

## 大肠癌中 p53 基因突变的研究<sup>①</sup>

吴国俊<sup>1,2</sup> 李明发<sup>1</sup> 单祥年<sup>1</sup> 余 龙<sup>2</sup> 赵寿元<sup>2</sup>

(1. 南京铁道医学院生物学教研室, 南京 210009) (2. 复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

**摘要** 应用聚合酶链反应(PCR)—单链构型多态性(SSCP)结合银染法对 14 例大肠癌 p53 基因的第 4、第 5—6 和第 7 外显子进行了点突变的研究, 结果共检测出 6 例点突变, 而且发现各外显子的突变频率存在差异。另外, 利用购自 ATCC 的两个探针(p53cDNA 探针和 pYNZ 22 探针)对大肠癌中 p53 基因的杂合性丢失进行了研究, 在 14 例大肠癌中共检出 6 例杂合性丢失。将点突变检测结果同杂合性丢失结果进行比较分析, 并着重探讨了大肠癌中 p53 基因失活导致肿瘤的作用方式。

**关键词** 大肠癌, p53 基因, 单链构型多态性, 杂合性丢失

## A Study on Mutation of p53 Gene in Colorectal Cancer

Wu Guojun<sup>1,2</sup> Li Mingfa<sup>1</sup> Shan Xiangnian<sup>1</sup> Yu Long<sup>2</sup> Zhao Shouyuan<sup>2</sup>

(1. Department of Biology, Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009)

(2. Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433)

**Abstract** The exons 4—7 of p53 gene were examined in 14 colorectal Cancer patients by using PCR—SSCP—silver staining method. The results showed 6 cases of point mutation and the mutation frequencies of exons were different from each other. p53 cDNA and pYNZ22 VNTR were used as probes to examine LOH(Loss of heterozygosity) of 14 colorectal cancers. 6 cases with LOH were found. The results of present research suggest that the mutation and LOH of p53 gene are critical events in the progress and development of Cancer. There were different kinds of inactivation model of p53 gene in the process of development of cancer and transformation of cells.

**Key words** Colorectal cancer, p53 gene, SSCP, LOH

p53 基因是目前公认的最为广谱的一种抑癌基因。国内外学者对 p53 基因与多种肿瘤的相关性, 以及基因本身的结构进行了一系列研究<sup>[1—4]</sup>。本文应用 PCR—SSCP 结合银染法对人类肿瘤中发病率和死亡率较高的大肠癌进行了 p53 基因突变的检测, 并同时用购自 ATCC 的两个探针(p53 cDNA 探针, pYNZ 22 VNTR 探针)对 p53 基因的杂合性丢失进行了研究。通过对比分析两项研究结果, 着重探讨了大肠癌中 p53 基因失活导致肿瘤发生的作用方式。

### 1 材 料 与 方 法

#### 1.1 基因组 DNA 的制备

所有标本均由南京铁道医学院附属医院病理科提供并鉴定。大肠癌及癌旁正常组织各 14 份, 均取自手术切

<sup>①</sup>本课题由江苏省自然科学基金资助。

除标本。立即置 $-80^{\circ}\text{C}$ 备用。用常规蛋白酶处理及酚-氯仿提取法提取基因组 DNA。

## 1.2 PCR-SSCP 结合银染法

在 p53 基因内设计并合成 3 对 PCR 引物, 分别位于 p53 基因的第 4、第 5—6 和第 7 外显子。长度分别为 317、416 和 171bp(中国科学院细胞生物学研究所合成)。引物序列如下:

第 4 外显子 F 5'-GGA ATT CTT TTC ACC CAT CTA CAG TCC; R 5'-GGA ATT CCT CAG GGC AAC TGA CCG TGC; 第 5—6 外显子 F 5'-GGA ATT CCT ATT CCT GCA GTA CTCC R 5'-GGA ATT CAG TTG CAA ACC AGA CCT CA; 第 7 外显子 F 5'-GGC CTC ATC TTG GGC CTG TG R 5'-CAG TGT GCAGGG TGG CAA GT。

扩增条件为  $93^{\circ}\text{C}$  45 秒、 $58^{\circ}\text{C}$  45 秒、 $72^{\circ}\text{C}$  1 分 30 秒, 30 个循环最后延伸  $72^{\circ}\text{C}$  8 分钟。反应体积  $50\mu\text{l}$ 。扩增产物取  $5\mu\text{l}$ , 加  $5\mu\text{l}$  变性加样液,  $95^{\circ}\text{C}$  变性 5 分钟。经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 3—5 小时后, 剥胶, 固定 20 分钟,  $\text{AgNO}_3$  染色 5 分钟, 显色至带型清晰为止。

## 1.3 Southern 杂交

$7.5\mu\text{g}$  基因组 DNA 用 40u 限制性内切酶 *ScaI* 和 *MspI*(pharmarcia 产品) 消化后, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 然后转移到 Hybond-N<sup>+</sup> 尼龙膜上,  $80^{\circ}\text{C}$  烘 1 小时, 备用。随机引物法标记探针。杂交用甲酰胺体系。 $42^{\circ}\text{C}$  预杂交 8 小时, 杂交 36 小时。洗膜用  $0.1\times\text{SSC}$ , 0.1% SDS  $60^{\circ}\text{C}$  半小时,  $42^{\circ}\text{C}$  1 小时。压上 X 光片,  $-70^{\circ}\text{C}$  放射自显影一周后冲片。

## 2 结 果

### 2.1 PCR-SSCP 的检测结果

在 14 例大肠癌样品中, 共检测到 6 例 PCR 产物单链存在迁移异常。突变率为 43%(见图 1)。而且各外显子突变频率不同, 第 4 外显子为 2/14(14%), 第 5—6 外显子为 3/14(21%), 第 7 外显子为 1/14(7%)。肿瘤的对正常组织中未检测到突变。

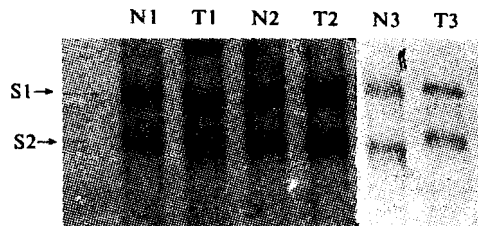


图 1 大肠癌中的 p53 基因点突变检测图示 (T1、T3 显示明显的带形迁移变化)

### 2.2 杂合性丢失的检测结果

利用 p53 cDNA 和 pYNZ22 VNTR 探针, 通过 Southern 杂交, 在 14 例大肠癌中共检出 10 例杂合性多态, 频率为 71%, 有 6 例杂合性丢失, 频率为 60%(见图 2, 3)。其中 p53 位点的杂合性多态 2 例, LOH 为 1 例 (50%), YNZ 22 位点杂合性多态 8 例, LOH 为 5 例(62%)。

## 3 讨 论

利用 PCR-SSCP 结合银染法在 14 例大肠癌中共检测到 6 例存在点突变, 突变率为 43%。此结果表明, 大肠癌中 p53 基因的点突变是个常发事件。由于 DNA 片段中碱基的变化对泳动率的影响结果是难以预计的, 因此, 只要电泳中肿瘤标本的单链带型与正常对照的单链位置不同, 即认为肿瘤 DNA 片断存在突变。如在本研究中,

T1 标本中两条单链的间距明显小于 N1 对应正常标本。而 T3 中 S2 单链也明显低于 N3 的 S2 位置。另外, 在其它一些标本中, 肿瘤标本与正常对照组织标本的 S1、S2 两条单链位置相同, 但肿瘤标本还存在另一条单链。这种情况, 我们认为这是由于肿瘤组织中混有未剔除干净的正常组织所致。

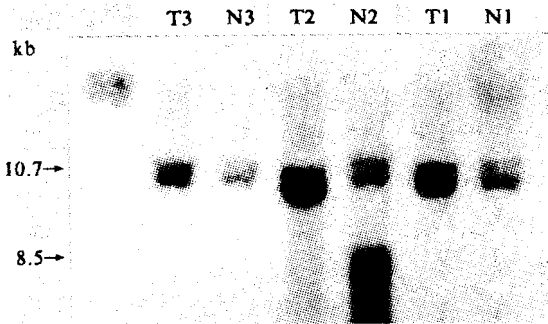


图2 大肠癌中的 p53 基因 p53 位点 LOH 的检测  
T2 显示杂合性丢失, 标本 1、3 未见杂合性;  
基因组 DNA 为 *Sca* I 酶切。

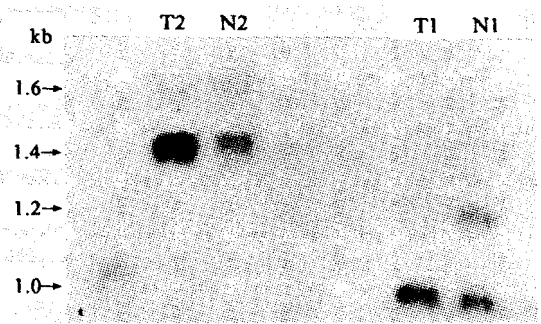


图3 大肠癌中的 p53 基因 pYNZ 22 位点杂合性丢失  
T1、T2 显示明显杂合性丢失; 基因组 DNA  
为 *Msp* I 酶切。

用于本研究中检测出的 6 例点突变病例, 我们将继续进行 DNA 序列分析, 以明确突变的确切形式, 其结果将另文报道。我们在 14 例大肠癌中共检出 6 例杂合性丢失, 表明在肿瘤的发生过程中, p53 基因的杂合性丢失是继基因点突变后的又一常发事件。

在研究 p53 基因杂合性丢失时, 我们用了两个探针, 一个是 p53 的 cDNA 探针; 另一个是 pYNZ 22 探针, 来自基因组的 D17S5 位点, 即人类染色体的 17P13.3。目的是了解大肠癌中 p53 基因本身的改变情况, 以及 p53 基因侧翼的序列变化信息。本研究中 p53cDNA 探针与 pYNZ 22 探针检测杂合性丢失的结果绝大多数不相一致的; 而且 pYNZ 22 位点杂合性丢失频率略高于 p53 位点。所以我们认为, pYNZ 22 探针检测出的杂合性丢失结果, 可能并不完全代表 p53 基因片段的缺失。要确证这种推测, 还有待于作进一步研究。

比较点突变和杂合性丢失的检测结果, 我们发现了 3 例大肠癌中 SSCP 的结果与 LOH 的结果是一致的。这一结果可以用 Knudson 的“二次突变”理论来解释<sup>[5]</sup>。另一方面, 还发现有 3 例大肠癌 p53 基因出现点突变但并不伴有 LOH。在这种情况下, 肿瘤的发生可以是突变 p53 基因的“显性负效应”(dominant negative effect)所致<sup>[6]</sup>。还有一部分肿瘤未检出 p53 基因突变和等位基因缺失, 这可能是由于我们检测的范围未能覆盖整个 p53 基因所致。

### 参 考 文 献

- (1) Fearon E R *et al*, 1990. *Cell*, 61(5): 759—767.
- (2) Levine A J *et al*, 1990. *Virology*, 177(2): 419—426.
- (3) Lane D P *et al*, 1992. *Nature*, 358(6381): 15—16.
- (4) Nigro J M *et al*, 1989. *Nature*, 342(6250): 705—708.
- (5) Knudson A G *et al*, 1985. *Cancer Res.*, 45(4): 1437—1443.
- (6) Su L K *et al*, 1993. *Cancer Res.*, 53(12): 2728—2731.

本文于 1995 年 9 月 21 日收到, 1996 年 1 月 15 日修回。