DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.06.004
第17卷第6期 第三军医大学学报 Vol.17,No.6
474 1995年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec.1995

肝细胞癌肿瘤抑制基因p53改变及其与乙型肝炎病毒关系的研究

王 东 张新立 史景泉 (第三军医大学基础部病理学教研室)重庆,630038

提 要 肝细胞癌(HCC)肿瘤抑制基因p53的改变有着显著的地理差异。应用地高辛标记探针原位杂交,PCR、PCR-SSCP分别检测重庆地区(HBV高感染、黄曲霉素中等含量区)38例HCC中HBV DNA及p53基因突变,并应用Southern杂交对其中的12例进行限制性片段多态性分析。结果显示38例HCC中30例HBV DNA阳性(79%),9例HCC有p53突变,其中8例HBV DNA阳性(88.9%,$P>0.05$)。12例HCC中2例表现杂合性缺失(LOH,16.7%),2例HBV DNA皆为阳性,占HBV DNA阳性例数的20%($P>0.05$)。结果表明,本地区HCC与HBV感染密切相关,HBV可能与黄曲霉素协同作用,共同引起p53的改变,进而在HCC发生发展过程中发挥重要作用。

关键词 肝细胞癌;肝炎病毒;p53基因
中图法分类号 R735.7

肝细胞癌(HCC)是一种世界范围的常见恶性肿瘤。流行病学的资料表明HCC的发生与乙型肝炎病毒(HBV)的感染密切相关,但其分子机制仍未完全清楚。最近有报道HBV和黄曲霉素(AF)可能通过引起p53基因的变化影响HCC的发生。肿瘤抑制基因p53定位于人类17号染色体短臂(17p13.1),可通过编码的Mr 53×10^4 u核磷蛋白与DNA特异结合,抑制细胞分裂,阻止细胞从G_1期进入S期[1]。有关HCC p53基因改变的报道虽然较多,但极为有意义的是各地区HCC p53基因改变有着显著的地理差异。综合不同地区的资料,使我们能够从分子流行病学的角度进一步探讨HCC发生的相关因素及其分子机制。

38例HCC来源于重庆地区,该地区属HBV高感染和AF中等含量区,我们应用地高辛标记探针原位杂交检测HBV DNA,多聚酶链反应(PCR)、多聚酶链反应一单链构象多态性(PCR-SSCP)分析p53基因突变,并对其中12例HCC进行Southern杂交以确定p53等位基因缺失,旨在探讨本地区HCC p53基因改变的特点及其与HBV感染的关系。

1 材料与方法

1.1 组织标本

38例HCC及其癌旁组织系1992~1993年我校西南医院手术切除标本(36例为新鲜组织)。10%甲醛固定,石蜡包埋包切片。按WHO肿瘤国际组织学分类标准:梁状型15例,假腺管型16例,实团型7例。

1.2 组织DNA提取

参照"分子克隆实验指南"用蛋白酶K-酚/氯仿法,分别提取36例新鲜组织、2例石蜡包埋组织和正常人血液白细DNA。

1.3 原位杂交

含有HBV DNA全基因(3.2 kb)的质粒pBR 322由日本JCRB Hishimoto,Ph.D惠赠。碱变性法大规模提取质粒DNA,BamHI酶切,电洗脱回收3.2 kb HBV DNA片段。用BM公司的地高辛标记及检测试剂盒进行标记。原位杂交按Lau等[2]的方法并加以改进,所用Dig-HBV DNA浓度为0.30 μg/ml。为保证待测标本中所检出信号确系HBV DNA,实验中设置了无探针对照、正常组织对照及DNA酶I消化对照。

1.4 多聚酶链反应(PCR)检测p53 249密码子突变

PCR扩增p53基因第7外显子全序列DNA片段(图1),引物的序列为,上游引物:5′CCCAAGGCGCACTGACCTCA3′;下游引物:5′GCTCCTGACCTGGAGTCTTC3′。

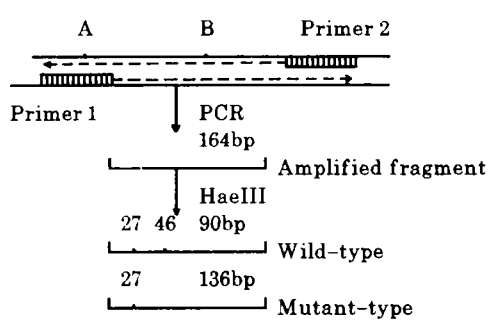


图1 分析p53基因249位密码子点突变模式图

A:HaeⅢ对照切点,B:HaeⅢ 249密码子切点

Fig 1 Schematic diagram of the point mutation in p53 codon 249 assays

A: Control cleavage site of the restriction endonuclease HaeIII; B: HaeIII cleavage site of codon 249

PCR反应体系为40 μl:模板DNA 1.8 μl,ddH_2O 28 μl,2.5 mmol/L dNTP 3.2 μl,20 pmol/L引物2 μl,10×Taq酶缓冲液4 μl,95℃变性8 min后,加1 μl Tap聚合酶(2.2 U)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

与 HBV 和 AF 的协同作用有关。

HBV DNA 的整合可引起宿主 DNA 缺失、重排等改变，是 HBV 致癌的重要基础。HBV 可以整合到肝癌细胞的染色体上，虽然尚未找到一个常见的整合位点，但已有报道 HBV 可以整合到 p53基因附近(17p11.1－12)，并且在 HBV 阳性的肝癌组织中进一步证实有 p53基因 的改变[12]。然而，HBV 在 p53基因内或附近的整合本身似乎并不能引起 p53基因发生249密码子 G→T 颠换[13]。最近 Fujimoto 等[14]在用 AFB1喂养灵长类动物产生的肝 癌中，未发现有 p53基因的突变，因此提出 HBV 感染可能是 AFB1引起 p53突变的先决条件。Sell 等[15]在转基因动物中进一步证实HBV和AFB1在HCC发生过程中具有协同作用。

综上所述，本地区 HCC 与 HBV 感染密切相关，HBV 可能与 AF 协同作用，共同引起肿瘤抑制基因 p53的改变，进而在HCC发生发展过程中发挥重要作用。

参考文献

1 McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). Proc Natl Acad Sci USA, 1986; 83: 130

2 Lau JYN, Naourmov NV, Aexander JM et al. Rapid detection of hepatitis B virus DNA in liver by in situ hybridization and its combination with immunohistochemistry for simultaneeous detection of HBV antigens. J Clin Pathol, 1991; 44: 905

3 侯金林，梁帜森，郭亚兵等. 地高辛探针原位杂交用于肝病及肝癌分子的病理研究. 生化资迅(BM), 1992; 4: 9

4 Hsu LC, Metcaf RA, Sun T et al. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellullar carcinoma. Nature, 1991; 350: 427

5 Bressac B, Kew M, Wands J et al. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocelluar carcinoma. Nature, 1991; 350: 429

6 Oda T, Tsuda H, Scarpa A et al. p53 gene mutation spectrum in hepatocelular carcinoma. Cancer Res, 1992; 52: 6358

7 Laurent-Puig D, Flejou J-F, Fabre M et al. Overexpression of p53: a rare event in a large series of white patients with hepatocellular carcinoma. Hepatology, 1992; 16: 1171

8 Kress S, Jahn UR, Buchmann A et al. p53 Mutations in human hepatocellular carcinomas from Germany. Cancer Res, 1992; 52: 3220

9 Challen C, Lunec J, Warren W et al. Analysis of p53 tumor — suppressor gene in hepatocellular carcinomas from Britain. Hepatology, 1992; 16: 1362

10 赵　坡，杨光华，毛　新. 肝细胞癌 p53基因的分子病理研究. 中华病理学杂志, 1993; 22: 16

11 朱明华，王文亮，李福才等. 原发性肝癌的等位基因型及基因型及肿瘤抑制基因 p53第七外显子分析. 第四军医大学学报, 1993; 14: 241

12 Slagle BL, Zhou YZ, Butel JS. Hepatitis B virus integration event in human chromosome 17p near the p53 gene identifies the region of the chromosome commonly deleted in virus-positive hepatocellular carinomas. Cancer Res, 1991; 51: 44

13 Foster PL, Eisentadt E, Miller JH. Base substitution mutations induced by metabolically activated aflatoxin B1. Proc Natl Acad Sci USA, 1983; 80: 2695

14 Fujimoto Y, Hampton LL, Luo LD et al. Low frequency of p53 gene mutation in tumors induced by aflatoxin B1 in nonhuman prinated. Cancer Res, 1992; 52: 1044

15 Sell S, Hunt JM, Dunsford Ha et al. Synergy between hepatitis B virus expressinon and chemical hepatocarcinogens in transgenic mice. Cancer Res, 1991; 51: 1279

(收稿1995-04-14；修回：1995-09-19)

Hepatitis B virus and changes of tumor suppressor gene p53 in hepatocellular carcinoma

Wang Dong, Zhang Xinlin, Shi Jingquan (Department of Pathology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The occurrence of the changes of tumor suppressor gene p53 appears to vary with geographic locations. HBV DNA and p53 mutation were observed in 38 cases of hepatocellular carcinoma (HCC) resected in the Chongqing region (a region of high prevalence of HBVand moderate exposure to dietary aflatoxin) with in situ hybridization using digoxigenin labeled probes, PCR and PCR-SSCP analysis. In addition, 12 cases out of the 38 were studied with Southern blot hybridization to undergo RFLP analysis. It was found that 30 cases out of the 38 were positive for HBV DNA (79%). p53 mutation was found in 9 cases of HCC of which 8 cases were positive for HBV DNA (88.9%, $P>0.05$). Loss of heterozygosity was demonsrtated only in 2 cases out of 12 HCC cases (16.7%) both of which were positive for HBV DNA (20%, $P>0.05$). These findings indicate that there is a striking correlation between HBV infection and HCC in the Chongqing region. HBV infection may act synergistically with aflatoxin in the generation of p53 mutation and contributes greatly to the development of HCC.

Key words Hepatocellular carcinoma; hepatitis virus; p53 gene

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net