

# 脑胶质瘤 p15 基因缺失及 5 CPG 岛甲基化研究

翟广<sup>1</sup>, 袁先厚<sup>1</sup>, 祁晋清<sup>2</sup>

**摘要:**目的 探讨 p15 基因变异及其与脑胶质瘤的发生、恶性进展的关系。方法 利用 PCR 和 PCR-based 甲基化检测技术检测了 56 例脑胶质瘤中 p15 基因外显子 1 缺失及 5 CPG 岛甲基化情况。结果 43 例高级别的脑胶质瘤中, 14 例发生了 p15 基因缺失 (32.6%), 而 13 例低级别的脑胶质瘤中无一例发生 p15 基因缺失, 差异具有显著性 ( $P < 0.05$ )。1 例低级别的脑胶质瘤, 3 例高级别的脑胶质瘤发生了 p15 基因 5 CPG 岛甲基化。结论 p15 基因异常可能参与脑胶质瘤的发生、恶性进展。基因纯合缺失是脑胶质瘤中 p15 基因失活的主要机制。

**关键词:** p15; 胶质瘤-脑-PCR-甲基化

中图分类号: R 739.41 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2001)04-0267-03

## Deletion and 5'CPG island Methylation of p15 Gene in Brain Glioma

ZHAI Guang, YUAN Xian-hou, QI Jin-qin

Department of Neurosurgery, the First Affiliated

Hospital Henan Medical University, Zhengzhou 450052, China

**Abstract: Objective** To investigate the abnormality of p15 gene in brain glioma and the correlation or it with occurrence or malignant progression of brain glioma. **Methods** Deletion and 5 CPG island methylation of p15 gene were detected by methods of PCR and PCR-based methylation in 56 cases of brain glioma. **Results** Out of the 43 cases of high grade glioma, 14 cases were found to have homozygous deletion of p15E1, while none of the 13 cases of low grade glioma was found to have deletion of p15E1 ( $P < 0.05$ ). Methylation of 5 CPG island of p15 gene was found only in four cases of glioma. **Conclusion** Abnormality of p15 gene may involved in the occurrence and malignant progression of brain glioma. Homozygous deletion of gene is the major mechanism of inactivation for p15 gene in brain glioma.

**Key words:** p15; glioma; brain; PCR; methylation

p15 基因是位于 9p21 并紧邻 p16 基因的又一细胞周期调控基因, 编码一生化功能与 p16 蛋白相似的蛋白质, 即 p15 蛋白。p15 基因被认为是 9p21 上又一肿瘤抑制基因。国外研究已经发现脑胶质瘤中存在 p15 基因缺失<sup>[1-3]</sup>, 而国内尚无报道。本实验利用 PCR 及 PCR-based 甲基化方法检测了 56 例脑胶质瘤 p15 基因外显子 1 (p15 E1) 缺失及甲基化状态, 以探讨 p15 基因异常与脑胶质瘤的病理发生及恶性进展的关系。

### 1 材料和方法

1.1 标本 56 例新鲜脑胶质瘤标本来自湖北医科大学附属第一、二医院神经外科 1997 年 1 月至 1998 年 7 月手术病例。经病理专家病检证实, I 级 5

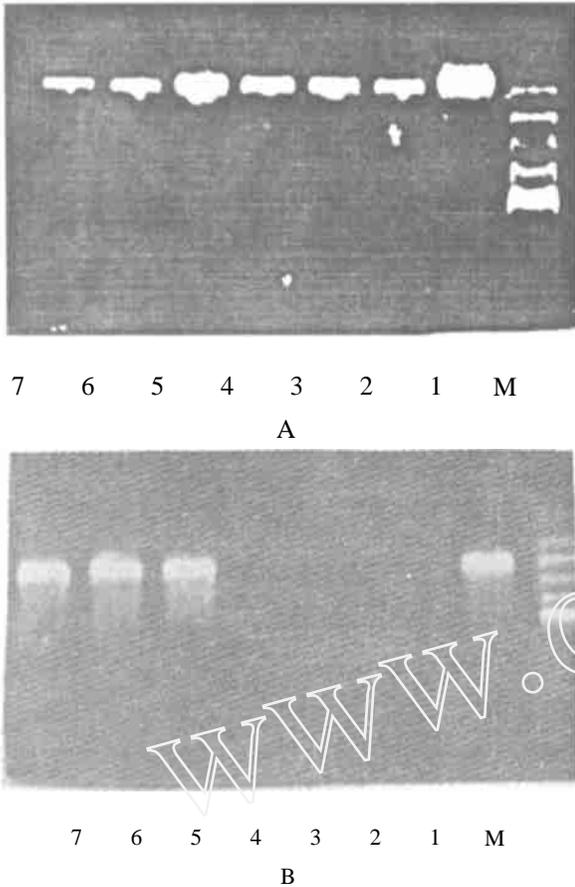
例, II 级 8 例, III 级 23 例, IV 级 20 例。肿瘤的分级均按 Kernohan 分级标准。肿瘤标本收集时, 取中心部位无出血坏死肿瘤组织, 用生理盐水洗净。液氮速冻后 -70℃ 保存。

1.2 染色体组 DNA 提取 蛋白酶 K 消化, 酚: 氯仿抽提方法提取染色体组 DNA。利用 751 紫外分光光度仪检测提取的 DNA 的浓度和纯度。

1.3 p15 基因缺失检测 p15 E1 引物根据 Jen 等<sup>[3]</sup> 报道而设计, 引物系列见表 1, GAPDH 基因作为内对照 (引物见表 1)。反应体系 20 μL, 含模板 DNA 0.2 μg, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mM dNTP, 1.25 U Taq 酶, 上下游引物各 20 pmol。预变性 95℃ 5 分钟后进入 PCR 循环: 95℃ 变性 30s, 50℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 1min。30 个循环后 72℃ 延伸 5 min。反应结束后, 2% 的琼脂糖凝胶电泳 (80 伏, 1 h), 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果或照像 (见图片 1)

收稿日期: 2000-04-07; 修回日期: 2001-05-31

作者单位: 1.450052 郑州, 河南医科大学附属第一医院; 2. 湖北医科大学附属第二医院



A 示标本 1~ 7GAPDH 均呈阳性,B 示标本 2, 3,4p15 基因缺失,M 为 PCR Marker

图 1 A、B 示标本 1~ 7 GAPDH 及 P15 基因 PCR 扩增结果

表 1 p15 及 GAPDH 基因引物系列

基因	引物系列	退火温度	片段大小
p15E1	5'-CCAGAAGCAATCCAGGCGCG-3'	50	532bp
	5'-AATGCACACACCTCGCCAACG-3'		
GAPDH	5'-GTGAAGGTCGGAGTCAAC-3'	52	356bp
	5'-GAGATGATGACCTTTTGGC-3'		

1.4 p15 基因 5'CPG 岛甲基化检测 对无 p15E1 缺失的脑胶质瘤进行 PCR-based 甲基化检测。引物同上, 扩增区域位于 5'CPG 岛。两条引物之间的 DNA 上有 5 个 Hpa II 酶切位点。取模板 DNA 1μg 加入甲基化敏感酶 Hpa II 或甲基化非敏感酶 Msp I (其酶切位点与 Hpa II 相同) 20u 及 20μl 酶切反应缓冲液 (Boehringer Mannheim Indianapolis, IN)。按限制性核酸内切酶生产厂家要求的条件, 37 水浴过夜, 以求完全消化。取 0.2 μg 消化的模板 DNA 进行 PCR 扩增, 反应体系和反应条件同上。每个标本同时对非消化的模板 DNA 及 Msp I 消化的 DNA 进行扩增。为避免不完全消化, 所有标本均消化两次。扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果或照像 (见图片 2)。

2 结果

2.1 p15E1 缺失情况 56 例脑胶质瘤中,14 例高级别的脑胶质瘤发生了 p15 基因外显子 1 缺失, 低级别脑胶质瘤无一例发生缺失 (见表 2)。所有标本 GAPDH 基因均阳性扩增。

2.2 p15E1 甲基化状态 PCR 证实无 p15E1 缺失的脑胶质瘤经 PCR-based 甲基化分析发现,4 例脑胶质瘤呈现 p15E15 CPG 岛甲基化, 其中 II、III 级各 1 例, IV 级 2 例 (详见表 3)。

表 2 56 例脑胶质瘤 p15E1 缺失情况

级别	例数	阴性	阴性率 (%)
I	5	0	0
II	8	0	0
III	23	5	21.8
IV	20	9	45

确切概率法检验: I、II 与 III、IV 比较, P<0.05

表 3 脑胶质瘤 p15E15 CPG 岛甲基化情况

级别	例数	5 CPG 岛甲基化
I	5	0
II	8	1 (12.5%)
III	18	1 (5.6%)
IV	11	2 (18.2%)

确切概率法检验: I、II 与 III、IV 比较, P<0.05



图 2 标本 26、27p15 基因 5 CPG 岛甲基化结果

3 讨论

p15 基因亦称多肿瘤抑制基因 2 (Multiple Tumor Suppressor MTS 2), 定位于 9p21, p16 基因上游大约 30Kb 处, 共有两个外显子, 其外显子 2DNA 系列 93% 与 p16 基因外显子 2 相同<sup>[1]</sup>。p15 基因编码一分子量为 15KD 的蛋白质, 其生化功能与 p16 蛋白相似, 能特异地抑制 CDK4/CDK6 的活性, 从而抑制了 cyclin D/CDK4 或 CDK6 介导的 pRb-E2F 磷酸化, 进而阻断了处于分裂周期的细胞从 G1 期向 S 期转变, 抑制细胞的增殖<sup>[4]</sup>。TGF-β 可导致 p15 基因上调, 有研究表明存在 p15 基因失活的白

血病细胞株能抵抗 TGF- $\beta$  的生长抑制效应,而无 p15 基因失活的白血病细胞株经过 TGF- $\beta$  处理后生长受到了明显抑制<sup>[5,6]</sup>。

脑胶质瘤中 p15 基因变异研究国内尚少。本实验利用 PCR 技术检测了 56 例脑胶质瘤中 p15 基因缺失情况, 结果发现 14 例脑胶质瘤 (25%) 发生了 p15E1 缺失, 缺失均发生在高级别的脑胶质瘤中, 而低级别肿瘤无一例发生缺失 ( $P < 0.05$ ), 与国外报道基本一致。这一结果提示 p15 基因缺失可能参与脑胶质瘤的病理发生及恶性进展。CPG 岛即 GC 富含区, 在正常体细胞中 CPG 岛处于非甲基化状态, 而在恶性转化时, 常染色体基因可发生广泛的 CPG 岛甲基化。本实验我们利用 PCR-based 甲基化检测技术检测发现仅 4 例脑胶质瘤发生了 p15 基因 5' CPG 岛甲基化, 其中 II、III 级各一例, IV 级 2 例, 提示, p15 基因 5' CPG 岛异常甲基化是脑胶质瘤中 p15 基因失活的又一机制, 但不是其主要机制。故我们认为 p15 基因异常可能参与脑胶质瘤的病理发生、恶性进展。基因纯合缺失是脑胶质瘤中 p15 基因

失活的主要机制; 5' CPG 岛异常甲基化是脑胶质瘤中 p15 基因失活的又一机制, 但其发生率较低。

参考文献:

[1] Kamb A, Grusis A G, Weaver -Feldhaus J, et al A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types [J]. Science, 1994, 264: 436.

[2] Sonoda Y, Yoshimoto T, Sekiya T. Homozygous deletion of the MTS 1/p16 and MTS 2/p15 genes and amplification of the CDK 4 gene in glioma [J]. Oncogene, 1995, 11: 2145.

[3] Jen J, Harper J W, Bigner S H, et al Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors [J]. Cancer Res, 1994, 54: 6353.

[4] Takeuchi S, Bartram C R, Seriu T, et al Analysis of a family of CDKs: p15/MTS 2/INK4B, p16/MST 1/INK4A, and p18 genes in all of childhood blood [J]. Jpn J Cancer Res, 1995, 86: 755.

[5] Hannon GJ and Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF- $\beta$  induced cell cycle [J]. Nature (Lond), 1994, 371: 257.

[6] Herman JG, Jen J, Merlo A, et al Hypermethylation-associated inactivation indicates tumor suppressor role for P15INK4B1 [J]. Cancer Res 1996, 56: 722.

(杨 卉校对)

## 抑凋亡基因 bcl-2 在宫颈上皮内瘤变中的表达

吴 丹, 苑中甫

关键词: 抑凋亡基因 bcl-2; 宫颈上皮内瘤变 (CIN)

中图分类号: R 737.33 文献标识码: D

文章编号: 1000-8578 (2001) 04-0269-01

宫颈上皮内瘤变 (CIN) 是宫颈癌的癌前病变, 但并不是所有癌前病变均能发展为宫颈癌。检测 CIN I、II、III 中抑凋亡基因 bcl-2 蛋白的表达, 以期找到 bcl-2 与宫颈癌进展的关系。

### 1 材料和方法

1.1 研究对象 宫颈活检及手术切除组织蜡块: CIN I 13 例, CIN II 9 例, CIN III 16 例, 取活检及手术前病人均未行放疗和化疗。

1.2 试剂 免疫组化 ABC 及 DAB 底物试剂盒来自北京中山生物工程公司, bcl-2 (100) 单克隆抗体来自 DAKO 公司。

1.3 免疫组化 ABC 法步骤按试剂盒

说明, bcl-2 逐渐向上皮的中上层扩展。稀释度为 1: 100, DAB 显色。1.4 结果判断方法 bcl-2 阳性细胞为细胞浆出现棕黄色颗粒或核膜着棕黄色, 按阳性细胞数及显色程度分为四组: (-): 无阳性细胞; (+): 阳性细胞散在, < 5%, 显色较淡; (++) : 阳性细胞 5% ~ 50%, 显色较深; (+++) : 阳性细胞 > 50%, 显色较深。每例计数 10 个高倍视野取平均值。计算阳性率时, 把 (-) 和 (+) 作为 bcl-2 表达阴性片, 把 (++) 和 (+++) 作为 bcl-2 表达阳性片。

1.5 统计学处理采用四格表的确切概率法。

### 2 结果

CIN I 中 4 例 bcl-2 阳性表达 (4/13, 30.8%), CIN II (5/9, 55.6%), CIN III (13/16, 81.3%), 随着 CIN 的进展, bcl-2 表达逐渐增多 ( $P < 0.05$ ), 且阳性细胞分布由基底层

说明, bcl-2 逐渐向上皮的中上层扩展。

### 3 讨论

bcl-2 抑制细胞发生凋亡, 其作用不是直接促进细胞的增殖, 而是延长细胞的生命期限。在各种原因诱导的凋亡通路中, bcl-2 的作用处于核心地位。

我们的研究发现, 随着 CIN 的进展, bcl-2 表达逐渐增强, 且由基底层逐渐向上皮的中上层扩展, 揭示 bcl-2 参与了基底储备细胞的异常分化过程, 反映了 CIN 的损害程度。已经证实, CIN III 有保持现状和向癌进展两种倾向, 而 CIN I、CIN II 的退化倾向占主流。我们的结果显示 bcl-2 在 CIN I 的表达水平较低, 抑凋亡作用也较小, 这就使大多数上皮细胞 (主要是基底层细胞) 的寿命相对缩短而发生退化, 而在 CIN III 的高表达使大多已经异常增生的细胞寿命延长, 使异常增生细胞的存活、积累、癌变有了可能, 提示 bcl-2 在 CIN 进展到癌或维持现状方面起重要作用。促凋亡因素和抑凋亡因素在宫颈癌变过程中 (从 CIN I、CIN III) 相互作用, 使该阶段的异常增生细胞或者发生凋亡转归成正常上皮细胞, 或者存活、积累、转归成癌细胞。

(刘红武校对)

收稿日期: 2000-07-08; 修回日期: 2001-05-21

作者单位: 450052 郑州, 河南医科大学第一附属医院妇产科