

人动脉粥样硬化斑块 p53 基因突变的初步报告

北京医科大学心血管基础研究所 周爱儒 赵新荣 宋良文 王泰龄*
李岱宗** 顾健人** 汤 健

摘 要 从甲醛固定的成人动脉粥样硬化斑块组织中提取 DNA, 用 PCR 扩增 p53 基因片段, 将扩增的 p53 基因片段亚克隆至 SK 载体内, 对扩增后的片段进行核苷酸序列分析。结果发现, 动脉粥样硬化斑块中 p53 基因内第 8 外显子第 272 位密码子的 T 变为 C。免疫组化分析观察到斑块内有 p53 基因突变蛋白的表达。提示 p53 基因突变可能与动脉粥样硬化的细胞增殖异常有关。

关键词 动脉粥样硬化; p53; 基因突变

人 p53 基因位于 17 号染色体短臂 1 区 3.1 带 (17p3.1), 含 11 个外显子, 长约 20kb^①。近年来研究发现, 肝癌、肺癌、食道癌等肿瘤中有 p53 基因的缺失或突变, 而且 p53 基因的改变高发于第 5 至 8 外显子^{②~④}。动脉粥样硬化 (As) 是以血管平滑肌细胞增殖为主要特征的疾病, 可被看成是一种“良性肿瘤”^⑤。我们曾在实验性家兔 As 斑块中发现有野生型 p53 基因的低表达和突变型 p53 蛋白的高表达^⑥。本实验进一步通过分子克隆和序列分析, 研究了人 As 斑块内 p53 基因的突变位点。

1 材料和方法

组织 DNA 抽提、PCR 扩增、克隆和序列测定参照 Li 的方法进行^⑦。

1.1 As 斑块标本及 DNA 抽提 As 斑块标本由中日友好医院病理科提供。As 斑块经组织匀浆后加入 1 ml 裂解液 (100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L TrisHCl pH8.0, 0.5% SDS 及 300 μg/ml 蛋白酶 K), 于 50℃ 消化过夜后改为 37℃ 继续消化 4 天, 每天补加 100 μg 蛋白酶 K。4 天后取消消化液加等体积酚抽提两次, 氯仿抽提两次, 无水乙醇沉淀, TE 溶解。

1.2 p53 基因片段的 PCR 扩增 所用的引物为: 上游序列 5'-AGGTTGGCTCTGACTGT-3', 下游序列 5'-AGCTCGTGGTGA-3', 用于扩

增第 7 和第 8 外显子。反应体系为: 微量基因组 DNA, 两种引物各 10 pmol, 0.1 mmol dNTP, 2 mmol MgCl₂, 终体积为 50 μl。100℃ 变性 10 分钟后加 2u TaqDNA 聚合酶。经 72℃ 1 分钟, 94℃ 40 秒钟, 48℃ 30 秒钟, 循环 35 次后 72℃ 保温 5 分钟。取 1/10 体积的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 得到 500bp 的特异性扩增片段。

1.3 p53 基因亚克隆和序列测定 pBlue-script SK 载体由上海肿瘤研究所提供, 经 Sma I 酶切后, 与 p53 基因片段作连接反应, 并转化 DH5α, X-gal, Amp 平板筛选出阳性克隆, 基因扩增后用碱裂解法抽提 DNA, 双脱氧链终止法测定核苷酸序列, 并与正常组织扩增后 p53 相应片段的核苷酸序列进行比较。

1.4 p53 蛋白免疫组化 按 AC 法进行。突变型 p53 蛋白抗体购自美国 oncogene 公司。

2 结 果

As 斑块组织扩增后 p53 基因片段测序结果与正常 p53 序列比较发现, 第 8 外显子 272 密码子 GTG 变成 GCG (图 1), 编码氨基酸由 Val 变为 Ala。第 7 外显子无异常。图 2 所示的测序结果是 p53 基因片段的互补链, 因此斑块内 p53 基因的突变形式应为 T→C。

免疫组化方法证明, p53 单克隆抗体可与 As

• 北京中日友好医院
•• 上海市肿瘤研究所

斑块中突变型 p53 蛋白特异性结合。图 3 可见斑块内最表层细胞和斑块深层细胞内均有 p53 蛋白免疫阳性反应颗粒的密集分布,斑块中层为坏死区,无细胞成分,因而无阳性反应产物。

3 讨论

应用核酸序列分析技术对常见肿瘤细胞 p53 基因突变进行研究发现,一些肿瘤组织中 p53 最常见的核苷酸改变是 G : C 为 T : A 取代,其次是 A : T 变为 G : C。在非小细胞肺癌中 p53 突变 G : C 转变为 T : A 的频率可高达 59.5%^⑥。我们共抽取了 10 例陈旧 As 斑块 DNA,由于甲醛固定时间较长(保留最久者达 10 余年),而且暴露于空气中甲醛氧化成甲酸,对 DNA 有破坏作用,因此 10 例标本中只有一例能扩增 p53 基因片段。结果发现,p53 基因第八外显子第 272 密码子 GTG 变为 GCG,编码氨基酸由 Val 变成 Ala,我们正在将 p53 突变基因导入表达载体内,分离纯化其蛋白质,以便深入研究它对血管平滑肌细胞增殖的影响,探讨其在 As 发生发展中的作用。

在正常细胞中野生型 p53 蛋白半衰期约 3 小时。由于其半衰期短而且含量低,应用常规的免疫组化方法难以测出。当 p53 基因突变后,表达蛋白质构象改变,半衰期明显延长而且稳定性增强,在细胞中堆积。新近的研究表明,突变型 p53 蛋白在肿瘤细胞中的表达具有一定普遍性。正常形态的细胞群体与肿瘤细胞之间 p53 蛋白免疫组化染色差异也很明显。这些结果提示 p53 在肿瘤和转化细胞中的稳定性增加^⑥。但是突变 p53 蛋白在 As 中的变化还不清楚。本室曾报道,As 家兔斑块中有 p53 突变蛋白的存在,而且野生型 p53 基因低表达^⑦。本实验在成人 As 斑块中也发现有 p53 突变蛋白的表达和 p53 基因点突变。p53 蛋白能与特异序列 DNA

结合,通过对 DNA 复制的影响而参与正常细胞的生长调控。野生型 p53 蛋白能激活与 p53 基因位点相邻基因的表达,但突变型 p53 蛋白则不但失去以上活性,而且还抑制共同表达的野生型 p53 蛋白的活性^⑧。As 的病理特征之一是血管平滑肌细胞的异常增殖,因此 p53 基因突变可能在 As 发生发展中起重要作用。

参考文献

1. Lmab P, Crawford L. Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 1986;6(5):1379
2. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991;351:453
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
4. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, et al. Mutational hotspot in p53 in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991;350:427
5. Li DZ, Gu JR. Aberration of p53 gene in human hepatocellular carcinoma from China. *Carcinogenesis* 1993;4(2):169
6. 汤健,周爱儒. 原癌基因与心血管疾病. 北京医科大学,协和医科大学联合出版社, 1990:150
7. 杨和平,周爱儒. 家兔动脉粥样硬化斑块组织 p53 基因的变化. *中华医学杂志* 1993;73(11):43
8. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989;342:705
9. Matlashewski G, Lamb P, Pim D, et al. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone, expression of the human p53 gene. *EMBO J* 1984;3(13):3257
10. Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, et al. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 1992;256:827

The Primary Report of p53 Gene Mutation in Human Atherosclerosis

Zhou Airu, Zhao Xinrong, Song Liangwen, Wang Tailing, Li Daizong, Gu Jianren, Tang Jian
(Institute of Cardiovascular Research, Beijing Medical University, Beijing, 100083)

DNA was extracted from aldehyde fixed human atherosclerotic plaques. By the method of PCR, P53 gene fragments were amplified. Cloning these fragments into SK vector and sequencing them, we found that p53 gene T²⁷² changed into C²⁷¹. Immunohistochemistry showed that in plaques, the mutant protein expressed. These results indicated that p53 gene mutation may be related with cell proliferation of atherosclerosis.

Key Words Atherosclerosis; P53; Gene mutation

a	Codon270~275	TTT	GAG	GTG	CGT	GTT	TGT
	amino acid	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Cys
b	Codon270~275	TTT	GAG	GCG	CGT	GTT	TGT
	amino acid	Phe	Glu	Ala	Arg	Val	Cys

Fig1 a. nucleotides sequences(270~275)[®] of exon 8 of p⁵³ from normal subject
b. nucleotides Sequences (270~275)of exon 8 of p⁵³ from atherosclerotic plaques
A Valine to alanine transversion occurred in codon 272

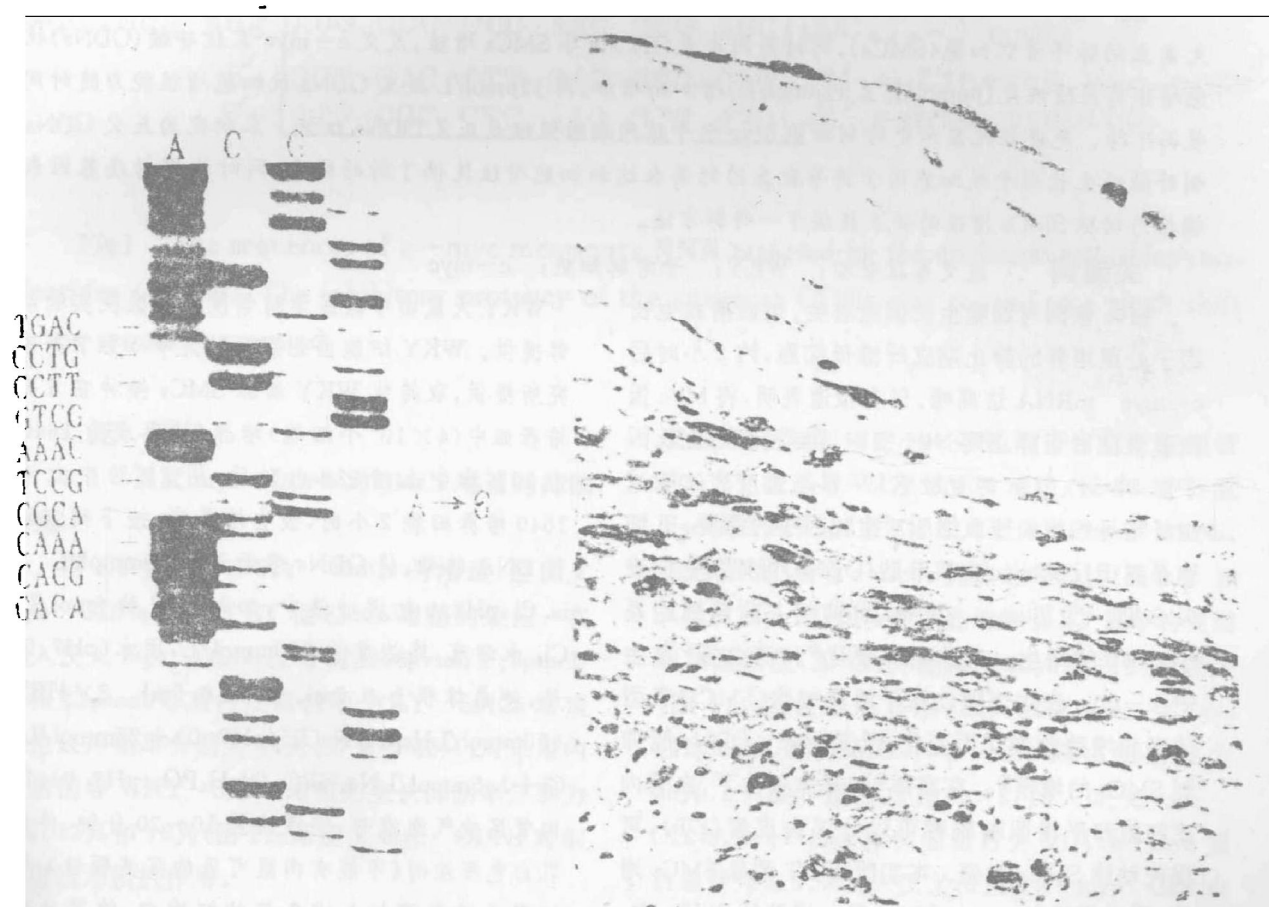


Fig2 Nucleotide sequences of exon 8 of p⁵³ from human atherosclerotic plaques

Fig3 Nuclear accumulation of mutant p⁵³ protein in human atherosclerotic plaques (40 × 2.5)