

# p16 基因突变与子宫内膜癌关系的研究

张秋实<sup>1</sup>, 其木格<sup>2</sup>, 李继俊<sup>1</sup>

## Study on the relationship between the mutations of p16 gene and endometrial carcinoma

ZHANG Qiu-shi, QIMu -ge, LI Ji -jun

Dept. of Obstet and Gynecol, Shandong Province Hospital, Jinan 250021, China

**Abstract: Objective** To study the relationship between the alterations of p16 gene and the occurrence and development of the endometrial carcinoma. **Methods** The alterations of p16 gene were studied by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and DNA sequencing in 40 endometrial carcinomas. **Results** The exon 2 of p16 gene occurred 522bp homozygous deletion in 12 cases. The point mutations at the same site were detected in 10 cases, and one of mutation sites was GTC → AAT (Val126Asn) on 126th codon, another mutation site was GCA → GCG (A127A) on 127th codon. The ratio of alteration of p16 gene was 55%. **Conclusion** The alterations of p16 gene correlate with the occurrence of endometrial carcinoma.

**Keywords:** p16 gene; Mutation; Endometrial carcinoma

**摘要:**目的 研究 p16 基因的突变在子宫内膜癌发生、发展中的作用。方法 应用 PCR-SSCP 及 DNA 测序对 40 例子宫内膜癌中 p16 基因第二外显子缺失及序列改变进行研究。结果 40 例子宫内膜癌中 12 例存在 p16 基因的第二外显子 522bp 的纯合缺失, 10 例存在点突变(突变位点相同), 突变位点之一为第 126 密码子碱基 GTC → AAT(错义突变), 另一突变位点为第 127 密码子 GCA → GCG(同义突变), 缺失及突变共占 55%。结论 p16 基因的突变与子宫内膜癌的发生有明显的相关性。

**关键词:** p16 基因; 突变; 子宫内膜癌

**中图分类号:** R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2003)01-0023-03

## 0 引言

p16 基因是第一个被证明是肿瘤抑制基因的细胞周期调控机制的内在成分, p16 基因突变在人类恶性肿瘤中相当普遍的存在, 突变率为 30% ~ 80% 不等, 主要突变形式为缺失、点突变及甲基化, 本实验应用从子宫内膜癌组织及正常子宫内膜组织中提取的基因组 DNA 为模板, 扩增 p16 基因第二外显子, 检测其缺失和突变, 探讨其与子宫内膜癌发生、发展的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 标本的取材及基因组 DNA 提取** 40 例子宫内膜癌标本中有 26 例是新鲜手术标本, 14 例为石蜡标本; 20 例正常子宫内膜均为新鲜手术标本。标本均由内蒙古医学院第一附属医院提供。常规采用酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。

**1.2 PCR-SSCP 银染** 应用子宫内膜癌组织及正常子宫内膜组织中提取的基因组 DNA 为模板, 以  $\beta$ -actin 作对照, PCR 扩增基因组 DNA 中 p16 基因第二外显子。PCR 反应体系: 10 × 反应缓冲液 5  $\mu$ l, DM - SO 2.5  $\mu$ l, 25mol/lMg<sup>2+</sup> 1.5  $\mu$ l, 10mol/l dNTP 1  $\mu$ l, 10 pmol 上下游引物各 4  $\mu$ l, 基因组 DNA 0.3  $\mu$ g, Taq DNA 聚合酶 2.5U, 总体积 50  $\mu$ l。95 °C 5min, 95 °C 30s, 50 °C 30s, 72 °C 75s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10min。引物根据实验可设计 2 对第二外显子引物(1 对外侧, 1 对内侧), 外侧引物序列 P<sub>1</sub>: 5' - TCT-GAGCTTTGGAAGCTCTCA - 3', P<sub>2</sub>: 5' - GAGAAGCAAGAAGGAAATTGG - 3'。内侧引物序列 P<sub>1</sub>: 5' - TGGACCTGGCTGAGGAG - 3', P<sub>2</sub>: 5' - CAAATTCTCAGATCATCAGTCCTC - 3'。第一轮扩增外侧 522bp 的片段, 第二轮扩增 140bp 片段。取 12  $\mu$ l 的 PCR 扩增引物, 2% 琼脂糖凝胶电泳, 以 100bp 的 DNA ladder marker 作标记, 出现 180bp 条带而未出现 522bp 条带为缺失, 取未发生缺失的 PCR 产物变性后经 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 4h, 银染分析。

**1.3 DNA 测序** 对有异常的 140bp 片段重新进行

收稿日期: 2002-01-20; 修回日期: 2002-05-23

作者单位: 1. 250021 济南, 山东省立医院、山东大学临床医学院妇产科; 2. 内蒙古医学院第一附属医院妇产科

PCR 扩增(反应体系同前),将 PCR 扩增产物纯化后寄大连宝生物技术公司在 DNA 测序装置(Bio-Rad 公司)中进行 DNA 测序。

### 2 结果

2.1 p16 基因第二外显子缺失 以 522bp 的外侧引物对 40 例子宫内膜癌标本进行 PCR 扩增,其中 12 例标本出现缺失,实验中以 -actin 引物(扩增片段 180bp)进行内对照,并以 100bp ladder 的 marker 为标记。缺失率 30.0%,如图 1 所示,肿瘤标本未出现 522bp 条带,但出现 180bp 的对照条带;正常子宫内膜标本同时出现 180bp 和 522bp 的条带。

2.2 SSCP 银染检查 取 140bp 的扩增片段进行 SSCP 银染检查,发现有 10 例子宫内膜癌标本出现单链 DNA 泳动速度发生变化,出现 3 条带或 2 条带,而正常子宫内膜标本均出现 4 条带,阳性率为 25%,见图 2。

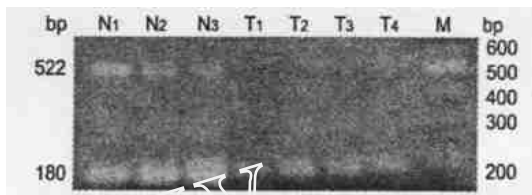


图 1 p16 基因外显子 2 缺失情况



图 2 子宫内膜癌组织 p16 基因第二外显子 140bp 扩增片段 SSCP 结果

2.3 DNA 测序结果 在对 10 例出现单链 DNA 泳动速度发生变化的子宫内膜癌标本的 DNA 测序时均发现了二个突变位点,其突变位点是 126 密码子硷基 GTC AAT 为错义突变,另外一突变位点是 127 密码子硷基 GCA GCG 为同义突变,突变率为 25%,见图 3,图 4。



图 3 正常内膜组织标本 DNA 测序结果

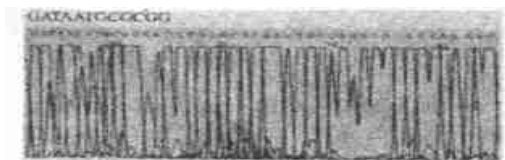


图 4 肿瘤组织 DNA 测序结果

### 3 讨论

p16 基因是第一个表达产生细胞固有成分的抑

癌基因,其定位于 9P<sup>21</sup>区,长约 8.5Kb,由两个内含子组成的间隔顺序分为三个外显子,p16 基因缺失或突变造成 p16 蛋白表达下降,p16 蛋白是细胞周期素依赖激酶 4(CDK4)的抑制蛋白,而过度 CDK4 的作用可导致细胞的非正常增生而发生肿瘤。

p16 基因突变在人类恶性肿瘤中相当普遍地存在,突变率 30% ~ 80% 不等,主要突变方式有缺失(主要为纯合缺失)、点突变、甲基化等。Peiffer 等<sup>[1]</sup>发现在 34 例子宫内膜癌中 3 例有 9P<sup>21</sup>区缺失,2 例点突变,表明 p16 基因异常与子宫内膜癌的发生有关;Shiozawa 等<sup>[2]</sup>认为 CDK4 的过量表达和 p16 表达的缺失与子宫内膜癌的亚型(组织学分型)发生有关。但 Hatta 等<sup>[3]</sup>认为 p16 基因的突变与子宫内膜癌无明显相关性,他应用 SSCP 和 Southern 杂交技术检测 15 例子宫内膜癌,未发现在子宫内膜癌组织中有 p16 基因的缺失和重排,这可能与其选择的病例和组织学类型的不同有关。本研究 40 例子宫内膜癌中有 12 例发生 p16 基因缺失,缺失率为 28.6%,这与其他妇科肿瘤的 p16 基因缺失率如卵巢癌 22.8% 相接近;但高于全身各种原发肿瘤中 p16 基因的平均缺失率(20.7%)<sup>[4]</sup>;在不同的恶性肿瘤中 p16 基因的纯合性缺失频率差异较大<sup>[5]</sup>,这说明 p16 基因尚有其他使之失活的机理。实验中有 10 例子宫内膜癌标本 p16 基因第二外显子发生点突变,点突变发生率 25%,由于目前尚未见到有关子宫内膜癌 p16 基因突变率的报道,所以本研究的 p16 基因第二外显子点突变率无法进行比较,但与 Hayashi<sup>[6]</sup>报道的非小细胞肺癌(NSCLC)中 p16 基因点突变率 29.6% 相接近。

目前通过 DNA 序列测定的突变比较多,主要有移码突变,错义突变和无义突变等<sup>[7]</sup>。本研究 10 例子宫内膜癌标本出现两个突变位点,其一由于错义突变使 126 密码子 GTC AAT,由缬氨酸变成天冬氨酸,使 p16 蛋白表达下降;另一突变位点上 127 密码子 GCA GCG 为同义突变,同义突变可使偏爱密码子变成非偏爱密码子,从而导致相应的 tRNA 由多数型转为少数型,结果使该密码子的表达明显减低,影响蛋白质的合成,造成了蛋白表达的下降。p16 蛋白的抑制功能区主要位于锚蛋白重复序列,而第 126 密码子突变和外显子缺失正发生于重复区域范围内,从而影响 p16 蛋白的功能,导致细胞增殖失控而发生肿瘤。我们应用 PCR-SSCP 和 DNA 测序技术对 40 例子宫内膜癌及正常子宫内膜组织中 p16 基因第二外显子进行检测,总变异率为 55%,明显高于正常子宫内膜组织,说明 p16 基因突变(缺失和点突变)参与了子宫内膜癌的发生。由于本研究未能得到 5 年生存率资料,故无法将 p16 基因突变与 5 年生存率进行相

关性研究,这有待于以后做进一步研究、探索,使 p16 基因的检测不但具有诊断意义,而且还具有判断预后的重要意义。

参考文献:

[1] Peiffer SL, Bartsch D, Whelan AJ, et al. Low frequency of CDKN2 mutation in endometrial carcinoma [J]. Mol Cell Oncol, 1995, 13(4): 210-212.  
 [2] Shiozawa T, Nikaido T, Shimizu M, et al. Immunohistochemical analysis of the expression of cdk4 and p16 in human endometrial carcinoma [J]. Cancer, 1997, 80(12): 2250-2254.  
 [3] Hatta Y, Hirama T, Takeuchi S, et al. Alterations of the p16 (MIS1) gene in testicular, ovarian, and endometrial malignancies [J]. J Urol, 1995, 154(5): 1954-1957.

[4] 傅松滨,王柏秋,黄承滨,等.非小细胞肺癌中 p16 基因的突变研究[J].中华医学遗传学杂志,1999,5(16):293-295.  
 [5] Okamoto A, Demetrick DJ, S Pillare EA, et al. Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer [J]. PNAS, 1994, 91(23): 11045-11049.  
 [6] Igaki H, Sasaki H, Kishi T, et al. High frequency of p16 gene deletion in human cancer cell lines [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 203(2): 1090-1095.  
 [7] Baumgarthner R, Catalan FC, Winoto A. Structure of human cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4: comparison of known and predicted structures and implications for the function of tumor suppressor p16INK4 [J]. Structure, 1998, 6(10): 1279-1290.

(安凤校对)

## 大肠癌术后早期 MPHLF 方案双路腹腔温热化疗并全身化疗的临床研究

王冰<sup>1</sup>, 周珞华<sup>2</sup>, 孔凡虎<sup>1</sup>, 于丁<sup>3</sup>,  
 黄凤桥<sup>1</sup>, 查松柏<sup>1</sup>, 殷辉<sup>1</sup>, 张建群<sup>1</sup>

关键词: 大肠癌; MPHLF 方案; 双路腹腔温热化疗

中图分类号: R735.2 文献标识码: D

文章编号: 1000-8578(2003)01-0025-01

大肠癌的治疗以手术为主,但术后患者半数以上死于复发和转移。故对它的控制及治疗是提高大肠癌术后生存率的关键。我们自 1992 年 1 月~2001 年 1 月对收治的 38 例进展期大肠癌术后患者采用术后早期 MPHLF 方案行双路腹腔温热化疗并全身化疗进行治疗,取得了较好疗效,现报告如下。

### 1 材料与方法

所选 38 例大肠癌术后患者均为我院 1992 年元月至 2001 年元月收治的 Duke's 中国改良分期 C 期患者。平均年龄 52.8 岁。其中男 29 例,女 9 例。均经病理诊断并分期。其中大多数为管状腺癌,乳头状腺癌 III4 例,粘液腺癌 III2 例。Kps 计分 85~100 分;所有病人均于术后 1 月内接受 MPHLF 方案双路腹腔温热化疗并全身化疗。

双路腹腔温热化疗:化疗的第 1 天持续灌注 44.5 的 0.9% 生理盐水注射液 2500ml~3500ml+ 顺铂 80mg~120mg/m<sup>2</sup>+ 地塞米松 10mg+ 丝裂霉素

20mg 的混合液。在向腹腔灌注药物时即按顺铂与硫代硫酸钠 1:200 的比例静脉滴注硫代硫酸钠,维持 12h。次日硫代硫酸钠的剂量减半静脉滴注,维持 12h。4 周重复 1 次,2 次为 1 疗程;共进行 2 疗程。顺铂剂量每次增加 20mg。但最大剂量不超过 120mg/m<sup>2</sup>。

全身化疗:CF200mgivdrip,在 CF 静脉滴注半量时,从另一静脉通道滴注 5-Fu0.5/m<sup>2</sup>,维持 6~8h,CF 余量维持 4~6h,第 1~5d,4 周重复,共 6 周期。羟基喜树碱 10mg 静脉滴注,第 1~5d,4 周重复,共 6 周期。于第 7d 开始应用 G-CSF 或 GM-CSF 皮下注射,直至白细胞大于 5.0 ×10<sup>9</sup>/L,血小板 >100 ×10<sup>9</sup>/L 停药。

在化疗前 3 天开始记 24h 出入量和尿量。水化、利尿按常规进行。止吐治疗按如下方法进行:每日化疗前 15min,给地塞米松 10mg 静推,枢丹注射液 8mg 静推;化疗开始即给地塞米松片 3.75mg 口服,6h1 次,4 次/日。每周期化疗开始前查血常规,每周 2 次;肝肾功、腹部及

次。根据主诉、体征、CEA、胸部 X 线平片、腹部及盆腔 B 超、CT 等结果判断是否有肝肺腹腔和盆腔等复发或转移。客观疗效和毒副作用按 WHO 的标准评价。

### 2 结果

疗效:1、3、5 年生存率分别是 100%、94.7%、89%。毒副作用主要是骨髓抑制、恶心、呕吐、肠麻痹等。但未见吻合口瘘、肠穿孔等。毒副作用经治疗后均在 1 周内恢复正常。

### 3 讨论

由于腹腔局部和区域复发以及肝转移是结肠癌术后最主要的致死因素。因此,大肠癌术后防止和治疗腹腔复发转移和肝转移是改善大肠癌预后和提高生存率的关键。腹腔化疗时,腹腔内药物浓度高,维持时间长。有利于杀灭腹腔内游离的癌细胞、术后残存的微小癌灶以及转移至肝脏的癌细胞。我们知道,热疗可有效杀灭癌细胞。而热损伤肿瘤细胞的分解产物刺激免疫系统,增加机体的免疫反应,可使转移的肿瘤细胞得到抑制。同时,加热可加快顺铂、丝裂霉素等化疗药物与癌细胞的结合,并可改变癌细胞的通透性,使它们有效地渗入癌细胞内,增强药物活性,充分发挥抗癌作用。另外,腹腔内化疗虽然使腹腔内药物浓度高,但全身剂量低,故其疗效受到影响,而同时全身化疗可弥补腹腔内用药局部浓度高但全身剂量低的不足。毒副作用主要为胃肠道反应及骨髓抑制。

心电图,每 2 周 1 次。  
 疗效评价:38 例患者全部随访完全。每年体检 3~4

## 论著摘要

(贺文校对)

收稿日期:2002-04-28; 修回日期:2002-09-16

作者单位:1.430081 武汉科技大学附属博爱医院肿瘤科;

2. 武汉科技大学附属医院外科;3. 湖北省肿瘤医院化疗科