

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.1998.02.03

人非小细胞肺癌组织 p16 基因缺失及突变的研究

杜铭 李良彬 曾昭淳 张雪梅

【摘要】 目的 探讨人类非小细胞肺癌组织中 p16 基因缺失及突变情况及其与临床病理的关系。方法 应用控制模板 DNA 量的银染 PCR-SSCP 技术检测 40 例非小细胞肺癌手术切除标本中 p16 基因第 2 外显子。结果 40 例中有 13 例发生纯合缺失, 3 例发生突变, 缺失及突变率为 40%。其缺失及突变率与肺癌的临床分期有密切关系 ($P < 0.05$)。结论 p16 基因的缺失及突变可能在非小细胞肺癌的发生、发展及转移中起重要作用。

【关键词】 非小细胞肺癌 p16 基因 PCR-SSCP 缺失 突变

Study on the deletion and mutation of p16 gene in human non-small cell lung cancer Du Ming, Li Liangbin, Zeng Zhaochun, et al. Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, P. R. China

【Abstract】 Objective To study the relationship between the deletion and mutation of p16 gene and clinicopathologic manifestations of human non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Silver staining PCR-SSCP method of control amount of template DNA was used to detect exon 2 of p16 gene in human NSCLC tissue specimens. **Results** The deletion of p16 gene was identified in 13 out of 40 specimens. Of the 40 specimens, 3 showed a variant band indicative of the mutation. There was significant correlation between the frequency of the deletion and mutation (40%) and clinicopathologic stage ($P < 0.05$). **Conclusion** The deletion and mutation of p16 gene may play an important role in carcinogenesis, development and metastasis of human NSCLC.

【Key words】 Non-small cell lung cancer p16 gene PCR-SSCP Deletion Mutation

近年的研究表明,抑癌基因的功能丧失在肿瘤发生中起重要作用。许多研究已经证明 p53 基因的缺失及突变和多种恶性肿瘤的发生、发展有关。新近发现的 p16 基因位于人类 9 号染色体的短臂 21 区,全长 8.5kb,由 2 个内含子组成的间隔顺序分为 3 个外显子。其编码的蛋白质为 15.71ku 的单链多肽,由 148 个氨基酸残基组成^[1]。国外许多研究表明,p16 蛋白能直接和周期蛋白依赖性激酶 4 (cyclin dependent kinase 4, CDK4) 相结合而影响细胞的增殖。我们从 40 例非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 手术标本中提取 DNA,利用聚合酶链反应-单链构象多态性分析 (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 对 p16 基因第 2 外显子进行研究,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集我院胸外科手术切除并经病理检查确诊的 40 例 NSCLC 的癌组织 (含远离肿瘤的正

彬),生化教研室 (曾昭淳、张雪梅)

常肺组织) 标本,患者术前均未行放、化疗。男 30 例,女 10 例;60 岁以下 22 例,60 岁以上 18 例,平均 58 岁。

1.2 基因组 DNA 提取 手术切除标本离体半小时内置 -80 保存备用。DNA 提取方法如下:0.1g 组织块碾碎,加入 TES 300 μ l 充分混匀;加入 5mol/L 高氯酸钠 80 μ l 及 10% SDS 100 μ l 充分混匀,37 水浴 10 分钟,65 水浴 15 分钟,加入等体积酚/氯仿/异戊醇 (25 24 1) 抽提 2 次,氯仿抽提 1 次,抽取上清液加入 1/2 体积 7.5mol/L 乙酸铵,加入二倍体积无水乙醇沉淀,TE 溶解,-20 保存备用。所有 DNA 样品经紫外分光光度计检测,260nmOD 值/280nmOD 值大于 1.8。

1.3 p16 基因第 2 外显子扩增 用 PCR 扩增 p16 基因第 2 外显子。P₁:5'-TGTTCTCTGGCAGGTCAT-3; P₂:5'-CTCAGATCATCAGTCCCTCAC-3。扩增片段长 342bp。引物和 4 种 10mmol/L dNTP 混合液购自上海 Sangon 公司, Taq DNA 聚合酶购自上海普洛麦格公司。50 μ l PCR 反应体系中含模板 DNA (0.05 μ g, 0.1 μ g, 0.2 μ g, 0.3 μ g), dNTP 各 100 μ mol/L, 引物各 25pmol, Mg²⁺ 2.0mmol/L, 10 \times 反应缓冲液 5 μ l, 5%DMSO (终浓度),

Taq DNA 聚合酶 1U。94 变性 5 分钟,58 复性 30 秒,72 延伸 30 秒,1 个周期;94 变性 30 秒,58 复性 30 秒,72 延伸 30 秒,39 个周期;94 变性 30 秒,58 复性 30 秒,72 延伸 10 分钟,1 个周期。取扩增产物 5μl,直接经 2.5% 琼脂糖电泳,溴乙锭染色,紫外灯下观察并拍照。

1.4 PCR 产物的 SSCP 分析 SSCP 分析法是在 Sugano 等^[2]报道方法的基础上加以改进,具体操作如下: 制胶:配制 8% 聚丙烯酰胺凝胶 (Acr/Bis = 49/1),加入 5% 甘油 (终浓度)。 预电泳:1 × TBE 缓冲液中 100V 电泳 30 分钟。 PCR 产物单链电泳:取 5μl 扩增产物加入 15μl 变性缓冲液 (90% 甲酰胺、20mmol/L EDTA、0.05% 溴酚兰、0.05% 二甲苯晴蓝),置于 94 水浴 5 分钟,冰浴骤冷,加样于已预电泳的凝胶中,150V,循环水控制在 17℃,电泳 6~7 小时。 银染:凝胶浸泡于 10% 乙醇和 10% 乙酸中固定 20 分钟,1% 硝酸脱色 5 分钟,漂洗 2 次,0.12mol/L 硝酸银染色 30 分钟,蒸馏水漂洗 2 次,加入 0.28mol/L 碳酸钠及 0.019% 甲醛显影 10 分钟,10% 乙醇和 10% 乙酸固定 5 分钟,蒸馏水漂洗 5 分钟,真空干燥后可照相及保存。

1.5 统计学分析 计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 PCR 扩增 (图 1) 我们以正常对照的不同的 DNA 模板量进行 PCR,明确了 DNA 模板量为 0.05μg 时为本体系的最小模板量。以 0.05μg DNA 作为模板,发现 40 例 NSCLC 中有 13 例未见相应的扩增产物,而相应的正常自身对照均见 342bp 处清晰的单带,无扩增产物的标本均重复两次试验。该结果说明这些肿瘤组织中存在较大片段的 p16 基因丢失或引物位置的小片段的缺失。其纯合缺失率为 32.5%。

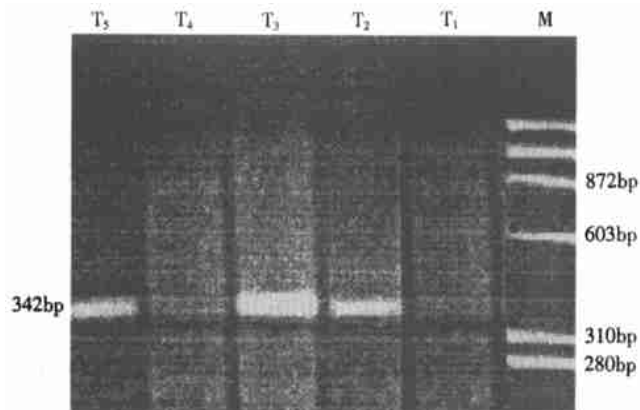


图 1 p16 基因第 2 外显子 PCR 产物的琼脂糖电泳 M:标准分子量; T₁~T₅:肺癌组织;T₁,T₄:未见扩增条带

Fig 1 PCR analysis of p16 gene exon 2

M:DNA markers;T₁~T₅:lung cancer tissues;T₁,T₄:no band

2.2 SSCP 分析 (图 2) PCR 产物经 2.5% 琼脂糖电泳 EB 染色呈现 342bp 处清晰的单带,未见明显非特异性泳带。SSCP 银染示正常对照的泳带有两种类型:一种为双带即纯合子类型,另一种为 4 条带即杂合子类型。3 例出现异常泳动带 (即 SSCP 阳性),表明存在 p16 基因突变。突变率为 7.5%。

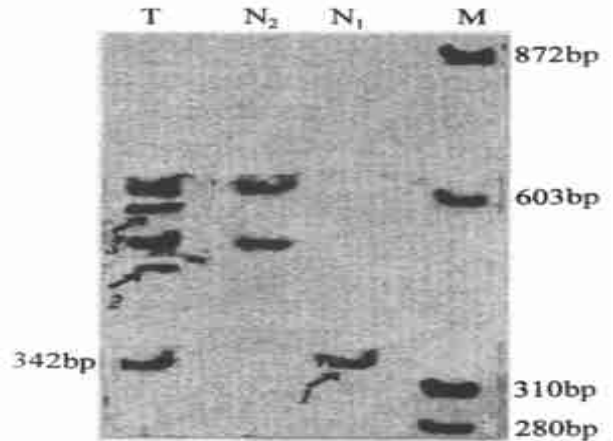


图 2 p16 基因第 2 外显子 PCR-SSCP 分析

M:标准分子量;N₁:未变性产物;N₂:变性的正常对照;

T:变性的肿瘤组织;箭头 1:未变性带;箭头 2,3:异常泳动的单链带

Fig 2 PCR-SSCP analysis of p16 gene exon 2

M:DNA markers;N₁:non-denatured products;N₂:denatured normal control;

T:denatured tumor tissues;Arrow 1:non-denatured band;

Arrow 2,3:abnormal single-chain band

2.3 p16 基因缺失及突变与临床病理生理特征的关系 研究表明 NSCLC p16 基因的缺失及突变率为 40% (16/40),其与性别、年龄、吸烟及病理分型无明显关系,而与临床分期有密切关系 ($P < 0.05$)。a + b 期的纯合缺失及突变率为 64.3% (附表)。

3 讨论

p16 基因的功能执行者是 p16 蛋白,p16 蛋白在细胞增殖周期中起负调控作用,在细胞生长过程中维护着细胞的正常增殖和分化。当 p16 基因失活即 p16 蛋白表达缺失或功能异常时,细胞增殖的负调控减弱,从而导致细胞的过度增殖,甚而恶变。p16 基因失活和肿瘤的发生、发展关系密切,已在众多研究中得到证实^[3~6]。有研究表明 p16 基因结构异常如纯合缺失、突变等及转录异常如调控区 5' CpG 岛的过度甲基化是导致 p16 基因失活的主要原因^[7]。

所谓纯合缺失,即两条等位基因同时丢失,从而导致 p16 基因失活即 p16 蛋白表达缺失。Nobori 等^[8]利用 STS-PCR 技术检测了肺癌细胞株 p16 基因,其纯合缺失率 36.4%。而 Washim 等^[9]报道 NSCLC p16 基因纯合缺失率为 30%。我们利用 PCR 技术检测 NSCLC

p16 基因,其纯合缺失率 32.5%,与国外报道接近。为避免标本中正常细胞干扰 p16 基因缺失的检出,我们采取了如下措施:首先尽可能去掉肿瘤标本的正常组织,其次在 PCR 扩增过程中,采用了 PCR 体系所能扩

增出正常对照目的基因片段的最小模板 DNA 量,并对 p16 基因缺失的标本进行两次重复试验,不仅结果可靠,而且也最大限度地消除了正常细胞对肿瘤细胞 p16 基因缺失的掩盖。

附表 NSCLC p16 基因的缺失及突变率与临床病理生理特征的关系

Tab The relations between the deletion and mutation of p16 gene in NSCLC and the clinical physiopathologic characteristics

Items (项目)	No. of cases (例数)	Deletion and mutation (缺失及突变)	Positive rate (%) (阳性率)	P value (P 值)
Sex (性别)				
Male (男)	30	12	40	> 0.05
Female (女)	10	4	40	
Age (年龄)				
60 岁	22	9	40.9	> 0.05
> 60 岁	18	7	38.9	
Smoking (吸烟)				
Smoking (是)	34	14	41.2	> 0.05
Non-smoking (否)	6	2	33.3	
Pathological classification (病理分型)				
Squamous cell carcinoma (鳞癌)	20	9	45	> 0.05
Adenocarcinoma (腺癌)	12	4	33.3	
Adenosquamous carcinoma (腺鳞癌)	8	3	37.5	
P-TNM staging (术后 TNM 分期)				
+	26	7	26.9	< 0.05
a + b	14	9	64.3	

除上述纯合缺失所致 p16 基因失活外, p16 基因编码区突变所引起的异常的、无功能的 p16 蛋白表达也是 p16 基因失活的重要原因。Hayashi 等^[10]报道了 64 例 NSCLC 中有 14 例发生突变。Xiao 等^[11]利用 FISH 技术也检出了 NSCLC 中有 p16 基因突变。我们应用 PCR-SSCP 银染技术对标本的 p16 基因突变进行了检测。该法较序列分析简便、省时,而且敏感度比溴乙锭法高 5 ~ 10 倍^[12]。SSCP 分析不仅能分析是否存在突变,而且能将突变定位于特定的片段,如需了解突变位点及序列改变情况,只需将 SSCP 分析筛出的阳性标本进行序列分析即可。为提高 PCR-SSCP 的敏感度及控制假阳性,我们在设计引物时,已把扩增片段控制在 345bp 以内。据文献^[13]报道,PCR-SSCP 银染对 176 ~ 345bp 片段的突变敏感度最高,并且每个肿瘤标本均设立正常自身对照以减少正常多态性的干扰。我们的结果显示 SSCP 的阳性率为 7.5%,较上述国外报道低,可能与只检测了第 2 外显子有关。

国外学者用免疫组化法对 p16 蛋白在 NSCLC 中的表达进行研究,结果显示未表达率为 51% ~ 66%^[13-15],而本组纯合缺失及突变率(40%)明显低于之。这也就间接提示,p16 基因结构异常以外的原因如调控区 5 CpG 岛过度甲基化等可能也是导致 p16 基因失活的原因。

Robert 等^[14]报道 p16 基因失活与 NSCLC 的临床分期关系密切, 期失活率为 39%, 期 63%, 期 75%。本组结果与上述报道类似。提示 p16 基因失活与肿瘤的恶性进展及转移有一种内在的联系,可能是细胞增殖周期中 G₁ 期至 S 期转换的负调控减弱,促进了肿瘤的恶性进展及转移的发生,当然也可能是晚期肿瘤的继发现象,其确切机理有待进行更深入的研究加以证实。

参 考 文 献

1 Serano M, Hannon G, Beach D. A new regulatory motif in cellcycle control

- causing specific inhibition of cyclin D/ CDK4. *Nature*, 1993, 360 (6456) 704-707.
- 2 Sugano K, Kyogoku A, Fukuyama N, et al. Method in laboratory investigation: Rapid and simple detection of C-Kras gene codon 12 mutations by non-radiois of opic single-strand conformation polymorphism analysis. *Laboratory investigation*, 1993, 68(3) 361-366.
 - 3 Marx J. New tumor suppressor may rival p53. *Science*, 1994, 264 (5157) 344-345.
 - 4 Okamoto A, Huscain SP, Hagiwara K, et al. Mutations in the p16INK4/ CDKN2, MTS2, and p18 genes in primary and metastatic lung cancer. *Cancer Res*, 1995, 55(7) 1448-1450.
 - 5 Dreyling MH, Bohlander SK, Adeyanu MO, et al. Detection of CDKN2 deletions in tumor cell lines and primary glioma by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res*, 1995, 55(5) 984-987.
 - 6 Xu L, Sgroi D, Sterner CJ, et al. Mutational analysis of CDKN2 in human breast carcinomas. *Cancer Res*, 1994, 54(20) 5262-5264.
 - 7 Gonzalez-Zulueta M, Bander CM, Yang AS, et al. Methylation of 5'- CpG island of p16/ CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res*, 1995, 55(20) 4531-4535.
 - 8 Nobori T, Miura N, Wu DJ, et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 1994, 368 (6473) 753-755.
 - 9 Washim O, Nagatake M, Osada H, et al. In vivo occurrence of p16 (MTS1) and p15 (MTS2) alterations preferentially in NSCLC. *Cancer Res*, 1995, 55(3) 514-518.
 - 10 Hayashi M, Sugimoto Y, Tsuchiya, et al. Somatic mutations of the MTS1/ CDK4I gene in human primary non-small cell lung carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 202(3) 1426-1430.
 - 11 Xiao S, Li DZ, Corson JM, et al. Codeletion of p16 and p15 genes in primary NSCLC. *Cancer Res*, 1995, 55(14) 2968-2971.
 - 12 Spagnolo DV, Turbett GR, Dix B, et al. Polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP): A novel means of detecting DNA mutations. *Adv Anat Pathol*, 1994, 2(1) 61-64.
 - 13 Shapiro GI, Edwards CD, Kodzik L, et al. Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res*, 1995, 55(3) 505-509.
 - 14 Kratzke RA, Greatens TM, Rubins TB, et al. Rb and p16INK4 expression in resected non-small cell lung tumors. *Cancer Res*, 1996, 56(15) 3415-3420.
 - 15 Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin dependent kinase4 inhibitor p16INK4. *Cancer Res*, 1994, 54(22) 5816-5820.

(收稿:1998-01-20 修回:1998-04-27)

(本文编辑 李蓓兰)

· 期刊文摘 ·

肺癌患者原发肿瘤、支气管粘膜活检标本及痰样中 FHIT 基因改变分析[英]/ Torielli S... *Lung Cancer*. — 1997, 18(Suppl 1) 139

肺癌最常见的遗传学改变是第 3 号染色体短臂 (3p) 的遗传物质丢失, 其中 3p25、p21、p14 这 3 个特定部位被认为是肿瘤抑制基因的主要位点。3p 上等位基因杂合性丢失为肺癌的早期事件, 因为它在诸如支气管不典型增生、化生、过度增生等早期癌前病变中均有报道。被公认为肿瘤抑制基因的 FHIT 基因, 位于 3p14.2 上并包含人类基因组最活跃又脆弱的 FRA3B 位点。FHIT 基因在较多的肺部原发性肿瘤和细胞系中发现有杂合性丢失和异常 RNA 转录。为确定 FHIT 基因改变是否是肺癌发生学中的早期分子现象, 从而用于肺部肿瘤检测和普查, 我们收集了 43 例非小细胞肺癌患者手术切除的肺部原发性肿瘤、不同部位的支气管粘膜和支气管活检标本, 以及术前痰样。选择与肿瘤相距甚远的正常肺实质组织标本配对, 作为正常 DNA 和 RNA 的来源。逆转录 FHIT mRNA 方法被用于分析肿瘤标本, 再对其产物进行 PCR 扩增和测序。影响该基因的等位基因缺失用微卫星多态性分析方法评

价, 测试该基因内部的 3 个不同位点 (D3S1300、D3S4103、D3S1234)。35% (13/37) 的被检测肿瘤标本存在异常 FHIT 转录, 它包括有含启动密码子外显子 5 和含三型组氨酸的外显子 8 的多种形式的编码外显子的缺失。同时观察到了用于编码非编码外显子之间的核苷酸插入, 即加入新的氨基酸并且改变基因的阅读框架。除了 2 例肿瘤外, 大多数肿瘤也有正常大小的 FHIT 转录本, 可能由于正常组织混入肿瘤中引起。在有资料病例中, 57% (15/27) 的肿瘤存在 FHIT 的杂合性丢失。所有表现出异常转录本的病例同时也丢失了一个 FHIT 等位基因, 这一现象提示由于功能丢失造成的基因失活机制。对 10 例患者的术前痰样进行了 FHIT 基因的微卫星改变分析。由痰样中提取出的 DNA 检测到 3 例杂合性丢失或微卫星不稳定性。痰样 DNA 中的等位基因异常在癌组织标本中同样被检测到。有趣的是一例经痰细胞学检查中未查见癌细胞的患者, 而痰 FHIT 检测可作为肺癌早期诊断的分子标志, 有助于肺癌的早期诊断。

(张世雯 译 周清华 校)