

[文章编号] 1000-4718(2009)04-0792-03

# 48例广西结直肠癌 p53 基因突变分析

李辰生<sup>1</sup>, 李乐平<sup>1</sup>, 李卫<sup>2</sup>, 高枫<sup>2Δ</sup>

(<sup>1</sup> 山东大学附属省立医院胃肠外科, 山东 济南 250021; <sup>2</sup> 广西医科大学普通外科, 广西 南宁 530021)

**[摘要]** 目的: 探讨广西地区结直肠癌 p53 基因突变范围。方法: 应用聚合酶链反应—单链构象多态技术和基因测序技术检测 48 例结直肠癌标本的 p53 基因, 包括外显子 2-11 及外显子内含子剪切位点。结果: 31.25% (15/48) 结直肠癌存在 p53 突变, 共有 13 种突变类型, 分别是: c.370T>G, c.524G>A, c.528C>G, c.529-546del18, c.536A>G, c.736A>G, c.743G>A, c.770-771del2, c.772G>T, c.814G>A, c.949delC, c.782+1G>A, 和 c.919+1G>C。c.524G>A 是最常见的突变类型, 占 18.75% (3/16)。60 岁以上结直肠癌 p53 基因突变率是 45.83%, 明显高于 60 岁以下的 16.27% (P<0.05)。直肠癌 p53 基因突变率是 47.83%, 明显高于结肠癌的 16.00% (P<0.05)。结论: IARC TP 53 突变数据库中 (2006 版本) 未见 c.370T>G 突变, c.370T>G 是个新突变。c.528C>G, c.949delC, c.782+1G>A 和 c.919+1G>C 突变在 IARC TP 53 结直肠癌突变数据库中 (2006 版本) 未见报道, 这些突变首次在结直肠癌中被发现。广西 p53 基因突变与其它地区有所不同。

**[关键词]** 结直肠肿瘤; 基因, p53; 基因突变

**[KEY WORDS]** Colorectal neoplasms; Genes, p53; Gene mutation

**[中图分类号]** R735 **[文献标识码]** A

结直肠癌的发生发展与多个癌基因的激活和抑癌基因的失活有密切联系<sup>[1-3]</sup>。目前, 关于 p53 基因的研究大多集中在外显子 5-8, 而关于其它外显子, 特别是外显子内含子剪切位点的研究少见报道, 因此, 我们应用聚合酶链反应—单链构象多态技术 (polymerase chain reaction - single strand conformation polymorphisms, PCR - SSCP) 和基因测序技术对广西地区 48 例结直肠癌标本的 p53 基因, 包括外显子 2-11 及外显子内含子剪切位点, 进行检测。

## 资料和方法

### 1 一般资料

收集广西地区根治性结直肠癌切除标本 48 例, 每例均取距肿瘤 10 cm 以上大肠粘膜作对照, 48 例中, 男 33 例, 女 15 例, 中位年龄 58 岁 (23-86 岁)。直肠癌 23 例, 结肠癌 25 例。Dukes' A 期 10 例, Dukes' B 期 14 例, Dukes' C 期 12 例, Dukes' D 期 12 例。DNA 用常规酚-氯仿法抽提。

### 2 巢式 PCR 和 SSCP

巢式 PCR 扩增 p53 基因 11 个片段, 包括所有外显子编码区及外显子内含子剪切位点, p53 基因结构、p53 蛋白结构、p53 引物位置及 p53 突变位置见图 1。我们发现 SSCP 电泳温度与 DNA 碱基组成有关, 得出经验公式: SSCP 电泳温度 = [80 × 碱基 C 个数 / (碱基 A 个数 + 1)] / {2.71 + [碱基 C 个数 / (碱基 A 个数 + 1)]}, 根据经验公式可大大提高检测效率<sup>[4]</sup>。首先扩增外引物 AB、CD、17F 和 E25 片段, 以 AB 为模板扩增 p53 - I、p53 - II、p53 - III 和 p53 - IV; 以 CD 为模板扩增 p53 - V、p53 - VI、p53 - VII、p53 - VIII 和 p53 - IX; 以 17F 为模板扩增 p53 - X; 以 E25 为模板扩增 p53 - XI。p53 基因扩增片段引物序列及 SSCP 反应条件见表 1。PCR 外引

物反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 71℃ 3 min, 35 个循环。内引物以稀释 30 倍的外引物扩增产物为模板进行 PCR, 反应条件是: 94℃ 预变性 1 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 71℃ 1 min, 30 个循环。取 PCR 内引物产物上样于 10 cm × 10 cm 12% 聚丙烯酰胺凝胶中行 SSCP 分析。

### 3 基因测序和统计学分析

SSCP 所发现的异常片段均进行正反双向 DNA 测序。所用测序仪器为 ABI PRISM 377-96, 测序试剂为 Big Dye terminator v2.0。资料经  $\chi^2$  检验处理。

## 结果

31.25% (15/48) 结直肠癌存在 p53 突变, 共有 13 种突变类型, 分别是: c.370T>G, c.524G>A, c.528C>G, c.529-546del18, c.536A>G, c.736A>G, c.743G>A, c.770-771del2, c.772G>T, c.814G>A, c.949delC, c.782+1G>A 和 c.919+1G>C。p53 基因突变 SSCP 结果见图 2, 均经正反双向 DNA 测序证实, 基因测序结果见图 3。c.524G>A 是最常见的突变类型, 占 18.75% (3/16); 其次是 c.536A>G, 占 12.5% (2/16); 其余每个突变类型各占 6.25% (1/16)。所有突变类型均为杂合子突变。一例为双重杂合子突变, 既有 c.370T>G 突变, 又有 c.529-546del18 突变。c.736A>G 突变在肿瘤组织和正常组织中均存在, 可能是性细胞突变, 其余突变类型均在肿瘤组织中存在, 而在正常组织中不存在。60 岁以上结直肠癌 p53 基因突变率是 45.83%, 明显高于 60 岁以下的 16.27% (P<0.05)。直肠癌 p53 基因突变率是 47.83%, 明显高于结肠癌的 16.00% (P<0.05)。p53 基因突变率与性别、分化程度、肿瘤大小、远处转移、Dukes' 分期和 5 年生存率无关。

[收稿日期] 2008-04-11 [修回日期] 2008-09-08

Δ 通讯作者 E-mail: chensheng76@163.com

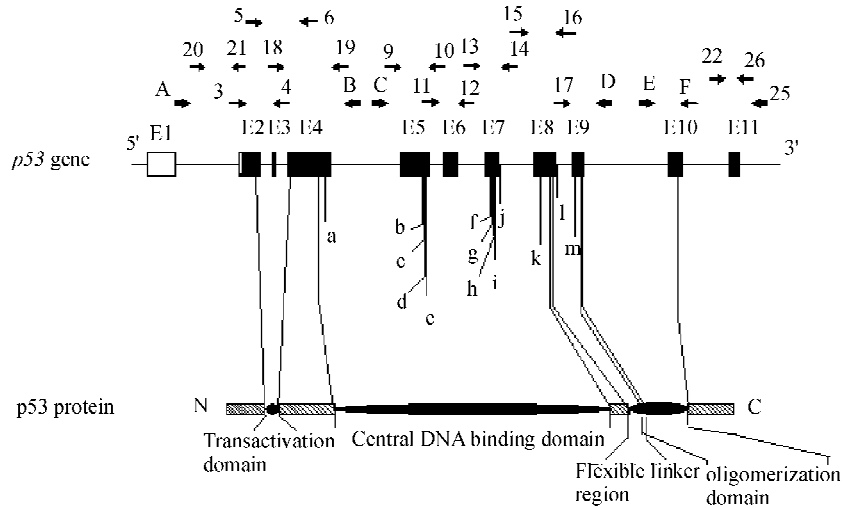


Fig 1 Schematic diagrams of *p53* gene, *p53* protein, the locations of PCR primers and *p53* gene mutations found by us. Arrows indicate PCR primers. Small letters (from a to m) below *p53* gene represent *p53* gene mutations, c. 370T > G, c. 524G > A, c. 528C > G, c. 529\_546del18, c. 536A > G, c. 736A > G, c. 743G > A, c. 770\_771del2, c. 772G > T, c. 782 + 1G > A, c. 814G > A, c. 919 + 1G > C, and c. 949delC, respectively. E1 - 11 represent exons 1 - 11, respectively. □ = noncoding exon; ■ = coding exons; ● = functional domains of *p53*.

图1 *p53* 基因、*p53* 蛋白结构、引物位置及突变位置示意图

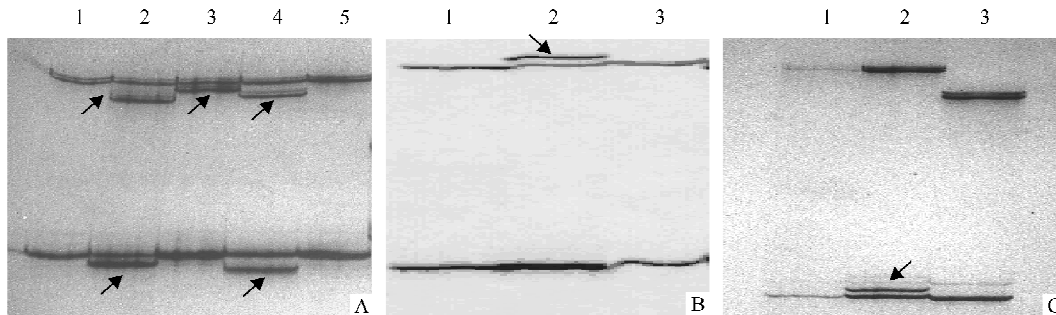


Fig 2 SSCP images of *p53* gene mutations. The arrows indicate the abnormal bands. A: Fragment IV; Lanes 1 and 5; the normal controls; Lanes 2 - 4; c. 524G > A, c. 528C > G, and c. 529\_546del18, respectively; B: Fragment IV; Lanes 1 and 3; the normal controls; Lane 2 is c. 536A > G; C: Fragment III; Lanes 1 and 3; the normal controls; Lane 2; c. 370T > G.

图2 *p53* 基因突变 SSCP 结果

### 讨 论

*p53* 蛋白在  $G_1$  期生长限制位点控制着细胞周期后的增殖,象“分子警察”监视着细胞基因组的完整性,具有抑制肿瘤生长功能。*p53* 蛋白主要功能区有<sup>[5]</sup>:1)转录激活区(氨基酸 20 - 42);2)含 5 个 PXXP 重复序列的富脯氨酸区(氨基酸 60 - 97);3)DNA 结合区(氨基酸 100 - 293);4)可弯曲的连接区(氨基酸 300 - 325);5)四聚化区(氨基酸 319 - 360)。本研究显示,*p53* 基因突变位于外显子 4 - 9,有错义、缺失、无义和移码突变 4 种类型。DNA 结合区的错义突变,例如 c. 370T > G、c. 524G > A 和 c. 528C > G 等,引起相应氨基酸的置换,阻断 *p53* 基因与特异 DNA 的结合。缺失突变 c. 529 - 546del18 在 DNA 结合区丢失 6 个氨基酸,亦可阻断 *p53* 基因与特异 DNA 的结合。缺失突变 c. 770 - 771del2 改变 mRNA 密码子的阅读顺序,阻断正常 *p53* 蛋白的合成。无义突变 c. 772G > T 引起 *p53* 蛋白的合成中断。在转录中,mRNA 前体中非编码序列必须由剪切酶识别去除,才能生成有功能

mRNA。mRNA 前体中剪切位点的改变也会引起 *p53* 蛋白功能改变,5' 端头两个碱基的作用至关重要。因此,移码突变 c. 782 + 1G > A 和 c. 919 + 1G > C 可导致剪切酶不能识别 mRNA 前体中的剪切位点,不能去除内含子 7 和 8,从而影响功能 mRNA 的生成。此外,*p53* 蛋白通过 C 端四聚体区相互连接形成四聚体,完整的四聚体构象是 *p53* 蛋白功能的前提。连接区的缺失突变 c. 949delC 改变了 mRNA 密码子的阅读顺序,生成无四聚体区的 *p53* 蛋白,各 *p53* 亚单位不能相互连接形成四聚体。本研究中,所有突变类型均为杂合子突变,没有纯合子突变,原因可能是:1. 肿瘤标本中混有正常的黏膜、血液等组织。2. 杂合子突变就具有促使肿瘤发生的可能。

本研究显示,*p53* 基因突变率在直肠癌中明显高于结肠癌,60 岁以上组明显高于 60 岁以下组,可能与食物中代谢产物的致癌物质有关。直肠中致癌物质作用时间比结肠长,特别是 60 岁以上老人容易发生便秘,致癌物质作用时间更长,可能更易引起 *p53* 基因突变。

表1 PCR片段、PCR引物及DNA检测片段的SSCP反应温度

Tab 1 PCR fragments, PCR primers and the optimal SSCP temperature of DNA fragments checked

| Fragments  | Primers Sequence (5' - 3')                                 | SSCP temperature(°C) |
|------------|--|----------------------|
| AB         | A:TAGAGGTTGCAGTGAGCTGA<br>B:GGACAGGAGTCAGAGATC             |                      |
| p53 - I    | 20:TCATGCCACTGTGCTCCAG<br>21:GGATCCAGCATGAGACGC            | 26                   |
| p53 - II   | 3:GACACTGGCATGGTGTG<br>4:CCAGCCCAACCCTTGTG                 | 33                   |
| p53 - III  | 5:CTGACTTTCTGCTCTTGTCT<br>6:GGAAGGGACAGAAGATGAC            | 39                   |
| p53 - IV   | 18:TGCTCTTTTCACCCATCTACAGTC<br>19:GATACGGCCAGGCATTGAAGTCTC | 33                   |
| CD         | C:TGTGCTCCAGCCTGAGTGAC<br>D:GTGTTCTGAAGTTAGTTAGCTA         |                      |
| p53 - V    | 9:GCTCGCTAGTGGGTTGCA<br>10:GGCAACCAGCCCTGTCC               | 28                   |
| p53 - VI   | 11:CCCACCATGAGCGCTGC<br>12:ATAAGCAGCAGGAGAAAAGC            | 28                   |
| p53 - VII  | 13:GATCACGCCACTGCACCTC<br>14:AGGTGGATGGGTAGTAGTA           | 28                   |
| p53 - VIII | 15:CCTGGAGCTGGAGCTTAG<br>16:GTGAATCTGAGGCATAACTG           | 17                   |
| p53 - IX   | 17:AAGCAGGACAAGAAGCGGT<br>D:GTGTTCTGAAGTTAGTTAGCTA         | 21                   |
| 17F        | 17:AAGCAGGACAAGAAGCGGT<br>F:GATGAGAATGGAATCCTATG           |                      |
| p53 - X    | E:TGCAGTTTCTACTAAATCGAT<br>F:GATGAGAATGGAATCCTATG          | 24                   |
| E25        | E:TGCAGTTTCTACTAAATCGAT<br>25:CCTAGAAATGTGGCTGATTGT        |                      |
| p53 - XI   | 22:CAGGGAAAAGGGGCACAGACC<br>26:GGCTGTCAGTGGGGAACAAG        | 21                   |

本研究中, c. 524G > A 是最常见的突变类型, 此与 IARC TP 53 突变数据库报道一致, 但 IARC TP 53 突变数据库中未见 c. 370T > G 突变, c. 370T > G 是个新突变。c. 528C > G、c. 949delC、c. 782 + 1G > A 和 c. 919 + 1G > C 突变在 IARC TP 53 结直肠癌突变数据库中未见报道, 这些突变首次在结直肠癌中被发现。p53 基因突变类型可能反映特异环境致癌物质情况, 广西是壮族自治区, 是少数民族地区, 环境与其它地区不同, 例如广西土壤中富含铝、锰、铬等稀有金属, 广西壮族喜欢用靛青染布等, 或许是这些因素造成广西结直肠癌 p53 基因突变类型与其它地区不同。这些新基因突变位点的发现, 为以后结直肠癌的基因治疗提供了新的靶向位点。

[参 考 文 献]

[1] Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer[J]. Cell, 1996, 87(2):159 - 170.

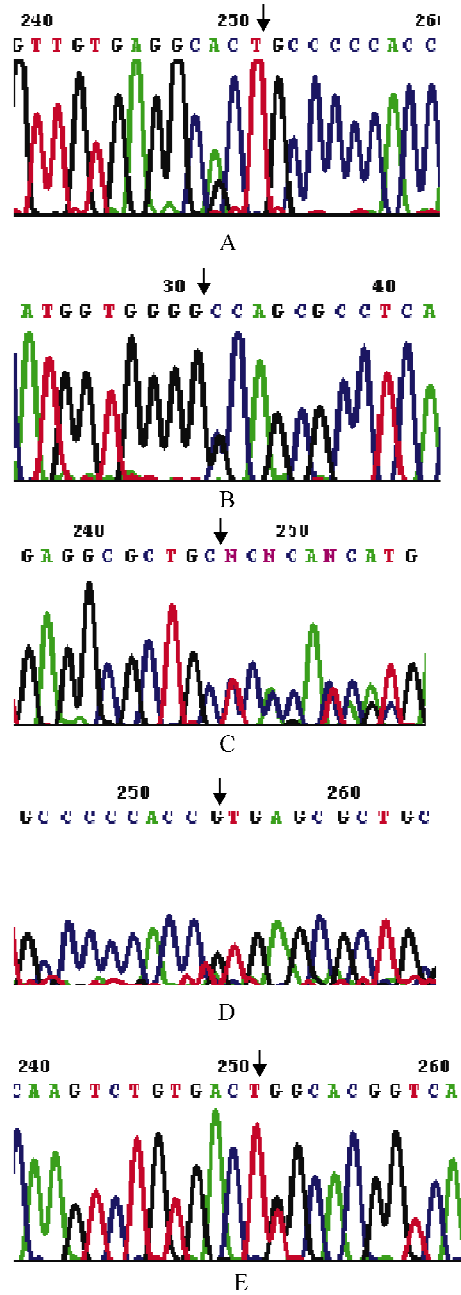


Fig 3 DNA automatic sequencing images of p53 genemutations. c. 524G > A, c. 528C > G, c. 529 546del18, c. 536A > G and c. 370T > G were demonstrated in a - e, respectively. The arrows indicate the mutations.

图3 p53 基因突变 DNA 测序结果

[2] 范 钰, 张尤历, 李 华, 等. RNAi 沉默 *Cripto* 基因对结肠癌细胞血管内皮生长因子的抑制[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(2):242 - 245.

[3] 杨祖立, 康 亮, 黄美近, 等. 结直肠癌细胞中脾酪氨酸激酶基因甲基化状态和表达的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(9):1720 - 1725.

[4] Li W, Gao F, Liang J, et al. Estimation of the optimal electrophoretic temperature of DNA single strand conformation by DNA base composition [J]. Electrophoresis, 2003, 24(14):2283 - 2289.

[5] Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division[J]. Cell, 1997, 88(3):323 - 331.