

黄曲霉毒素高污染区 肝细胞癌 P53 基因高频率定点突变*

High Frequency of P53 Gene Fixed Point Mutation in Hepatocellular Carcinoma from AFB₁ High Risk Area

马 韵 邓卓霖 罗 虹 丁志敏
Ma Yun Deng Zhuolin Luo Hong Ding Zhimin

(广西医科大学病理学教研室 南宁市滨湖路6号 530021)

(Dept. of Pathology, Guangxi Medical Univ., 6 Binhu Road, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 用聚合酶链反应及限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 分析技术, 对广西黄曲霉毒素高污染区 52 例肝细胞癌 (HCC) 进行分析, 检查 P53 基因第 7 外显子的 249 密码子的突变频率。结果发现 36/52 例 HCC 中 249 密码子有集中的点突变, 频率为 69.2%。P53 基因突变热点与乙型肝炎病毒感染无关。提示黄曲霉毒素 B1 是突变热点的主要原因。

关键词 肝细胞癌 P53 基因 突变热点 乙型肝炎病毒 黄曲霉毒素 B1

Abstract Fifty two cases of hepatocellular carcinoma (HCC) from high aflatoxin B₁ (AFB₁) contaminated area in Guangxi were studied by polymerase chain reaction and restrictive fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis to examine the exon 7 of P53 gene in HCC. Mutation points were mostly clustered at codon 249 to form a mutational hot-spot. The frequency was 36/52 (69.2%). It seems that there has no relation to hepatitis B virus infection. The result indicates that AFB₁ is the most important agent for the specific mutation at hot-spot in the P53 gene of human hepatocellular carcinoma.

Key words hepatocellular carcinoma, P53 gene, mutational hot-spot, hepatitis B virus, aflatoxin B₁

P53 基因异常在人类肿瘤中是相当普遍的现象, 但极少出现定点突变。1991 年 Hsu^[1] 及 Bressac^[2] 分别报道在江苏启东及南部非洲的肝细胞癌 (HCC) 中, P53 基因第 7 外显子 (exon7) 的第 249 密码子 (codon 249) 突变, 突变率达 50%。桂西南地区属黄曲霉毒素 (AFB₁) 高污染区及乙型肝炎病毒 (HBV) 高感染区, 与具有相似发病背景的南部非洲及江苏启东两地一样, 同属 HCC 最高发区。我们已经发现此地 HCC 中 P53 蛋白异常表达占 68.8%, 并在小样本 DNA 直接测序中发现 6 例 codon 249 第 3 核苷酸 G→T 颠换^[3]。本文用 PCR-RFLP 分析技术, 对 52 例 HCC 癌组织进行检测, 以观察在 P53 基因的 codon 249 上突变的频率, 并与癌旁肝组织中乙型肝炎

炎表面抗原 (HBS Ag) 检测结果进行对比分析, 探讨 AFB₁ 及 HBV 与本地区 HCC 发生的关系。

1 材料与方法

52 例 HCC 来自桂西南以扶绥为中心的邻近县市, 均为外科手术后病理存档材料。组织经常规福尔马林固定, 石蜡包埋。其中男性 40 例, 女性 12 例, 平均发病年龄 44 岁。

43 例有癌旁肝的病例用单克隆抗 HBsAg 抗体 (MAB-0234) 及 S-P 试剂盒 (均购自福州迈新生物制品公司), 按试剂盒说明用 S-P 法检测癌旁肝中的 HBsAg。

另取 HCC 组织蜡块, 切 4 μm 薄片, 置 EP 管内, 经二甲苯、酒精脱蜡、干燥后, 用蛋白酶 K 消化。完全消化后的组织离心取上清液用于 PCR 扩增。PCR 反应在 BIO-RAD 公司的基因扩增仪中进行。预期扩

1996-06-10 收稿。

● 国家自然科学基金资助课题。

增 exon 7 片段长度为 138 bp。引物设置、反应条件参照文献 [4]。每一反应管总容积为 50 μ L，内含 1 对引物各 10 pmol，2U Taq 酶（华美公司产品）等。扩增产物用限制性内切酶 Hae III 消化（10 μ L/10 U，37 $^{\circ}$ C 过夜）后，在 15% 聚丙烯酰胺凝胶中垂直电泳，溴化乙锭染色，紫外灯下观察及照相。野生型 P53 基因 codon 249~250 间的核苷酸序列 GGCC 中间是 Hae III 的酶切位点，可被切成长度为 87 及 51 bp 的两个片段。当 codon 249 第 2 或第 3 位核苷酸异常时，则导致酶切位点丢失，仅能观察到 138 bp 的一个片段（图 1）。

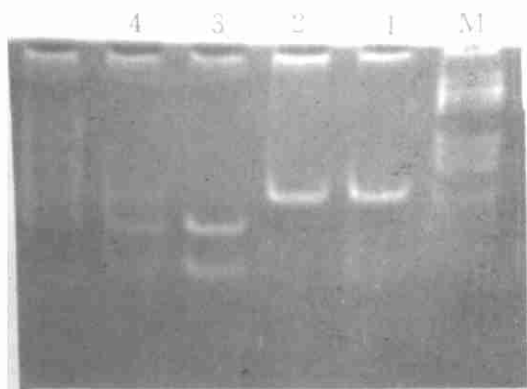


图 1 exon 7 扩增产物经 Hae III 酶切后电泳结果

Fig. 1 Electropherogram show the results of the exon 7 amplification products digested by Hae III

由右 \rightarrow 左 From right to left; M; PBR322-Hae III DNA 分子量标准 PBR322-Hae III DNA standard molecular weight; 1, 2; codon 249 突变 Codon 249 mutation. PCR 产物不能被 Hae III 切开，为 138bp 的一条泳带 PCR product was showed as 138 bp, which was not digested by Hae III; 3; codon 249 正常 Normal codon 249. PCR 产物被切成 87+51bp 两个片段 PCR product was showed as 87+51 bp by Hae III digestion; 4; 癌组织中有较多正常组织，PCR 产物同时含野生型及突变型 codon 249，经 Hae III 酶切后可见 138, 87, 51 bp 三条泳带。More normal tissue was seen in the HCC tissue. PCR product contained wild-type and mutation of codon 249, and was showed as 138, 87, 51 bp by Hae III digestion.

表 1 不同 HBV 感染状况下 HCC P53 基因 codon 249 突变频率

Table 1 The frequency of P53 gene codon 249 mutation in HCC under various HBV infectious states

HBsAg	例数 No. cases	HCC codon 249 突变数 No. Mutational cases	突变率 Frequency of mutation (%)
阳性 Positive	35	23	65.71
阴性 Negative	8	7	87.50

2 结果

36/52 例 HCC 中有 P53 基因 codon 249 突变，突变率为 69.2%。35/43 例癌旁肝组织中 HBsAg 阳性，占 81.4%。P53 基因 codon 249 的突变率与 HBV 感染状况无关 ($P > 0.05$)，见表 1。

3 讨论

启东及莫桑比克地区先发现 HCC P53 基因中有突变热点的存在，在基因研究中具有重要意义，突变热点的出现被认为是与 AFB1 及 HBV 有关。随后世界各地的学者纷纷进行类似的研究，所采取的标本均来自 AFB1 低污染区，如日本、台湾、香港、澳大利亚及中国北方等地，无论当地 HBV 感染率高低，均未发现 exon 7 有集中的突变热点存在^[5~9]。反证了 AFB1 与 codon 249 突变之间的关系。

桂西南地区 HCC 的发病背景与启东及莫桑比克类似，本文发现在 HCC 组织中 P53 基因 codon 249 上同样存在着突变热点，突变频率与上述两地相近，而明显高于 AFB1 低污染区。在三个具有不同自然环境的地区中发现 HCC P53 基因同一密码区突变，结合动物实验的结论^[10]，足以证明 AFB1 确是引起 P53 基因 codon 249 突变的祸首，揭开 AFB1 致肝癌的分子机密。

在 HBsAg 阳性及阴性的病例中，HCC codon 249 的突变频率无差别，表明 AFB1 可单独引起本地 HCC 的基因改变。大量的研究已经充分表明 HBV-DNA 可随机地整合到人基因组 DNA 中^[11]，但不能引起 P53 基因特异性突变热点^[5~9]。由于一条 P53 等位基因的突变，常需伴另一条等位基因的缺失或突变，才易导致基因表达失常，致使 P53 蛋白丧失肿瘤抑制作用。因此，HBV 感染作为本地区 HCC 发生的高危因素，在分子水平上可能是通过引起 P53 基因等位基因的点突变或缺失等异常改变，与 AFB1 协同促进 HCC 的发生。有关这方面的工作尚待进一步研究。

致谢

本研究得到广西医科大学血红蛋白室谢建生、林伟雄两位同志的热情协助，特此致谢！

参考文献

- Hsu IC, Metcalf RA, Sun T et al.. Mutational hot-spot in the P53 gene in human hepatocellular carcinomas. Nature, 1991, 350: 427.
- Bressac B, Kew M, Wands J et al.. Selective G \rightarrow T muta-

tion of P53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 1991, 350: 430.

3 邓卓霖, 潘朗星, 马 韵等. 肝细胞性肝癌 P53 基因多态性定点突变. *广西科学*, 1995 年, 2 (4): 59.

4 Murakami Y, Hayashi K, Sekiya T. Detection of aberrations of the P53 alleles and the gene transcript in human tumor cell lines by singlestrand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res*, 1991, 51: 3356.

5 Teramoto T, Satonaka K, Kitajawa S et al. P53 gene abnormalities are closely related to hepatoviral infections and occur at a late stage of hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*, 1994, 54: 231.

6 Sheu J C, Huang G C, Lee P H et al. Mutation of P53 gene in hepaticellular carcinoma in Taiwan. *Cancer Res*,

1992, 52: 6098.

7 Gopesh IOL, Chung LP. Overexpression and point mutations of P53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinomas in Hong Kong Chinese people. *Cancer*, 1994, 74: 30.

8 Hayward NK, Walker GJ, Graharm W et al. Hepatocellular carcinoma mutation. *Nature*, 1991, 352: 764.

9 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 (4): 245.

10 Wogan G N. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Res*, 1992, 52 (suppl): 2114-8.

11 Bressac B, Galvin K M, Liang J J et al. Abnormal structure and expression of P53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1990, 87: 1973.

(责任编辑: 邓大玉 蒋汉明)

(上接第 44 页 Continue from page 44)

之本文的实验操作技术日臻成熟, 其结果更优。这不但再次确证了 LDH₆ 和变异型酶谱的存在^[1,2,3], 与青山羊精子一样, 水牛血清 LDH 同工酶可能存在第 3 个基因位点^[8], 因 LDH_x 与本文 LDH₆ 的位置不同, 故此位点与前者可能不同。

致谢

本文经杨传任教授审阅, 并得到胡曦璇老师的热忱帮助, 谨表谢意!

参考文献

1 栾桂龙, 欧阳柱, 庞廷英. 四种水牛血清 LDH 同工酶谱型的分析研究. *广西农学院学报*, 1989, 8 (4): 61~65.

2 栾桂龙, 韦莉莉, 蒋艳明. 三种奶水牛品种血清乳酸脱氢

酶研究. *西南农业学报*, 1995, 8 (3): 89~94.

3 武 彬, 秦川, 晋南和南阳黄牛血清乳酸脱氢酶同工酶谱型的初步研究. *畜牧兽医学报*, 1988, 19 (1): 18~22.

4 周宗汉, 林金榜. 血清 LDH 同工酶圆盘电泳法在鱼类分类中的应用. *动物学杂志*, 1983, (5): 33~35.

5 Gerald P C. LDH Isoenzymes Sandard Methods of Clinical Chemistry, 1972, (7): 49~61.

6 余桂馨, 陈守筠. 家畜遗传标记研究. 成都: 西南民族学院出版社, 1989, 31~38, 39~117.

7 欧阳柱, 栾桂龙, 庞廷英. 尼罗罗非鱼、莫桑比克罗非鱼和福寿鱼中某些组织 LDH 及其同工酶的研究. *广西农学院学报*, 1988, 7 (3): 51~57.

8 张庆朝, 陈鑫磊, 杨景芝等. 青山羊精子中乳酸脱氢酶同工酶的研究. *畜牧兽医学报*, 1995, 26 (6): 496~499.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)