

云南妇女卵巢癌中 p21^{WAF}基因有较高的 31 位密码(Ser/Arg)突变*

江燕¹, 赖建华¹, 董跃兰², 余敏¹, 何云刚¹, 张虹¹, 谭德勇¹

(1. 云南大学生物技术系, 云南昆明 650091; 2. 云南省第一人民医院 妇科, 云南昆明 650030)

摘要: 通过 PCR-SSCP 分析和序列分析, 对取自云南地区的 44 例妇女卵巢肿瘤样本的 p21^{WAF} 基因 Ser³¹ 密码子的突变进行了分析. 结果表明 35 例恶性肿瘤样本中有 15 例发现有突变, 突变率为 42.9%; 9 例良性肿瘤中有 4 例出现突变, 突变频率 44.4%; 在另外 6 例正常组织中出现 1 例突变, 突变率为 16.7%. 这一结果表明, 云南妇女在这一基因位点存在多态性, 这一位点的突变具有发生卵巢癌的趋势.

关键词: p21^{WAF} 基因; 突变; 卵巢癌

中图分类号: Q 75 文献标识码: A 文章编号: 0258-7971(2002)03-0223-04

p21^{WAF} 基因是一个肿瘤抑制基因^[1], 定位在第 6 号染色体的短臂上(6p21.2), 全长 84 kb, 含 3 个外显子, 其中第 1 和第 3 外显子的编码序列较短, 而第 2 外显子为主要的编码区. 肿瘤中肿瘤抑制基因常常表现为突变, 如 p53 基因, p16 基因, 由于这些基因的突变导致基因功能丧失, 因而导致肿瘤^[2~5]. 作为肿瘤抑制基因的 p21 基因的突变与肿瘤的关系的报道很少, Chedid 等^[6] 曾报道在肿瘤细胞中发现 31 号密码子存在碱基 T[→]C 突变, 引起氨基酸残基由丝氨酸突变成精氨酸, 但通过转基因, 发现该突变并不影响 p21^{WAF} 基因对细胞生长的抑制活性, 并且在检测的 22 例肿瘤组织, 只发现 2 例突变. 报道取自云南地区卵巢癌中的 p21^{WAF} 基因的这一位点的突变与云南地区妇女卵巢癌的发生有一定的关系.

1 材料与方法

1.1 材料 p21^{WAF} 基因质粒由美国 Cool Spring Harbor 实验室 Bech 博士赠送^[4~7]. 卵巢癌肿瘤组织(共 44 例)由云南省第一人民医院妇科手术切除

组织, 正常卵巢组织(6 例)来自非肿瘤手术切除组织.

1.2 主要试剂 组织提取试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司; Taq DNA 聚合酶、PCR 反应缓冲液及 MgCl₂ 购于上海 Promega 公司; dNTP 购于上海 Sangon 公司; PCR 引物由上海 Sangon 公司合成. 所用 PCR 仪为 Hybaid 公司产品; 凝胶图像扫描仪、电泳仪为 Bio-Rad 公司产品.

1.3 方法

1.3.1 肿瘤组织 DNA 的提取 取组织约 0.1 g, 剪成小块, 置于 1.5 mL 离心管中, 捣碎后, 然后按试剂盒操作说明进行操作提取 DNA.

1.3.2 PCR 扩增 p21^{WAF} 基因第 2 外显子 5' 端 220 bp 包含 31 号密码子序列扩增这段序列即可检测到 31 号密码子的变化. 上游引物为 5'-ATGTCAGAACCGCTGGGATG-3', 下游引物为 5'-GCAGGCCAAGGCCCGCAC-3'. 扩增产物包含第 1 个密码子到 74 个密码子, 产物长度 224 bp. 循环条件为: 94 °C 3 min, 循环 1 次; 94 °C 30 s, 70[→]56 °C(降落) 30 s, 72 °C 30 s, 循环 25 次; 94 °C

* 收稿日期: 2001-11-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39760034, 39960030); 云南省应用基础研究基金资助项目(97C073M); 云南省应用基础研究基金资助项目重点项目(1999C002Z).

作者简介: 江燕(1957-), 女, 江西人, 教授, 主要从事小鼠胚胎发育发育过程中细胞周期调控基因的表达以及与肿瘤发生的关系研究.

30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环 10 次; 72 °C 10 min, 循环 1 次。

PCR 扩增基本反应体系中的成分及其用量: 灭菌四蒸水 14.5 μ L, 10 \times Buffer 缓冲液 2.5 μ L, 25 mmol/L 的 MgCl₂ 1.5 μ L, 10 pmol/ μ L 的上下游引物各 2.5 μ L, 10 mmol/L 的 dNTP 1 μ L, 5 U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L (1U), 模板(即质粒或组织样品 DNA) 0.5 μ L, 总体积为 25.2 μ L。

1.3.3 PCR 扩增产物的电泳检测 配制质量分数为 1.0% 的含溴化乙锭的琼脂糖凝胶, 0.5 \times TBE 电极缓冲液, 用 6 V/cm 的电压电泳, 紫外光下观察, 以质粒扩增产物作为对照确定是否有特异产物谱带。

1.3.4 PCR 扩增产物的单链构象多态性(SSCP)分析

(1) 聚丙烯酰胺凝胶的制备: 在干净的烧杯内先用移液管加入质量分数为 30% 丙烯酰胺 5 mL, 5 \times TBE 3 mL, 蒸馏水 7 mL, 再用加入质量分数为 10% 过硫酸胺 150 μ L 和 TEMED 15 μ L, 这样便配制质量分数为 10% 的凝胶。

(2) 样品变性: 根据扩增产物琼脂糖凝胶电泳的条带强度, 取适量扩增产物(2~5 μ L), 加入等体积的变性缓冲液(质量分数为 95% 甲酰胺, pH 8.0, 20 mmol/L 的 EDTA, 质量分数为 0.05% 溴酚蓝), 混匀。沸水浴 5 min, 使双链 DNA 变性, 之后移于冰上骤冷, 然后迅速上样, 这样可避免变性后的 DNA 单链在逐渐降温的过程中大量复性成双链, 同时也有利于单链空间折叠结构的形成。

(3) 电泳: 用 0.5 \times TBE 作为电泳缓冲液, 120 V 恒压电泳 4~5 h。

(4) 染色观察结果: 电泳结束后, 剥下凝胶, 将其浸在含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭的蒸馏水中染色 30~60 min, 紫外灯下观察, 最后用凝胶扫描仪分析, 将样品与正常质粒 DNA 单链的迁移位置进行对比, 单链谱带不同者即为存在差异。

(5) DNA 测序: PCR 产物测序由上海生物服务公司测序。

2 结果

2.1 人卵巢癌组织的 p21 基因的 PCR 扩增 44 例人卵巢癌肿瘤组织和 6 例正常人卵巢癌组织均能扩增出 PCR 产物, 其产物大小与预想的一致(部分结果见图 1)。这一结果表明所有检测样品中的

p21 基因均无缺失。



图 1 云南妇女卵巢癌 p21 基因第 2 外显子 5' 端扩增部分结果

ST: 标准质粒 DNA 扩增产物; 1~3, 肿瘤组织扩增产物

Fig. 1 The result of the second exons 5' - end amplification of p21 gene in ovary tumor of Yunnan women

ST: The amplification product of the standard plasmid DNA;

1-3: The amplification product of the tumor tissue

2.2 人卵巢癌中 p21 基因的 PCR-SSCP 分析

224 bp 序列的 SSCP 分析部分图谱见图 2, 4 号标本的图谱明显较标准样品和其它标本不同, 该段序列初步判断有突变, 经序列分析发现突变发生在 31 号密码(测序图谱略), 碱基由 C 突变成 T, 该碱基的突变引起丝氨酸变成精氨酸。其它标本的 SSCP 图谱与 ST 相同。

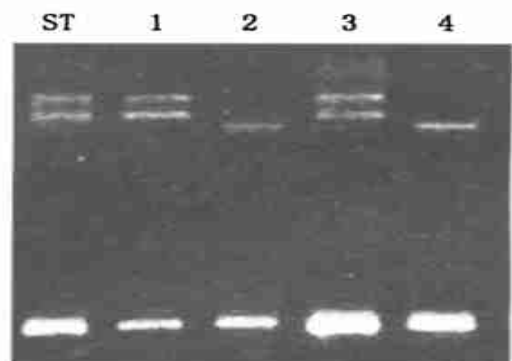


图 2 云南妇女卵巢癌 p21 基因第 2 外显子 3' 端序列 SSCP 分析部分结果

ST: 标准质粒 DNA 扩增产物; 1~4: 肿瘤组织扩增产物

Fig. 2 The result of the second exons 3' - end sequence SSCP analysis of p21 gene in ovary tumor of Yunnan women

ST: The amplification product of the standard plasmid DNA;

1-4: The amplification product of the tumor tissue

2.3 p21^{WAF} 基因突变与云南妇女卵巢癌的关系

分析 44 例卵巢癌标本, p21^{WAF} 基因的突变与肿瘤病理比较结果如表 1. 35 例恶性肿瘤中有 15 例有突变, 突变频率为 42. 9%, ; 9 例良性肿瘤中有 4 例

出现突变, 突变频率 44. 4%; 在 6 例正常组织中出现 1 例突变, 突变频率为 16. 7% .

表 1 p21^{WAF} 基因的突变与肿瘤病理比较

Tab. 1 The comparison of p21^{WAF} gene mutation and tumor pathology

标本 编号	突变分 析结果	病理结果	标本 编号	突变分 析结果	病理结果	标本 编号	突变分 析结果	病理结果
1	+	卵巢颗粒细胞癌	18	-	卵巢癌	35	-	正常
2	-	卵巢粘液癌	19	+	卵巢癌	36	-	正常
3	-	卵巢囊肿	20	+	卵巢癌	37	-	正常
4	-	卵巢粘液癌	21	-	卵巢癌	38	-	卵巢癌
5	-	卵巢癌	22	+	巢肿瘤(良性)	39	-	卵巢内膜癌
6	+	卵巢甲状腺囊肿	23	+	卵巢癌	40	+	卵巢肿瘤(良性)
7	+	卵巢癌	24	-	颗粒细胞瘤	41	-	卵巢颗粒细胞瘤
8	+	卵巢癌	25	-	颗粒细胞瘤	42	-	卵巢颗粒细胞瘤
9	-	正常	26	+	卵巢肿瘤(良性)	43	-	卵巢癌
10	-	卵巢癌	27	+	卵巢癌	44	-	卵巢癌
11	-	卵巢癌	28	+	卵巢癌	45	-	卵巢癌
12	+	卵巢癌	29	+	颗粒细胞瘤	46	+	卵巢癌
13	-	卵巢纤维癌(良性)	30	-	卵巢肿瘤(良性)	47	+	卵巢癌
14	-	卵巢肿瘤(良性)	31	-	卵巢肿瘤(良性)	48	+	卵巢癌
15	-	卵巢癌	32	-	卵巢肿瘤(良性)	49	+	卵巢颗粒细胞瘤
16	-	卵巢癌	33	+	卵巢肿瘤(良性)	50	-	卵巢癌
17	+	正常	34	-	正常			

3 讨 论

p21^{WAF} 基因被认为是一个 p53 基因的下游基因, 被 p53 基因控制, 但也具有不依赖于 p53 基因的表达调控途径^[7- 10]. 野生型 p21 基因的编码产物 p21 蛋白即为 CKI 中的一员, 它与 CDKs- Cyclins 复合物结合抑制激酶活性, 也可以与增殖细胞核抗原(PCNA) 结合抑制 DNA 的复制^[11- 13], 这 2 种方式都起到了阻滞细胞周期的作用. p21 的充分表达与对肿瘤细胞的增殖有抑制作用并促使其发生分化^[1, 14].

Chedid 等^[6] 于 1994 年首先报道在肿瘤细胞中发现 31 号密码子存在 T[→] C 突变并引起氨基酸残基由丝氨酸突变成精氨酸, 但通过转基因, 发现

该突变并不影响 p21^{WAF} 基因对细胞生长的抑制活性, 检测 22 例肿瘤组织, 只发现 2 例突变, 因此他认为这一位点的突变与肿瘤发生无关, 这只是一个多态性位点, 在人群中的频率为 14%. 本研究发现在 35 例恶性卵巢癌中有 15 例该位点存在突变, 在 9 例良性肿瘤中有 4 例存在突变, 而 6 例正常组织中只有 1 例存在突变. 这一结果表明, 云南正常人群中也存在这一多态性位点, 其频率为 16. 7%, 与 Chedid 等报道的基本一致. 然而肿瘤中的突变频率比例远远大于正常人群, 达 42. 9%, 良性肿瘤中为 44. 4%. 表明这一位点的突变可能与云南妇女的卵巢癌发生有关, 至少带有这一位点的妇女人群患卵巢癌的可能性较不带这一位点的可能性大. 近年来的研究表明, 同时有多个基因的突变导致肿瘤

的可能性较少数基因突变导致肿瘤的可能性大^[15], Chedid 等将单个突变的 p21 基因导入细胞而对细胞的生长无抑制作用, 并肯定该位点的突变与肿瘤的发生无关. 可能是因为该细胞的其它基因的突变较少而并不影响细胞的生长. 这可能是本研究与 Chedid 报道有差异的原因.

参考文献:

- [1] STEIN J P, GINSBERG D A, GROSSFELD G D, et al. Effect of p21^{WAF} 1/ CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer[J]. J Natl Cancer Inst , 1998, 90 (14) : 1 072—1 079.
- [2] BONETTA L. Open question on p16[J]. Nature, 1994, 370: 180.
- [3] CHARLES H SPRUCKLLL, MIRELLA GONZALEZ ZULUETA, ATSUKO SHLBTA, et al. p16 gene in nur cultured tumors[J]. Nature, 1994, 370: 183—184.
- [4] CHANG F, SYRJANES S, KURVIEN K, et al. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis[J]. The Merican Journal of Gastroenterology, 1993, 88(2) : 174—186.
- [5] STOREY A, THOMAS M T, KALITA A, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma virus associated cancer[J]. Nature, 1998, 393: 229—234.
- [6] CHEDID M, MICHELI P, LENGEL C, et al. A single nucleotide substitution at codon 31(Ser/ Arg) defines a polymorphism in a highly conserved region of the p53 inducible gene WAF 1/ CIP1[J]. Oncogene, 1994, 9(10) : 3 021—3 024.
- [7] WU Y Y, TAKATA M, REHMAN I, et al. The Temporal and spatial distribution of p21^{WAF} expression in skin appendages[J]. Br J Dermatol, 2000, 42(4) : 694—701.
- [8] KNNAN K, AMARIGLIO N, RECHAVI G, et al. Profile of gene expression regulated by induced p53: connection to the TGF- Beta family[J]. Fbbs Lett, 2000, 47 (1) : 77—82.
- [9] NORTH S, EF GHISSASSI F, PLUQUET O, et al. The cytoprotective aminothioli WR1065 activates p21^{WAF} - 1 and regulates cell cycle progression through a p53- dependent pathway[J]. Oncogene, 2000, 24(9) : 1 206—1 214.
- [10] YUE Xiong, GREGORY J H, ZHANG Hui, et al. P21 is a universal inhibitor of cyclin Kinases[J]. Nature, 1993, 366: 701—704.
- [11] SERRANO M, GERGORY J H, DAVIA H, BEACH D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK[J]. Nature, 1993, 366: 705—707.
- [12] JONATHON P. p21 inhibites cyclin shock[J]. Nature, 1994, 369: 520—521.
- [13] SHOU W, GREGORY J H, DAVID B, et al. The p21 inhibitor of cyclin dependent Kinases controls DNA replication by interaction with PCNA[J]. Nature, 1994, 369: 574—578.
- [14] LINARES CRUZ G, BRUZZONF GIOVANELLI H, ALVARO V, et al. p21^{WAF} - 1 reorganizes nucleus in tumor suppression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 1 131—1 135.
- [15] HARVEY L, ARNOLD B, LAWRENCE Z S, et al. Molecular cell biology[M]. 4th ed. New York: W H Freeman & Co, 2000.

A high codon 31(Ser/ Arg) mutation frequency of p21^{WAF} in ovary tumor of Yunnan

JIANG Yan¹, LAI Jiarhua¹, DONG Yaolan², YU Ming¹, HE Yuirgang¹, ZHANG Hong¹, TAN De yong¹,
(1. Department of Biotechnology, Yunnan University, Kunming 650091, China;
2. Department of Gynecology, First Peoples Hospital of Yunnan, Kunming 650030, China)

Abstract: Using the PCR- SSCP and sequencing technique, the codon 31(Ser/ Arg) mutation of p21^{WAF} of 36 ovary carcinomas samples were examined. The mutation was discovered in 41. 6% (15 of 44) malignant ovary tumor and 50% (4 of 8) benign ovary tumor, only 16% (one of 6) normal ovary tissue. These results show that there is polymorphism at this location in Yunnan women, and this mutation tends to result in tumorigenesis.

Key words: p21^{WAF} gene; mutation; ovary carcinoma