

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2001.05.05

青老年肺癌患者 p53 基因突变情况的对比研究

胡咏武 董光同 李红智 高元兴 蒋成榜 郑哲

【摘要】 目的 分析 45 例青老年肺癌中 p53 基因突变,比较青年肺癌与老年肺癌 p53 基因突变的差异。方法 45 例患者均为温州医学院附属第一医院胸外科收治的病例,其中 22 例为 20~45 岁肺癌患者,23 例为 55~80 岁肺癌患者。应用 PCR-SSCP 银染技术检测 p53 基因的突变情况,并进行 PCR 产物直接测序。结果 发现青年组和老年组中 p53 基因突变情况基本相同(50.0% 比 52.2%),其中小细胞肺癌突变率分别为 70.0% (7/10)和 75.0%(6/8),非小细胞肺癌突变率分别为 33.3%(4/12)和 40.0%(6/15),差异均无显著性($P > 0.05$)。结论 青年肺癌和老年肺癌 p53 基因突变并无明显差异,提示 p53 基因的突变不属‘先天’致癌因素。

【关键词】 肺肿瘤 p53 基因 聚合酶链反应 单链构象多态性 银染

【中图分类号】 R734.2 R730.43

Comparison of p53 gene mutation between adolescent and senile patients with lung cancer HU Yunwu, DONG Guangtong, LI Hongzhi, GAO Yuanxing, JIANG Chengbang, ZHENG Zhe. Department of Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325000, P. R. China

【Abstract】 **Objective** To find out whether there is a difference of p53 gene mutation between adolescent and senile patients with lung cancer. **Methods** Forty-five patients with lung cancer were divided into two groups. One was adolescent group with age less than 45 years old, another was senile group with age older than 55 years old. p53 gene mutation was detected by polymerase chain reaction (PCR)-single strand conformation polymorphism (SSCP)-silver staining technique and the mutated p53 gene specimen was analysed by DNA-sequencing. **Results** p53 gene mutation rate was 50.0% (11/22) in the adolescent group and 52.2% (12/23) in the senile group and there was no significant difference between the two groups. For small cell lung cancer, the mutation rate was 70.0% (7/10) and 75.0% (6/8) in the two groups respectively. For non-small cell lung cancer, that was 33.3% (4/12) and 40.0% (6/15) in the two groups respectively. **Conclusion** These results indicate that the p53 gene mutation is a postnatal carcinogenetic factor of lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms p53 gene Polymerase chain reaction (PCR) Single-strand conformation polymorphism (SSCP) Silver staining

肺癌是发病率较高的恶性肿瘤,并呈逐渐上升的趋势。肺癌分为小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)两大类。肺癌的演变过程是一系列分子变异的过程,其中 p53 基因突变是肺癌发生的重要因素之一。本实验采用 PCR-SSCP 分析法^[1]检测 22 例 45 岁以下肺癌患者和 23 例 55 岁以上肺癌患者 p53 基因突变情况,并对突变基因进行 DNA 序列分析,观察 p53 基因突变与患者年龄的相关性。

1 材料和方法

1.1 标本 45 例原发性肺癌标本取自温州医学院附属第一医院胸外科 1997~1999 年间住院患者。其中

22 例患者年龄在 20~45 岁间,23 例患者为 55~80 岁;小细胞肺癌 20 例,非小细胞肺癌 25 例。采取手术切取癌组织 1 cm³,并取小量癌旁正常组织作对照,-70℃保存。

1.2 DNA 提取 参考文献 2 的方法,具体操作为:剪碎组织块,PBS 缓冲液中研磨 10 分钟,并用 PBS 液冲洗两次,1 000 r/min 离心 5 分钟收集细胞,加 1 ml DNA 提取缓冲液(10 mmol/L TrisCl,0.1 mol/L EDTA,0.5% SDS)于 37℃保温 1 小时,加蛋白酶 K 至终浓度 100 mg/L,50℃保温过夜。再用饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提两次,氯仿抽提 1 次,加 1/10 体积 2N NaAc,2 倍体积无水乙醇于 -20℃沉淀 1 小时,6 000 r/min 离心 10 分钟,去上清,沉淀用 70%乙醇洗 1 次,溶于重蒸水中,紫外分光光度计检测 DNA 含量和纯度。

作者单位 325000 温州医学院遗传教研室(胡咏武、李红智)温州医学院附属第一医院胸外科(董光同、蒋成榜、郑哲)麻醉科(高元兴)

1.3 PCR 扩增 引物选用 p53 基因突变热点区的 5~8 外显子,设计合成三对引物,由北京赛百盛公司合成,引物序列如下:

P1 5'-TTC CTC TTC CTG CAG TAC TC-3'

P2 5'-AGT TGC AAA CCA GAC CTC AG-3'

扩增第 5、6 外显子和第 5 内含子,共 408 bp。

P3 5'-AGG TTG GCT CTG ACT GTA C-3'

P4 5'-CAA GTG GCT CCT GAC CTG-3'

扩增第 7 外显子共 127 bp。

P5 5'-CCT ATC CTG AGT AGT AGT GGT-3'

P6 5'-GTC CTG CTT GCT TAC CTC-3'

扩增第 8 外显子共 165 bp。

50 μl PCR 反应总体系中含模板 DNA 0.5 μg,引物各 20 pmol,1.5 units Taq DNA 聚合酶。P1P2 引物的反应条件为 94℃,45 秒;58℃,45 秒;72℃,1 分钟,30 个循环。P3P4 引物的反应条件为 94℃,45 秒;56℃,45 秒;72℃,30 秒,35 个循环。P5P6 引物的反应条件为 94℃,45 秒;55℃,45 秒;72℃,25 秒,30 个循环。

1.4 SSCP 和银染 取 PCR 反应产物 4 μl 加 15 μl 变性缓冲液(95% 甲酰胺,20 mmol/L EDTA,溴酚兰),97℃ 变性 10 分钟,冰浴后加样于 10% 聚丙烯酰胺凝胶(49:1),120 V 下电泳 15 小时,电泳后凝胶置于 10% 乙醇漂洗 5 分钟,1% 硝酸 3 分钟,0.012 mol/L 硝酸银染色 20 分钟,于含 0.28 mol/L Na₂CO₃、0.05% 甲醛的显色液中显色 5~10 min,10% 冰醋酸漂洗 2 分钟终止显色,拍照记录。

1.5 DNA 测序 随机挑选青年组和老年组 p53 基因突变患者各 5 名,将其 PCR 产物经电泳后透析、回收纯化并直接测序。

2 结果

2.1 PCR-SSCP 分析结果 经 PCR-SSCP 分析,22 例 45 岁以下患者中检测到 11 例突变,突变率为 50.0%。7 例突变位于第 5、6 外显子,3 例突变位于第 7 外显子,1 例突变位于第 8 外显子。小细胞肺癌中突变率为 70.0%(7/10),非小细胞肺癌中突变率为 33.3%(4/12)。

23 例 55 岁以上患者中检测到 12 例突变,突变率为 52.2%。8 例突变位于第 5、6 外显子,4 例突变位于第 7 外显子。小细胞肺癌中突变率为 75.0%(6/8),非小细胞肺癌中突变率为 40.0%(6/15)。PCR 结果见图 1,SSCP 银染结果见图 2。

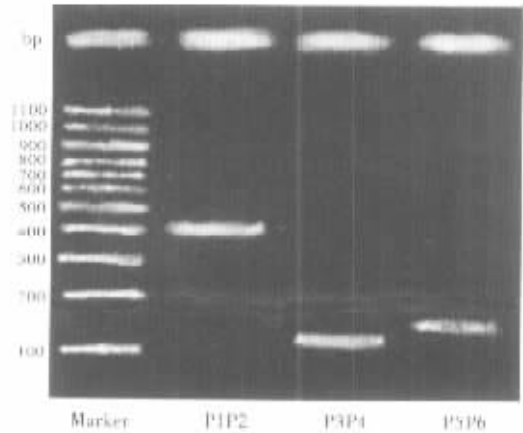


图 1 PCR 结果(2% 琼脂糖电泳)

Fig 1 The result of PCR (2% agarose electrophoresis)

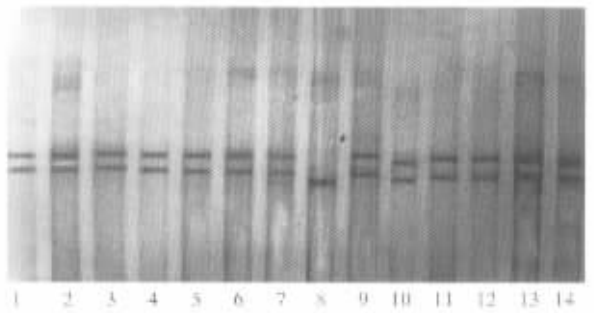


图 2 SSCP 银染结果(10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳)

Fig 2 The result of SSCP-silver staining(10% polyacrylamide gel electrophoresis)

Lanes 7, 8 and 9 had mutation.

2.2 DNA 测序结果 经 DNA 测序分析,10 例标本中 9 例为点突变,1 例为缺失引起移框突变。突变 p53 基因 DNA 序列分析情况见表 1,测序图见图 3。

表 1 p53 基因突变 DNA 序列分析结果

Tab 1 The results of sequence analysis about mutated gene p53

Exon	Codon	Mutation of base pair	Mutation of aminoacid
5	141	TGC→TAC	Cys---Trp
5	155	ACC→GCC	Thr---aLa
5	158	CGC→CTC	Arg---Leu
5	164	AAG→AAT	Lys---Asn
5	179	CAT→CGT	His---Arg
6	205	TAT→TGT	Tyr---Cys
6	220	TAT→GAT	Arg---Asp
7	147	AAC→ATC	Asn---iLe
8	266	GGA→GTA	Gly---Val
7	236	AAC→AA	1 bp deletion*

* Frame shift

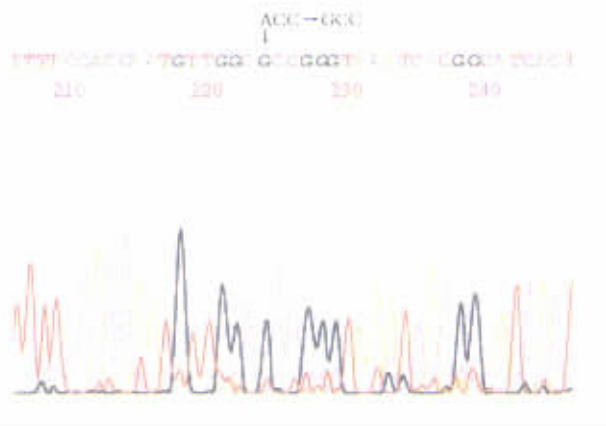


图 3 p53 基因测序图
Fig 3 Sequence analysis of p53 gene

3 讨论

p53 基因定位于人类第 17 号染色体短臂 1 区 3 带 (17p¹³⁻¹) 编码一个分子量约 53×10^3 U 的磷蛋白。目前研究认为 p53 基因的主要功能一是抑制细胞分裂, 让其停留在细胞周期的 G₁ 期, 二是使细胞凋亡^[3]。p53 蛋白与肿瘤的关系已被广泛证实^[4,5]。在肺癌的发生过程中 p53 基因的突变、失活被认为是最常见的遗传学改变之一。青年肺癌与老年肺癌相比较, 具有发病早的明显特点, 因此可能先天性因素起较大的作用。是否存在遗传性的肺癌易感人群对于肺癌的早期诊断和预防具有重要临床意义, 对肺癌的发生机理的研究也具有实际意义。我们所采用的 PCR-SSCP 技术是近年来发展起来的检测基因突变的一种快速、简便和灵敏的方法, 同时结合 DNA 序列分析进行突变类型分析。

从本组资料看, 青年组与老年组相比较, 无论在小细胞肺癌、非小细胞肺癌或总突变率方面, 两组差异都不显著。统计法为: 实验总人数 45 人, p53 基因突变人数为 23 人, 突变率为 52.2%。假设青老年患者突变情况相同, 那么理论值为: 青年患者突变 $22 \times 52.2\% \approx 11.4$ 人, 老年患者突变 $23 \times 52.2\% \approx 12$ 人。实际值

为: 青年患者突变 11 人, 老年患者突变 12 人。

$$\chi^2 = \frac{\sum (\text{理论值} - \text{实际值})^2}{\text{总人数}} = \frac{(11.4 - 11)^2}{11.4} + \frac{(12 - 12)^2}{12} = 0.014$$

自由度 N = 1, 查表: P > 0.05, 理论与实际值差异不显著。

其它几组对比方法同上。

在我们的研究中发现, p53 基因在青年人中突变率与老年人相比较并无明显差异, 在小细胞肺癌和非小细胞肺癌中情况基本相同。这说明 p53 基因的突变可能是体细胞发生其他某种肿瘤相关基因突变后, 逐渐影响到该基因复制、转录, 进而发生突变, 并引起连锁反应。而 p53 基因的突变并不是“先天”因素, 与肺癌易感性相关不大或者认为是无直接相关性。被测患者的正常组织中均无突变的发生也说明这一问题。DNA 序列分析结果表明, p53 基因的突变具有多态性及混杂性, 与其他文献报道相符^[6]。在 PCR-SSCP 银染检测中出现一些既有正常基因片段, 又有突变片段的个体, 是否属于突变杂合体或是方法学上的问题, 有待进一步研究证实。

参 考 文 献

- 1 梁国容, 周德南, 龙学明, 等. 应用 PCR-SSCP 银染技术检测非小细胞肺癌 p53 基因点突变. 广西医学, 1998, 20(2): 198-200.
- 2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1995. 463-468.
- 3 张振峰. p53 与人类肺癌研究进展. 国外医学内科学分册, 1999, 26(6): 255-257.
- 4 Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. Nature, 1989, 343(6250): 705-708.
- 5 Georges RN, Mukhopadhyay T, Zhang Y, et al. Prevention of orthotopic human lung cancer growth by intratracheal instillation of a retroviral anti-sense K-ras construct. Cancer Res, 1993, 53(8): 1743-1746.
- 6 Hibi K, Takahashi T, Yamakawa K, et al. Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. Oncogene, 1992, 7(3): 445-449.

(收稿 2000-09-04 修回 2001-02-26)

(本文编辑 张世雯)

· 启 事 ·

致作者

根据国家科技部中国科技论文统计源期刊要求, 凡受各类基金资助项目的论文, 请作者向本刊投稿时, 务必附上基金资助通知复印件。

本刊编辑部