

人肝癌裸鼠移植瘤株 p53 基因突变及测序研究*

杨善民 周红 陈瑞川 王宇 郑耘 陈福

目的 研究从厦门同安肝癌高发区所建的裸鼠移植瘤(HHC₄、HHC₁₅)是否存在 p53 基因突变。**方法** 从两移瘤提取的总 DNA 用分子生物学方法检测并测序,如 PCR 方法扩增 p53 基因部分第7外显子,地高辛标记 DNA 探针斑点杂交法, DNA 限制性酶切片长度多态分析和激光荧光 DNA 测序等。**结果** HHC₄细胞 DNA 有 p53 基因第250密码子(C A)的突变; HHC₁₅有 p53 基因第249密码子(G T)的突变。**结论** HHC₄、HHC₁₅ p53 基因突变是肝癌发生的基础,与移植瘤来源地区 AFB₁的严重污染可能有关系。

关键词 人肝细胞癌 裸鼠 移植瘤 p53 基因突变

原发性肝癌的病因尚未明了,厦门市同安地区 1987~1989 年肝癌粗死亡率达 44.75/10 万人,标化死亡率仅次于广西扶绥,成为全国第二肝癌高发区^[1]。1991 年笔者从厦门市同安县肝癌病人肝癌组织建立了人肝癌裸鼠移植瘤株 HHC₄^[2]、HHC₁₅^[3]。流行病学调查资料表明,同安地区是食品中黄曲霉素 B₁ (AFB₁) 污染严重^[1]和乙肝病毒(HBV)感染率较高的地区^[4],但该地区原发性肝癌的分子病理学研究资料尚缺乏。笔者拟应用分子生物学、激光荧光 DNA 测序等方法证实 HHC₄和 HHC₁₅存在 p53 基因突变,报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 pBR322 质粒、蛋白酶 K、Hae^Ⅲ、BamH^Ⅰ、及 Taq 酶均为 Promega 公司产品。地高辛标记检测试剂盒及 DNA 测序试剂盒分别购自 Boehringer Mannheim 和 PE-ABD 公司。硝酸纤维膜及相关生化试剂购自华美生物工程上海分公司,其他均为国产分析纯。php53 β 质粒(含全长野生型 p53c DNA)由天津医科大学刘恩莉教授惠

赠。

1.2 动物及移植瘤株 BALB/CA 裸小鼠(SPF 级)由本单位医学实验动物室提供,6~8 周龄,平均体重 18 \pm 2 g,雌雄兼用。HHC₄、HHC₁₅人肝癌移植瘤株由本单位细胞生物学研究室建立,按文献[3,4]方法接种和传代。

1.3 DNA 提取 取水平传数十代的裸鼠移植瘤株 HHC₄、HHC₁₅的瘤组织 0.2 g,置于研钵中,注入少量液氮,将冰冻的组织捣碎,研成粉状,参照文献[5]方法,以 SDS 裂解,蛋白酶 K 消化以及酚/氯仿抽提法提取 DNA,乙醇沉淀,75% 乙醇洗涤后溶于 TE 液中,-20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.4 PCR 扩增和产物鉴定 以上述方法提取的 DNA 为模板,PCR 法扩增 p53 基因第7外显子部分序列。PCR 引物设计参照文献[6],为 P₁₅-GTTGGCTCTGACTGTACCAC-3 和 P₂₅-CTGGAGTCTTCCAGTGTGAT-3。PCR 共设 40 个循环,首次循环条件是:94 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、72 $^{\circ}$ C 各 1 min,其余 39 个循环条件是 94 $^{\circ}$ C (30 s)、55 $^{\circ}$ C (45 s)、72 $^{\circ}$ C (1 min),72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 扩增产物按设计为 110 碱基对。将 php53 β 质粒用 BamH^Ⅰ 酶切出 DNA (2.0 kb),按试剂盒说明,用随机引物延伸法制备地高辛标记探针,然后按文献[7]方法进行

* :福建省“八五”肝癌攻关项目(85003-01-10,85003-01-12)
厦门大学抗癌研究中心(厦门 361005)

PCR 产物的斑点杂交验证。pBR322质粒按文献[7]方法进行扩增、DNA 提取和 PCR 反应。

1.5 PCR 产物的限制性酶切片段长度多态分析(RFLP) 取 p53第7外显子 PCR 扩增产物5~10 μ l, 加入 Hae III (Promega) 7~10 U 在37 $^{\circ}$ C 酶切6 h, 乙醇沉淀, 真空干燥, 溶于蒸馏水20 μ l 中, 用15%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 溴化乙啶(EB) 染色后, 紫外透射仪上观察、拍照。

1.6 DNA 测序 两移植瘤 DNA p53基因第7外显子 PCR 扩增产物经琼脂糖电泳, 低熔点琼脂糖分离纯化, 参照 Taq Dye DeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit 方法进行荧光标记。取纯化的 PCR 扩增产物1 pmol, 加上上述 p53基因引物 P₁ 及其他反应试剂至20 μ l, 于 TC9600 PCR 扩增仪(PE 公司)上进行扩增。PCR 循环条件是: 95 $^{\circ}$ C 先变性5 min, 然后95 $^{\circ}$ C (15 s), 50 $^{\circ}$ C (1 s), 60 $^{\circ}$ C (3 min) 共20个循环。按试剂盒说明, 采用 Spin Column 纯化结合荧光的 DNA 片段, 去除未结合、游离的 dNTP 等。-70 $^{\circ}$ C 下乙醇沉淀。纯化了了的 PCR 扩增产物, 真空干燥, 溶于 DNA 溶解保护液6 μ l(去离子甲酰胺5 μ l 和 50 mmol/L EDTA 1 μ l, pH 8.0) 中。取 DNA 90 $^{\circ}$ C 变性2 min, 然后加样于6% 聚丙烯酰胺凝胶板上, 电泳过夜, 由全自动荧光测序仪 (Applied Biosystems 373A DNA Sequencer) 收集信号, 编辑分析 DNA 序列。

2 结果

2.1 PCR 产物鉴定 HHC₄和 HHC₁₅癌组织提取纯化后 DNA、php53 β 质粒和 pBR322质粒 DNA 经 p53基因第七外显子特异性引物 PCR 扩增, 扩增产物点膜后进行斑点杂交, 显示 HHC₄(A) 和 HHC₁₅(B) 及 php53 β 质粒(C) 均为杂交阳性, 即棕褐色标记(图1)。pBR322(D) 则为阴性, 表明该 PCR

引物设计具有较好的特异性。

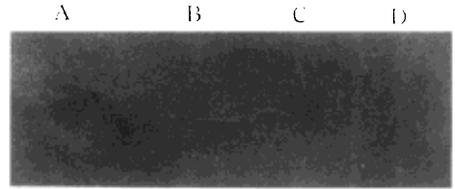


图1 HHC₄(A)、HHC₁₅(B) p53基因第7外显子 PCR 扩增产物与标记上地高辛的 p53基因的 Dot blot 杂交显示棕色斑点
C: 为阳性对照(p_{hp53 β}), D: 为阴性对照

2.2 PCR 产物的 RFLP 分析 HHC₄和 HHC₁₅癌组织提取纯化后 DNA、php53 β 质粒的 PCR 产物经 Hae III 酶切后的电泳图谱见图2。php53 β 质粒(含野生型 p53 cDNA) 的 PCR 产物显示110 bp 的扩增条带, 扩增产物经 Hae III 核酸内切酶识别并切断成75 bp 和 35 bp 两个片断(A 泳道), 即249~250号密码子处的序列未发生改变。HHC₄、HHC₁₅ DNA 的 PCR 扩增产物不能被 Hae III 酶切, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳中显示单一110 bp 泳带(图2C、D 泳道), 提示第249或250号密码子已发生突变。

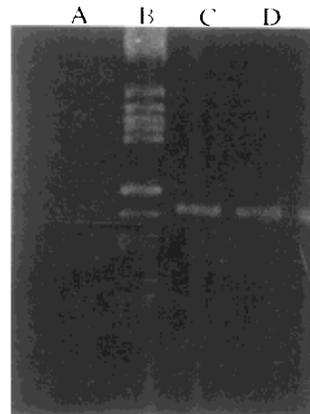


图2 HHC₄(C)、HHC₁₅(D) p53基因第7外显子不被 Hae III 水解, 显示单一泳带, 能被水解的第7外显子(A)显示两条带。
B: 为 DNA 分子量标志(pBR322/Hae III)

2.3 PCR 产物测序 两移植瘤 HHC₄和 HHC₁₅ DNA 的 p53基因第7外显子 PCR 部分

扩增产物经全自动荧光标记 DNA 测序(如图3, 4), HHC₄显示第250号密码子存在 CCC ACC 突变; HHC₁₅显示第249号密码子存在 AGG AGT 突变。



图3 HHC₄ p53基因第7外显子 DNA 测序
250密码子有 C A 突变。



图4 HHC₁₅ p53基因第7外显子 DNA 测序
249密码子有 G T 突变。

3 讨 论

已报道晚期肝癌病人约30%~60%有 p53基因的突变, 在世界上某些区域, 如亚洲、非洲, AFB₁是导致肝癌 p53抑癌基因突变的最常见的致癌因素^[8-10]。AFB₁常引起 p53基因249密码子的突变, 有突变“热点”之称^[8], 原因尚未明了。p53基因是一种抑癌基因, 其突变与多种肿瘤发生有密切关系, 近来的研

究表明, 用突变不同的 p53基因外显子转化正常人乳腺上皮, 能使上皮细胞在体外培养形成永生细胞系, 并有端粒酶的激活^[11]。

研究已表明, 正常 p53基因编码蛋白控制 DNA 受损伤的增生细胞终止在 G₁期^[12]或凋亡^[13], 这是正常的 p53蛋白直接诱导产生 p21蛋白, 后者是细胞周期蛋白激酶 CDK₂和 CDK₄的抑制因子, 能使细胞终止在 G₁期。p53基因突变如第249密码子突变由原来的精氨酸变成丝氨酸^[14]或其他突变, 均使异常 p53蛋白不能与细胞 DNA 中的 p21基因促进子结合^[15], 从而 p21蛋白转录异常, DNA 受损伤的细胞没能终止在 G₁期, 分裂持续进行。

动物实验中已证实 AFB₁有很强的致癌作用, 大鼠饲喂 AFB₁所发生的肝癌数目与剂量密切相关^[16]。AFB₁污染食物的长期摄入以及它所造成的肝细胞坏死与再生, 肝脏增生细胞一旦有 p53基因的突变, 根据肿瘤发生“端粒假说”的理论, 增生的细胞不断分裂, 端粒 DNA 持续变短, 当它缩短到一定程度到“临界状态”(crisis), 端粒酶被激活, 这是肿瘤细胞发生的基础^[17], 两移植瘤 p53基因的突变可能与本地区 AFB₁严重污染有关。人肝癌 p53基因250密码子发生突变尚未见报道^[18]。本研究结果可为该地区肝癌高发因素的分析提供分子病理学依据, 也为肿瘤基因治疗研究提供有价值的动物模型。

参考文献

- 1 林 浪, 徐蕴芹, 施美德, 等. 同安县4种常用食品 AFB₁污染情况调查. 福建医学院学报, 1992; 26: 77
- 2 杨善民, 赵玉华, 陈 福, 等. 双标记人肝癌裸鼠实验研究. 北京实验动物科学, 1992; 19: 24
- 3 杨善民, 郑 耘, 傅寿宁, 等. 人肝癌裸鼠移植瘤株 HHC₁₅的建立. 中国实验动物学杂志, 1995; 5: 10
- 4 孙昌盛, 任金香, 薛常锦, 等. 福建省同安县肝癌危险因素的条件 logistic 回归分析. 福建医药杂志, 1994; 16: 63

- 5 Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor University Press, 1989; 463
- 6 Harlow ED, Williamson NW, Ralston R, et al. Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53. *Molec Cell Biol*, 1985; 5: 1601
- 7 王申五(编). 基因诊断技术. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社出版, 1993; 119
- 8 Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, et al. Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Nature*, 1991; 350: 427
- 9 Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. p53 mutation in human cancer. *Science* 1991; 253: 49
- 10 Bressac B, Kew M, Wand S, et al. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 1991; 350: 429
- 11 Gollahon LS, Shay JW. immortalization of human mammary epithelial cells transfected with mutant p53. *Oncogen*, 1996; 12: 4
- 12 Kastan MB, Kuerbitz SJ. Control of G1 arrest after DNA damaged. *Environ Health Perspect Suppl*, 1993; 101: 55
- 13 Baker J, Morkovitz S, Fearon ER, et al. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, 1990; 249: 912
- 14 Prives C. How loops, β sheets and α helices help us to understand p53. *Cell*, 1994; 78: 543
- 15 Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein B, et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 1994; 54: 4855
- 16 Okuda K, Ishak KG. *Neoplasms of the liver*. New York: Springer Verlag, 1987; 10
- 17 Wright WE, Shay JW. Time, telomere and tumours: is cellular senescence more than an anticancer mechanism? *Trends Cell Biol* 1995; 5: 293
- 18 Heskett R. *The oncogene facts book*. Machays: Chatham PLC, 1995: 313

Studies of p53 Gene Mutation in the Xenografts of Human Hepatocellular Carcinoma in Nude Mice

Yang Shanmin, Zhou Hong, Chen Ruichuan, et al
(Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Objective To investigate whether p53 gene mutation presented in the xenografts (HHC₄, HHC₁₅) of nude mice set up in Tong'an Area Xiamen with high mortality of HHC.

Methods Total DNA extracted from two xenografts were analysed by molecular biological methods, such as PCR amplification of a fragment of p53 exon 7, dot blot filter hybridization with digoxigenin-labeled DNA probe, restriction fragments length polymorphisms and DNA sequencing.

Results The mutation at 250 codon(C → A) in p53 was determined in DNA of HHC₄ xenograft and at 249 codon(G → T) in DNA of HHC₁₅. **Conclusions** It is reasonable that p53 gene mutation is responsible for the carcinogenesis of HHC and may be a result of the high pollution of AFB₁.

Key words human hepatocellular carcinoma nude mice xenograft p53 mutation

(收稿: 1997-07-07 修回: 1997-12-22)