

广西肝癌中 HBV感染与 N-ras基因突变的研究*

N-ras Gene Mutation and Hepatitis B Virus Infection in Guangxi Hepatocellular Carcinomas

刘启福 罗丹 苏建家 C Gove** R. Williams**
Liu Qifu Luo Dan Su Jianjia

(广西肿瘤研究所 南宁市滨湖路6号 530021)

(Guangxi Cancer Institute, 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 应用 PCR-SSCP和免疫组化法检测 29例广西南部肝癌 (HCC) 组织中的 N-ras 基因突变和 HBV 感染状况。结果, 肝癌中 N-ras 基因在第 2~3 密码子之间的突变率为 79.3%, 其中 22例 (75.86%) 有 2~5 个突变位点。该基因突变也见于癌旁组织 (80.77%)。肝组织中 HBsAg 和 HBxAg 检出率分别为 86.2% 和 79.3%, 两者具有相关性, 并与 N-ras 基因突变率呈相平行的趋势。因广西南部的肝癌与 AFB₁ 污染有关, 本研究中 HCC 的 N-ras 基因的突变可能也与 AFB₁ 的作用有关。

关键词 肝癌 N-ras 基因 HBV AFB₁

Abstract The mutation of N-ras gene and hepatitis B virus (HBV) markers were detected in 29 cases of hepatocellular carcinomas (HCC) in Southern Guangxi by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and immunohistochemistry. The aberrations at N-ras codons 2~37 were found at 79.3% in HCC. 2~5 mutated codons of N-ras gene were tested in 22 cases (75.86%) HCC. These mutations were also found in 80.77% liver tissue surrounding the HCCs. The HBsAg and HBxAg positive rates in liver tissue were 86.2% and 79.3% respectively. There was a positive correlation between the detection of HBsAg and HBxAg, on the other hand, there was a parallel tendency between the HBV markers and mutation rate of N-ras gene. Since the aflatoxin B₁ (AFB₁) contamination is a risk factor for HCC in Southern Guangxi, AFB₁ may play a role the mutation of N-ras gene.

Key words Hepatocellular carcinoma N-ras gene HBV AFB₁

中图法分类号 R735.7

肝细胞癌 (HCC) 是我国常见恶性肿瘤之一, 广西是一高发区。肝癌的发生涉及许多因素, 已有相当多的研究表明, 乙型肝炎病毒 (HBV) 感染可能是导致肝癌发生的因素之一, 其作用机制可能与乙型肝炎病毒 x 抗原 (HBxAg) 的反式激活癌基因有关^[1]。近来发现 N-ras 癌基因的激活可能是 HCC 发生发展的分子基础^[2,3]。已有关于肝癌中 N-ras 基因过度表达的报道^[4], 而关于肝癌中 N-ras 突变及其与 HBV 感染关系的研究报道不多, 本文采用多聚酶链反应-单

链构象多态性分析法 (PCR-SSCP) 和免疫组化方法分析肝癌中 N-ras 基因突变与 HBV 感染的关系, 现将结果报告如下。

1 材料和方法

- 1.1 标本: 广西肿瘤研究所外科 1987年~1992年肝癌手术标本 29例, 28例附癌旁组织。标本经福尔马林固定, 石蜡包埋, 4μm 连续切片, HE 染色。
- 1.2 免疫组化染色: 单克隆抗 HBV 表面抗原 (HBsAg) 抗体, 由英国伦敦 Middlesex 医院 Tedder 教授赠送, 单克隆抗 HBxAg 抗体为英国伦敦 King's 医学院 Naomov 教授提供。应用 Strep-ABC 试剂盒, 按说明书操作, 每次染色均设阳性和阴性对照。

1997-03-06收稿

* 国家自然科学基金 (编号 39060032) 及中英友好奖学金资助课题

** King's College Hospital, London, UK.

1.3 DNA提取: 将石蜡切片放入离心管中, 二甲苯脱蜡, 95%乙醇水化, 蛋白酶 k消化, 采用酚 氯仿抽取法提取 DNA

1.4 PCR-SSCP 分析 N-ras基因突变的引物由英国伦敦 King's医学院医学分子生物学教研室合成, 引物序列如下: 5'-GACTGAGTA-CAAAGTGGTGG-3', 5'-GGGCCTCACCTC-TATGGTG-3'。该引物通过 PCR可合成 N-ras基因第2~3密码子的118 bp DNA片段。

取0.1μg组织 DNA加入9μL PCR混合液, 加一滴灭菌石蜡油覆盖, 经94℃ 5 min后, 进入35个扩增循环, 每个循环包括: 95℃ 30 s→ 55℃ 1 min→ 72℃ 1 min30 s, 最后72℃ 10 min

取2μL PCR扩增产物用2μL稀释液稀释, 95℃变性5 min, 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 85℃真空干胶, -70℃放射自显影。

2 结果

2.1 病理组织学改变: 肝癌组织的病理学诊断均为肝细胞癌。癌旁组织26例呈慢性肝炎和(或)结节性肝硬化, 急性炎症 1例。

2.2 N-ras基因的点突变: PCR-SSCP结果表明, 作为正常对照的人胎盘组织(1例)和人肝组织(3例)均呈3条单链带。所检测的肝癌标本除有与正常组织相同的3条单链带外, 23例(79.3%)还出现了泳动变异带, 即 N-ras基因发生了点突变。其中22例(75.86%)有2~5条泳动变异带, 表明有2~5个突变位点者占大多数。N-ras基因的点突变不仅见于肝癌组织, 而且见于癌旁组织, 其检出率为80.77%(21/26), 与癌内的检出率相比, $P > 0.05$, 无显著性差异。

2.3 HBV感染标志的免疫组化染色: HBsAg和HBxAg阳性颗粒均呈棕黄色, 位于细胞浆内。HBsAg还有膜型表现。HBxAg的阳性率为86.2%(25/29), HBsAg的阳性率为79.3%(23/29), 两项阳性率经统计学分析, 具有相关性, $P < 0.01$ 。

3 讨论

大量研究提示, HBV慢性感染者发生HCC的危险性明显增高^[5,6]。HBxAg可能是HBV整合到宿主细胞DNA后产生, 具有反式激活癌基因的作用^[7]。本研究中的HCC, 检出HBsAg和HBxAg阳性率分别为86.2%和79.3%, 统计学处理显示, 两者具有相关性, $P < 0.01$ 。表明HBxAg和HBV感染关系密切, 并与HCC密切相关。

PCR-SSCP法是根据单链DNA在中性聚丙烯酰胺凝胶电泳时是否出现变异带来检测DNA链上碱基是否发生变异。相同长度且碱基顺序相同的DNA片段呈现相同的单链带型, 如果此段DNA链中某个或某些碱基发生了点突变, 则DNA构象随之发生改变, 因而在电泳中出现泳动迁移率不同的变异带。

N-ras是首先被证明的人肝癌转化基因之一^[2], 当其由于点突变, 染色体重排或基因扩增而被激活时, 细胞跨膜信号的传递改变, 细胞分裂增加, 发生异常分化, 导致癌变。已有不少关于人肝癌中出现N-ras基因过度表达的报道^[3,4], 而对人HCC中N-ras突变的研究不多。已发现N-ras基因的点突变热点在第12、第13和第6密码子^[8]。Rechard等在人肝细胞瘤细胞系HepG2中发现N-ras的第6密码子有无义突变(missense mutation)^[9]。房殿春等^[10]在人肝癌中检出N-ras第12密码子有点突变, 突变率为37.2%。本研究PCR扩增的DNA片段包括N-ras的第12、第13密码子。检出肝癌中N-ras的点突变率为79.3%, 突变的频率相当高。而且其中23例(75.86%)的点突变有2~5个位点之多, 明显不同于已有报道的肝癌中N-ras突变仅见于第12密码子或在南非黑人^[11]及日本^[8]肝癌中未能检测出N-ras突变热点的研究。表明广西肝癌的N-ras突变是多位点的, 并且不仅仅局限于所报道的突变热点部位。检测中有些标本的泳动变异带位置相似, 但没有所检标本均出现的某一特异的泳动变异带。至于N-ras基因具体在哪些密码子发生点突变, 还需经DNA测序来确定。本研究不仅在肝癌组织检出N-ras点突变, 而且在癌旁组织也检出点突变, 这些癌旁组织多呈慢性肝炎和(或)结节性肝硬化。肝癌和癌旁组织中检出N-ras突变率相近, 统计学上无显著性差异, $P > 0.05$ 。表明N-ras基因的突变在肝癌尚未形成的时候已经出现, 且一直持续存在于已形成的肝癌中, 提示它在肝癌的发生发展过程中均起作用。

N-ras基因点突变的机制尚不明了。房殿春等的研究显示, 血清HBsAg阳性组的ras基因突变率为53.6%, 高于HBsAg阴性组的20%, $P < 0.05$, 提示HBV感染可能与此突变有关。最近的实验证实^[12], HBxAg能在体内激活ras蛋白, 形成ras-GTP复合物, 迅速诱导细胞复制的增加, 在癌变过程中起作用。本资料中HBsAg和HBxAg的阳性率分别为86.2%和79.3%, 与肝癌中N-ras的突变率79.3%相似, 均较高, 有相平行的趋势。已有报道^[13], 在黄

(下转第14页 Continue on page 142)

及整合型的 HBV DNA 证实树鼩对 HBV 易感。由于树鼩来源丰富,是用于 HBV 生物学特性、感染机理、治疗乙肝药物筛选验证及 HBV 致肝癌发生机理等研究的较好的实验动物模型。

参考文献

- 1 苏建家, 严瑞琪, 甘友全等. 成年树鼩实验感染人乙型肝炎病毒的研究. 中华病理学杂志, 1987, 16 (2): 103
- 2 Yan R Q, Su J J, Huang D R et al. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma- I. Experimental infection of tree shrew with hepatitis B virus. J of Cancer Research & Clinical Oncology, 1996, 122 (5): 283
- 3 李奇芬, 丁明权, 王洪等. 成年树鼩感染丁型肝炎病毒的研究. 第三军医大学学报, 1994, 16 (4): 1.
- 4 刘芳华. 人乙型肝炎病毒血清实验感染树鼩的研究. 贵州医学, 1987, 11 (2): 24.
- 5 Summers J, Mason W. Replication of the genome of a hepatitis B like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. Cell, 1982, 29 403.

- 6 高寿征主编. 病毒性肝炎防治研究. 北京: 北京出版社, 1993. 498.
- 7 Eike Walter, Ruth Keist. Hubert E. Blum et al. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. Hepatology, 1996, 24 (1): 1.
- 8 王宇, 陶其敏. HBV adr 亚型全基因组分子克隆的建立. 北京医科大学学报, 1986, 18 44.
- 9 陈怀宇, 骆抗先. 整合的乙型肝炎病毒核酸与原发肝癌. 国外医学, 流行病学传染病学分册, 1988, 15 52.
- 10 陈健, 刘启福, 魏琦等. 广西 HBsAg 阳性母亲的胎儿肝、肾细胞中乙肝病毒 DNA 存在状态的研究. 生物化学杂志, 1994, 10 (5): 611.
- 11 Hajime H A, Terkatsu Arima, Hides Nagashima. Hepatitis B virus DNA in human hepatocellular carcinoma is the integration of hepatitis B virus DNA really carcinogenic Hepatology (Rapit literature Review), 1987, 17 (3): 869.
- 12 Pierre tiollais, Christine poured & Anne Dejean. The hepatitis B virus. Nature, 1985, 317 489.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 138 页 Continue from page 138)

曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 诱导的实验大鼠肝癌中有 N-ras 基因的突变, 且发生于第 8 第 13 第 14 和第 18 等多个密码子, 本研究肝癌的多位点 N-ras 基因点突变与之相似。据以往的流行病学资料^[6], 广西南部食物中 AFB₁ 的污染程度较高, 所以本文的 N-ras 基因突变, 可能还与 AFB₁ 的作用有关, 而不仅仅是 HBV 感染的作用。

参考文献

- 1 Miyaki M, Sato C, Gotanda T et al. Integration of region X of hepatitis B virus genome in human primary hepatocellular carcinomas propagated in nude mice. J Gen Virol, 1986, 67 1449.
- 2 顾健人, 胡利富, 万大方等. 人原发性肝癌转化基因 N-ras 的研究. 肿瘤, 1985, 5 52.
- 3 李仕能, 王明生, 李士谔等. 大鼠肝癌变过程中细胞癌基因的表达. 中国医学科学院学报, 1990, 12 (2): 121.
- 4 Farshid M, Tabor E. Expression of oncogenes and tumor supressor genes in human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cell lines. J Med Virology, 1992, 38 235.
- 5 Breasley RP, Hwang L Y, Lin CC et al. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus a prospective study of 22, 707 men in Taiwan. Lancet, 1981, 2 1129.
- 6 Yeh FS, Yu M C, Mo CC et al. Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinomas in Southern Guangxi,

- China. Cancer Res, 1989, 49 (9): 2506.
- 7 Wang W L, London W T, Feitelson M A. Hepatitis B x antigen in hepatitis B virus carrier patients with liver cancer. Cancer Res. 1991, 51 4971.
- 8 Tada M, Omata M, Ohto M. Analysis of ras gene mutations in human hepatic malignant tumors by polymerase chain reaction and direct sequencing. Cancer Res, 1990, 50 1121.
- 9 Recharad C A, Short SA, Thorgeirsson SS et al. Characterization of a transforming N-ras gene in human hepatoma cell line Hep G2 additional evidence for the importance of c-myc and ras cooperation in hepatocarcinogenesis. Cancer Res, 1990, 50 (5): 1521.
- 10 房殿春, 罗元辉, 鲁荣等. 原发性肝癌组织癌基因 ras 和抑癌基因 p53 点突变研究. 第三军医大学学报, 1994, 16 340.
- 11 Leon M, Kew M C. Analysis of ras gene mutations in hepatocellular carcinoma in Southern African blacks. Anticancer Res, 1995, 15 859.
- 12 Doria M, Klein N, Lucito R et al. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of ras and nuclear activator of transcription factors. EMBO J, 1995, 14 (19): 4747.
- 13 McMahan G, Davis EF, Huber L J et al. Characterization of c-ki-ras and N-ras in aflatoxin B₁-induced rat liver tumors. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87 (3): 1104.

(责任编辑: 蒋汉明)