

涎腺腺样囊性癌 p16 基因失活机制的研究

郭小玲¹, 孙善珍¹, 魏奉才²

(1. 山东大学口腔医院 口腔颌面外科; 2. 山东大学齐鲁医院 口腔颌面外科, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的 研究 p16 基因在涎腺腺样囊性癌中的失活机制。方法 收集山东大学齐鲁医院及口腔医院口腔颌面外科涎腺腺样囊性癌新鲜标本 53 例, 应用 PCR、聚合酶链反应 - 单链构象多态性分析 (PCR-SSCP) 及甲基化特异性 PCR (MSP) 技术检测涎腺腺样囊性癌中 p16 基因的纯合性缺失、突变及甲基化。结果 53 个病例中 16 例 (30.2%) 纯合性缺失, 4 例 (7.5%) 突变, 26 例 (49.1%) 高甲基化。结论 p16 基因在涎腺腺样囊性癌中的主要失活机制是启动子高甲基化和纯合性缺失, 而基因突变比较少见。

[关键词] 涎腺腺样囊性癌; p16; 缺失; 突变; 甲基化

[中图分类号] R 739.8 [文献标识码] A

Mechanism of p16 Gene Inactivation in Salivary Adenoid Cystic Carcinoma GUO Xiao-ling¹, SUN Shan-zhen¹, WEI Feng-cai². (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Hospital of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] **Objective** To study the mechanism of p16 gene inactivation in salivary adenoid cystic carcinoma. **Methods** 53 cases of freshly excised salivary adenoid cystic carcinomas were studied. Polymerase chain reaction (PCR) and single-stranded conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products (PCR-SSCP) were used to detect deletion and mutation of p16 gene in salivary adenoid cystic carcinomas. Methylation specific PCR (MSP) was used to detect the methylation status of p16 gene. **Results** The homozygous deletion, mutation and hypermethylation of p16 gene were noted in 16 cases (30.2%), 4 cases (7.5%) and 26 cases (49.1%) respectively in 53 cases of salivary adenoid cystic carcinomas. **Conclusion** The main inactivation mechanisms of p16 gene in salivary adenoid cystic carcinoma were hypermethylation and homozygous deletion. The mutation p16 gene was rare in salivary adenoid cystic carcinoma.

[Key words] salivary gland adenoid cystic carcinoma; p16; deletion; mutation; methylation

p16 基因在人类肿瘤中有着广泛的失活, 而且在不同肿瘤中有着不同的失活机制, 如缺失、突变或甲基化等。本研究利用 PCR、聚合酶链反应 - 单链构象多态性分析 (single-stranded conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products, PCR-SSCP) 及甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP) 技术, 检测原发性涎腺腺样囊性癌患者的肿瘤组织中 p16 基因的缺失、突变和甲基化, 以评价不同的失活机制在涎腺腺样囊性癌发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 标本来源和主要实验材料

选取 2002 年 8 月至 2004 年 12 月山东大学齐鲁医院及口腔医院口腔颌面外科手术切除的原发性涎

腺腺样囊性癌标本 53 例, 迅速置于液氮灌中冻存, 备用。

基因组 DNA 提取试剂盒、Taq 酶、dNTP 等购自上海申能博彩生物科技有限公司, Wizard Genomic DNA Purification 试剂盒购自美国 Promega 公司, 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2 肿瘤组织基因组 DNA 的提取

将 25 ~ 30 mg 冷冻组织用液氮碾碎, 将粉末收集到 1.5 ml 离心管中, 加入 200 μ l TE 悬浮。基因组 DNA 的提取按照试剂盒内说明进行。提取的 DNA 用 TE 溶解, 紫外分光光度计检测其浓度及纯度, OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 比值在 1.8 ~ 2.0 之间, 备用。

1.3 PCR 扩增肿瘤组织基因组 DNA

p16 基因外显子 Exon1, Exon2 及内参照 β -actin 基因的引物序列如表 1 所示。在 50 μ l 的 PCR 反应体系中加入基因组 DNA 200 ng, 10 \times PCR 反应缓冲液 5 μ l, 25 μ mol/L 的 MgCl₂ 3 μ l, 10 μ mol/L 的 dNTP 1 μ l, 25 μ mol/L 的上、下游引物各 2 μ l。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 加入 5 U/ μ l 的 Taq 酶 0.4 μ l, 开始循环, 94

[收稿日期 2005-03-02; 修回日期 2005-05-10]

[基金项目] 山东省卫生厅基金资助项目 (981010108)

[作者简介] 郭小玲 (1969-), 女, 山东人, 讲师, 博士

[通讯作者] 郭小玲, Tel: 0531-88175179

30 s, 55 ~ 62 30 s, 72 45 s, 共 35 个循环, 72 延伸 5 min。

表 1 引物序列
Tab 1 Primer sequences

引物	大小(bp)	序列
p16 Exon1	340	S 5 - GAAGAAA GAGGA GGGGCTG 3
		AS 5 - GCCTACCTGATTC AATTC 3
Exon2	427	S 5 - GGCTCTACACAA GCTTCCTF 3
		AS 5 - TGA GCTTTGGAA GCTCTCAG 3
M	150	S 5 - TTATTA GAGGGTGGGCCG GATCG 3
		AS 5 - GACCCCGAACCGC GACCGTAA 3
U	151	S 5 - TTATTA GAGGGTGGGGTGGATTGF 3
		AS 5 - CAACCCAAAACCA CAACTATA 3
-actin	600	S 5 - CGTCTGACCTGGCTG GCCCGC GACC 3
		AS 5 - CTAGAAGCATTTC GGTGGACGATG 3

注:M代表p16基因启动子甲基化引物,U代表p16基因启动子未甲基化引物

1.4 肿瘤组织 p16 基因缺失检测

分别取 5 μl PCR 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/ml 的溴化乙锭) 电泳, 在凝胶成像分析仪上进行观察拍照。出现 600 bp 的 -actin DNA 片段说明 DNA 模板完好。对于无 Exon1 或 Exon2 扩增产物而 -actin 有产物者, 则重复扩增, 仍无产物者, 判定为相应的外显子缺失。

1.5 聚合酶链反应 - 单链构象多态性分析 (PCR-SSCP) p16 基因突变

对于无纯合性缺失的标本, 取其 PCR 产物 8 μl, 加入等量加样缓冲液 (95% 去离子甲酰胺, 10 mmol/L 的 EDTA, 0.05% 溴酚蓝, 0.05% 二甲苯蓝) 混匀, 97 变性 8 min, 冰上骤冷 5 min, 迅速加样于 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶中 (含 10% 的甘油), 室温下电泳, 银染显色。出现异常泳动条带者判定为基因突变。

1.6 甲基化特异性 PCR (MSP) 检测 p16 基因异常甲基化

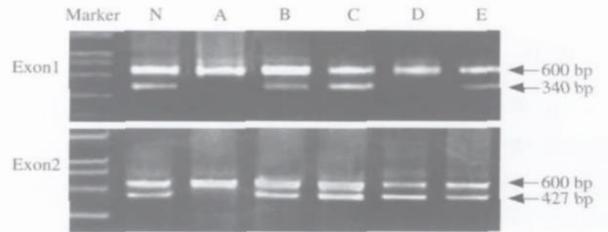
基因组 DNA 的亚硫酸氢钠修饰参照 Herman 等¹ 的方法进行, 修饰后的 DNA 经 Wizard Genomic DNA Purification 试剂盒纯化后, 以适量的双蒸水溶解, -20 保存备用。设计甲基化 (p16M) 等位基因特异引物和非甲基化 (p16U) 引物 (表 1), 用这两对引物对同一模板进行扩增来检测待扩增片段的甲基化状态。出现 p16M 扩增产物说明该片段已发生了甲基化, 出现 p16U 扩增产物说明该片段未发生甲基化,

p16M 及 p16U 产物均出现说明该片段存在部分甲基化。

2 结果

2.1 p16 基因外显子 1 和外显子 2 的纯合性缺失

53 例涎腺腺样囊性癌标本中, p16 基因外显子 1 的缺失率为 20.8% (11/53), 外显子 2 的缺失率为 13.2% (7/53), 其中外显子 1 和 2 共同缺失者 2 例, 总的缺失率为 30.2% (16/53) (图 1)。

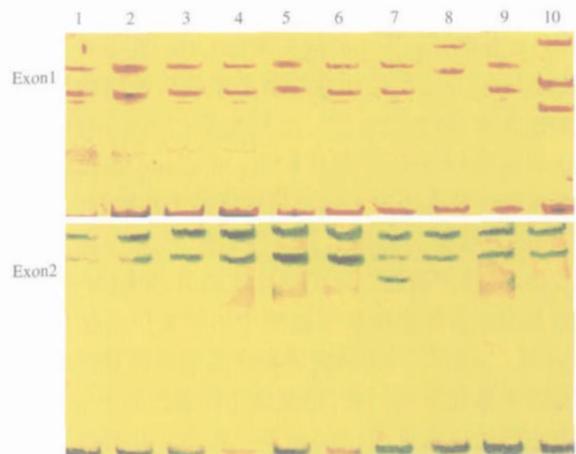


Marker:DL2000; N:正常涎腺组织;
A、B、C、D、E:均为腺样囊性癌组织

图 1 p16 基因外显子 1 (A 和 D) 和外显子 2 (A) 的纯合性缺失
Fig 1 Homozygous deletion of p16 gene Exon1 and Exon2

2.2 p16 基因外显子 1 和外显子 2 的突变

p16 基因外显子 1 的突变率为 5.7% (3/53), 外显子 2 的突变率为 1.9% (1/53), 总的突变率为 7.5% (4/53) (图 2)。

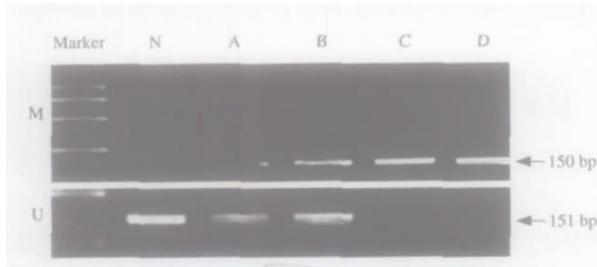


1~6, 9:外显子无异常条带; 7:外显子 2 异常条带;
8:外显子 1 条带位移; 10:外显子 1 异常条带

图 2 p16 基因外显子 1 和外显子 2 的突变分析
Fig 2 Mutation analysis of p16 gene Exon1 and Exon2

2.3 p16 基因异常甲基化

53 例涎腺腺样囊性癌标本中, p16 基因启动子高甲基化为 49.1% (26/53), 其中完全甲基化 7 例, 部分甲基化 19 例 (图 3)。



M:甲基化产物; U:未甲基化产物; Marker:DL2000; N:正常涎腺组织,未甲基化; A、B、C、D:均为腺样囊性癌组织

图3 p16 基因启动子的甲基化分析

Fig 3 Methylation analysis of p16 gene promoter

3 讨论

在多种人类肿瘤的研究中,发现有 p16 基因产物的高频率丢失,而且这种丢失并非 p16 基因缺失、突变所致,后来研究证实 5 CpG 岛的甲基化抑制 p16 基因的转录而失活²。而对大量正常组织及癌前病变组织研究发现,p16 基因与 5 CpG 岛均为非甲基化状态³。p16 基因的缺失、突变和甲基化导致其不能与 CDK4 和 CDK6 结合,使 pRb 蛋白磷酸化和转录调节因子 E2F 释放,引起细胞周期延长,有助于肿瘤发生。p16 基因在各种肿瘤中的变异不相同,在涎腺肿瘤方面研究较少⁴,尤其涎腺肿瘤甲基化的研究未见报道,尚存在许多需要解决的问题,有待进一步研究。

本文对 53 例涎腺腺样囊性癌的 p16 基因变异进行了研究,发现 p16 基因的纯合性缺失为 30.2% (16/53),其中外显子 1 的缺失率(20.8%)高于外显子 2 的缺失率(13.2%),其总的缺失率较口腔鳞状细胞癌的缺失率高(22.2%)⁵;而突变率(7.5%)与口腔鳞状细胞癌(8.9%)⁵相比较低,可见 p16 基因突变在涎腺腺样囊性癌中可能不是重要的失活机制。

p16 基因是目前甲基化研究的焦点,近年应用简便快捷、灵敏度高的甲基化特异性 PCR 技术(MSP)发现该基因在头颈部鳞状细胞癌中的异常甲基化频率为 21%~54%⁶⁻⁸,本研究发现在涎腺腺样囊性癌中的异常甲基化为 49.1%,是涎腺腺样囊性癌中 p16 基因最主要的失活机制;而 Lin 等⁷在对 110 例口腔鳞状细胞癌的研究中发现,p16 基因在舌癌中以甲基化为主,但在颊癌中却以基因突变为主。

有学者⁹报道,在头颈部鳞癌发现 p16/CDKN2A 的变化(除了纯合子缺失)在肿瘤发生早期就频繁出现,并随着肿瘤的发展逐渐增多,而 CDKN2A 的纯合子缺失出现在肿瘤的晚期。由此可见,p16 基因的变化形式在不同的肿瘤中差异很大,提示 p16 基因变异在不同组织的癌变过程中起着不同的作用。

由于 DNA 甲基化与人类发育和肿瘤疾病的密切

关系,特别是 CpG 岛甲基化所致抑癌基因转录失活问题,DNA 甲基化已经成为表观遗传学(epigenetics)和表观基因组学(epigenomics)重要研究内容。甲基化可能是人类肿瘤发生自然进程中的早期事件,且有肿瘤类型特异性及基因种类特异性的特点¹⁰。DNA 甲基化与肿瘤发生发展的关系已得到初步的阐明,由于 CpG 岛甲基化导致抑癌基因转录失活是一个可以逆转的表观遗传学基因修饰过程,且该逆转(CpG 岛去甲基化)可直接恢复抑癌基因的功能,因此,改变 DNA 甲基化状态可能成为肿瘤治疗的新途径。

[参考文献]

- 1] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG island J. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18):9821-9826.
- 2] Mirella CZ, Christina MB, Allen SY, et al. Methylation of 5 CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing J. Cancer Res, 1995, 55(20):4531-4535.
- 3] Minoru T, Coty H, Nito A, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification J. Cancer Res, 1999, 59(9):2307-2312.
- 4] 史宏男,周正言,顾云峰.涎腺腺样囊性癌细胞株 p16 基因缺失、突变及表达意义 J. 口腔颌面外科杂志, 2001, 11(2):111-113.
(Shi HN, Zhou ZY, Gu YF. Study on deletion, mutation and expression of p16 gene in human salivary cystic carcinoma cell line J. Chinese J Oral and Maxillofacial Surgery, 2001, 11(2):111-113.)
- 5] 王文霞,孙善珍,杨丕山,等.多肿瘤抑制基因 1 在口腔黏膜癌前病变和鳞癌中的变异 J. 中华口腔医学杂志, 2003, 38(5):361-363.
(Wang WX, Sun SZ, Yang PS, et al. The alteration of MTS1 gene in precancerous lesions and squamous cell carcinoma of oral mucosa J. Chinese J Stomatology, 2003, 38(5):361-363.)
- 6] Montserrat SC, Manel E, Li W, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients J. Cancer Res, 2000, 60(4):892-895.
- 7] Lin SC, Chang KW, Chang CS, et al. Alterations of p16/MTS1 gene in oral squamous cell carcinomas from Taiwanese J. J Oral Pathol Med, 2000, 29(4):159-163.
- 8] Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, et al. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck J. Oncogene, 2002, 21(37):4231-4236.
- 9] Tripathi Bhar A, Banerjee S, Chunder N, et al. Differential alterations of the genes in the CDKN2A-CCND1-CDK4-RB1 pathway are associated with the development of head and neck squamous cell carcinoma in Indian patients J. J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 129(11):642-650.
- 10] Esteller M, Corn PG, Baylin SB, et al. A gene hypermethylation profile of human cancer J. Cancer Res, 2001, 61(8):3225-3229.

(本文编辑 汤亚玲)