

· 实验研究 ·

林州居民食管癌 p53 基因突变谱分析与不同地区食管癌和其他类型肿瘤的比较

王立东 刘宾 郑树

【摘要】 目的 分析河南省林州市与其他地区食管癌前病变和鳞状细胞癌 p53 突变谱,探讨食管癌变的发病因素。方法 采用生物信息学和 Monte Carlo 方法,依据 IARC p53 突变数据库、Curic 研究院 p53 突变数据库和郑州大学医学院肿瘤研究所实验室的资料,用 FileMark Pro 3.0 软件系统建立局部资料库进行分析。结果 林州食管癌高发区食管鳞癌碱基替换的发生率低于其他地区食管鳞癌的发生率(32.8% vs 39.8%),但 CpG 位点 G:C→A:T 的发生率高于其他地区食管癌(29.6% vs 16.4%)。林州食管癌突变位点具有明显的特征,主要发生在 273(占有所有错义突变的 11.3%)、175(9.7%)、159(6.5%)和 282(6.5%)位密码子的 CpG 位点上。林州地区食管鳞癌 p53 突变与其他地区食管鳞癌以及头颈部鳞癌 p53 突变相比,差异有显著性($P = 0.02$)。结论 林州食管癌 p53 突变具有内、外源致癌原所致突变的特征,提示慢性炎症、饮食习惯和接触致癌原,可能是林州居民发生食管鳞癌的主要危险因素。

【关键词】 p53 突变谱;食管肿瘤;生物信息学

Analysis of p53 mutational spectra of esophageal squamous cell carcinomas from Linzhou, comparison with esophageal and other cancers from other areas WANG Li-dong*, LIU Bin, ZHENG Shu. *Cancer Institute, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China

【Abstract】 Objective To study the etiological clues involved (in esophageal cancer in Linzhou, Henan, a high-incidence area for esophageal cancer) by analyzing p53 mutational spectrum from esophageal precancerous and cancerous lesions. **Methods** Using bolt bioinformatic and Monte Carlo methods to analyze p53 mutation spectra from "The IARC Database of Somatic p53 Mutations in Human Tumors and Cell Lines", "p53 Database at Institute Curic" and to establish a local database based on these data using the FileMark Pro 3.0 software to allow fast and off-line analysis on a PC from the authors' laboratory. **Results** We found that esophageal squamous cell carcinomas from Linzhou had a lower prevalence of base substitutions associated with strand bias than those from other areas (32.8% vs 39.8%). However, a higher prevalence of G:C→A:T transitions at CpG site (29.6% vs 16.4%) was found. Esophageal squamous cell carcinomas from Linzhou displayed a distinctive profile of mutation hotspots, including codons 273 (covers 11.3% of all missense mutations), 175 (9.7%), 158 (9.7%), 159 (6.5%) and 282 (6.5%), all of which were at the CpG site. Statistical analysis showed that the p53 mutation profiles between esophageal squamous cell carcinomas from Linzhou and those from other areas were different ($P = 0.02$). The p53 mutation profiles of esophageal squamous cell carcinomas from Linzhou and from other areas were also different from cancer of the head and neck. **Conclusion** Data showed that the p53 mutational spectrum of esophageal squamous cell carcinomas from Linzhou bearing the characteristics of those caused both by endogenous and exogenous mutagenic agents, suggesting the potential involvement of chronic inflammation, unique dietary habits and carcinogen exposure in the pathogenesis of esophageal squamous cell carcinoma in Linzhou.

【Key words】 p53 mutation spectrum; Esophageal neoplasms; Bioinformatics

食管癌变是一个多阶段多基因变异的进行性发展过程。肿瘤抑制基因 p53 的改变是人类肿瘤最常

见的分子学变化之一。文献报道^[1] p53 突变类型可能是某些特异的外源性危险因素或内源性危险因素导致基因突变的“指纹”。例如 CpG 二核苷酸处 G:C→A:T 可能是缺乏错配修复功能的细胞内的自发性脱氨基所致。另一方面,肺癌中 G:C→T:A 则是烟草中的苯并芘或其他多环碳氢化合物所致突变的结果。由此可见,特殊人群中 p53 突变的性质可以

基金项目:国家杰出青年科学基金资助项目(30025016);河南省高校创新人才工程基金资助项目

作者单位:310009 杭州,浙江大学医学院肿瘤研究所(王立东、郑树);首都医科大学同仁医院(刘宾)

反映引起突变的 DNA 损伤的生化机制,归纳总结突变谱,有助于确认内、外源性致突变原。利用生物信息学研究手段对河南省食管癌高发区林州(原林县)和其他地区食管癌 p53 突变资料进行比较分析,加深对食管癌发病机制和致病危险因素的认识。

资料与方法

1. 研究 p53 突变谱数据来源:①IARC 数据库的 9 465 例突变记录,其中 408 例来自食管鳞癌。所分析的食管鳞癌中,81 例为林州高发区食管鳞癌,非林州地区的食管鳞癌 327 例,111 例为有吸烟史的食管鳞癌^[2,3];②郑州大学医学院癌症研究所实验室对食管癌高发区林州地区 165 例的分析资料,食管鳞癌手术切除标本 104 例,无症状居民的食管黏膜活检组织 61 例^[4,5]。

2. 方法:用 FileMark Pro 3.0 软件系统建立局部资料库对这些数据库资料和参考文献^[4,5]的数据进行分析。利用这种方法分析快速且可下网工作。突变类型、分布特征(热点等)和结构关系是分析比较的重点。就突变类型而言,本研究检测了 G:C→A:T(CpG 位置和非 CpG 位置)和 A:T→G:C 的转换,G:C→C:G,G:C→T:A,A:T→T:A 的转换,以及其他一些类型(缺失、插入和偶发的双核苷酸替代)。为了对不同突变谱进行统计学处理,应用了 Adams 和 Skopek 系统,两者均使用 Monte Carlo 方法模拟行列表超几何检验^[6,7]。

结 果

1. 林州食管癌高发区居民食管鳞癌和癌前病变的 p53 突变:对林州食管癌高发区的 104 例食管鳞癌手术切除标本、61 例无症状居民的食管黏膜活检组织和 17 例上述食管鳞癌患者手术切除的淋巴结进行 p53 突变分析^[4,5]发现,61 例(58.7%)至少存在 1 处 p53 突变,其中 51 例被检出 1 处突变,8 例有

2 处突变,2 例有 3 处突变。61 例无症状人群中(大多数为基底细胞增生或间变),10 例(19.6%)观察到其活检组织存在 p53 突变。17 例食管鳞癌患者既检出了原发肿瘤,又检出了转移淋巴结,7 例检出了 p53 突变,其中 6 例原发灶与转移淋巴结存在相同的突变。另 1 例原发灶检出了 3 处突变,转移淋巴结检出 2 处与原发灶相同的突变和 1 处与原发灶不同的突变。

2. 林州食管鳞癌的 p53 突变类型:表 1~3 为林州地区与非林州地区食管鳞癌组织以及头颈部癌、肺癌和结肠癌 p53 突变类型及分布特征。林州地区的食管鳞癌 CpG 位置 G:C→A:T 的转换频率(29.6%)高于其他地区的食管鳞癌。有吸烟史的食管鳞癌和林州地区的食管鳞癌均有中等频率的 G:C→A:T 转换(分别为 21.6% 和 21.0%),但前者 A:T→T:A 的转换发生率(14.4%)在所有被分析肿瘤中最高,林州地区食管鳞癌 A:T→T:A 的发生率最低(2.5%)。对 8 个最常见突变类型的突变谱的统计学分析显示,其他地区的食管鳞癌同肺癌($P < 0.000$)、结肠癌($P < 0.000$)差异有显著性,食管鳞癌与头颈部肿瘤的突变谱差异也存在显著性($P = 0.001$)。其他地区的食管鳞癌与有吸烟史的食管鳞癌的突变类型分布差异无显著性($P = 0.67$)。但林州高发区的食管鳞癌与其他地区的食管鳞癌的突变类型分布差异有显著性($P = 0.02$)。林州地区食管鳞癌与头颈部肿瘤的差异无显著统计学意义($P = 0.01$) (表 1)。

3. 林州地区居民食管鳞癌的突变分布和突变热点:62 例错义突变和小片段缺失中(< 2 个残基)检出 3 处突变热点,分别为密码子 158、175 和 273,他们分别占这类改变的 9.7%、9.7% 和 11.3% (表 2)。密码子 159(6.5%)和 282(6.5%)也是相对常见的突变位置(表 2)。

表 1 不同肿瘤 p53 突变谱

肿瘤类型	G:C→A:T (各个部位)	G:C→A:T (CpG 位点)	A:T→G:C	G:T→C:G	G:C→T:A	A:T→C:G	A:T→T:A	其他*	合计
各类肿瘤	4 22(44.6)	2 46(26.1)	1 04(11.5)	70(7.4)	1 41(14.9)	34(3.7)	49(5.3)	1 20(12.7)	9 465
食管癌(非林州市)	12(32.3)	6(16.4)	3(7.9)	1(3.7)	9(26.2)	1(3.7)	3(10.1)	6(16.1)	378
食管癌(吸烟者)	3(32.4)	2(18.0)	1(10.8)	4(3.6)	2(21.6)	0(5.4)	1(14.4)	1(11.7)	111
食管癌(林州地区)	31(38.3)	2(29.6)	6(7.4)	6(7.4)	17(21.0)	5(6.2)	2(2.5)	14(17.3)	81
头颈部癌	22(33.1)	10(15.8)	7(11.4)	6(9.1)	11(16.5)	2(3.2)	4(6.9)	13(19.8)	683
肺癌	30(26.6)	10(9.2)	11(9.9)	14(15.5)	36(31.9)	4(3.9)	4(3.7)	13(11.6)	1 155
结肠癌	66(62.2)	28(42.3)	8(8.1)	4(4.5)	9(9.0)	2(2.2)	4(4.3)	10(9.8)	1 066

* 丢失,插入,2~3 个碱基对替换,表中括号外数据为病例数,括号内为发生突变率(%)

表 2 食管鳞癌 p53 不同密码子部位的突变发生频率

林州地区食管癌				非林州地区食管癌				食管癌(吸烟者)			
密码子部位	突变数	突变频率(%)	累积频率(%)	密码子部位	突变数	突变频率(%)	累积频率(%)	密码子部位	突变数	突变频率(%)	累积频率(%)
273	7	11.29	11.29	176	48	16.05	16.05	273	7	7.45	7.45
158	6	9.68	20.97	175	19	6.35	22.41	248	6	6.38	13.83
175	6	9.68	30.64	248	18	6.02	28.43	282	5	5.32	19.15
159	4	6.45	37.10	273	15	5.02	33.44	175	4	4.26	23.41
282	4	6.45	43.55	282	11	3.68	37.12	176	4	4.26	27.66
135	3	4.84	48.39	193	8	2.68	39.80	220	4	4.26	31.92
176	3	4.84	53.23	195	7	2.34	42.14	179	3	3.19	35.11
				220	7	2.34	44.48	195	3	3.19	38.30
				157	6	2.01	46.49	205	3	3.19	41.49
				266	6	2.01	48.49	236	3	3.19	44.68
				278	6	2.01	50.50	157	2	2.13	46.81
				286	6	2.01	52.51	173	2	2.13	48.94
								193	2	2.13	51.07
合计(外显子)	62				299				94		

4. 碱基替换的条带差异:表 3 按由高到低的顺序列出了所有被分析的表现为条带差异的肿瘤的碱基替换。林州地区表现为条带差异的碱基替换频率(41.8%)与头颈部肿瘤(38.9%)突变率相似。

表 3 条带差异的肿瘤碱基替换频率

肿瘤类型(例数)*	条带差异突变率(%)	双链突变率(%)			单链突变率(%)		
		G→T	T→G	A→G	G→T	T→G	A→G
各类肿瘤(8365)	34.4	17.1	4.2	13.1	83.4	65.8	71.7
肺癌(1021)	51.6	36.0	4.4	11.2	88.6	35.6	80.7
食管癌(317)(非林州市)	45.1	31.2	4.4	9.5	88.9	100.0	80.0
头颈部癌(548)	38.9	20.6	4.0	14.2	81.4	54.5	76.9
结肠癌(962)	21.3	10.0	2.4	8.9	76.0	60.9	59.3
食管癌(88)(吸烟者)	47.7	27.3	6.8	13.6	87.5	100.0	100.0
食管癌(67)(林州市)	41.8	25.4	7.5	9.0	70.6	100.0	83.3

* 各类肿瘤突变数,其不同于表 1 之处是仅包括碱基替换的突变数

5. 突变的分布和突变热点:图 1 显示不同类型肿瘤的 p53 基因突变热点分布。密码子 273 是林州地区食管鳞癌 p53 突变发生率最高的部位。密码子 157~159 这一突变热点组合只在林州食管鳞癌和癌前病变中检出。密码子 176、175、248、273 和 282 是其他地区食管鳞癌的 p53 基因突变热点,特别是密码子 176,是其他地区食管鳞癌最常见的突变发生部位,其突变发生率共占全部错义的 16%。

讨 论

通过对河南省林州地区食管鳞癌和癌前病变组织 p53 突变资料分析,进一步证实 p53 突变是食管

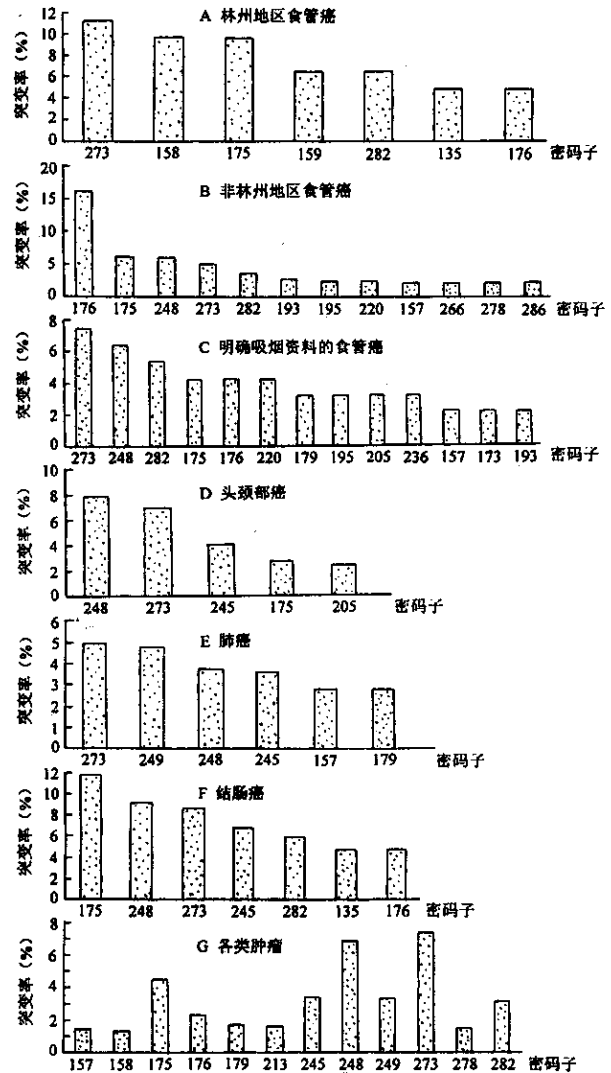


图 1 食管、头颈、肺和结肠癌 p53 基因好发部位(密码子)和频率

鳞癌发生过程中的早期和频发事件(61例/104例)。对于林州食管鳞癌,175~176、273和282位密码子均为突变高发区域,而248位密码子突变率低于平均水平。另一方面,157~159位点也在高发突变之列,约占所有已检出突变的20%左右。第157和158位突变主要为G:C→T:A转换,在非转录链中具有很强的G→T倾向。157~159位点不在p53序列的高度保守区,这个区形成的β链不与DNA结合区相邻。有趣的是,第158位的突变有5/6是在癌前病变(基底细胞过度增生)中检出的。而在食管鳞癌癌旁组织中却存在其他类型的突变^[5]。由此可见,具有较低生长优势的突变,如158位突变(或许因它们与DNA结合区不相邻),可能在癌变多阶段演进的极早期阶段起作用。与之相对,273和282位的突变具有更强的致癌性。第248和273位密码子编码两个精氨酸,直接与DNA分子相连。该位点的突变阻止了p53蛋白与其在DNA识别位点的正常结合^[8]。第282位密码子突变是十分严重的,因为精氨酸282参与DNA螺旋结构的装配,是形成DNA螺旋结构中螺旋折叠部分的重要因素。精氨酸175和半胱氨酸176发生在L2环上,在锌结合位点的附近,而且大部分与蛋白表面隔离^[8]。在不同的种系中,这个区域高度保守,这对保持DNA结合区结构的稳定性具有重要的意义^[9]。所以,半胱氨酸176紧邻精氨酸175,并能与其他残基形成双硫带,因此在维持蛋白结构的稳定性方面可能也具有类似的作用。

林州食管鳞癌与文献报道的食管鳞癌相比,p53突变谱有所不同,主要表现在林州食管鳞癌中碱基置换与条带偏差关系不大,而G:C→T:A转换在CpG位点发生率却很高(24/31)。资料显示^[1],CpG位点G:C→T:A转换,可由自发性因素引起,或者在甲基化CpG二核苷酸处由亚硝基化合物诱导5-甲基胞嘧啶脱氨基作用造成^[10]。亚硝酸和烷化剂可引起A:T→G:C转换,而不是在CpG位点G:C→T:A转换或A:T→T:A的转换^[11]。外源致癌物常常诱导非转录链发生突变,这种现象已在乳腺细胞和鼠皮肤癌模型中得到证实^[8]。检出带有大量条带差异的突变提示有外源致癌物的作用。

在西方国家,吸烟与酗酒被认为是食管癌的主要发病因素,而在林州,食管癌的发生与进食霉变食物(可能是亚硝酸或前体及霉菌毒素的来源之一)、过烫饮食及微量元素的缺乏^[12,13]有很大关系。营

养缺乏与过热刺激可引起消化道黏膜受损,从而成为内源性突变发生的原因。林州食管癌病人常患有食管炎,而食管的慢性炎症则可导致内源性突变的发生^[14,15]。所以内源性和外源性危险因素的共同作用,可能是林州食管癌高发率的主要作用机制。

参 考 文 献

- Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA [see comments]. *Nature*, 1993, 362:709-715.
- Hainaut P, Hernandez T, Robinson A, et al. IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualization tools. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26:205-213.
- Beroud C, Soussi T. p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26:200-204.
- Gao H, Wang LD, Zhou Q, et al. p53 tumor suppressor gene mutation in early esophageal precancerous lesions and carcinoma among high-risk populations in Henan, China. *Cancer Res*, 1994, 54:4342-4346.
- Shi ST, Yang G, Wang LD, et al. Role of p53 gene mutations in human esophageal carcinomas: result from immunohistochemical and mutation analyses of carcinomas and nearby non-cancerous lesions. *Carcinogenesis*, 1999, 20:591-597.
- Piegorsch WW, Bailer AJ. Statistical approaches for analyzing mutational spectra: some recommendations for categorical data. *Genetics*, 1994, 136:403-416.
- Cariello NF, Piegorsch WW, Adams WT, et al. Computer program for the analysis of mutational spectra: application to p53 mutation. *Carcinogenesis*, 1994, 15:2281-2285.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, et al. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations [see comments]. *Science*, 1994, 265:346-355.
- Gannon JV, Greaves R, Iggo R, et al. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *Embo J*, 1990, 9:1595-1602.
- Routledge MN, Wink DA, Keefer LK, et al. Mutations induced by saturated aqueous nitric oxide in the pSP189 supF gene in human Ad293 and *E. coli* MBM7070 cells. *Carcinogenesis*, 1993, 14:1251-1254.
- Olshan AF, Weissler MC, Pei H, et al. p53 mutations in head and neck cancer: new data and evaluation mutational spectra. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev*, 1997, 6:499-504.
- Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer*, 1996, 69:225-235.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 1994, 54:4855-4878.
- Qiu SL, Yang GR. Precursor lesions of esophageal cancer in a high risk population in Henan province, China. *Cancer*, 1988, 62:551-556.
- Wang LD, Qiu SL, Yang GR, et al. A randomized double-blind intervention study on the effect of calcium supplementation on esophageal precancerous lesions in a high-risk population in China. *Epidemiol Biomarkers & Prev*, 1993, 2:71-78.

(收稿日期 2002-03-20)

(本文编辑:尹廉)