

[文章编号] 1000-1182(2006)04-0362-04

口腔颊癌p16INK4/CDKN2基因的 纯合子缺失与点突变

董玉英¹, 王 洁², 董福生¹, 王 旭², 张英怀³, 郭立华³

(1.河北医科大学口腔医院 口腔颌面外科; 2.口腔病理室;

3.河北医科大学第二医院 口腔颌面外科, 河北 石家庄 050017)

[摘要] 目的 探讨p16基因纯合子缺失和点突变与颊癌发生、发展的关系。方法 采用聚合酶链反应(PCR)、DNA单链构象多态性(SSCP)分析和DNA测序技术研究30例颊癌及10例颊黏膜白斑p16基因纯合子缺失和点突变的情况,并应用免疫组化检测基因改变组织中P16蛋白质的表达。结果 颊白斑和正常颊黏膜无p16基因的纯合子缺失和点突变。在30例颊癌标本中,7例标本p16纯合子缺失,纯合子缺失率是23.3%(7/30);5例颊癌出现点突变,均发生在第2外显子上,点突变率为16.7%(5/30)。经DNA直接测序,发现5例点突变均为错义突变,其中3例突变位点相同,均在第99密码子上由GAT突变为AAT,由门冬酰胺取代门冬氨酸;对纯合子缺失和点突变的12例颊癌组织进行P16蛋白的检测,发现11例标本P16蛋白表达缺失,1例点突变标本表达正常。结论 p16基因纯合子缺失和点突变是颊癌基因失活的主要形式,与颊癌的发生、发展密切相关。

[关键词] 颊黏膜; 鳞状细胞癌; p16基因; 纯合子缺失; 点突变

[中图分类号] Q754 [文献标识码] A

Study of p16INK4/CDKN2 Gene Homozygous Deletions and Point Mutation in Squamous Cell Carcinoma of Buccal Mucosa DONG Yu-ying¹, WANG Jie², DONG Fu-sheng¹, WANG Xu², ZHANG Ying-huai³, GUO Li-hua³. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Dept. of Oral Pathology, School of Stomatology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 3. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

[Abstract] Objective To explore the correlation between homozygous deletions and mutation of p16 gene and the carcinogenesis and progression of squamous cell carcinoma of buccal mucosa. Methods Thirty buccal cancers, 10 leukoplakias and 8 buccal mucosae were involved. DNA was extracted from the tissues. PCR was used to analyze homozygous deletion of p16 gene. PCR-SSCP-DNA sequencing was performed to detect the point mutation of p16 gene. Immunohistochemical techniques were used to detect the expression of P16 protein. Results Gene deletions and point mutations were not found in leukoplakia and normal buccal mucosa. Gene deletions were found in 7 samples out of 30 cases of squamous cell carcinoma of buccal mucosa (23.3%), while point mutations were found in 5 samples out of 30 cases of squamous cell carcinoma of buccal mucosa (16.7%). Sequencing analysis showed that 5 cases point mutations were missense mutations, occurred on exon 2. Three cases occurred in the same point, codon 99 (GAT → AAT). The result of immunohistochemical stains showed that 11 out of 12 cases gene inactivation did not expressed P16 protein. Conclusion Homozygous deletion and point mutation of p16 were the main pattern of gene inactivation in squamous cell carcinoma of buccal mucosa. There was a closely correlation between p16 gene inactivation and the carcinogenesis of squamous cell carcinoma of buccal mucosa.

[Key words] buccal mucosa; squamous cell carcinoma; p16 gene; homozygous deletion; point mutation

周期素依赖性激酶4抑制因子基因 p16INK4/

CDKN2, 简称p16)是一种新型抑癌基因^[1-2],由3个外显子和2个内含子组成。由于该基因在多种类型肿瘤中频繁失活,而成为近年来肿瘤分子遗传学研究热点。口腔颊癌是发生于口腔颊黏膜的鳞状细胞癌,是口腔颌面部较常见的恶性肿瘤^[3],笔者应用

[收稿日期] 2005-09-05; [修回日期] 2006-01-16

[基金项目] 河北省科学技术研究与发展指导计划课题资助项目 (052761998)

[作者简介] 董玉英(1966-),女,河北人,副教授,博士

[通讯作者] 王 洁, Tel: 0311-86265780

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 与 DNA 单链构象多态性 (single strand conformation polymorphism, SSCP) 及 DNA 序列分析技术对 30 例口腔颊癌患者的 p16 基因第一、二外显子进行纯合子缺失和点突变研究, 以探讨 p16 基因缺失、点突变与颊癌发生、发展的关系。

1 材料和方法

1.1 标本采集

选择 2002 年 1 月—2005 年 9 月在河北医科大学附属医院口腔颌面外科进行手术治疗的 30 例颊癌和 10 例颊白斑患者的术中切取的新鲜标本为研究对象, 另取 8 例正常口腔颊黏膜作为对照。每例标本一部分经甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 连续切片, 厚度为 4 μm, 进行病理检查; 另一部分切取后立即冻入液氮, 存放于 -80 °C 冰柜用于分子生物学研究。所有病例术前均未行放疗和化疗, 具有完整的临床病理资料。

1.2 引物设计

本实验设计的引物序列及扩增片段大小见表 1。exon1 为 p16 基因第一外显子, exon2 为第二外显子, 其中 exon2 又分为 exon2a (上游片段) 及 exon2b (下游片段) 两个片段分别合成引物。甘油醛-3-磷酸盐脱氢酶 (glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内对照基因。所有引物均由北京赛百盛公司合成。因 p16 基因第三外显子仅为 11 个碱基, 本实验未予检测^[4]。

表 1 p16 基因第一、二外显子和 GAPDH 引物序列及扩增片段大小

Tab 1 Primer sequencing of exon1 and exon2 p16 gene and GAPDH

外显子	引物序列	片段大小 (bp)
exon1	5 - GCTGCGGAGAGGGGAGAGCAGGCA - 3	280
	5 - GCGCTACCTGATTCCAATTC - 3	
exon2a	5 - ACAAGCTTCCTTCCGTCATGCCG - 3	244
	5 - CCAGGCATCGCGCACGTCCA - 3	
exon2b	5 - TTCCTGGACACGCTGGTGGT - 3	242
	5 - TCTGAGCTTTGGAAGCTCTCAG - 3	
GAPDH	5 - GTCAGTGGTGGACCTGA - 3	415
	5 - AGGGGAGATTCAAGTGTGGTG - 3	

1.3 DNA 模板的制备

所有标本的基因组 DNA 提取按常规酚/氯仿/异戊醇方法制备, 提取 DNA 后采用琼脂糖凝胶电泳, 定性检查有无降解, 并用 Specgene 仪进行定量检测纯度。

1.4 PCR 检测 p16 基因纯合子缺失

p16 基因目的片段及 GAPDH 基因同时进行 PCR 扩增, PCR 仪型号为 PTC-200 型 (MJR 公司, 美国)。扩增体系为 25 μL, 其中包括 10 × Taq 酶缓冲液 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μL, 10 mmol/L 4 × dNTPs 0.5 μL, p16 基因片段引物上、下游各 25 pmol, GAPDH 基因引物上、下游各 15 pmol, 模板 300 ng, Taq 酶 (Promega 公司, 美国) 为 1.5 U, 其余用水补齐。反应条件: 94 °C 预变性 2 min 后进入循环, 94 °C 变性 45 s, 复性温度 exon1 为 55 °C, exon2a 和 exon2b 为 59.3 °C, 复性时间都为 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 用消毒灭菌双蒸水代替模板 DNA 作为阴性对照。PCR 扩增产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳, 若扩增出 GAPDH 基因片段但未能出现 p16 特异性片段, 则说明 p16 基因纯合子缺失。

1.5 SSCP 检测 p16 基因点突变

未检测出纯合子缺失的组织 DNA 进行 PCR 反应, 反应体系均同前但不加内对照基因引物。取 6 μL 该 PCR 扩增产物, 加入 6 μL SSCP 变性缓冲液 95% 去离子甲酰胺, 20 mmol/L 乙二胺四乙酸, 0.05% 溴酚蓝, 0.05% 二甲苯青, 95 °C 变性 7 min, 冰上骤冷, 然后迅速上样于 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 140 V 恒压电泳 5—6 h。凝胶经固定、银染显色、终止显色, 用玻璃纸制成干胶后照相。结果判断: 每次电泳都以正常颊黏膜标本对照, 若肿瘤标本出现电泳条带的增多、减少或位置的迁移即为异常泳动条带, 有异常泳动条带者判定为基因突变。

1.6 DNA 序列分析

对有异常泳动条带者的 PCR 产物, 连同 PCR 引物一起, 由上海生物工程有限公司测序。采用 Sanger 双脱氧终止法, ABI 377 型测序仪进行 DNA 测序。突变情况以测序结果为准。

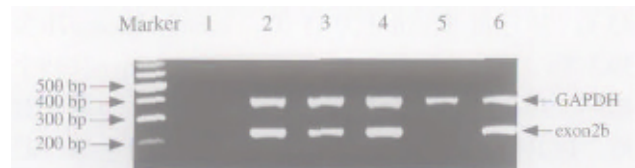
1.7 免疫组织化学染色检测 P16 蛋白表达

鼠抗人 P16 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司, 美国), 工作浓度 1:50; ABC 染色试剂盒 (Vector 公司, 美国)。染色步骤按 ABC 试剂盒说明进行。结果判定参照 Yakushiji 等^[5]的方法: 细胞核着色者为 P16 蛋白阳性, 细胞浆着色不计算在内。采用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统双盲法在 400 倍光镜下, 每张切片随机选取 5 个视野, 应用分析系统的免疫组化自动分析程序, 测量至少 300 个细胞, 计数阳性细胞, 并计算其占总细胞数的阳性率。细胞核阳性率低于 5% 为 (-), 不低于 5% 为 (+)。以同一张切片中的间质细胞 (淋巴细胞和成纤维细胞) 核染色作为阳性对照。

2 结果

2.1 PCR检测p16基因纯合子缺失的结果

经PCR检测, 10例白斑和8例正常颊黏膜标本均扩增出p16 exon1、exon2a和exon2b产物, 无p16基因的纯合性缺失。30例颊癌标本中, 7例无p16扩增产物(图1), 其中2例exon1缺失, 3例exon2a缺失, 3例exon2b缺失, 其中1例exon2a和exon2b同时缺失。因此p16基因在颊癌中纯合子缺失率是23.3% (7/30)。



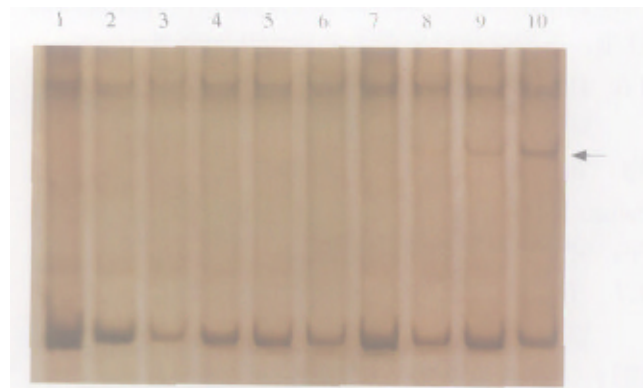
1: 阴性对照; 2: 正常颊黏膜; 3: 颊黏膜白斑; 4—6: 颊癌, 其中5显示为纯合子缺失

图1 p16基因exon2b扩增结果及纯合子缺失情况

Fig 1 Amplification results of exon2b of p16 gene with PCR

2.2 SSCP对颊癌p16基因突变的分析

除7例纯合子缺失颊癌病例外, 对其余标本均进行了PCR产物的SSCP分析。正常颊黏膜和白斑中未发现异常泳动条带, 无基因突变。23例颊癌标本中5例出现异常泳动条带(图2), 有3例发生于p16基因第2外显子上段, 2例发生于下段, 第1外显子未见突变病例。总突变率为16.7% (5/30)。图2示PCR-SSCP检测p16基因exon2a的突变结果, 箭头示异常泳动带。



1: 正常对照; 2—10: 颊癌, 箭头示异常泳动带

图2 PCR-SSCP检测p16基因exon2a的突变结果

Fig 2 Mutation results of exon2a of p16 gene with PCR-SSCP

2.3 DNA序列测定对颊癌p16基因点突变的分析

对5例SSCP检测有异常泳动条带的p16基因扩增产物进行直接测序, 结果5例均为错义(missense)突变, 其突变情况见表2。由表2可见, 有3例exon2a突变位点相同, 在第99密码子上由GAT突变为AAT, 蛋白表达由门冬酰胺取代门冬氨酸; 另外有1例于exon2b发现3处点突变, 分别发生在第102、128和129密码子上, 另1例在第101密码子发生了TGG

TGT(色氨酸 半胱氨酸)的错义突变。

表2 p16基因突变及其与蛋白表达的关系

Tab 2 Correlation of p16 gene mutation and P16 protein expression

病例	密码子	点突变	氨基酸	突变类型	蛋白表达
1	99	GAT-AAT	Asp-Asn	missense	-
2	99	GAT-AAT	Asp-Asn	missense	-
3	99	GAT-AAT	Asp-Asn	missense	-
4	101	TGG-TGT	Trp-Cys	missense	+
5	102	GGC-AGC	Gly-Ser	missense	-
	128	ACC-ATC	Thr-Ile		
	129	AGA-ATA	Arg-Ile		

2.4 P16蛋白在纯合子缺失和突变组织中的表达情况

对7例p16纯合子缺失和5例点突变患者的颊癌组织进行P16蛋白的检测, 发现11例标本中P16蛋白表达缺失, 1例点突变标本P16蛋白正常表达(见表2中病例4)。

3 讨论

p16基因定位于染色体9p21, 全长8.5 kb, 由3个外显子和2个内含子组成。3个外显子长度分别为126 bp, 307 bp和11 bp, 编码CDK4抑制蛋白, 是由148个氨基酸组成的蛋白质。p16基因主要突变形式有: 纯合缺失、杂合缺失、插入、点突变、重排和甲基化等, 突变率在30%—80%之间, 使之成为继p53之后肿瘤基础及临床研究中又一热点之一。在不同组织的肿瘤中, 检测出p16基因的变异频率差异很大, 提示p16基因的改变在不同组织癌变过程中的作用可能有所不同。

p16基因缺失表现为纯合性缺失和杂合性丢失, 以纯合性缺失为主, 不同类型的肿瘤p16基因的缺失率不同。据报道, p16基因在头颈部肿瘤中有高频率的纯合子缺失, p16基因的纯合子缺失是其失活的主要机制, 并在头颈部肿瘤的形成和发展中起重要作用^[6]。Tsai等^[7]对48例口腔癌p16基因缺失进行分析, 发现纯合子缺失率为14.6%。本实验检测了30例颊癌及10例颊白斑标本中p16基因的第1、2外显子的缺失情况, PCR结果发现在30例颊癌标本中有7例标本缺失, 缺失率为23.3%; 而10例颊白斑标本未发现p16基因缺失, 这一结果表明p16基因在颊癌中可发生缺失改变, 提示p16基因纯合子缺失在颊癌的发生和发展中具有重要意义。

目前通过DNA序列测定p16突变位点比较多, 包括无义、错义和移码突变, 其中以错义突变为主。对于p16基因的点突变, 可发生的位置很多,

或发生于编码区, 或发生于非编码区以及启动子区等。综合国内外文献, 发现p16基因的点突变主要发生于第2外显子^[7]。不同类型肿瘤p16基因点突变率差异很大, 且细胞系中p16基因的突变频率明显高于原发癌的频率。Lin等^[8]发现p16基因突变主要发生于颊癌中而p16甲基化主要存在于舌癌患者; 而且发现第101和102密码子位于保守的锚蛋白通用序列上, 这些密码子的突变在p16基因变异中起着重要作用。本实验从30例颊癌中检测出5例点突变均为错义突变, 且均位于p16第2外显子, 其中3例为第99密码子上GAT突变为AAT, 另2例发生于第101和102密码子上, 提示在颊癌中, p16基因突变主要在第2外显子, 突变类型以错义突变为主, 突变热点集中在第99、101、102密码子上。

p16基因发生纯合缺失、点突变时均可导致P16蛋白失表达^[9-10]。有关肿瘤中p16基因错义突变对P16蛋白结构和功能的影响, 取决于突变发生的密码子的位置。如果突变发生在保守的锚蛋白通用序列上, 突变所致的氨基酸置换, 可能会通过改变产物的二级结构, 导致P16蛋白功能丧失。如果突变发生在P16蛋白少数氨基酸的编码序列上, 则对P16蛋白产物的活性没有太大影响^[11]。在本实验中, p16基因异常的12例颊癌中, 11例P16蛋白表达阴性, 说明基因异常导致蛋白表达缺失。而1例基因点突变, 但P16蛋白表达阳性, 提示p16基因虽发生碱基改变, 但未影响其编码蛋白质的功能, 可能是一种基因多态性。由此可以看出, 对于p16基因突变与P16蛋白结构和功能改变的关系研究, 有助于了解该基因的作用原理以及该基因与肿瘤发生发展的关系。

[参考文献]

[1] Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feidaus J, et al. A cell cyclin regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J].

Science, 1994, 264 (5157): 436-440.

[2] Nobori T, Miura K, Wu DJ, et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers[J]. Nature, 1994, 368 (6473): 753-756.

[3] 王洁, 张英怀, 董福生, 等. 口腔癌及癌前病变中c-myc癌基因与Rb抗癌基因表达的意义[J]. 现代口腔医学杂志, 2000, 14 (1): 14-16.

(WANG Jie, ZHANG Ying-huai, DONG Fu-sheng, et al. Significance of expression of c-myc oncogene and retinoblastoma gene in oral squamous cell carcinoma and primalignant lesions[J]. J Modern Stomatol, 2000, 14 (1): 14-16.)

[4] Lee JK, Kim MJ, Hong SP. Inactivation patterns of p16/INK4A in oral squamous cell carcinomas[J]. Exp Mol Med, 2004, 36 (2): 165-171.

[5] Yakushiji T, Noma H, Shibahara T, et al. Analysis of a role for p16/CDKN2 expression and methylation patterns in human oral squamous cell carcinoma[J]. Bull Tokyo Dent Coll, 2001, 42 (3): 159-168.

[6] Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, et al. High frequency of homozygous deletion and methylation of p16 (INK4A) gene in oral squamous cell carcinomas[J]. Cancer Lett, 2001, 163 (2): 221-228.

[7] Tsai CH, Yang CC, Chou LS, et al. The correlation between alteration of p16 gene and clinical status in oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2001, 30 (9): 527-531.

[8] 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 (2): 159-166.

[9] Kim HS, Chung WB, Hong SH, et al. Inactivation of p16/INK4a in primary tumors and cell lines of head and neck squamous cell carcinoma[J]. Mol Cells, 2000, 10 (5): 557-565.

[10] Soni S, Kaur J, Kumar A, et al. Alterations of rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma[J]. Oncology, 2005, 68 (4/5/6): 314-325.

[11] Akanuma D, Uzawa N, Yoshida MA, et al. Inactivation patterns of the p16 (INK4a) gene in oral squamous cell carcinoma cell lines[J]. Oral Oncol, 1999, 35 (5): 476-483.

(本文编辑 吴爱华)

第二届全国口腔颌面修复重建外科学术会议征文通知

经中华口腔医学会批准, 口腔颌面外科专业委员会修复重建外科协作组主办, 南京医科大学口腔医学院承办的第二届全国口腔颌面修复重建外科学术会议将于2006年11月22日—24日在南京召开。会议同期将举办国家级继续医学教育学习班, 参会代表可获得国家级继续医学教育学分10分。欢迎投稿, 欢迎报名参会。

征文内容: 口腔颌面创伤畸形的整复治疗; 口腔颌面肿瘤切除后组织器官缺损的功能性修复重建; 颌面部整形美容; 口腔颌面种植技术、显微外科技术、微创外科技术、牵张成骨技术及计算机辅助设计与制造等领域的新技术在口腔颌面修复重建中的应用; 新型生物材料学、干细胞与再生医学及组织工程学等前沿生物学技术在口腔颌面修复重建中的应用基础研究等。征文要求: 结构式论文摘要和软盘一张, 请写明单位、详细地址和联系方式。此外, 欢迎网上投寄电子文档。投稿截止日期: 2006年9月10日。地址: 南京市汉中路136号, 南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科; 邮编: 210029; 电传: 025-86516414。联系人: 邢树忠教授, Tel: 025-85031881, E-mail: szxing@njmu.edu.cn; 江宏兵副教授, Tel: 025-85031914, E-mail: jhbod@sina.com。

口腔颌面外科专委会修复重建外科协作组
南京医科大学口腔医学院