文章编号:1000-5404(2008)05-0399-03

论著

T 细胞淋巴瘤 p53 突变与其周围微卫星改变的研究

罗春英[1],邓 飞[2],刘曙光[2] ([1]右江民族医学院病理科,广西 百色 533000;[2]遵义医学院附属医院病理科,贵州 遵义 563003)

摘 要:**目的** 探讨 T 细胞淋巴瘤 p53 突变和其周围微卫星 DNA 的改变及两者的关系,以进一步研究 T 细胞淋巴瘤的分子遗传学发病机制。**方法** 采用 PCR、PCR-SSCP 技术观察 38 例 T 细胞淋巴瘤的肿瘤组织及其肿瘤旁淋巴组织或同一病例的反应性增生淋巴结组织进行 p53 基因外显子 5~8 的点突变研究和 p53 周围 4 个微卫星位点 D17S945、D17S938、D17S947、D17S926 的微卫星(microsatellite, MS)改变:微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)和杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)分析。**结果** p53 基因外显子 5~8 总突变率为 39.47%(15/38)。微卫星改变的阳性率为 23.68%(9/38),LOH 为 7.89%(3/38)。各位点 MSI、LOH 频率介于 2.86%~18.42% 和 0~5.26%。微卫星改变阳性肿瘤的 p53 突变率为 55.56%(5/9),阴性者为 34.48%(10/29)($P>0.05$)。D17S926 和 D17S947 位点 LOH 阳性组与阴性组的 p53 突变率分别为 100%、36.11%($P>0.05$)。**结论** T 细胞淋巴瘤中存在微卫星改变和 p53 基因突变,两者发生无明显关系。但微卫星改变阳性的肿瘤,p53 突变倾向于高发。

关键词:T 细胞淋巴瘤;微卫星;杂合性缺失;p53 基因;突变
中图法分类号:R394.3;R730.23;R730.263 **文献标识码**:A

p53 mutation and microsatellite alteration in T cell lymphoma: 38 cases

LUO Chun-ying[1], DENG Fei[2], LIU Shu-guang[2] ([1]Department of Pathology, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, Guangxi; [2]Department of Pathology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China)

Abstract: **Objective** To determine the mutations of exons 5, 6, 7 and 8 of p53 gene and the alteration of microsatellite DNA around it, and investigate their relationship in T-cell lymphoma. **Methods** We measured frequencies of p53 gene point mutation in exons 5 to 8 by PCR-SSCP methods and detected microsatellite alteration (MA) including microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) by PCR-based methods at 4 microsatellite loci (D17S945, D17S938, D17S947 and D17S926) around p53 gene in tumor mass and adjacent normal lymphatic tissue or reactive hyperplasia lymph node excised from 38 cases of T-cell lymphoma. **Results** The frequency of p53 gene mutation, MA, and LOH was 39.47% (15/38), 23.68% (9/38), and 7.89% (3/38), respectively. At the 4 microsatellite loci, the frequency of MSI and LOH varied from 2.86% to18.42% and from 0 to 5.26%, respectively. The mutation frequency of p53 gene in MA positive cases was 55.56% (5/9), and in MA negative group was 34.48% (10/29), but the difference was not significant ($P>0.05$). Additionally, at D17S926 and D17S947, the mutation frequency of p53 gene in LOH positive cases was 100% and in the negative cases was 36.11% ($P>0.05$). **Conclusion** There are MA and mutation of p53 gene in T-cell lymphoma though no significant correlation between them. But, MA positive cases might experience high mutation of p53 gene in T-cell lymphoma.

Key words: T-cell lymphoma; microsatellite instability; loss of heterozygosity; mutation; p53 gene

肿瘤的发生涉及癌基因、抑癌基因和错配修复基因的异常。肿瘤表型的形成涉及由抑癌基因(tumor suppressor gene, TSG)失活引起的肿瘤抑制途径和由 DNA 错配修复系统功能缺陷引起微卫星改变:微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)和杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)。微卫星改变是否引起其他基因改变而导致恶性肿瘤发生是目前国内外研究的热点。目前对 T 细胞淋巴瘤进行 MSI 及其与 p53 基因的关系研究较少。本研究收集了 38 例 T 细胞淋巴瘤,从基因突变、微卫星不稳定性和杂合性缺失的角度对 p53 基因及其周围的 4 个微卫星位点进行初步研究,以探讨它们与 T 细胞淋巴瘤以及它们之间的相互关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

标本取自 1998-2003 年遵义医学院附属医院及贵州省人民医院病理科的 T 细胞淋巴瘤存档材料 38 例,所有病例根据

基金项目:国家自然科学基金(30160030)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30160030)
作者简介:罗春英,女,贵州省铜仁市人,硕士研究生,讲师,主要从事淋巴瘤方面的研究。电话:(0776)2849481,E-mail:chun2005008@163.com
通信作者:邓 飞,电话:(0852)8925881,E-mail:mdproffeideng@hotmail.com
收稿日期:2007-04-18;修回日期:2007-12-12

2001 年 WHO 淋巴造血组织肿瘤分类,形态学及免疫组织化学切片复习确诊。各病例中取同一病例的反应性增生淋巴结或肿瘤旁淋巴组织作为对照。标本均为 4% 甲醛固定、石蜡包埋。提取 DNA 主要试剂,PCR 相关试剂及电泳试剂购于上海生工生物工程有限公司。

1.2 石蜡组织 DNA 提取

组织块大且坏死少者脱蜡后采用常规蛋白酶 K 消化,酚-氯仿-异戊醇抽提,盐沉淀法提取石蜡组织 DNA。反之用粗提法:常规脱蜡后加入裂解液和蛋白酶 K,55 ℃过夜,待组织溶解后灭活蛋白酶 K,吸取上清液。核酸测定仪上测定 DNA 浓度及 $D(260)/D(280)$ 值,比值 < 1.6 者弃用重提。

1.3 p53 基因突变分析

1.3.1 引物 p53 第 5 ~ 8 外显子 DNA 引物序列由上海生物工程有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 p53 基因 5 ~ 8 外显子引物序列及所扩增的 DNA 的长度

引物	引物序列(5′→3′)	扩增片段长度(bp)	延伸温度(℃)
Exon 5	GTACTCCCCTGCCCTCAACA CTCACCATCGCTATCTGAGCA	184	58
Exon 6	TTGCTCTTAGGTCTGGCCCC CAGACCTCAGGCGGCTCATA	119	62
Exon 7	TAGGT GGCTCTGACTGTACC TGACCTGGAGTCTTCCAGTGT	114	60
Exon 8	AGTGGTAATCTACTGGGACGG ACCTCGCTTAGTGCTCCCTG	134	60

1.3.2 聚合酶链反应(PCR)检测 PCR 反应体系(50 μl):10 × Buffer 5 μl、1.5 mmol/L $MgCl_2$、200 μmol/L dNTPs、0.5 μmol/L 引物 1 对、0.2 U *Taq* 酶、0.5 μg 模板 DNA。以双蒸水代替模板作空白对照,在 PTC-100-96 多功能 PCR 扩增仪(MJ Research. USA)上扩增。反应条件:95 ℃预变性 5 min(第 4 分钟时加 *Taq* 酶),94 ℃变性 1 min,退火 1 min,退火温度见表 1,72 ℃延伸 1 min,循环 35 次后延伸 7 min,4 ℃保存。产物 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳,硝酸银染色。

1.4 MSI 和 LOH 的检测

1.4.1 引物 选取 p53 基因附近微卫星位点多态标记 4 个。引物序列来自 Genome Database(http://www.gdb.org),由上海生工生物工程有限公司合成。引物的碱基序列及扩增片段长度见表 2。

表 2 p53 基因附近微卫星位点多态标记碱基序列及扩增片段长度

位点	区位	引物序列(5′→3′)	片段长度(bp)	延伸温度(℃)
D17S947	17pter – 17qter	TGTCCCAGAGTTTCGATA GACAAGAATTTCCCAAGATAG	250 ~ 282	54
D17S938	17pter – 17qter	CCGGATTGCTACACCTAA AT AACAGTCTCTNCTGGAGCAG	164 ~ 182	55
D17S926	17p13 – 17p13	GCAGTGGGCCATCATCA CCGCAGAAGGCTGTTGT	243 ~ 260	54
D17S945	17p13 – 17p12	CCTGAAGCCTGACCCC AACCAATCTGGACTCCCC	186 ~ 208	53

1.4.2 PCR 扩增 PCR 反应体系(50 μl):10 × Buffer 5 μl,1.7 mmol/L $MgCl_2$、200 μmol/L dNTPs、0.5 μmol/L 引物 1 对、0.2 U *Taq* 酶、0.5 μg 模板 DNA,以双蒸水代替模板作空白对照,在 PTC-100-96 多功能 PCR 扩增仪(MJ Research. USA)上扩增。反应条件:95 ℃预变性 5 min(第 4 分钟时加 *Taq* 酶),94 ℃变性 1 min,退火 1 min,退火温度见表 2,循环 35 次后延伸 10 min,4 ℃保存。产物 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶(含 7 mol/L 尿素)垂直电泳,硝酸银染色。

1.5 图像分析及结果判断

采用全自动凝胶成像分析系统,利用 Genesnap 软件获取图像,Genetools 软件(版本 3.0)分析凝胶成像。SSCP 分析如出现目的 DNA 条带泳动变位(条带增加、减少或移位),则判断为有突变。微卫星改变包括 MSI 和 LOH,与正常组织相比,肿瘤组织出现等位带的移位或获得额外的带型即判断为 MSI;肿瘤组织较正常对照组织出现某一条带消失或密度减少 50 % 以上,判断为 LOH。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件,两组间比较采用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法检验。

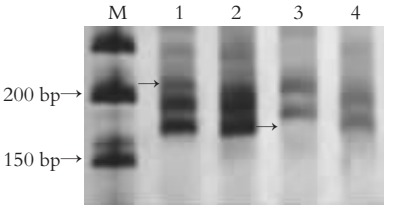
2 结果

2.1 p53 基因突变情况

38 例 T 细胞淋巴瘤中有 15 例 p53 基因组 DNA 存在异常迁移率带,总突变率为 39.47% (15/38),其中第 6 外显子的突变率最高为 18.42% (7/38)。

2.2 微卫星 MSI 和 LOH 情况

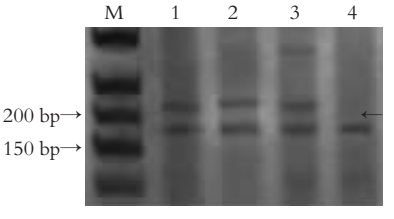
38 例 T 细胞淋巴瘤的肿瘤组织中有 9 例发生了至少 1 个位点的微卫星改变(图 1、2),改变率为 23.68%。LOH 为 7.89% (3/38),且 3 例 LOH 均发生在 D17S926、D17S947,同时 3 例都发生了 MSI 和 p53 突变。各位点 MSI 频率介于 2.86% ~ 18.42%,LOH 频率介于 0 ~ 5.26%。



M 标准;1:T_1;2:N_1;3:T_2;4:N_2

T_1 箭头示肿瘤组织出现条带增加;T_2 箭头示肿瘤组织条带迁移改变,均定为 MSI。T_1、T_2:肿瘤组织;N_1、N_2:同一病例相应的正常组织

图 1 部分标本 D17S938(164 ~ 182 bp)微卫星改变结果



M 标准;1:N_1;2:T_1;3:N_2;4:T_2

T_2 箭头示肿瘤组织条带消失,均定为 LOH。T_1、T_2:肿瘤组织;N_1、N_2:同一病例相应的正常组织

图 2 部分标本 D17S926(243 ~ 260 bp)微卫星改变结果

2.3 MSI/LOH 与 p53 突变的关系

2.3.1 38 例标本中微卫星改变与 p53 突变总的情况 微卫星改变阳性病例的 p53 总突变率为 55.56 % (5/9),高于微卫星改变阴性病例 34.48% (10/29)($P = 0.436 > 0.05$)。

2.3.2 不同微卫星位点 MSI/LOH 与 p53 突变的关系 结果见表 3。D17S945、D17S947、D17S926 位点 MSI 阳性组的 p53

突变率比阴性组低($P > 0.05$)。D17S926 和 D17S947 位点 LOH 阳性组与阴性组的 p53 突变率分别为 100% 与 36.11%($P > 0.05$)。各位点微卫星改变阳性组的 p53 突变率与阴性组比较无显著性差异。

表 3　38 例 T 细胞淋巴瘤各微卫星位点 MSI/LOH 与 p53 总突变的比较

MSI	p53 突变		P	p53 突变		P
	MSI^+	MSI^-		LOH	NO(LOH)	
D17S938	2/5 (40.00)	13/33 (39.39)	1.000	0/0 (0)	15/38 (39.47)	–
D17S945	0/1 (0.00)	15/34 (44.12)	1.000	0/0 (0)	15/35 (57.14)	–
D17S947	2/7 (28.57)	13/31 (41.94)	0.681	2/2 (100)	13/36 (36.11)	0.149
D17S926	1/4(25.00)	14/34(41.18)	1.000	2/2(100)	13/36(36.11)	0.149

分子表示 p53 突变例数,分母表示观察例数,括号内数字表示突变率(%),P 值采用确切概率法计算

3　讨论

微卫星不稳定性反映 DNA 错配修复系统功能缺陷的制瘤途径,在某些恶性肿瘤的发生机制中起关键性作用,然而目前国内外对 MSI 在 T 细胞性淋巴瘤中的情况研究报道较少,而我国该型淋巴瘤发生比例较欧美国家高。本研究选取了 p53 基因附近微卫星位点 D17S945、D17S938、D17S947、D17S926,对 38 例 T 细胞性淋巴瘤进行了 MSI/LOH 分析。结果显示 MSI 的阳性率为 23.68%(9/38),LOH 为 7.89%(3/38),提示在 T 细胞性淋巴瘤中存在 p53 基因周围微卫星 DNA 的不稳定性,这跟 Baumgärtner 等[1] 研究结果一致。但 LOH 的发生率仅为 7.89%,而 Boonstra 等[2] 在 8 例原发中枢神经系统淋巴瘤研究中和 Yoon 等[3] 在 13 例 NK/T 细胞淋巴瘤中发现 6q 上存在高频率的 LOH(75.00%,47.44%)。这表明在 p53 基因周围寻求高 LOH 发生率位点的必要性。同时各微卫星位点 MSI/LOH 的发生率不同,在 D17S947 位点 MSI 的发生率较其他高,为 18.42%,然而各组间比较无显著性差异。

有关 MSI 在淋巴瘤中的研究报道不多,且大多是研究 B 细胞性淋巴瘤。Takeuchi 等[4] 对 113 例原发性儿童急性淋巴母细胞性白血病的 6 号染色体进行了 34 个微卫星标志物的研究,发现 2 个 MSI 热点:6q21–22。但也有相反报道,Lee 等[5] 在胃的 B 细胞淋巴瘤研究中,没有发现高频的 MSI;Starostik 等[6] 对 25 例胃低度恶性的边缘区 B 细胞性淋巴瘤和 31 例胃的高度恶性弥漫性大 B 细胞性淋巴瘤分别用 29 个和 18 个微卫星标志物位点进行 MSI 的分析,也没有发现高频的 MSI。这些相关报道不一,原因可能与微卫星位点选择、样本大小、肿瘤属性和临床特征等的差异有关。

p53 基因是目前发现与人类肿瘤密切相关的抑癌基因,它的失活常导致肿瘤的发生,约 50% 的实体瘤有 p53 基因的缺失和(或)点突变,约 86% 集中于第 5 至第 8 外显子。本研究对 38 例 T 细胞性淋巴瘤进行了 p53 基因第 5 到第 8 外显子突变研究,结果 p53 基因总突变率为 39.47%,其中外显子 6 的突变率最高为 18.42%;同时为了全面的了解 p53 基因在 T 细胞淋巴瘤中的情况,有必要在其他其外显子上作进一步的工作,因为虽然肿瘤中 p53 基因突变热点位于外显子 5~8,但仍有可能是位于其他外显子上,也许这种情况在 T 细胞淋巴瘤中是比较常见的。

理论上单纯微卫星 DNA 不稳定或基因失活不足以引发正常细胞的恶性转化,需要其互相促进或他基因改变的共同参与。Takakuwa 等[7] 研究了 19 例甲状腺淋巴瘤中的 MSI 和 p53、K-ras 突变,结果提示 MSI 与 p53 突变没有明显的联系,而与 K-ras 突变有紧密联系。在非霍奇金淋巴瘤中,关于 p53 基因与 MSI 的关系,文献报道较少。

本研究结果显示,T 细胞淋巴瘤中存在微卫星改变和 p53 基因突变,两者发生无明显联系,但 MSI/LOH 阳性肿瘤的 p53 总突变率与阴性者相比倾向于高发。分析不同微卫星位点 MSI/LOH 与 p53 突变的关系,发现不同位点微卫星改变对 p53 突变的影响不同。D17S945、D17S947、D17S926 位点 MSI 阳性组的 p53 突变率比阴性组低($P > 0.05$),这提示 MSI^+ 与 p53 突变没有明显的联系。但 3 例发生 LOH 的病例均发生了 p53 突变,且 3 例 LOH 均发生在位于微卫星位点 D17S947 和 D17S926 上,提示 p53 突变可能与微卫星位点 D17S926、D17S947 杂合性缺失有一定关系,由于样本量小,LOH 检出率低,有待进一步研究。可见 MSI 不是 T 细胞淋巴瘤的表现型,而只是一个特定的标志物不稳定性的现象。

参考文献:

[1] Baumgärtner A K, Zettl A, Chott A, *et al*. High frequency of genetic aberrations in enteropathy-type T-cell lymphoma [J]. Lab Invest, 2003, 83(10): 1509–1516.

[2] Boonstra R, Koning A, Mastik M, *et al*. Analysis of chromosomal copy number changes and oncoprotein expression in primary central nervous system lymphomas: frequent loss of chromosome arm 6q [J]. Virchows Arch, 2003, 443(2): 164–169.

[3] Yoon J, Ko Y H. Deletion mapping of the long arm of chromosome 6 in peripheral T and NK cell lymphomas [J]. Leuk Lymphoma, 2003, 44(12): 2077–2082.

[4] Takeuchi S, Koike M, Seriu T, *et al*. Frequent loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 6: identification of two distinct regions of deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Cancer Res, 1998, 58(12): 2618–2623.

[5] Lee H, Kim J J, Kim J H, *et al*. Microsatellite instability in gastric B-cell lymphoma [J]. Korean J Gastroenterol, 2006, 47(3): 205–212.

[6] Starostik P, Greiner A, Schultz A, *et al*. Genetic aberrations common in gastric high-grade large B-cell lymphoma [J]. Blood, 2000, 95(4): 1181–1187.

[7] Takakuwa T, Hongyo T, Syaifudin M, *et al*. Microsatellite instability and k-ras, p53 mutations in thyroid lymphoma [J]. Jpn J Cancer Res, 2000, 91(3): 280–286.

(编辑　郭建秀)