

# 原发性肝癌 P<sup>53</sup>基因第 249 密码子突变的研究

## The Mutation at Codon 249 of the P<sup>53</sup> Gene in Primary Hepatocellular Carcinoma

杨定华      林伟雄      李绍森      卢全书      姜海行  
Yang Dinghua      Lin Weixiong      Li Shaosheng      Lu Quanshu      Jiang Haixing  
卢榜裕      王文光      冯穗生      刘家奇      彭民浩  
Lu Bangyu      Wang Wenguang      Fong Shuisheng      Liu Jiaqi      Peng Minghao

(广西医科大学第一附属医院 南宁市滨湖路 6 号 530021)

(Dept. of Surgery, First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning, 530021)

**摘要** 用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术对 7 例原发性肝细胞癌 (PHC) 进行 P<sup>53</sup>基因第 249 密码子突变的检测。结果: 7 例肝细胞癌中 3 例有 P<sup>53</sup>基因第 249 密码子突变, 突变率达 42.9%。

**关键词** 肝细胞癌 P<sup>53</sup>基因 PCR-RFLP

**Abstract** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was used to examine the mutation at codon 249 of the P<sup>53</sup> gene in 7 cases of primary hepatocellular carcinoma. The mutation at codon 249 of the P<sup>53</sup> gene occurred in 3 out of the 7 cases. The mutant rate was 42.9%.

**Key words** Hepatocellular Carcinoma, P<sup>53</sup> gene, PCR-RFLP

P<sup>53</sup>基因定位于人类 17 q<sup>13.1</sup>, 含有 11 个外显子, 全长 16~20 kb<sup>[1]</sup>。具有表达 53 kd 磷酸蛋白的功能, P<sup>53</sup>蛋白能与序列特异性 DNA 结合, 通过对 DNA 复制的影响而参与正常细胞的生长调控。P<sup>53</sup>基因的点突变或缺失往往导致细胞的恶性转化, 在大量肿瘤组织和细胞系中发现 P<sup>53</sup>基因的异常<sup>[2]</sup>。最近发现 P<sup>53</sup>基因变化与 PHC 发生有关<sup>[3,4]</sup>。广西为原发性肝细胞癌的高发区之一, 为了探讨本区 PHC 与 P<sup>53</sup>基因突变的关系, 我们应用 PCR-RFLP 技术, 对 7 例新鲜的 PHC 样本进行 P<sup>53</sup>基因第 249 密码子突变的分析。

### 1 材料与方 法

**1.1 病例** 7 例经病理确诊的 PHC 均为手术切除的新鲜组织, 切除组织贮存于 -80℃ 中备用, 其中男 6 例、女 1 例, 年龄 38~59 岁, 均有结节性肝硬化, 6 例 HBsAg (+), 1 例 HBsAg (-), 均来自广西各地。

**1.2 DNA 提取** 每例各取癌组织 5 g, 研碎, 采用蛋白酶 K (Sigma 公司产品) 消化, 饱和酚-氯仿抽提法提取 DNA。正常对照组织 DNA 按同法提取。

**1.3 P<sup>53</sup>基因扩增和分析** P<sup>53</sup>基因 PCR 扩增引物: P1; 5'-TC TC CT AG GG TT GG CT CT GA CT G-3'; P2; 5'-GC AA GT GG CT CC TG AC CT GG A-3' (中国医学科学院微生物所合成), 扩增片段长 195 bp。PCR 扩增反应体系按 Saiki<sup>[5]</sup>等人的方法加以改进, 35 个循环后, 取 10 μl PCR 反应产物, 经 Hae III 酶消化, 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后在紫外光透射板上观察并照相。野生型 P<sup>53</sup>序列的 249 密码子为 Hae III 的酶切点, 经 Hae III 酶切后, 如在琼脂糖凝胶上观察到两个分别为 125 bp、70 bp 电泳带, 表示能酶切, 酶切点没有碱基突变, 即为 Wild-Type P<sup>53</sup> gene; 如在琼脂糖凝胶上观察到一个 195 bp 电泳带, 表示不能酶切, 酶切点因碱基突变而消失, 即为 Mutation-Type P<sup>53</sup> gene。

### 2 结 果

7 例原发性肝细胞癌 P<sup>53</sup>基因片段经 PCR 扩增后, 进行 Hae III 酶切电泳观察, 3 例不能被酶切, 仅出现一个电泳带, 提示 P<sup>53</sup>基因 249 密码区发生突变, 为 Mutation-Type P<sup>53</sup> gene, 其余 4 例及对对照正常组织被酶切出现两个电泳带, 提示在 P<sup>53</sup>基因 249 密码区无突变发生, 为 Wild-Type P<sup>53</sup> gene (图 1)。P<sup>53</sup>基因

1994-12-24 收稿。

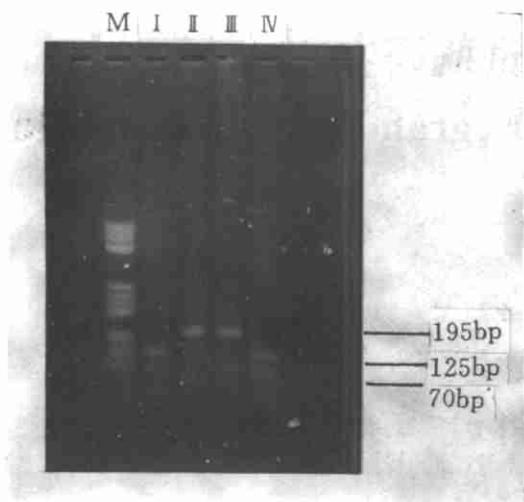


图 1 用 PCR 和 Hae III 酶消化检测 P<sup>53</sup> 基因 249 密码子  
Fig. 1 P<sup>53</sup> gene at codon 249 tested by PCR and digested with Hae III

M: PBR322Hae III 酶切片段分子量标准;  
M: PBR322 standard molecular weight by Hae III digestion;  
I: 肝癌 DNA 片段经 Hae III 酶切后为 125 bp 和 70 bp 即 Wild-Type P<sup>53</sup> gene;  
I: DNA fragments from HCC is showed as 125 bp and 70 bp by Hae III digestion or wild-Type P<sup>53</sup> gene;  
II: 肝癌 DNA 片段经 Hae III 酶切后仍为 195 bp 即 Mutation-Type P<sup>53</sup> gene;  
II: DNA fragments from HCC are showed as 195 bp by Hae III digestion or Mutation-Type P<sup>53</sup> gene;  
N: 对照的正常组织 DNA 片段经 Hae III 酶切后为 125 bp 和 70 bp 即 Wild-Type P<sup>53</sup> gene;  
N: DNA fragments from control normal tissue is showed as 125 bp and 70 bp by Hae III digestion or wild-type P<sup>53</sup> gene.

### 3 讨论

近年来许多学者都证实 PHC 中存在 P<sup>53</sup> 基因突变。Murakami<sup>[6]</sup>用 PCR-SSCP 检测 10 株 PHC 细胞系, 4 株有 P<sup>53</sup> 变异, 他们用同法分析 43 例 PHC 样本, 8 例存在 P<sup>53</sup> 结构变异。Hsu<sup>[3]</sup>等的研究发现, PHC P<sup>53</sup> 基因点突变密码子为: 110、175、244、246、249、272、276、318 至 382。Bressac<sup>[4]</sup>等报道 50% 的南非 PHC 存在 P<sup>53</sup> 基因突变。Nishida<sup>[7]</sup>等分析了 52 例 PHC 的 P<sup>53</sup> 基因突变谱, 17 例发生癌细胞 P<sup>53</sup> 基因突变, 部分在早期显示突变, 在晚期 PHC 中则频繁发生。近年国内的报告<sup>[8,9,10]</sup>亦证实 PHC 存在 P<sup>53</sup> 基因的突变。本组 P<sup>53</sup> 基因突变率为 42.9%, 认为 P<sup>53</sup> 基因突变可能与 PHC 的发生和演变有关。

P<sup>53</sup> 基因点突变与黄曲霉素 (AFB<sub>1</sub>) Hsu<sup>[3]</sup> 及 Bressac<sup>[4]</sup> 分别报告了一组启东及南非地区的 PHC 发现 广西科学 1995 年 2 月 第 2 卷第 1 期

50% 在 P<sup>53</sup> 第 7 外显子 249 密码区有一特征性点突变区, 此突变区第三个碱基发生了 G→T 颠换, 启东及南非都是 AFB<sub>1</sub> 污染严重的地区。Oztak<sup>[6,11,12]</sup>等报告 AFB<sub>1</sub> 含量较低的澳大利亚、日本、德国的 PHC 却没有上述的改变, 他们认为 P<sup>53</sup> 第 249 密码区的特征性点突变可能与 AFB<sub>1</sub> 和其他环境致癌物的作用有关。本组 7 例 PHC, P<sup>53</sup> 基因第 249 密码子突变率为 42.9%, 接近 Hsu<sup>[3]</sup> 及 Bressac<sup>[4]</sup> 的报道结果, 此提示, 广西的 PHC 与启东、南非的 PHC 可能具有类似的致癌物。由于病例数少, 需继续积累资料, 本组 P<sup>53</sup> 基因点突变测序正在进行中。

### 参考文献

- 1 Lmabp Crawfordl. Characterization of the human P<sup>53</sup> gene. Mol Cell Biol. 1986, 6 (5): 1379.
- 2 Hollstein M, Sidrandky D, Vogelstein B, et al. P<sup>53</sup> mutations in human cancers. Science. 1991, 253 (5015): 49.
- 3 Hsu IC, Metcalf RA, SunT, et al. Mutational hotspot in the P<sup>53</sup> gene in human hepatocellular carcinoma. Nature. 1991, 350 (6317): 427.
- 4 Bressac B, Kew M, Wands J, et al. Selective G to T mutation of P<sup>53</sup> gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. Nature. 1991, 350 (6317): 429.
- 5 Saiki Rk, SHarf S. Primer-directed enzymatic amplification of DNA polymerase. Science. 1988, 239: 487.
- 6 Murakami Y, Hayashi K, Hirohashi S, et al. Aberrations of the tumor suppressor P<sup>53</sup> and retinoblastoma gene in human hepatocellular carcinomas. Cancer Res. 1991, 51 (20): 5520.
- 7 Nishida N, Rukuda Y, Kokuryn H, et al. Role and mutational heterogeneity of the P<sup>53</sup> gene in hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 1993, 53 (2): 368.
- 8 赵坡, 杨光华, 毛新. 肝细胞癌 P<sup>53</sup> 基因的分子病理学研究. 中华病理学杂志, 1993, 22 (1): 16.
- 9 李岱宗, 曹宇清, 贺丽萍, 等. 人原发性肝癌 P<sup>53</sup> 基因缺失和突变. 肿瘤, 1991, 14 (4): 241.
- 10 朱明华, 王文亮. 原发性肝癌的等位基因型及肿瘤抑制基因 P<sup>53</sup> 第 7 外显子分析. 第四军医大学学报, 1993, 14 (4): 241.
- 11 Ozturk M and collaborators. P<sup>53</sup> mutations in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. Lancet, 1991, 338 (8779): 1356.
- 12 Kress S, Jahn V, Buchanann A, et al. P<sup>53</sup> mutations in human hepatocellular carcinomas from Germany. Cancer Res. 1992, 52 (11): 3220.

(责任编辑: 莫鼎新、唐铃弟、何启彬)