

· 实验研究 ·

肝细胞癌患者中 p53 基因的突变研究^①彭晓谋^② 彭文伟 周元平

(中山医科大学附属第三医院病毒性肝炎研究室; 广州, 510630)

摘要 为了解肝细胞癌(HCC)中 p53 基因的突变情况, 收集 86 例 HCC 手术切除标本, 采用聚合酶链反应—单链构象多态性(PCR/SSCP)、聚合酶链反应—限制性片段长度多态性(PCR/RFLP)和 DNA 序列分析, 研究了 p53 基因的突变情况。86 例 HCC 中, p53 基因的突变率为 36%。其中, 密码子 249 的突变率为 33.7%, 1 例 SSCP 和 RFLP 均提示密码子 249 存在突变者经 DNA 序列分析显示密码子 249 的第三个碱基发生了 AGG/Arg → AGT/Ser 突变。以上结果提示, HCC 中, p53 基因的突变主要以点突变为主, 主要发生在密码子 249, 其突变率、突变谱和突变方式与启东等 HCC 高度流行区相似。

关键词 癌, 肝细胞; 基因, p53/遗传学; 突变

中图分类号 R 512.6

在肝细胞癌(HCC)中, p53 基因常常出现变化, 包括杂合性丢失、点突变和插入等形式, 其中以点突变为多见并具有明显的特点。启东 HCC 中, 密码子 249 的第三个碱基发生 G → T 突变的频率达 50%^[1]。这种特征性突变已引起了国内外许多学者的极大兴趣^[2~6]。进一步研究显示, 密码子 249 的特征性突变仅限于非州部分地区和我国的启东地区。在我国西北部和世界其它地区, p53 基因的突变率、突变谱和突变方式存在显著差异。这种显著性地区差异可能在 HCC 的病因、发病机理和防治等方面存在特殊含义。中国南方地区是 HCC 的中、高度流行区, 为此, 本研究分析该地区的 HCC 中 p53 基因的突变情况, 为阐明 HCC 的发生机制和确定 HCC 防治策略提供分子水平上的依据。

1 材料与方 法

1.1 标本收集

86 例 HCC 标本收集和保存方法同彭晓谋等的报道^[7]。

1.2 组织 DNA 提取

组织 DNA 是在蛋白酶 K 消化后, 采用酚—氯仿抽提法进行提取。

1.3 PCR 扩增 p53 基因的外显子

由于 98% 的突变发生在外显子 5 ~ 8, 因而, 本研究选择的引物只覆盖此区域。引物从加拿大合成, 具体序列见表 1。PCR 反应体积 30 μ L, 加样本 DNA 0.5 μ g, 98 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 于 80 $^{\circ}$ C 延时并加入 Taq DNA 聚合酶 1.5 U, 然后, 外显子 7 以下列条件扩增: 94 $^{\circ}$ C, 40 s; 64 $^{\circ}$ C, 50 s; 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 共 30 循环, 于 71 $^{\circ}$ C 延时 10 min。外显子 5 ~ 6 和 8 的扩增条件除复性温度分别为 59 $^{\circ}$ C 和 62 $^{\circ}$ C 外, 余同外显子 7。外显子 7 的反应液中加 10% 二甲基亚砜, 用于 RFLP 分析时, 复性温度为 60 $^{\circ}$ C。

表 1 用于扩增 p53 基因的引物序列

外显子	序 列	n (产物大小)/bp
	5'-TGTT CACTTG TGCC TGACT-3'	
5-6	5'-GGAG G C C C A C T G A C A A C C A -3'	489
	5'-GGCGA CAGAG CGAGA TTCCA-3'	
7	5'-GGGTC AGCCG CAAAG AGAGG-3'	286
	5'-GACAA GGGT G GTTG GAGTA GATG-3'	
8	5'-GCAAG GAAAG GTGAT AA AAG T G A A -3'	320

1.4 单链构象多态性(SSCP)分析

取 PCR 产物 20 μ L, 加 1/10 体积 4 mol/L 醋酸钠(pH 6.2)和 2 体积无水乙醇沉淀 DNA。沉淀的

① 美国中华医学基金会(CMB)部分资助; ② 第一作者, 1963 年出生, 男, 讲师

DNA 加 10 μ L 甲酰胺染料 (95% 去离子甲酰胺, 20 mmol/L EDTA, 0.05% 溴酚蓝), 于混匀器上充分混匀。95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冰浴中速冷, 立即上样。采用 45 mmol/L Tris $^{\circ}$ 硼酸 (pH8.3)/4 mmol/L EDTA 缓冲的 6% 聚丙烯酰胺凝胶 (49:1), 在电扇降温下, 于 100 V 电泳 5~6 h。电泳后, 参照 Budowle 的方法进行硝酸银染色^[8]。以癌组织和癌周组织相互比较的方式判断结果。

1.5 限制性片段长度多态性(RFLP)分析

拟用于 RFLP 分析的第七外显子 PCR 产物经氯仿抽提 1 次, 加 *Hae* III 限制酶 (GIBCO BRL 产品) 进行消化。具体按厂家说明进行。采用 2% 琼脂糖凝胶或 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果。

1.6 DNA 序列分析

HCC₃₂ 外显子 7 的 PCR 产物经低熔点琼脂糖纯化后与载体 PCR II (T 载体, 中山大学罗进贤教授提供) 进行连接, 转化到大肠杆菌并亚克隆至 M13mp18, 19 制备单链。采用 TaqTrackTM Sequencing System 和 ³²P 标记的 M13/pUC 通用引物 (Promega 产品), 按 Sanger 双脱氧链终止法进行 DNA 序列分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增 p53 基因诸外显子

除标本 HCC₁₀₃ 的外显子 5~6 扩增未成功外, 余均成功地扩增出来, 且扩增片段大小与设计相符。

2.2 SSCP 分析

SSCP 分析中出现的带漂移情况见图 1, 其中 A 图显示 HCC_{30~32} 的第七外显子的分析结果。通过与癌周组织 (PCT) 相比较, HCC₃₁、HCC₃₂ 的癌组织 (CT) 的带出现了漂移, 判断为 SSCP 阳性, HCC₃₀ 则为阴性。HCC₃₁ 和 HCC₃₂ 的带漂移形式相似。B 图显示 2 个少见的带漂移的形式。HCC₁₀₂ 为典型的漂移形式, 见大部分 SSCP 阳性病例。HCC₃₈ 可见漂移带与原带同时存在, 提示仅有 1 个等位基因发生突变。HCC₁₀₁ 可见较淡的漂移带, 提示只有部分癌细胞发生了突变。C 图显示 HCC₁₆ 的第八外显子发生带漂移的情况。86 例 HCC 标本中, 各外显子出现 SSCP 阳性情况见表 2。HCC₁₀₁ 的突变癌细胞不占绝对多数, 未列入 SSCP 阳性率的统计中。由于有资料表明, p53 基因的单个等位基因突变就可能在 HCC 发病机制中起作用^[9], 因而, HCC₃₈ 纳入 SSCP 阳性率的统计。SSCP 总突变率为 36%, 其中,

93.5% 的突变发生在第七外显子。

表 2 SSCP 分析 p53 基因突变的结果

外显子	n (HCC)/ 例	n (SSCP 阳性)/ 例	n (阳性率) %
5~6	85 ¹⁾	0	0
7	86	29	33.7
8	86	2	2.3

1) HCC₁₀₃ 扩增未成功

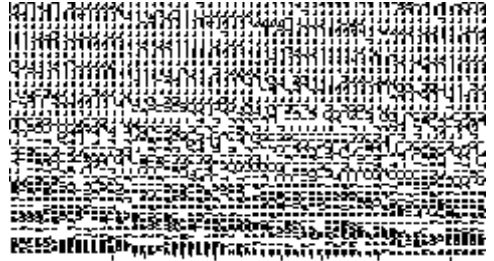


图 1 SSCP 分析中出现的带漂移情况

2.3 RFLP 分析

第七外显子的 PCR 产物上有 5 个 *Hae* III 酶切位点, 所得酶切片段长度依次为 42、39、12、92、66 和 35 bp。92 bp 和 66 bp 片段之间为密码子 249 和 250 之间的酶切位点。如果该位点发生突变就出现一条 158 bp 的带时就可判断为阳性。典型的 RFLP 分析结果见图 2。86 例 HCC 中, RFLP 分析阳性 29 例, 与外显子 7 的 SSCP 分析结果符合率为 100%, 提示外显子 7 的突变均涉及密码子 249。

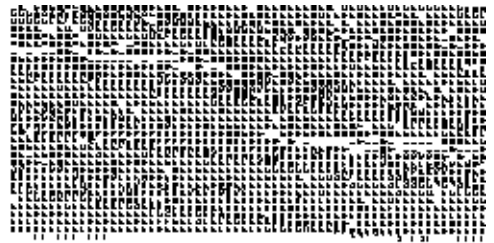


图 2 HCC₃₂ 的 RFLP 电泳分析

1 癌周组织的 PCR 产物; 2 癌周组织的 PCR 产物经 *Hae* III 限制酶消化; 3 癌组织的 PCR 产物经 *Hae* III 限制酶消化; 4 癌组织的 PCR 产物; M 为 100 bp Ladder (GIBCO BRL 产品)

2.4 DNA 序列分析

HCC₃₂ 系男性, 48 岁, 广东恩平人, HCC 分化为

II 级。DNA 序列分析结果见图 3。密码子 249 发生了 AGG/Arg → AGT/Ser 突变, 密码子 260 发生了 TCC/Ser → CCC/Pro 突变。



图3 HCC₃₂的第七外显子序列分析

CT 表示癌组织; PCT 表示癌周组织

3 讨论

PCR/SSCP 分析法是目前检测点突变最简便和最快捷的方法^[4]。SSCP 分析中常采用放射自显影和硝酸银染色来显示电泳分析结果。前者敏感性高, 后者简便、安全, 但由于敏感性偏低而常需加较多的样本。样本多了会降低甲酰胺的终浓度, 从而影响条带的清晰程度和结果判断。为此, 本研究采用先将 PCR 产物浓缩再进行 SSCP 电泳分析和硝酸银染色的方法分析了 p53 基因的突变, 并获得了满意结果。SSCP 分析前, 先将产物浓缩, 一方面提高了甲酰胺的浓度, 另一方面又能采用严格的 PCR 条件来减少非特异性扩增, 两者均有利于提高 SSCP 条带的清晰程度。PCR/RFLP 已被许多学者用于检测密码子 249 的突变^[5, 10]。本研究采用 PCR/SSCP 方法分析的同时, 对需重点观察的突变位点采用 PCR/RFLP 方法进行了分析。两方法在检测密码子 249 的突变方面符合率达 100%, 提示 SSCP 分析的条件选择适当, 本研究的结果准确可信。

SSCP 分析中未发现明显的缺失和插入, 表明突变可能以点突变为主, 86 例 HCC 中, p53 基因的突变率为 36%。涉及到密码子 249 者为 33.7%。该突变率高于欧美和我国西北部地区的 0 ~ 2.3%^[10, 11], 稍低于启东和非洲部分地区的 45 ~ 50%^[11, 6]。涉及密码子 249 的突变占总突变的 93.5% (23/24)。随机抽一例 SSCP 和 RFLP 分析阳性的 HCC 进行 DNA 序列分析发现, 密码子 249 的突变涉及第三个碱基, 突变方式为 G → T。以上资料表明, 中国南方地区的 HCC 中, p53 基因的突变率相

对较高, 其突变谱和突变方式与启东和非洲等地区的 HCC 类似, 提示这些地区可能存在相同的致病因子和相近的发病机制。

HCC₃₂的第七外显子发生了联合突变, 其中, 密码子 260 为少见的突变位点。该突变可能存在两种来源: ①癌细胞确实存在突变; ②PCR 过程中出现的碱基错配。有关其确切的来源和意义需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Hsu I C, Metcalf R A, Sun T, *et al.* Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Nature*, 1991, 350 :427
- 2 Unsal H, Yakicier C, Marçais C, *et al.* p53 mutations and hepatitis B virus 'cofactors in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1995, 21 :597
- 2 Hayashi H, Sugil K, Matsumata T, *et al.* The clinical significance of p53 gene mutation in hepatocellular carcinomas from Japan. *Hepatology*, 1995, 22 :1702
- 4 Oda T, Tsuda H, Scarpa A, *et al.* Mutation pattern of the p53 gene as a diagnostic marker for multiple hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 1992, 52 :3674
- 5 Shieh Y S C, Nguyen C, Vocal M V, Chu H W. Tumor-suppressor p53 gene in hepatitis C and B virus associated human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 1993, 54 :558
- 6 Li D, Cao Y, He L, *et al.* Aberrations of p53 gene in human hepatocellular carcinoma from China. *Carcinogenesis*, 1993, 14 :169
- 7 彭晓谋, 彭文伟, 姚集鲁. HCC 癌组织和癌旁组织中 HCV RNA 检测及半定量分析. *中山医科大学学报*, 1996, 17(4) :251
- 8 Budowle B, Chakraborty R, Giusti A M, *et al.* Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet*, 1991, 48 :137
- 9 Herskowitz I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature*, 1987, 329 :219
- 10 朱明华, 王文亮. 肿瘤抑制基因 p53 突变与原发肝癌的关系. *中华肿瘤杂志*, 1993, 15 :245
- 11 Challen C, Lunec J, Warren W, *et al.* Analysis of p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinomas from Britain. *Hepato*, 1992, 16 :1362

(1996-10-23 收稿 1997-07-03 修回)

STUDIES ON MUTATIONS OF p53 GENE IN HCCs

Peng Xiaomou Peng Wenwei Zhou Yuanping

(Department of Viral Hepatitis Research, Sun Yat-sen University
of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

In order to investigate mutations of p53 gene and their significance in hepatocarcinogenesis in HCCs, mutations of p53 gene were studied in surgical removed HCC specimens by means of PCR/SSCP, PCR/RFLP and sequencing. Among 86 cases of HCC, the mutation rate of p53 gene was 36%, that of codon 249 was 33.7%. Mutation of AGG/Arg → AGT/Ser in codon 249 was found by DNA sequencing of a randomly selected HCC case which was positive for both SSCP and RFLP analyses. These results suggested that the major mutation pattern of p53 gene in HCCs from southern China was point mutations which mainly occurred in codon 249 with the same mutant spectrum and pattern as these in high incidence regions of HCC.

Subject headings carcinoma, hepatocellular; genes p53/genetics; mutation

°新成果°

肾脏病诊断与治疗学

课题负责人 叶任高

(中山医科大学附属第一医院肾脏病科; 广州, 510080)

《肾脏病诊断与治疗学》是我国第一部有110万字以诊断和治疗为重点,立足于临床实用的大型肾脏病专著。该专著具有独立的水、电解质失调篇,透析和移植篇,为其它肾脏病学专著所无。每一个较常见的肾脏病,均有中、西结合疗法内容的介绍,有明显的中国特色,为该书的一大特色。而且,本书病种齐全,临床实用,层次分明,文字精炼,深入浅出,切合广大临床医生所需,方便医生们在临床工作中查阅,为近年来最畅销的肾脏病专著。该专著于1996年获卫生部医药卫生杰出科技著作科技进步奖二等奖。

(陈丽芳)