\times$ 缓冲液5 $\mu$ l, 消毒双蒸水35 $\mu$ l, 内含Taq聚合酶2U。PCR循环35~40周期(94 $^{\circ}$ C变性, 55 $^{\circ}$ C退火, 72 $^{\circ}$ C延伸各1分钟, 首次98 $^{\circ}$ C变性10分钟), 取5 $\mu$ l扩增液用1.7%琼脂糖凝胶电泳证实。

#### 1.4 样品DNA扩增液点膜

取扩增液10 $\mu$ l, 点于经预处理的醋酸纤维素膜上一式三份, 各加变性液 100 $\mu$ l, 晾干后80 $^{\circ}$ C烘烤 2小时备用。

#### 1.5 Ki-ras寡聚核苷酸探针 5'末端标记与纯化

分别取上述三种各2 $\mu$ l, 10 $\times$ T<sub>4</sub>激酶缓冲液2 $\mu$ l, T<sub>4</sub>激酶2U、<sup>32</sup>P-ATP5 $\mu$ l、重蒸水11 $\mu$ l, 混匀后37 $^{\circ}$ C保温反应70分钟, 经Sephadex G-50过柱, TE 缓冲液洗脱, 分管收集过柱液, 测量各管的放射性, 以第一放射峰所在管(5、6管)过柱液作为杂交探针。

#### 1.6 点杂交

上述膜先在预杂交液中42 $^{\circ}$ C下预杂交6小时, 之后分别加入上述已标记的探针, 在杂交液中42 $^{\circ}$ C杂交36小时, 经漂洗晾干夹于X光胶片中间, 压片6天, 曝光、印片。

## 2 结果

### 2.1 外周血白细胞高分子DNA

各白细胞样品的 DNA 提取物在1%琼脂糖凝胶电泳中均显示明显的高分子 DNA 电泳带(见封三图1), 说明白细胞样品 DNA 提取达到要求。

### 2.2 白细胞DNA Ki-ras 基因扩增

引物PKA-I<sub>1</sub>为Ki-ras 基因第一外显子之启动子AT后的互补序列, PKB-I<sub>1</sub>为Ki-ras基因第30个位点GA以后的互补序列, 所扩增的目的基因片断为108bp大小, 经35~40轮PCR扩增, 目的基因被扩增了上百万倍。3%琼脂糖凝胶电泳结果显示, 扩增样品均出现了明显扩增带, 且其位置均大致在108bp 区域(见封三图2), 说明Ki-ras基因片断的PCR扩增达到要求。

### 2.3 扩增产物的Ki-ras探针杂交

杂交结果表明野生型探针Ki-ras Gly均呈

明显显影, 说明样品中Ki-ras基因片断扩增良好。Ki-ras Ser 探针杂交均呈阴性结果, 而Ki-ras Cys 探针杂交有一例显影(见封三图3), 是暴露组中的第34号, 其余均阴性。在苯作业工人中有一例在Ki-ras基因第12位点发生G $\rightarrow$ T突变, 而对照工人中无一发生突变。但经精确概率法统计处理, 无显著意义。经查该阳性者是2号工厂的苯作业工人, 34岁, 接苯工龄6年, 连续三次(均间隔三个月)外周血白细胞计数均呈低下状态(4.5, 3.0, 3.7 $\times 10^9$ /L), 有发生白血病的可能性, 应予以重点监护和进一步观察; 但其他血液学指标未见异常。

## 3 讨论

癌基因是一组重要的细胞基因, 具有调节细胞分化、生长和发育的功能, 但异常的激活、表达与肿瘤的发生发展有关<sup>(6)</sup>, 这是近年肿瘤分子生物学研究中的重要进展之一。

迄今, 已有足够的实验证据说明癌基因和肿瘤发生的关系。化学、物理和生物学因素通过引致机体细胞的点突变(碱基变换)、DNA重排、外源性基因插入等方式激活癌基因, 引起肿瘤的发生<sup>(7)</sup>。有资料表明ras癌基因和Myc癌基因在肿瘤的发生发展过程中起重要作用<sup>(8)</sup>。已有人证实激活的yas基因可转化NIH/3T3细胞成为肿瘤细胞<sup>(9)</sup>。ras癌基因突变时, 会使其编码的 P<sub>21</sub>蛋白的GTP酶活性降低, 进一步影响跨膜信息的传导而使细胞生长增殖异常, 从而发展为肿瘤。研究表明, ras 基因突变的脆性位点是第一外显子第12、13位点和第二外显子第61位点, 许多化学致癌剂所致肿瘤就是通过引起ras基因突变而诱发的<sup>(10~12)</sup>。

本研究中, 41名慢性苯接触者中有1例白细胞 Ki-ras 基因12位点发生G $\rightarrow$ T突变, 虽与对照组无显著统计学差异, 这可能与样本小有关, 尚无理由认为Ki-ras基因点突变与苯接触无关。ras 基因是人急性白血病的相关癌基因<sup>(5,6)</sup>, 一般说来, 癌基因的激活引起的肿瘤往往并非单一癌基因的激活, 常是2种及以上癌基因突变的协同作用<sup>(7,10,11)</sup>, 本研究同时进

行 Ha-ras和Myc 基因突变的分子检测未获阳性结果(资料未出示)。所以如要证实癌基因激活与苯白血病的相关关系,尚需检测更大样本的苯接触人群和更多的白血相关癌基因。然而由于机体的自我监视功能及抑癌基因的拮抗作用<sup>(7)</sup>,即便是Ki-ras 癌基因突变,也不一定发生白血,但Ki-ras基因点突变作为一种生物标志在职业性苯接触者可作为早期重点监护和观察指标仍有一定意义,癌基因突变表达的分子检测作为一种生物标志为职业性肿瘤的分子流行病学评价提供了一种新方法。

#### 4 小结

应用 PCR 技术和寡聚核苷酸探针检测苯作业工人外周血白细胞中Ki-ras癌基因第12位密码子点突变,结果41名接苯工人有一例发生GGT→TGT(Gly→Cys)突变,对照组无一发生突变。初步探讨了Ki-ras基因点突变检测作为苯白血病的生物标志和职业人群早期监护指标的意义。

(感谢同济医科大学博士研究生夏俊杰、湖北医学院病毒所分子生物室丁晓华同志的协助和支持。)

#### 5 参考文献

- 1 Boss, J. I, et al. Ras oncogene in human cancer; a review Cancer Res. 1989;49:4682

- 2 George D L, et al. Enhanced C-Kii-ras expression associated with French virus integration in a bone marrow-derived mouse cell line. Proc. Natl. Acad. Sci(USA)1986,83:1651
- 3 Pulciani S, et al. Oncogene in solid human tumours Nature 1982, 300:539
- 4 Paul, W. Brandt- rauf. Oncogene proteins as boimarkers in the molecular epidemiology of occupational carcinogenesis. Int Arch Occup Environ Health 1991,63(1):1
- 5 Boss, J. I, et al. Mutations in N- ras predominant in acute myeloid leukemia Blood 1987; 69:1237
- 6 Butturini, A, et al. Oncogenes and human leukemias. Int. J. Cell Cloning 1988,6: 2
- 7 蔡良琰,主编.基因工程技术在基础医学与临床医学中的应用.人民卫生出版社.P60-68,1990.
- 8 Bisop, J. M. et al. The molecular genetics of cancer. Soienoes 1987;235:305
- 9 Shih, C. et al. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts Nature 1981;290:261
- 10 Anderson, M. W. et al. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis Environ Health Perspect. 1992;98:13
- 11 Hamm, R. D. Occupational cancer in oncogene year. Br. J. Ind. Med. 1990, 47:217
- 12 Harris, C. C. Chemical and physical carcinogenesis advances and perspectives for the 1990's. Cancer Res. 1990; 51:5023s

## 58例尘肺结核的胸部X线分析

铁岭市职业病防治所 (112000) 许鸿斌

58例尘肺病患者均为男性,其中年龄最大为70岁,最小为40岁。接尘工龄10~20年者23例,21~30年者25例,30年以上10例。岩工20例,占34.4%,运搬工13例占22.4%,其余为焊工、铸工、管工等。

在X线胸片上主要表现为单侧或双侧出现不规则片状影、团块状、云雾状致密影及结核球。单侧或双侧出现不规则影者40例占68.9%;团块状影9例占15.5%;云雾状致密影7例占12.1%,结核球2例占3.5%。动态分析认为有融合灶突然变化迅速,且密

度不均匀,边缘模糊。尘肺病变部位出现小透亮区或大块融合灶出现空洞,周围有卫星灶,结节轮廓模糊,肺纤维化,胸膜增厚,应考虑是否有结核存在。

结核灶在中上肺野53例占91.4%,下肺野5例占8.6%;右侧为37例占63.8%,左侧21例占36.2%。

已患尘肺,尤其是矽肺病人容易并发结核。矽肺与结核两种病,互相促进使病情进展加快,是造成病人死亡的一个重要原因。因此要加强尘肺结核病的预防工作。

## Abstracts of Original Articles

### Molecular Monitoring of Point Mutations of Ki-ras Oncogene in White Blood Cells of Benzene Workers

Xia Zhaolin, et al

Activation of ki-ras oncogene in WBC by point mutation at codon 12 was detected by Polymerase Chain Reaction (PCR) using specific oligonucleotide probe. Only one case among 41 workers exposed to benzene was found to have point mutation from GGT to TGT (Gly to Cys). This worker has exposed to benzene for 6 years and her WBC counts in peripheral blood were lower than  $4.5 \times 10^9/L$  in all three successive examinations. It is suggested that this worker has a possibility of suffering from leukemia. It is also supposed that point mutation of Ki-ras oncogene in WBC may be used as a biomarker of leukemia induced by benzene and may be employed as a early surveillance indicator among occupational benzene exposed population.

Key words: benzene exposure, Ki-ras oncogene, oligonucleotide, PCR

### Alterations of the Levels of LDH, ALP, TC, TG and PL in Bronchoalveolar Lavage Fluid and Serum in Acute Lung Injured Rats

Liu Hong, et al

Acute lung injury (ALI) of rats was induced by injection of oleic acid. After injection, the levels of lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and phospholipid (PL) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and serum were periodically quantified. The results showed that the levels of LDH, ALP,

TC and PL in BALF were increased, the level of LDH in BALF even increased to 6.7-folds of the control at 0.5 hour after injection ( $P < 0.001$ ). Serum LDH level increased to 2-folds of control at 0.5 hour after injection ( $P < 0.01$ ). TG in BALF and serum of rats with ALI were decreased compared with the control. It was suggested that the increase of LDH with the abnormalities of lipids (TC, TG and PL) in BALF and serum may be served as a early specific combined parameter for the diagnosis of ALI.

Key words: LDH, ALP, TC, PL, TG

### Effects of Experimental High Temperature on Acute Phase Response Protein

Wu Yang, et al

12 male volunteers did a mimic work of moderate-intensity at  $T_{db} 39^\circ C \pm 1^\circ C$ , Rh 20% for 3 hours in an artificial climate chamber. Pulse rate, oral temperature, perspiration amount were measured and the subjective feeling were inquired before work, at the given time during the work and after the work. Before and after work, venous blood was taken to determine acute phase response protein (APRPs). During work, pulse rate increased from the first exercise and oral temperature went up after the second exercise but never exceed  $38^\circ C$ .  $\alpha$ -AT,  $\alpha$ -AG, Hp, Cp, and Fn significantly increased at 3 hours after heat exercise, except that Tr decreased slightly. The results suggested that some indices of APRPs might be of diagnostic significance for heat injury or heat-stroke, but their specificity should be further investigated in the future.

Key words: high temperature, acute phase response proteins