

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.05.014

K-Ras 和 *P53* 基因突变与子宫肌瘤发生和术后复发的关系

刘蓉, 秦嶽 (西宁市第一人民医院 妇科, 青海 西宁 810000)

[摘要] **目的:**探讨 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变与子宫肌瘤发生和术后 3 年累积复发率的关系。**方法:**选取西宁市第一人民医院 2008 年 6 月至 2010 年 6 月收治的行子宫肌瘤剔除术的 56 例子宫肌瘤患者,分别取患者子宫肌瘤组织和正常子宫肌层组织,采用聚合酶链式反应-单链构象多态性分析 (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis, PCR-SSCP) 和基因测序方法进行 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变的分析,并对 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变子宫肌瘤患者术后 3 年累积复发率进行比较。**结果:**子宫肌瘤患者 *K-Ras* 基因突变以外显子 1 和 2 为主,*P53* 基因突变以外显子 7 和 8 为主。与正常子宫肌层组织相比,子宫肌瘤组织 *K-Ras* 和 *P53* 基因单突变率以及双突变率均明显增加 (73.21% vs 7.14%, 83.93% vs 10.71%, 32.14% vs 1.79%; 均 $P < 0.05$)。 *K-Ras*、*P53* 单突变子宫肌瘤患者术后 3 年累积复发率分别为 14.28% (6/42) 和 8.51% (4/47), 双突变患者术后 3 年累积复发率为 66.67% (12/18); 双突变患者术后 3 年累积复发率明显高于单突变患者 ($P < 0.05$)。**结论:***K-Ras* 和 *P53* 基因突变可能是子宫肌瘤发生和术后复发的主要原因之一,可作为临床诊断和预后判断的指标。

[关键词] 子宫肌瘤; *K-Ras*; *P53*; 基因突变; 术后复发

[中图分类号] R737.33; R730.2; R730.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)05-0586-04

Relationship of *K-Ras* and *P53* gene mutations with development and postoperative recurrence of hysteromyoma

Liu Rong, Qin Yue (Department of Gynecology, First People's Hospital of Xining, Xining 810000, Qinghai, China)

[Abstract] **Objective:**To explore the relationship of *K-Ras* and *P53* gene mutation with development and postoperative recurrence of hysteromyoma. **Methods:** Fifty-six patients with hysteromyoma undergoing myomectomy were selected from First People Hospital of Xining during June 2008 to June 2010. The hysteromyoma tissues and normal uterus tissues were obtained from patients. *K-Ras* and *P53* gene mutations were analyzed by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP) and gene sequencing. The postoperative recurrence rate after uterine fibroid surgery in patients with *K-Ras* and *P53* gene mutation was analyzed. **Results:** *K-Ras* gene mutation was focused on exon 1 and 2. *P53* gene mutation was focused on exon 7 and 8. The mutation rate of *K-Ras* and *P53* and the double mutation rate in the hysteromyoma tissues were significantly increased when compared with those in the normal uterus tissues (73.21% vs 7.14%, 83.93% vs 10.71%, 32.14% vs 1.79%, $P < 0.05$). Postoperative 3-year cumulative recurrence rates were 14.28% (6/42) and 8.51% (4/47) in the hysteromyoma patients with *K-Ras* or *P53* mutation. Postoperative 3-year cumulative recurrence rate in the patients with double mutation was 66.67% (12/18), which was significantly higher than that in patients with single mutation ($P < 0.05$). **Conclusion:** *K-Ras* and *P53* gene mutations may be one of the main reasons leading to the occurrence and postoperative recurrence of hysteromyoma, which can be indicators for clinical diagnosis and prognosis.

[Key words] hysteromyoma; *K-Ras*; *P53*; gene mutation; postoperative recurrence

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(5): 586-589]

[基金项目] 青海省科研基金资助项目 (No. 963211Y0141)。Project supported by the Scientific Research Foundation of Qinghai Province (No. 963211Y0141)

[作者简介] 刘蓉 (1971 -), 女, 山西省榆次市人, 主治医师, 主要从事妇产科疾病临床及基础方面的研究。E-mail: sslgwg@163.com

[通信作者] 秦嶽 (Qin Yue, corresponding author), E-mail: guilincz@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130930.1549.002.html>

子宫肌瘤是女性生殖系统常见的肿瘤类型之一,发病率为 20% ~ 25%,严重影响了女性的生理和心理健康^[1-2]。手术是子宫肌瘤常用的手术治疗方法,尽管子宫肌瘤剔除手术可保留患者生育能力和器官的完整性,但是术后仍然存在复发的危险,研究^[3-4]显示,子宫肌瘤剔除术后的 3 年累积复发率为 20% ~ 62%。*K-Ras* 和 *P53* 基因突变普遍存在于许多肿瘤发生和术后复发过程中,如结直肠癌、宫颈癌和胃癌等^[5-7],关于其在子宫肌瘤发生和术后复发中的作用尚无报道。本研究采用聚合酶链式反应-单链构象多态性分析(polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis, PCR-SSCP)和基因测序分析了 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变与子宫肌瘤发生和术后复发率的关系,旨在为子宫肌瘤临床诊断和预后判断提供依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取 2008 年 6 月到 2010 年 6 月西宁市第一人民医院妇科收治的子宫肌瘤行手术治疗患者 56 例。所有患者术前均经病理学确诊,所有患者均签署知情同意书。患者年龄 23 ~ 43 岁,平均年龄(34.2 ± 8.6)岁;其中月经改变者 25 例,下腹部包块者 15

例,无临床症状、B 超检查时发现者 16 例;行腹腔镜肌瘤剔除术者 27 例,经腹肌瘤剔除术者 29 例。56 例患者术后随访 1 ~ 3 年,平均随访(2.4 ± 1.0)年,其中 22 例术后出现 3 年累积复发率。所有子宫肌瘤组织和正常子宫肌层组织均在术中获得,并保存于 -80℃ 用于 DNA 提取。

1.2 PCR-SSCP 分析子宫肌瘤组织中 *P53* 与 *K-Ras* 基因的突变

取患者子宫肌瘤组织和正常子宫肌层组织 0.1 g,置于 1.5 ml 离心管中,加入 200 μl 5% 的 Chelex-100 和 5 μl 5 mg/ml 的蛋白酶 K,55℃ 水浴消化 12 h,取出振荡,100℃ 孵育 8 min 后振荡,离心取上清。采用 PCR 法扩增 *K-Ras* 基因,合成的引物见表 1,以提取的 DNA 为模板扩增 *K-Ras* 外显子 1、2、3。PCR 反应体系:5 × PrimeSTAR[®] Buffer(Mg²⁺) 10 μl,dNTP(2.5 mmol/L)4 μl,上游引物 1 μl,下游引物 1 μl,PrimeSTAR[®] Max DNA 聚合酶 0.5 μl,灭菌蒸馏水将体积补至 50 μl。PCR 条件:98℃、10 s,55℃、5 s,72℃、1 min,30 个循环;延伸 5 min。*P53* 基因扩增方法与 *K-Ras* 相同。PCR 产物进行 2% 的琼脂糖凝胶电泳,采用银染法对 PCR 产物进行分析,对有异常的样本进行测序分析。

表 1 *P53* 和 *K-Ras* 基因引物序列

Tab. 1 Primer sequences of *P53* and *K-Ras* genes

<i>P53</i>	Primer	<i>K-Ras</i>	Primer
Exon 5-6	Forward 5' -GCAGTTCCTCTTCCTGCAGTA-3'	Exon 1	Forward 5' -GTACTGGTGGAGTATTTGATA-3'
	Reverse 5' -GCAGTTCCTCTTCCTGCAGTA-3'		Reverse 5' -AAGAATGGTCTGCACCAGTA-3'
Exon 7-8	Forward 5' -TGTTGTCTCCTAGGTGGCTCT-3'	Exon 2	Forward 5' -AGGTGCACTGTAATAATCCAG-3'
	Reverse 5' -GTCCTGCTTGCTTACCTCGCT-3'		Reverse 5' -GCACTATAATTACTCCTTAATG-3'
Exon 8	Forward 5' -CCTATCCTGAGTAGTGCT-3'	Exon 3	Forward 5' -GACTGAATATAAACTTGTGG-3'
	Reverse 5' -GTCCTGCTTGCTTACCTC-3'		Reverse 5' -CTCTATTGTTGGATCATATT-3'

1.3 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件,组间计量资料比较采用 *t* 检验,组间计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子宫肌瘤组织中 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变的水平

采用 PCR-SSCP 检测子宫肌瘤组织中 *K-Ras* 和

P53 基因的突变情况,结果(图 1)显示,部分样本由于 *K-Ras* 或 *P53* 基因突变在聚丙烯酰胺凝胶电泳后出现了异常条带。将异常的扩增产物进行测序,结果(表 2)显示,*K-Ras* 以外显子 1 和 2 突变为主,*P53* 以外显子 7 和 8 突变为主。

2.2 子宫肌瘤组织和正常子宫肌层组织 *K-Ras* 和 *P53* 突变的比较

PCR-SSCP 和测序分析结果(图 2)显示,正常子宫肌层组织中 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变率分别为

7.14% (4/56) 和 10.71% (6/56), 其中 *K-Ras* 和 *P53* 基因双突变率为 1.79% (1/56)。子宫肌瘤组织中 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变率分别为 73.21% (42/56) 和 83.93% (47/56), 其中 *K-Ras* 和 *P53* 基因双突变率为 32.14% (18/56)。与正常子宫肌层组织比较, 子宫肌瘤组织中 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变率明显增加(均 $P < 0.01$)。

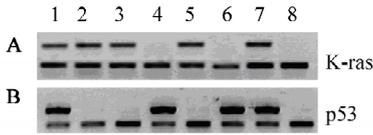


图 1 PCR-SSCP 法检测子宫肌瘤组织中 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变

Fig. 1 *K-Ras* and *P53* gene mutation detected by PCR-SSCP assay in hysteryomyoma tissues

A1-A3 and A7 were mutation sample; A4, A6 and A8 were not mutation sample; B1, B4, B6 and B7 were mutation sample; B2, B3, B5 and B8 were not mutation sample

表 2 子宫肌瘤组织中 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变位点 [n (%)]

Tab. 2 *K-Ras* and *P53* gene mutation loci in hysteryomyoma tissues [n (%)]

<i>K-Ras</i>	Positive rate	<i>P53</i>	Positive rate
Exon 1	21(50.00)	Exon 5-6	9(19.15)
Exon 2	16(38.10)	Exon 7-8	33(70.21)
Exon 3	6(14.29)	Exon 9	5(10.64)

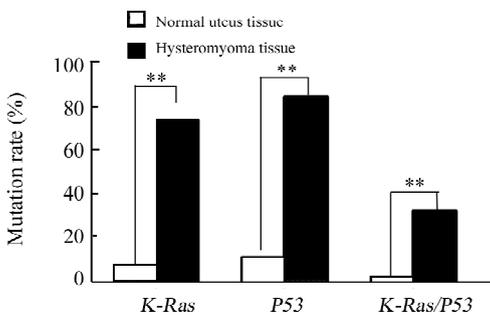


图 2 子宫肌瘤组织和正常子宫组织中 *K-Ras* 和 *P53* 基因的突变率

Fig. 2 *K-Ras* and *P53* gene mutation rates in normal uterus tissues and hysteryomyoma tissues

* * $P < 0.01$ vs normal uterus tissues

2.3 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变与子宫肌瘤患者术后 3 年累积复发率的关系

K-Ras 基因单突变的子宫肌瘤患者术后 3 年累积复发率为 14.28% (6/42), *P53* 基因单突变的子宫肌瘤患者术后 3 年累积复发率为 8.51% (4/47), *K-Ras/P53* 基因双突变的子宫肌瘤患者术后 3 年累积复发率为 66.67% (12/18)。 *K-Ras* 和 *P53* 基因单突变的子宫肌瘤患者术后 3 年累积复发率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.591, P = 0.442$)。 *K-Ras/P53* 基因双突变的子宫肌瘤患者术后 3 年累积复发率明显高于 *K-Ras* 和 *P53* 基因单突变患者术后 3 年累积复发率 ($\chi^2 = 7.865, P = 0.005; \chi^2 = 12.322, P = 0.000$)。

3 讨论

子宫肌瘤是妇科常见的疾病类型之一,也是导致妇女不孕、月经失调和子宫切除的重要原因^[8]。近年来,我国妇女子宫肌瘤的发生率呈现明显的上升趋势,且好发于生育年龄的女性,给患者带来了极大的生理和心理损害^[9]。目前,临床对于子宫肌瘤主要以手术治疗为主,包括腹腔镜肌瘤剔除术和经腹肌瘤剔除术等,虽然很大程度上缓解了患者的痛苦,但是手术后经常复发,需再次进行手术治疗,对患者造成二次伤害^[10-11]。目前关于子宫肌瘤发生和术后复发的原因尚不明确,可能与患者卵巢分泌雌激素偏高或者生长激素增多有关^[12]。此外,推测 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变可能与肌瘤的发生与术后复发存在关系。本研究着重分析了子宫肌瘤组织中 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变情况及其与患者术后 3 年累积复发率之间的关系,旨在为临床子宫肌瘤的发生和术后复发提供一定的实验依据。

K-Ras 基因是一种原癌基因,可编码 *K-Ras* 蛋白,该蛋白具有 GTPase 活性,定位于细胞膜上,在调控 G 蛋白偶联受体信号通路中起着重要作用。其一旦突变,则使整个信号通路处于激活状态,细胞不断生长和分化,最终出现细胞大量增殖^[13-15]。 *P53* 基因是一种抑癌基因,可编码 *P53* 蛋白,在正常生理条件下,当细胞 DNA 受到损伤时,其可大量表达,抑制细胞周期,介导细胞凋亡;但是其一旦突变,则 *P53* 蛋白失活,细胞分裂出现无节制状态,可能发生肿瘤^[16-17]。 *P53* 和 *K-Ras* 的基因突变均可使细胞出现大量增殖和恶性转化,在肿瘤的发生、发展和复发中发挥着重要的作用^[18-20]。

本研究采用 PCR-SSCP 分析和测序分析相结合的方法,分析了正常子宫肌层组织和子宫肌瘤组织中 *K-Ras* 和 *P53* 基因的突变情况,结果显示,子宫肌瘤组织中 *K-Ras* 和 *P53* 基因单突变和双基因突变的发生率明显高于正常子宫肌层组织,提示子宫肌瘤组织中 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变可能是子宫肌瘤发生的原因之一。本研究进一步分析了子宫肌瘤组织中 *K-Ras* 和 *P53* 基因突变与患者术后 3 年累积复发率之间的关系,结果显示,子宫肌瘤组织中 *K-Ras* 和 *P53* 基因单突变的患者术后 3 年累积复发率为 14.28% 和 8.51%,而 *K-Ras* 和 *P53* 基因双突变患者术后 3 年累积复发率高达 66.67%,明显高于 *K-Ras* 和 *P53* 基因单突变的患者术后 3 年累积复发率。这一结果提示,*K-Ras* 和 *P53* 基因双突变加剧了患者术后 3 年累积复发的概率。

综上所述,*K-Ras* 和 *P53* 基因突变与子宫肌瘤的发生和术后复发有着重要的关系,本研究为子宫肌瘤的临床诊断和术后预后判断提供了一定的实验依据。

[参考文献]

[1] Fürst S, Lenhard M, Burges A, et al. Uterine leiomyomas: How to proceed [J]. MMW Fortschr Med, 2012, 154(20): 61-63.

[2] Dikareva LV, Shvarev EG, Shvarev GE, et al. Age, structural and biochemical characteristics of endometrial secretion in patients with hysteromyoma [J]. Adv Gerontol, 2008, 21(4): 596-601.

[3] 朱俊彦,李卫平,刘芳荪. 子宫肌瘤挖除术后 3 年累积复发率相关因素分析 [J]. 上海交通大学学报:医学版, 2008, 28(2): 203-204.

[4] 李孟慧,冷金花,史精华,等. 腹腔镜与开腹子宫肌瘤剔除术后肌瘤残留、复发及妊娠结局的比较 [J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(9): 669-673.

[5] Eltahir HA, Elhassan AM, Ibrahim ME. Contribution of retinoblastoma LOH and the p53 Arg/Pro polymorphism to cervical cancer [J]. Mol Med Report, 2012, 6(3): 473-476.

[6] Saxena A, Shukla SK, Prasad KN, et al. Analysis of p53, K-ras gene mutation & *Helicobacter pylori* infection in patients with gastric cancer & peptic ulcer disease at a tertiary care hospital in north India [J]. Indian J Med Res, 2012, 136(4): 664-670.

[7] Malhotra P, Anwar M, Nanda N, et al. Alterations in K-Ras,

APC and p53-multiple genetic pathway in colorectal cancer among Indians [J]. Tumour Biol, 2013, 34(3): 1901-1911.

[8] 刘禄斌,张光金,徐惠成,等. 腹腔镜下子宫动脉阻断术辅助子宫肌瘤挖除术对患者生育功能及肌瘤复发率的影响 [J]. 重庆医学, 2012, 41(15): 1517-1519.

[9] 张晓玲,王佳春,朱清仙. 心理干预对子宫肌瘤患者术后生活质量的影响 [J]. 中国综合临床, 2010, 26(7): 690-693.

[10] 陆剑锋,朱云龙. 子宫肌瘤切除术后 3 年累积复发率因素探讨 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2010, 24(12): 1242-1243.

[11] 王涛,王国庆,王权,等. K-Ras 基因突变表达谱与结直肠癌肝转移的相关性分析 [J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(3): 449-452.

[12] 倪小平,雷丽红,李丽燕. 雌、孕激素受体及表皮生长因子受体表达与子宫肌瘤术后复发的相关性研究 [J]. 中国医师进修杂志, 2012, 35(6): 25-27.

[13] Higuchi Y, Okuda K, Nakamura Y, et al. Efficacy and safety of bipolar electrode grasping forceps for laparoscopic myomectomy in uterine cervical myoma [J]. Asian J Endosc Surg, 2012, 5(3): 126-30.

[14] Luo F, Pouligiannis G, Ye H, Hamoudi R, et al. Mutant K-Ras promotes carcinogen-induced murine colorectal tumorigenesis, but does not alter tumor chromosome stability [J]. J Pathol, 2011, 223(3): 390-399.

[15] Navas C, Hernández-Porras I, Schuhmacher AJ, et al. EGF receptor signaling is essential for K-Ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Cancer Cell, 2012, 22(3): 318-330.

[16] Radovanović D, Knezević M, Canović D, et al. Correlation between p53 expression and clinical-pathological characteristics of gastric cancer [J]. Vojnosanit Pregl, 2011, 68(10): 832-836.

[17] 魏永永,侯静,唐文如,等. p53 与 Ras 协同及其在肿瘤发生中心的作用 [J]. 遗传, 2012, 34(12): 1513-1521.

[18] Muller PA, Vousden KH. p53 mutations in cancer [J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(1): 2-8.

[19] Wade M, Li YC, Wahl GM. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(2): 83-96.

[20] Califano R, Landi L, Cappuzzo F. Prognostic and predictive value of K-Ras mutations in non-small cell lung cancer [J]. Drugs, 2012, 72 (Suppl 1): 28-36.

[收稿日期] 2013 - 05 - 12

[修回日期] 2013 - 07 - 06

[本文编辑] 韩丹,周玲琳