

四种原发恶性肿瘤中 p16 基因的缺失和突变研究

李淑锋¹, 曹祥荣¹, 陈涛¹, 叶玉坤²

(1. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

(2. 解放军第 81 医院全军肿瘤中心, 南京 210002)

[摘要] 采用双重 PCR、PCR-SSCP 和序列分析方法, 对 31 例非小细胞肺癌、15 例食管癌、13 例胃癌、9 例乳腺癌共 68 例原发肿瘤组织标本 p16 基因进行了研究。p16 基因在肺癌、食管癌、胃癌、乳腺癌中的缺失率分别为 16%(5/31)、20%(3/15)、8%(1/13) 及 0/9。2 例突变: 一例食管癌在第 130 位氨基酸密码由 AGA 变为 ATA, 编码的氨基酸由精氨酸变为异亮氨酸。一例肺癌第 140 位氨基酸的 CGG 处的 C 缺失, 导致移码突变。p16 基因在人类恶性肿瘤发生发展中起重要作用, 是多肿瘤抑制基因。

[关键词] 肿瘤; p16 基因; 基因缺失; 基因突变

[中图分类号] Q75; [文献标识码] A; [文章编号] 1001-4616(2001)02-0079-04

1994 年 Kamb 等^[1]在人染色体 9p21 发现一个新的抑癌基因, 即 p16 基因。由于该基因在多种类型肿瘤细胞株中的频繁缺失, 成为近年来肿瘤分子生物学的研究热点。随着研究的深入, 又证实在原发肿瘤如黑色素瘤、恶性间皮瘤、恶性胶质瘤、神经母细胞瘤及星形细胞瘤中都有高频率缺失和突变。我们采用双重 PCR 及 SSCP 方法, 对原发非小细胞肺癌、食管癌、胃癌、乳腺癌共 68 例肿瘤中 p16 基因的缺失和突变情况进行了分析, 结果如下。

1 材料与方法

1.1 材料

68 例肿瘤组织及相应癌旁组织来自南京八一医院手术标本, 每例均经病理确诊。术后立即用液氮保存, 以备提取 DNA。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及 PCR 扩增

常规方法提取组织 DNA。参考有关的文献报道^[2,3,4], 对 p16 基因第一、第二外显子的两侧各设计一对引物(均由上海生工生物工程公司合成), 另外还设计一对内对照引物(3-磷酸甘油醛脱氢酶 GAPDH 引物)。见表 1。以提取的基因组 DNA 为模板, 在 DNA 扩增仪(基因公司 PTC-200)上扩增基因组中的 p16 基因第 1、第 2 外显子, 以 GAPDH 为内对照, PCR 反应总体积为 25 μ L。反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳分析。

1.2.2 PCR-SSCP 银染分析

取 PCR 产物 5 μ L, 加入变性加样液 10 μ L, 加热变性后骤冷, 上样 8% 聚丙烯酰胺凝胶, 电

收稿日期 2000-12-16

基金项目: 国家九五重点科技(攻关)计划项目(969060118)

作者简介: 李淑锋, 1968—女, 硕士, 东南大学医学院生物教研室助教, 从事分子生物学研究。

通讯联系人: 曹祥荣, 1963—男, 博士, 南京师范大学生命科学学院副教授, 从事细胞与分子遗传学研究。

泳,凝胶银染后拍照.

1.2.3 序列分析

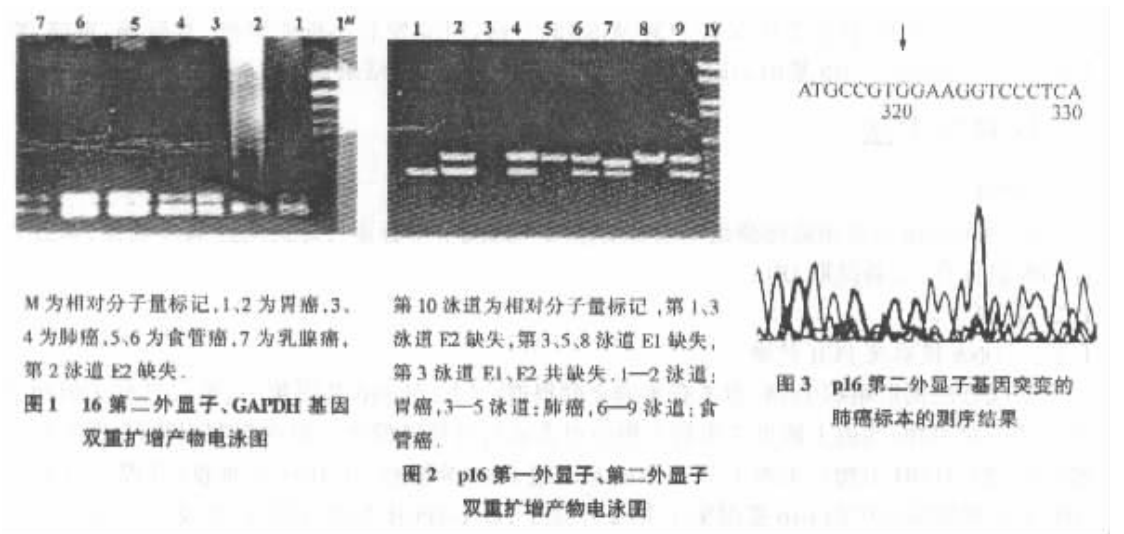
用 Wizard™ PCR preps DNA Purification System(Promega)纯化 PCR 产物,然后送 310 全自动测序仪测序.

2 结果

2.1 PCR

68 例癌旁组织标本在 280bp(p16 第一外显子)和 427bp(p16 第二外显子)处均有 PCR 扩增带,为排除实验误差,加入内对照 GAPDH 引物(356 bp)进行扩增.而 68 例肿瘤组织中肺癌、食管癌、胃癌、乳腺癌的 p16 基因存在不同的缺失率,分别为 16%(5/31),20%(3/15),8%(1/13)及 0/9).统计情况见表 2. p16 第二外显子扩增见图 1, p16 第一外显子扩增见图 2.

表 1 PCR 扩增引物序列			表 2 PCR 检测结果统计				
扩增片段	引物序列	片段大小	类型	例数	CDKN2/p16 基因缺失		
					E1 缺失	E2 缺失	总缺失
Exon1	5'TCTGCGGAGGGGAGAGCAG 3 ,	280 bp	肺癌	31	2	4	5/31(16%)
外侧引物	5'CGCTACCTGATTCCAATTC 3 ,		食管癌	15	1	2	3/15(20%)
Exon2	5'CTCAGCTTTGGAAGCTCTCA 3 ,	427 bp	胃癌	13	0	1	1/13(8%)
外侧引物	5'GGCTCTACACAAGCTTCCTT 3 ,		乳腺癌	9	0	0	0/9(0%)
GAPDH	5'GTGAAGGTCGGAGTCAAC 3 ,	356 bp	合计	68	3	7	9/68(13%)
(内对照引物)	5'GAGATGATGACCCTTTTGGC 3 ,						



2.2 PCR-SSCP 测序

对 PCR 扩增的肿瘤第二外显子通过 SSCP 进行初步突变筛查,然后将 SSCP 异常的标本进行 DNA 测序.图 3 示一例测序异常的肺癌标本,第 140 位氨基酸的 CGG 处的 C 缺失,导致移码突变,箭头示 C 碱基缺失处.

3 讨论

p16 基因是多重肿瘤抑制基因(又称 Ink4a/MTS1/CDK4I 基因)的简称.该基因位于 9p21 ,

— 80 — 万方数据

全长约 8.5 kb,包括 2 个内含子和 3 个外显子(126 bp,307 bp,11 bp)。编码区为 444 bp。p16 表达的蛋白对细胞周期抑制机制是通过与 CDK4、CDK6 (Cyclin dependent Kinase 细胞周期素依赖激酶)结合,使 cyclinD/CDK4 复合物活性丧失,从而阻止 RB 磷酸化,细胞不能进入 S 期。如果 p16 基因发生突变、缺失等异常变化,则必然会导致细胞的无限制的增殖,从而引起肿瘤的发生。

研究发现,p16 基因失活机制主要包括基因的纯合性缺失、点突变、重排和 5'端 CpG 岛异常甲基化,尤以纯合性缺失为主。我们在 68 例肿瘤组织中,经 PCR 检测确定 p16 基因在肺癌、食管癌、胃癌、乳腺癌的 p16 基因存在不同的缺失率,分别为 16%(5/31)、20%(3/15)、8%(1/13)和 0/9。这一结果与文献^[2,5,6]基本相符。我们认为 PCR 检测的基因缺失率可能低于实际水平,除正常间质细胞和炎性细胞污染外,在引物未包括的启动子区和内含子区变异的漏检以及检测方法、病例选择及病程等因素均可影响检测结果。另一方面,p16 基因缺失在某些原发性肿瘤细胞如肺癌、食管癌中较常见,但在胃癌、乳腺癌中可能以其他的基因失活机制如点突变或甲基化为主。Herman 等^[7,8,9]的研究显示,p16 基因启动子 CpG 岛高度甲基化在细胞系(乳腺癌 33%,前列腺癌 60%)以及原发性肿瘤(乳腺癌 31%,大肠癌 40%)中均有较高频率。表明 CpG 岛高度甲基化也是肿瘤常见变异。Joseph^[10]在对神经胶质瘤的研究中也发现 24%的肿瘤有 p16 的部分甲基化,但在正常脑组织中未见,为证明是否部分的甲基化可以抑制肿瘤细胞株中 p16 的表达,这些细胞经去甲基化试剂 5-氮,2-去氧胞嘧啶的处理,导致启动子可接近性的增加和 p16 表达的增加,提示染色质的结构,CpG 岛甲基化和 p16 的表达的相关性。

我们通过 PCR-SSCP 和 DNA 测序,仅检测到 2 例突变,这比文献报道的结果要略低^[4,11,12]。一例食管癌在第 130 位氨基酸密码由 AGA 变为 ATA,编码的氨基酸由碱性氨基酸精氨酸变为异亮氨酸。一例肺癌第 140 位氨基酸的 CGG 处的 C 缺失,导致移码突变。许多研究显示,p16 蛋白结构中具有 4 个回钩状重叠的空间构型蛋白结构,称为 Ankyrin repeats。4 个 Ankyrin repeats 也是 p16 蛋白家族(p16INK4a、p15INK4b、p16INK4a、p18INK4c 和 p19INK4d)所共有空间结构,均可结合 CDK4 和 CDK6 而发挥抑制细胞周期的作用。一旦碱基突变影响其回钩结构,造成 p16 结合 CDK4 的能力下降,就无法发挥其抑制作用。Rong Yang^[13]等利用体外随机碱基突变和酵母双杂交系统,检测 p16 蛋白氨基酸的改变与其结合 CDK4 的能力的关系。一些氨基酸非常重要,这些残基的改变将严重影响 p16 结合 CDK4 的能力,而许多这些氨基酸的位点在 p16 蛋白家族中是保守的,位于 Ankyrin repeats 区间内。有些碱基突变虽然只是轻微的改变,改变了 p16 结合 CDK4 的能力,但却严重影响了 p16 的抑制功能。以上研究充分说明了 Ankyrin repeats 结构的重要性。

p16 基因在不同肿瘤组织标本中的缺失率差别很大,说明其失活机制不完全相同。这可能与各脏器组织接受致癌物种类、剂量以及对致癌物代谢能力有关,此外,还可能与各组织中 p16 基因表达活性有关。p16 的研究目前处于上升趋势,研究还远未达到定论程度,一个重要的原因是原发性肿瘤比细胞株复杂,而要得到明确的结论,必须研究各种原发性肿瘤,并能改进方法学,去除正常细胞的干扰。总之,这方面的研究将为了了解肿瘤的发生、发展及治疗提供新的思路和线索。

[参考文献]

- [1] Kamb A, Gruis N A, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J]. Science, 1994, 264(15): 436—440.

- [2] 金顺钱,彭琼,陆士新.食管癌组织中 MTS1/p16 基因的缺失[J].中华肿瘤杂志,1998,20(1):9—11.
- [3] 周春晓,孙建衡,陆士新.子宫内腺癌中 CDKN2/p16 基因缺失的研究[J].中华肿瘤杂志,1997,19(6):404—406.
- [4] 王国丽,杜传书,林群娣.非小细胞肺癌中 p16INK4/CDKN2 基因的缺失和点突变[J].中华医学遗传学杂志,1998,15(1):5—8.
- [5] Liggett W H Jr, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer[J]. J Clin Oncol, 1998, 16(3):1197—1206.
- [6] Nobori T, Miura K, Wu D J, *et al.* Deletion of the cyclin dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers[J]. Nature, 1994, 368:753—756.
- [7] Washmi O, Nagatake M, Osada H, *et al.* *In vivo* occurrence of p16 (MTS1) and p15 (MTS2) alteration preferentially in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 1995, 55:514—517.
- [8] Merlo A, Herman JG, Mao L, *et al.* 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers[J]. Nat Med, 1995, 1:686—688.
- [9] Herman J G, Merlo A, Mao L, *et al.* Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers[J]. Cancer Res, 1995, 55(20):4525—4530.
- [10] Joseph F. Costello, Mitchell S Berger, H-J Su Huang, *et al.* Silencing of p16 /CDKN2 Expression in Human Gliomas by Methylation and Chromatin Condensation[J]. Cancer Res, 1996, 56:2405—2410.
- [11] 陈柏华,王秀琴,林晨,等.中国人食管癌 p16 基因突变分析[J].中华医学遗传学杂志,1997,14:138—141.
- [12] 王柏秋,傅松滨,李克深,等.肺腺癌中 p16 基因外显子 2 的突变分析[J].中华医学遗传学杂志,1997,14(3):152—154.
- [13] Rong Yang, Manuel Serrano, James Slater, *et al.* Analysis of p16INK4a and its interaction with CDK4[J]. Biochemical and Biophysical Research communications, 1996, 218(1):254—259.

p16 Gene Deletions and Mutations in Human Primary Cancers

Li Shufeng¹, Cao Xiangrong¹, Chen Tao¹, Ye Yukun²

(1. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, PRC)

(2. The Cancer Center of PLA the 81st Hospital, Nanjing, 210002, PRC)

Abstract To investigate the alteration of p16 gene in human primary cancers, p16 gene was analyzed by duplex PCR, SSCP and sequencing in 68 tumors including 31 non-small cell lung cancers, 15 esophageal cancers, 13 gastric cancers and 9 breast cancers. Two mutations were found by DNA sequencing. One is point mutation in esophageal cancer, the other is frame shift in non-small cell lung cancer. Gene deletions were found in nine samples (5 non-small cell lung cancers, 3 esophageal cancers, 1 gastric cancer). One case had whole p16 gene deletion and the other 8 had deletion in exon1 or in exon2. These results indicate that inactivation of p16 gene plays a critical role in the development of some cancers, p16 gene is an important suppressor gene of many tumors.

Key words tumor; p16 gene; gene deletion; gene mutation

[责任编辑 孙德泉]