

肝细胞性肝癌 P⁵³ 基因多态性定点突变 P⁵³ Gene Polymorphic Point Mutation in Hepatocellular Carcinoma

邓卓霖 潘朗星* 马 韵 彭 H. Z.*
Deng Zhuolin Pan Langxing Ma Yun Peng H. Z.

(广西医科大学 南宁市滨湖路 6 号 530021)

(Guangxi Medical University, 6 Binhu Road, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 对 P⁵³ 阳性的 8 例肝细胞性肝癌 (HCC) (广西科学, 1995, 2 (1): 55~57) 中的 7 例的 P⁵³ 基因进行 DNA 单键构象多态性分析 (SSCP) 和 PCR 扩增物直接测序。结果, 7 例均在 P⁵³ 第 7 外显子第 249 编码区的 3 号位发现异常。1 例在 249 编码区的第 3 碱基微小丧失引起乱码突变; 另 6 例在此位点同时出现突变的 T 和 C 带, 成为 G→ $\begin{matrix} T \\ C \end{matrix}$ 的多态性突变形式。外显子 5、6、8 和 9 没有异常。估计除黄曲霉毒素 B₁ 外可能有别的致癌因素协同作用造成此种多态性。认为南宁地区是继中国江苏启东和莫桑比克后的第 3 个 HCC P⁵³ 基因 249 编码区有集中突变热点的地区。

关键词 P⁵³ 基因 多态性突变 肝细胞性肝癌

Abstract P⁵³ gene DNA of 7 cases of 8 hepatocellular carcinomas (HCC) with positive P⁵³ mutation (Guangxi Sciences, 1995, 2(1): 55~57) were detected by and proceeded for PCR-SSCP analysis and DNA direct sequencing. 7 HCCs showed a single point abnormality at position 3 of exon 7 codon 249. One showed a microdeletion at position 3 of codon 249 leading to a frame shift, other six showed two bands for mutants T & C at the third base of codon 249, leading to a G→ $\begin{matrix} T \\ C \end{matrix}$ polymorphic mutation form. No other mutation was in exon 5, 6, 8 and 9. There may be more other factors besides aflatoxin B₁ for these polymorphic mutations. Nanning prefecture could be confirmed as a third area in the world with mutational hot-spot at codon 249 in the P⁵³ gene in HCC.

Key words P⁵³ gene, polymorphic mutation, hepatocellular carcinoma

我们在《广西科学》1995 年第 1 期发表题为“南宁地区肝细胞性肝癌中突变型 P⁵³ 蛋白表达”^[1] 的论文, 其中报道 13 例本高发区肝癌有 8 例 P⁵³ 突变蛋白阳性, 占 62%。属国内外肝癌 P⁵³ 突变蛋白阳性率最高之列。由于南宁地区在致癌因素中乙型肝炎病毒 (HBV) 感染率高, 特别是黄曲霉毒素 B₁ 在口粮中高污染, 我们认定这些 P⁵³ 阳性的肝细胞性肝癌 (HCC) 的 P⁵³ 基因可能有集中的突变热点。为证实世界上第三个 P⁵³ 基因突变热点的地理区域和确定黄曲霉毒素高污染与 HCC 突变热点的关系, 我们接着进

行 DNA 单键构象多态性 (SSCP) 分析和 PCR 扩增物直接测序。

结果与讨论:

(1) SSCP 证明 P⁵³ 第 7 外显子 (EX7) 有异常, 其余常发生突变的 5、6、8 和 9 外显子均无异常。EX7 直接测序结果见放射自显影图 (图 1)。

图中例 a 第 249 编码区 (从箭头处往上读, 正常 249、250 为 AGGCCC), 现第 3 碱基微小丢失, 发生乱码突变 (frame shift mutation)。其余 6 例完全一样, 249 编码区第 3 碱基发生多态性突变, 由 G 变为 $\begin{matrix} T \\ C \end{matrix}$ 。突变碱基 T 和 C 都在同一位点上取代原碱基 G。249、250 编码区变为 AG $\begin{matrix} T \\ C \end{matrix}$ CCC, 放射自显影图只展示 3 例, 另 3 例完全相同。上述测序工作是在伦敦学院大学医学院分子生物和分子诊断实验室做的。每例

1995-09-07 收稿。

* 伦敦大学医学院分子生物和诊断实验室 Molecular Biology & Molecular Diagnostics Lab., University college London Medical School.

测序都重复4次,每次测序所用的PCR产物都是新扩增的,结果都一样,重复性很好,放射自显影图很清晰,人工假象的可能性很小。

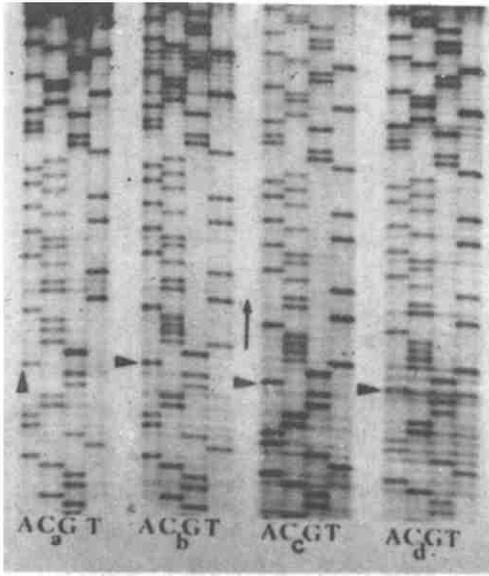


图1 南宁地区4例肝细胞性肝癌P⁵³基因突变放射自显影图
Fig. 1 Sequencing autoradiogram of P⁵³ gene mutations in hepatocellular carcinomas in 4 cases from Nanning prefecture.

a, b, c, d为病例编号,ACGT为碱基位置,三角箭头指向EX7、249编码区第1位点。往上编码正常为AGGCC。图中例a为AG·CCC,第3位点丢失,若仍按3个碱基编码一个氨基酸往上读则全部乱了码。b、c、d 3例同为AG^TCCC,第3位点多了一个碱基。The panel (a) shows the microdeletion of the third base at codon 249 leading to a frame shift mutation, detected in tumour of patient (a). The other 3 panels show the point mutations at codon 249 at the third bases, formed G to T & C polymorphic mutations in tumours of patients (b, c and d).

(2) 这可能是一个非常意义的新发现。过去的报道只注意到HBV和黄曲霉高危区人群的肝细胞性肝癌有个新奇的现象。P⁵³基因突变群集在EX7的249编码区形成一个突变热点^[2-5],但未注意到多态性突变现象。Hsu等^[2]1991年利用我国江苏启东16例HCC作P⁵³基因测序发现单独在EX7的249编码区3号位突变者8例,其中G→T突变的7例,G→C 1例。在G→T的7例中有3例其突变的249编码区第3位点同时出现G→^TC。另外Ozturk等^[4]也1991年报道12例(非洲9,亚州3)249编码区3号位G→T突变,其中8例与Hsu^[2]报道的3例一模一样,也是G→^TC,他们解释为癌旁肝组织或间质细胞

的野生型G污染所致。但据作者所知,P⁵³突变已发现发生于30余个不同编码区,并未见有此种现象报道,单独在249编码区的突变热点上集中发生G→^TC,(11/19,占60%)不能忽视。作者连续6例未经翻译的249编码区第3位点全部出现G→^TC多态性突变,不能用野生型碱基污染解释,而是实实在在的一种多态性突变形式。估计Hus^[2]及Ozturk^[4]所报道的是突变热点多态性的另一种形式。目前所有突变热点多态性总是包涵G→T在内。我们6例AGG变AG^TC也不例外。AGG变AGT和AGC是精氨酸变丝氨酸(Ang→Sez),但变成AG^TC会怎样呢?虽然AGT和AGC都是丝氨酸的兼并(degeneracy)形式,即一种氨基酸有两种以上不同的密码子,但在T位点上又插入C,这个密码能否编译丝氨酸则不清楚。

(3) P⁵³基因SSCP分析和PCR产物直接测序进一步证明:

①HCC高危区南宁地区,HCC P⁵³基因确实有特定的突变热点,集中在EX7 249编码区第3位点;②在黄曲霉毒素B₁高污染地区,HCC突变热点通常为G→T颠换突变,而南宁地区HCC的突变热点与众不同地发生少数微小丢失,且多数是G→^TC多态性突变,这是前所未有的;③乙型肝炎病毒和黄曲霉毒素B₁是HCC的危险因素已有充分的流行病学和病理学证据。然而HCC的分子病因及发病机理所知尚少。突变热点及其中新的基因突变类型很值得深入研究。④南宁地区HCC的危险因素与具有相同突变热点的启东和莫桑比克相同,而突变形式上有所不同,其中原因有待探讨。

参考文献

- 1 邓卓霖,马韵,罗虹. 南宁地区肝细胞性肝癌中突变型P⁵³蛋白表达. 广西科学, 1995, 2 (1): 55~57.
- 2 Hsu TC, Metcalf RA, Sun T et al. Mutational hot spot in the P⁵³ gene in human hepatocellular carcinoma. Nature, 1991, 350, 427~428.
- 3 Bressac B, Kew M, Wands J et al. Selective G to T mutations of P⁵³ gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. Nature, 1991, 350, 429~431.
- 4 Ozturk M. P⁵³ mutation in hepatocellular carcinoma aflatoxin exposure. Lancet, 1991, 338, 1356~1359.
- 5 Scorsone KA, Zhou YZ, Butel JS et al. P⁵³ mutations cluster at codon 249 in hepatitis B virus positive hepatocellular carcinoma from China. Cancer Res. 1992, 52, 1635~1638.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)