

# *P16* 基因与散发性食管癌的研究

龚嫦虹, 邱定红, 黄 鹰, 周晓雷, 王为未, 张丽珊

(南京铁道医学院生物教研室 江苏 南京 210009)

**摘要:** 本文对 47 例散发性食管癌中 *P16* 基因的第二外显子, 先用外侧引物扩增进行缺失筛查, 再用三对内侧引物扩增经首次外侧引物扩增所得的 PCR 的产物, 进行套式 PCR 结合 SSCP 及 PCR 直接银染测序技术检测突变。结果检出食管癌中有 2 例缺失, 5 例突变。在检测出的食管癌的突变中, 我们发现所有的突变均为 125 位密码子的错义突变, 为 CGG→CTG 的颠换, 使 p16 蛋白该位的碱性的精氨酸变为酸性的亮氨酸。这一结果提示 *P16* 基因可能与食管癌的发生密切相关。本文参考 *P16* 基因的结构功能区对所测突变进行了讨论, 提出了进一步研究的设想。

**关键词:** 食管癌; *P16* 基因; 突变; 银染测序

中图分类号: Q754; R735.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)01-0007-10

## Investigation of *P16* Gene and Sporadic Esophageal Tumors

GONG Chang-hong, QIU Ding-hong, HUANG Ying, ZHOU Xiao-lei, WANG Wei-wei, ZHANG Li-shan

(Department of Biology, Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** To elucidate the involvement of abnormalities of exon2 of *P16* gene located at chromosomal region 9p21 in the development of upper digestive tract cancer, we analysed DNA from 47 patients with sporadic esophageal tumors using PCR, nested-PCR, SSCP, PCR-direct DNA sequencing. We detected allelic deletions in 2 samples (4.2%), missense mutations in 5 samples (10.6%). Furthermore these mutations were the CGG→CTG transversion at the same site of the codon 125, leading to the change from Arg→Leu, once transcribed.

**Key words:** Esophageal tumors; *P16* gene; Mutation; Silver-sequencing

1994 年 Kamb 报道的 *P16* 基因是一种抑癌基因, 它位于 9 号染色体短臂的 2 区 1 带上, 全长约 8.5kb, 由 3 个外显子 (126bp, 307bp, 11bp) 和两个内含子组成, 它的外显子序列编码一种已知的细胞周期素激酶的抑制蛋白 p16<sup>[1]</sup>。进一步的研究发现, *P16* 编码的蛋白通过特异地与细胞周期素激酶 CDK4、CDK6 结合, 而抑制 CDK4/cyclinD 的酶活性, 从而使 Rb 蛋白脱磷酸化, 控制 G<sub>1</sub>/S 期的进展<sup>[2]</sup>。因此如果 *P16* 基因发生了突变、缺失, 或者 p16 蛋白发生质和量上的改变, 则必然导致细胞的无限增殖, 从而引起肿瘤的发生。

在对一些来源于肺、乳腺、脑、骨、皮肤、膀胱、肾、卵巢、食管、结肠等肿瘤细胞株的研究中, 和对家族性肿瘤如恶性黑色素瘤等的研究<sup>[3]</sup>, 及在对神经

胶质瘤、肺癌、食管癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌、白血病等原发性肿瘤研究中, *P16* 表现出较高的缺失突变频率, 或者发现 p16 蛋白在肿瘤组织中的低水平表达和不表达<sup>[4-10]</sup>, 这些事实体现了 *P16* 基因在肿瘤的发生过程中扮演着重要的角色。

目前所发现的突变热点主要位于 *P16* 的第一、二外显子。本课题应用了 PCR、套式 PCR、SSCP、PCR 产物直接银染测序技术对 47 例散发性食管癌 *P16* 基因第二外显子的突变、缺失进行了检测, 并对 *P16* 基因突变缺失与肿瘤病理分型, 恶性程度等生物学行为指标进行了相关性讨论, 为深入了解肿瘤发生发展的分子遗传学机理奠定了基础, 并为临床诊断提供了一些客观的依据。

收稿日期: 1998-09-24; 修回日期: 1999-03-15

基金项目: 铁道部基金资助课题

作者简介: 龚嫦虹, 女, 26 岁, 硕士, 助教, 专业: 医学遗传学。

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

本文所涉及的 47 例散发性食管癌的癌组织及癌旁组织均取自外科手术切除的肿瘤包块,并由南京铁道医学院附属医院病理科和江苏省肿瘤医院病理科提供并鉴定。

## 1.2 方法

### 1.2.1 DNA 的提取

### 1.2.2 PCR 扩增和套式 PCR 扩增

参考已有的文献报道,对第二外显子设计了一对外侧引物,为便于进一步进行 SSCP 操作和提高 PCR 产物直接测序的模板纯度,又设计了三对内侧引物(上海生工生物工程有限公司合成)。

表 1 PCR 扩增及套式扩增的引物序列、片段大小

扩增片段	引物序列	片段大小
P16 <sub>exon2</sub> 外侧	5' - TCTGAGCTTTGGAAGCTCTCA - 3'	522bp
	5' - GAGAACTCAAGAAGGAAATTGG - 3'	
内侧1	5' - CATTATGTTCTCTCTGGCAG - 3'	158bp
	5' - CACCACCAGCGTGTCCAGGAA - 3'	
内侧2	5' - GACCCGTGCAGCAGCT - 3'	150bp
	5' - GGTACCGTGGCAGATCGC - 3'	
内侧3	5' - TGGACCTGGCTGAGGAG - 3'	140bp
	5' - CAAATTCTCAGATCATCAGTCCTC - 3'	
内对照	5' - AGGACAAGAGAAATAAGGCC - 3'	294bp
	5' - CACGTTGGGGCCTTTGCGTA - 3'	

反应总体积为 50 $\mu$ l,其中 10 $\times$  反应缓冲液 5 $\mu$ l, 10pmol/ $\mu$ l 引物各 2 $\mu$ l, 15mol/L MgCl<sub>2</sub> 2.7 $\mu$ l, 2mmol/L dNTPs 5 $\mu$ l, 基因组 DNA 0.3 $\mu$ g, Taq 酶 2.5U(上海生工);反应条件为 95 $^{\circ}$ C 30", 50 $^{\circ}$ C 30", 72 $^{\circ}$ C 45", 35 个循环。

最后我们将扩增产物取 8~10 $\mu$ l,经 3% 琼脂糖凝胶电泳,已知小分子 Marker 作标记,检测 PCR 产物的长度和纯度,观察有无缺失。

### 1.2.3 SSCP - 银染检测

通过对实验条件的摸索,在对 158、150bp 的产物进行 SSCP 时,我们采用的是 8% 的聚丙烯酰胺凝胶;而对于 140bp 的产物,我们使用了不连续密度梯度聚丙烯酰胺凝胶,上层为 8%,下层为 12%,取得了较好的结果。

### 1.2.4 PCR 产物直接银染测序

## 2 结果

### 2.1 P16 第二外显子的缺失

本实验用外侧引物对 47 例食管癌 P16 基因进行检测,发现其中 2 例食管癌存在纯合性缺失,为排除实验误差,对这些异常标本进行重复扩增并加入可获得 294bp 的一对内对照引物结果显示正常标本中均存在 522bp 带,而 2 例肿瘤标本的扩增产物中没有这条带(图 2),为排除是由于引物两端改变造成 522bp 缺失的假象,我们又以基因组 DNA 为模

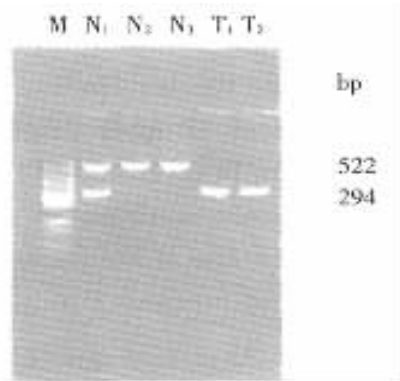


图 2 P16 第二外显子 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

板,分别用三对内侧引物进行扩增,结果依然是阴性,因此说明这些标本至少存在 522bp 的缺失。

### 2.2 PCR-SSCP 筛查结果

(1) 为了提高测序模板的纯度和 SSCP 的敏感性,以外侧引物的 522bp 扩增片段为模板,分别用三对内侧引物对各标本进行套式扩增可得 158、150、

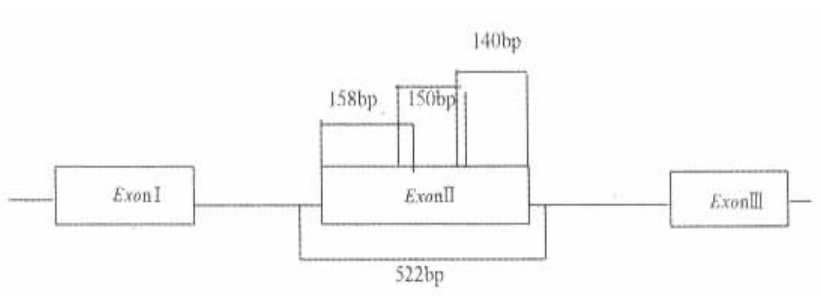


图 1 4 对引物的扩增产物在 P16 基因中的相对位置

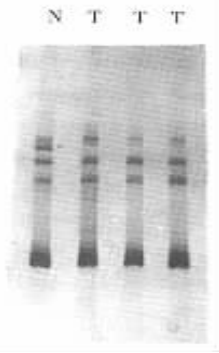


图 3 食管癌组织 *P16* 第二外显子 140bp 片段 SSCP 结果

140bp 的片段。

(2) 经 PCR-SSCP 检测发现,在这些标本中所得的 158 和 150bp 片段中均无异常,而 5 例标本的 140bp 片段出现了异常(图 3)。

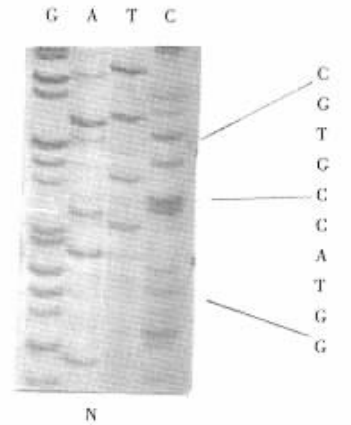
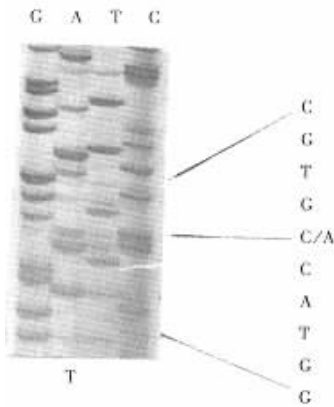


图 4 食管癌测序结果

### 2.3 DNA 序列分析结果

为进一步确定经 PCR-SSCP 测出的 5 例阳性标本的突变性质,我们对它们进行了 DNA 序列分析(图 4)。

结果显示,这 5 例阳性标本均为 C-A 的杂合性错义突变,即在相应的 125 位密码子处出现 G→T,密码子由 CGG 变为 CTG,由碱性的精氨酸变为酸性的亮氨酸,使极性发生了改变。

## 3 讨 论

肿瘤细胞的分裂与正常细胞一样,也经过一定的细胞周期,传统上被分为  $G_1$ 、S、 $G_2$ 、M 期,体内有些不活跃分裂的细胞可能最终分化而不能进入细胞周期,或进入一种暂时静止状态  $G_0$  期。除此之外,细胞周期会在  $G_1$ 、 $G_2$  期的关卡受到阻滞<sup>[11]</sup>。细胞进入分

表 2 *P16* 基因突变患者的一般情况

编号	性别	年龄	病理组织分型	浸润程度	淋巴结转移
1	男	60	溃疡型鳞癌 II - III 级	累及肌层	无
2	男	49	溃疡型鳞癌 I - II 级	浸润深肌层	无
3	男	51	髓质型小细胞未分化癌	累及全层	6/13 转移
4	女	66	髓质型鳞癌 I - II 级	累及深肌层	无
5	男	64	溃疡型鳞癌 II - III 级	累及深肌层	2/12 转移

裂周期后依赖于周期蛋白依赖性激酶(cdk)的活化,cdk 只有与周期蛋白结合才能被激活,同时 cdk 也可与一系列蛋白质结合而被抑制<sup>[12]</sup>。这些蛋白质又称为 CDK-inhibitors,是一组小分子蛋白质,它们可以参与细胞周期的负性调节,当这些蛋白发生缺陷时,必然会导致细胞的无限增殖,从而引起肿瘤的发生<sup>[13]</sup>。p16 蛋白就是其中的一种,*P16* 基因的产物能与

CyclinD 竞争性结合 cdk4,抑制 cdk4 的正向作用,它通过 Rb/CyclinD/CDK4/p16 负性调节,使之不能对 Rb 进行磷酸化,导致 Rb 蛋白抑制了 DNA 合成所需的一些酶的表达<sup>[14]</sup>。

*P16* 基因的改变因肿瘤的病理学类型、组织学类型,以及肿瘤的恶性程度的不同而不同。Stephen J.Meltzer 在研究了 24 例食管鳞状上皮细胞癌,19 例食管腺癌,发现 5/24(21%) 鳞癌和 1/19(5.2%) 腺癌出现了碱基的替代,包括 4 个无义突变,导致蛋白质合成的提前终止,在通过 LOH 分析,在另外 19 个鳞癌,4/18(20%) 个腺癌中有 LOH,且在多个位点上<sup>[15]</sup>,提示 *P16* 基因的改变与肿瘤病理组织类型相关。

在我们研究的食管癌中检出了 2 例缺失 2/47,突变 5/47。且我们发现这些有 *P16* 改变的肿瘤大多属于恶性程度较高者,且多见于鳞癌(表 2),提示

P16 基因的突变可能为肿瘤发生的较晚期行为,且与肿瘤的病理类型有关。

在我们的研究中,发现几例肿瘤突变位点均在同一位置的杂合性突变,即位于 125 位的密码子由 CGG 到 CTG。Richard<sup>[16]</sup>等人通过体外实验发现其中从 73 位氨基酸到 131 位氨基酸非常重要,其间的突变与缺失会严重影响 p16 结合 CDK4 发挥抑制作用。因此 5 例食管癌标本同在 125 位的错义突变显然是有意义的,可以排除由于 DNA 多态引起改变的可能性。

我们的结果还显示了这一突变是杂合性突变方式出现的,即在同一位置除有突变的碱基,还包括正常的碱基,造成这一结果的原因可能为:(1)存在与 p53 基因相类似的显性负效应:指不伴随等位片段丢失的单个突变事件导致基因失活的一种方式<sup>[17]</sup>(2)有正常组织的混杂。由于我们取的标本皆位于病灶中心部位,所以可以排除第二种可能,因此我们认为正是由于显性负效应造成的。

对于未检出肿瘤标本,可能与第一外显子或 CDKN2 基因的甲基化有关。由于时间和经费有限,我们只对 P16 的第二外显子作了研究,而第一和第三外显子未作检测,因此未见异常的肿瘤有可能通过其他外显子或通过除缺失和点突变以外的机制使 P16 基因失活。

## 参考文献:

- [1] Kamb A, Gruis N A, Skoninick M H, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J]. Science, 1994, 15: 264(5157): 436 ~ 440.
- [2] Mannel S, Hannon G C, Beach D, et al. A new regulatory motif in cell ~ cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4[J]. Nature, 1993, 366: 704 ~ 707.
- [3] Wainwright B. Familial melanoma and p16—a hung jury[J]. Nature Genetics, 1994, 8: 15 ~ 21.
- [4] 黄倩,陶勇浩,李川源,等. p16, p15 基因在多种原发恶性肿瘤与肿瘤细胞株中存在状态的研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 1996, 13(4): 198 ~ 202.
- [5] Delvin J, Elder P A, Gabra H, et al. High frequency of chromosome 9 deletion in ovarian cancer: evidence for three tumour suppressor loci[J]. British Journal of Cancer, 1996, 73: 420 ~ 423.
- [6] Walker D, G, Duan W, Popovic E A, et al. Homozygous deletions of the multiple tumor suppressor gene 1 in the progression of human astrocytomas[J]. Cancer Research, 1995, 55: 20 ~ 23.
- [7] Walker D G Duan W, Popovic E A, et al. Homozygous deletions of the multiple tumor suppressor gene 1 in the progression of human astrocytomas[J]. Cancer Research, 1995, 55: 20 ~ 23.
- [8] Mori T, Miura K, Aoki T, et al. Frequent somatic mutation of MTS1/CDK4(Multiple Tumor Suppressor/ Cyclin-dependent kinase 4 Inhibition) gene in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Research, 1994, 54: 3396 ~ 3397.
- [9] Okamoto A, Hussain S P, Hagiwara K, et al. Mutations in the p16<sup>INK4</sup>/MTS1/CDKN2, p15<sup>INK4B</sup>/MTS2 and p18 genes in primary and metastatic lung cancer[J]. Cancer Research, 1995, 55: 1448 ~ 1451.
- [10] Moulton T, Samara G, Chung W Y. MTS1/p16/CDKN2 lesions in primary glioblastoma multiforme[J]. Am J Pathol, 1995, 146: 3, 613 ~ 619.
- [11] Fizzotti M, Cimino G, Pisegna S. Detection of homozygous deletion of the cyclin dependent kinase 4 inhibitor(p16) gene in acute lymphoblastic leukemia and association with adverse prognostic features[J]. Blood, 1995, 85: 10, 2685 ~ 2690.
- [12] Sherr C. J. G1 phase progression: cycling on cue[J]. Cell, 1994, 79: 551 ~ 555.
- [13] Hannon G J, Beach D. p15<sup>INK4B</sup> is a potential effector of TGF-β-induced cell cycle arrest[J]. Nature, 1994, 371: 257 ~ 260.
- [14] Elledge S J, Harper J W. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development[J]. Curr Opin Cell Biol, 1994, 6: 6, 847 ~ 852.
- [15] Xiong Y, Hannon G J, Zhang H, et al. P21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature, 1993, 366: 701 ~ 704.
- [16] Meltzer S T, Zhou X, Tarmin L, et al. The MTS1 gene is frequently mutated in primary human esophageal tumors[J]. Oncogene, 1994, 9: 3737 ~ 3741.
- [17] Richard L, Sarcevic B, Kennedy C, et al. Cancer-associated mis-sense and deletion mutations impair P16INK4 CDK inhibitory activity[J]. Int. J. Cancer, 1996, 66: 249 ~ 254.
- [18] 陈仁彪,冯波等(编). 医学遗传学[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,1995.

## · 会 讯 ·

### 第九届全国眼科遗传学术会议召开

第九届全国眼科遗传学术会议于 1999 年 10 月 30 ~ 11 月 2 日在重庆市举行。出席会议的代表 150 人,交流学术论文 165 篇,大家围绕眼遗传病防治进行了热烈的讨论。近视眼是眼科中最常见的遗传性疾病,为此,会议期间举办了近视眼防治学习班,由上海医科大学附属二院杜之渝医师为大家讲述近视眼预防、透氧硬性隐形眼镜(RGP)、角膜塑形镜片(OK 镜)、近视眼预测系统以及屈光手术的近代研究成果及实践经验,并作专业实习,学习气氛浓厚,发言踊跃,代表们都认为受益匪浅。会议期间组成了新一届全国眼科遗传学组,共由 21 名委员组成。主任委员褚仁远;副主任委员周久模、张清炯,秘书周行涛、陈民高。下届会议初步定于 2001 年在陕西省西安市举行。

(周行涛、陈民高)