

脑胶质瘤中 *P53* 基因突变及其与染色体 17p 杂合性丢失的比较

金卫新¹ 杨天明² 董雪吟¹ 华子春¹ 徐贤秀¹

(1. 医药生物技术国家重点实验室 南京大学生物化学系 南京 210093 2. 南京铁道医学院附属医院脑外科 南京 210009)

摘要:为进一步阐明 *P53* 基因突变和染色体 17p 杂合性丢失(LOH)的关系及两者与脑胶质瘤发生发展的相关性。应用 PCR-SSCP、DNA 序列测定及 RFLP 分析方法对 55 例脑胶质瘤中的 *P53* 基因突变及染色体 17p 的杂合性丢失进行了检测。发现 *P53* 基因在高级别星型细胞肿瘤(III-IV 级)、低级别星型细胞肿瘤(I-II 级)和非星型细胞肿瘤中的突变频率分别为 53%(9/17)、7%(1/15)和 9%(2/23)。而 55 例肿瘤组织对应的淋巴细胞中未见 *P53* 突变。22% 的胶质瘤丢失 1 个 17p 等位基因,这部分肿瘤中 *P53* 基因的突变频率为 50%(6/12),而在 43 例持有 2 个 17p 等位基因的肿瘤中,*P53* 基因的突变频率降为 14%,两组相比差异显著($P < 0.025$)。结果提示 *P53* 基因突变是星型细胞肿瘤演变过程中的一个常见遗传事件,可能标志着肿瘤的恶性进展;散发性脑胶质瘤中的 *P53* 突变是体细胞型的突变;另外,丢失 1 个 17p 等位基因的肿瘤中有 50% 缺少 *P53* 基因突变,提示染色体 17p 上可能存在另一个参与了部分肿瘤恶性演变的肿瘤抑制基因。

关键词: 脑胶质瘤/遗传学;*P53* 基因;杂合性丢失

中图分类号:R739.41

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2000)06-0357-04

P53 Mutation in Human Brain Gliomas: Comparison of Loss of Heterozygosity with Mutation Frequency

JIN Wei-xin¹, YANG Tian-ming², DONG Xue-yin¹, HUA Zi-chun¹, XU Xian-xiu¹

(1. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

2. Department of Neurosurgery, The Affiliated Hospital of Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009, China)

Abstract: To further illustrate the roles of *P53* gene and loss of heterozygosity (LOH) on chromosome 17p in the development of malignant gliomas, mutations in the *P53* gene were analyzed in 55 gliomas of various malignant grades and histological types by the polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technique and were confirmed by sequencing. Loss of heterozygosity (LOH) for chromosome 17p was also assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in same tumors. The mutations did not follow a random distribution among various different subtypes, but occurred in 9 of 17 high-grade astrocytomas (53%), in 1 of 15 low-grade astrocytomas (7%) and in 2 of 23 (9%) non-astrocytic tumors. Most of the mutations were missense ones and 42% (5/12) occurred at the sites of CpG dinucleotide. *P53* mutations were not detected in any of the 55 leukocyte DNA samples from patients with brain tumors. These studies demonstrated that *P53* inactivation is a common genetic event in astrocytoma progression that may signal the transition from benign to malignant tumor stages. *P53* gene mutations in sporadic human brain tumors are somatic in origin (i.e., nonprenatally determined). The majority of gliomas (43/55) analyzed here retained both 17p alleles. The frequency of *P53* mutations was 14% in this group of tumors and increased to 50% (6/12) in tumors with one 17p allele ($P < 0.025$). Allelic loss for chromosome 17p occurred in 6 of 12 gliomas independently of mutations in the *P53* gene. Absence of *P53* mutations in 50% of the tumors with one allele suggests that a tumor suppressor gene

收稿日期:1999-11-15;修回日期:2000-02-02

基金项目:国家自然科学基金(批准号 39570714)

作者简介:金卫新(1967-),男,江苏南京人,硕士学位,讲师,从事分子生物学研究多年。

other than *P53* may be located on chromosome 17p and involved in progression to malignancy of some gliomas.

Key words: glioma-genetics; genes - *P53* - genetics; loss of heterozygosity

肿瘤分子生物学的研究表明,肿瘤的发生发展不仅与环境因素有关,更与多种遗传改变的不断累积相关。这种遗传改变包括肿瘤抑制基因的失活、原癌基因的激活等。其中研究最多的肿瘤抑制基因是 *P53* 基因(定位于 17p13.1),*P53* 基因的表达产物 p53 蛋白是一个多功能的转录因子,在细胞周期的调控、维持细胞基因组的完整性、诱发细胞分化和凋亡中起着重要的作用。*P53* 基因的失活将会使其丧失肿瘤抑制功能并获得致癌性,从而使得癌前细胞获得某种生长选择优势^[1]。已有的研究工作表明,脑肿瘤中,尤其是星型细胞肿瘤中,经常发生 *P53* 基因突变和/或染色体 17p 杂合性丢失^[2,3,4]。为了了解 *P53* 基因突变和 17p 的 LOH 与脑胶质瘤发生发展的相关性以及两者的相互关系,我们对 55 例不同类型和级别的脑肿瘤组织中 *P53* 基因突变及 17p 的 LOH 进行了检测。

1 材料与方 法

1.1 标本收集

55 例脑肿瘤手术标本及相应的外周血淋巴细胞均来自南京铁道医学院附属医院脑外科。所有标本参照 WHO 分类标准进行分型分级。这些标本的组织病理资料为:星型细胞肿瘤 32 例,包括毛细胞型星形细胞肿瘤(WHO I 级)7 例、星形细胞瘤(WHO II 级)8 例、间变性星形细胞瘤(WHO III 级)6 例、多形性胶质母细胞瘤 11 例(WHO IV 级);非星型细胞肿瘤 23 例,包括髓母细胞瘤 10 例、极性成胶质细胞瘤 5 例、室管膜瘤 7 例和室管膜母细胞瘤 1 例。所有标本离体后均经病理证实,于液氮中冷冻后,-70℃ 长期保存。

1.2 DNA 提取和 RFLP 分析

肿瘤组织和正常对照 DNA 按常规酚/氯仿方法提取。10~15μg DNA 样品用限制性内切酶 *RsaI* 完全消化后,经 1.2% 凝胶电泳后,转移到尼龙膜(BioTrace HP, Gelman Science)上,80℃ 30min 固定 DNA。用 α-³²P-dATP(北京亚辉)对探针 pYNZ22 和 p144D6(两种探针均购自 ATCC)进行随机引物标记,按 Gelman 公司产品说明进行杂交,杂交后的膜片放射自显影,观察 17p13 的 LOH。

1.3 PCR 引物

引物由中科院上海植物生理研究所合成,4 对引物分别扩增 *P53* 基因的外显子 5、6、7、8,引物名称及序列如下:

P5-5 5' - CAGTACTCCCCTGCCCTCAA - 3';

P5-3 5' - CATCGCTATCTGAGCAGC - 3';

P6-5 5' - GATTGCTCTTAGGTCTGGCCCCCTCCTCAGC - 3';

P6-3 5' - CAGTTGCAAACCAGACCTCAGGCG - 3';

P7-5 5' - CTAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCC - 3';

P7-3 5' - TGACCTGGAGTCTTCCAGTGTG - 3';

P8-5 5' - TGAGTAGTGTAATCTACTGGGACGG - 3';

P8-3 5' - TTCCTTCGCTTAGTGCTCCCTGG - 3'。

1.4 PCR - SSCP 分析

PCR 扩增条件为 94℃4min,94℃40s,55℃40s,72℃40s(30 个循环),72℃7min,50μl 体积。10μl PCR 产物变性后,于 8% 非变性聚丙烯酰胺(含 5% 甘油)凝胶中电泳分离,电泳条件为 3~4W,12~18hr。电泳完毕后,取下胶,按文献方法进行银染色^[5]。

1.5 DNA 序列分析

以不对称 PCR 扩增单链 DNA,以单链 DNA 为模板进行测序反应^[6]。测序反应参照 T7 DNA sequencing system (Shanghai Promega)试剂盒进行。每个标本分别作 3 次测定,以确定所检结果不存在 PCR 非特异性问题。

1.6 统计学方法

χ² 检验,四格表精确概率法。

2 结果与讨论

55 例肿瘤标本均扩增出特异性片段,12 例显示有 SSCP 异常电泳迁移条带,对这 12 例肿瘤标本的对应外周血淋巴细胞 DNA 及其它标本的对照 DNA 进行的 PCR - SSCP 分析未发现异常迁移带,提示这种 *P53* 基因突变仅限于肿瘤组织。序列分析证实这 12 例标本均存在 *P53* 基因突变,其中 11 例为错义点突变,1 例为插入 4 个碱基的移码突变(见表 1 和图 1)。12 例突变中 7 例是碱基转换,4 例为碱基颠换,碱基转换大部分(5/7)发生于 CpG 位点。25%(3/

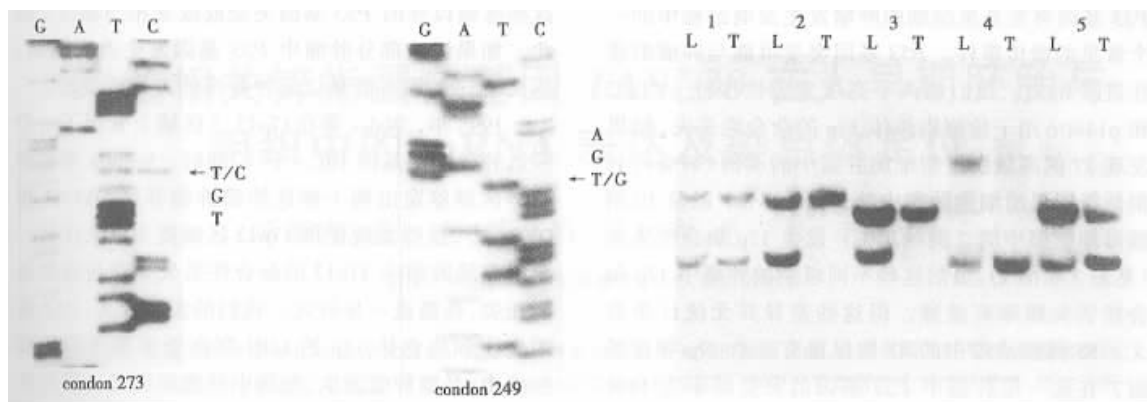


图 1 P53 突变的序列分析

图示 P53 基因 273 位密码子 (病例 AA36) 由野生型 CGT 突变为 TGT, 249 位密码子 (病例 GB4) 由野生型 AGG 突变为 AGT。在病例 AA36 中, 可见野生型和突变型条带, 而病例 GB4 中仅见突变型条带。“/”后为野生型碱基序列。

Fig. 1 DNA sequences of P53 mutations detected in PCR-amplified fragments

Representative DNA sequences of P53 mutations are shown for codon 273 (case AA36, CGT→TGT) and 248 (case GB4, AGG→AGT). In case AA36, both wild-type and mutant nucleotide sequences were seen in the sequencing ladder (arrowhead); while in case GB4, only the mutant nucleotide sequence was seen (arrowhead). The wild-type sequences in the mutated sites follow the slash bar.

12) 的突变发生于 273 位密码子, 在许多其它肿瘤中这个位点也经常发生突变^[1]。从表 2 可知, P53 基因突变在各个病理类别中的分布是非随机的, 32 例星

图 2 脑胶质瘤中 17p13 的杂合性丢失

L 淋巴细胞; T 肿瘤组织。

图示探针 pYNZ22 的杂交图谱, 2、3、4 号发生 17p13 杂合性丢失。

Fig. 3 RFLP analysis of loss of heterozygosity for chromosome 17p13 in gliomas.

L: leukocyte DNA, T: tumor DNA. Panel 2, 3, 4 showed loss of heterozygosity with chromosome 17p marker, pYNZ22.

型细胞肿瘤中有 10 例存在 P53 基因突变, 而 23 例非星型细胞肿瘤中仅 2 例存在 P53 基因突变。同时, 我们发现高级别星型细胞肿瘤 (WHOIII - IV 级) 和低级别星型细胞肿瘤 (WHOI - II 级) 中 P53 基因的突变频率有显著差异 ($P < 0.025$)。Fults 等人也有类似的结果, 他们发现在 25 例星型细胞肿瘤 (WHO IV 级) 中有 7 例 (28%)、14 例星型细胞肿瘤 (WHOIII 级) 中有 5 例 (36%) 存在 P53 基因突变, 而 6 例低级别的星型细胞肿瘤中无一例突变^[3]。这些结果提示:

表 1 脑胶质瘤病例的 P53 基因突变

Table 1 Mutations of the P53 gene in human gliomas

病例	肿瘤类型	外显子	位点	序列改变	氨基酸改变	17p 等位基因数目
GB2	GBM	8	273	CGT→TGT*	Arg→Cys	1
GB3	GBM	5	138和139位插入5'TGCA3'四个碱基*			1
GB4	GBM	7	249	AGG→AGT*	Arg→Ser	1
GB6	GBM	6	205	TAT→TCT#	Tyr→Ser	2
GB17	GBM	7	251	ATC→AGC#	Ile→Ser	2
GB45	GBM	5	175	CGC→CAC*	Arg→His	1
AA5	AA	5	179	CAT→CGT#	His→Arg	2
AA16	AA	8	273	CGT→TGT*	Arg→Cys	1
AA36	AA	8	273	CGT→TGT#	Arg→Cys	2
A14	AS	5	173	GTG→ATG*	Val→Met	1
EB13	EB	8	283	CGC→TGC#	Arg→Cys	2
P27	PA	5	148	GAT→CAT#	Asp→His	2

注 GBM: 多形性胶质母细胞瘤; AA: 间变性星型细胞瘤; AS: 星型细胞瘤; EB: 室管膜母细胞瘤; PA: 极性成胶质细胞瘤。

* 突变位点没有或几乎没有野生型条带; # 突变位点同时存在野生型和突变型条带。

P53 基因突变是星型细胞肿瘤发生发展过程中的一个常见的遗传事件, *P53* 基因突变可能与肿瘤的恶性进展相关。我们用两个高度多态性探针 pYNZ22 和 p144D6 用于检测染色体 17p 的杂合性丢失, 结果发现 17 例高级别星型细胞肿瘤中的 8 例 (47%), 15 例低级别星型细胞肿瘤中的 2 例 (13%) 以及 10 例髓母细胞瘤中的 2 例 (20%) 发生 17p 杂合性丢失 (见表 2 和图 2)。虽然这些不同级别的肿瘤中 17p 杂合性丢失频率有差异, 但这些差异并无统计学意义。55 例胶质瘤中的 43 例保留有 2 个 17p 等位基因, 在这一组肿瘤中 *P53* 基因的突变频率为 14% (6/43), 在另一组丢失 1 个 17p 等位基因的肿瘤中, *P53* 基因突变频率增加为 50% (6/12)。两组之间有显著性差异 ($P < 0.025$, $\chi^2 = 5.189$)。这些结果提示 *P53* 基因突变和 17p 杂合性丢失在肿瘤的形成过程中紧密相连, *P53* 基因可能是染色体 17p 等位基因丢失的靶子。在这些肿瘤中, *P53* 基因的一个拷贝通过染色体缺失而失活, 另一个拷贝则通过突变而失活。另外, 在本研究中有 6 例标本同时存在野生型和突变型的 *P53* 等位基因 (见表 2)。在这些标本中, *P53* 基因的功能通过所谓的“显性负效应”而失活。因而, *P53* 基因正常功能的丧失并不需要两个基因座位同时失活。

虽然我们观察到在丢失一个 17p 等位基因的标

表 2 脑胶质瘤中的遗传改变

Table 2 Frequency of genetic changes in 55 gliomas

肿瘤类型和级别	例数	<i>P53</i> 突变 (%)	LOH17p (%)
星型细胞肿瘤 (III - IV)	17	9(53%) ^a	8(47%) ^b
星型细胞肿瘤 (I - II)	15	1(7%)	2(13%)
非星型细胞肿瘤	23	2(9%)	2(9%)

注 a. 和星型细胞肿瘤 I - II 级比较: $P < 0.025$ ($\chi^2 = 5.935$);

b. 和星型细胞肿瘤 I - II 级比较: $P > 0.05$ ($\chi^2 = 2.795$)。

本中 *P53* 基因有较高的突变率 (50%), 但我们同时也注意到另外 50% 的标本中并未检测到 *P53* 基因的突变。对这个发现有这样两种可能的解释: 1) *P53* 基因突变存在于我们检测的区域以外或 *P53* 基因以另外的方式失活; 2) 在这些肿瘤中 *P53* 基因并不是 17p 杂合性丢失的靶基因, 也就是说, 有另外一个肿瘤抑制基因可能存在于 17p 上。由于 95% 以上的 *P53* 基因突变发生于我们所检测的区域^[1], 发生于

这些区域以外的 *P53* 基因突变或改变相当稀少。因此, 如果说这部分肿瘤中 *P53* 基因发生改变的话, 那么 *P53* 基因可能是以某种特殊的方式改变的。

1995 年, Wales 等在 17p13.3 区域上发现了一个候选肿瘤抑制基因 HIC - 1^[7], 同时, Schults 等也在同样区域鉴定出两个候选肿瘤抑制基因 OVCA1 和 OVCA2^[8], 这些发现使得 17p13 区域更为引人注目。至于在脑肿瘤中 17p13 的杂合性丢失是否与这些基因相关, 尚需进一步研究。我们的实验证实, *P53* 基因突变和染色体 17p 的 LOH 存在于多种类型的脑肿瘤中, 是脑肿瘤发生、发展中的重要因素。研究表明, 除 *P53* 基因突变外, 许多其它遗传事件, 如 *MDM2* 基因扩增、*P16* 基因的缺失等参与了脑肿瘤的演变过程^[9]。可以预见, 进一步的研究将会使我们更加了解脑肿瘤发生发展的本质, 并使我们有希望发展出更加有效的治疗手段。

参考文献:

- [1] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. *P53* mutations in human cancers[J]. Science, 1991, 253(5051): 49 ~ 53.
- [2] Li Y, Millikan R C, Carozza S, Newman B, et al. *P53* mutations in malignant gliomas[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1998, 7(4): 303 ~ 308.
- [3] Fuhs D, Brockmeyer D, Tullous M W, et al. *P53* mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression[J]. Cancer Res, 1992, 52(3): 674 ~ 679.
- [4] Chattopadhyay P, Rathore A, Mathur M, et al. Loss of heterozygosity of a locus on 17p13.3, independent of *P53*, is associated with higher grades of astrocytic tumors[J]. Oncogene, 1997, 15: 871 ~ 874.
- [5] Peng H, Du M, Ji J, et al. High resolution SSCP analysis using polyacrylamide agrose composition gel and a background free silver staining method [J]. BioTechniques, 1995, 19(3): 411 ~ 413.
- [6] Yi S, Glenn H, Nancy H C. A simple method using PCR for direct sequencing of genomic DNA from frozen tumor tissue embedded in optimal cutting temperature compound[J]. BioTechniques, 1992, 12: 639 ~ 640.
- [7] Wales M W, Biel M A, Deiry W E, et al. *P53* activates expression of HIC - 1, a new candidate tumor suppressor gene on 17p13.3[J]. Nat Med, 1995, 1: 570 ~ 577.
- [8] Schults D C, Vanderveer L, berman D B, et al. Identification of two candidate tumor suppressor genes on chromosome 17p13.3[J]. Cancer Res, 1996, 56: 1997 ~ 2002.
- [9] Sandra A, Rempel. Molecular biology of central nervous system tumors [J]. Curr Opinion Oncol, 1998, 10: 179 ~ 185.