维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)02-0175-05

乳腺癌及良性病变中 P16 蛋白与基因 5′CpG 岛甲基化的病理意义的探讨

周林艳,张　徽,李圆圆,林　晓

(重庆医科大学病理学教研室,重庆　400016)

【摘　要】目的:探讨 P16 蛋白在乳腺良性病变,乳腺导管内癌,浸润性导管癌中的表达,p16 基因 5′ CpG 岛甲基化在原发性乳腺癌组织中与 P16 蛋白失表达的关系及意义。方法:用限制性酶 PCR 检测 45 例乳腺浸润性导管癌及 15 例乳腺良性病变 p16 基因中 5′ CpG 岛甲基化状态,甲基化检测结果与免疫组织化学方法检测的 P16 蛋白表达结果进行比较。结果:p16 蛋白在乳腺癌中强表达,但随组织学分级升高,淋巴结的转移,肿瘤直径的增加,p16 蛋白表达率降低。p16 基因甲基化与 p16 蛋白表达负相关,且与组织学分级相关。结论:p16 基因甲基化是其失表达的可能机制之一。

【关键词】DNA 甲基化;乳腺肿瘤;CpG 岛; p16

【中国图书分类法分类号】R737.9　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2005-10-20

Research on DNA methylation in 5′ CpG island of P16 gene and P16 expression in primary breast cancer and benign breast lesions

ZHOU Linyan, et al

(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:* To examine the involvement of methylation of p16 gene on the p16 status and tumor progression in primary breast cancer and the role of p16 protein in primary breast cancer. *Methods:* DNA was extracted from 45 cases of primary breast carcinomas and 15 cases of benign breast lesions. Polymerase chain reaction (PCR), using the extracted DNA and methylation-sensitive restriction enzymes (Hpa Ⅱ、Sac Ⅱ), was performed to detect the methylation of 5′ CpG island in the p16 gene. The results were compared with the P16 expression by immunostaining. *Results:* (1) p16 was overexpressed in breast cancer. With the increase of histological grade of breast carcinomas, p16 expression decreased. In addition, the low expression of p16 in primary breast cancer was associated with tumor size and lymph node involvement. (2) Methylation of the CpG island of the p16 gene was inversely correlated with p16 expression in a subset of the primary breast carcinomas. With the increase of histological grade of breast carcinomas, DNA methylation was enhanced. *Conclusion*: Methylation of p16 gene may be the cause of loss of p16 expression.

【Key word】DNA methylation; Breast cancer; CpG island; p16

乳腺癌的发生及转移与多种抑癌基因异常表达有关。在肿瘤进展中,p16 基因作为抑癌基因应该是失表达而不是高表达，但近年已有许多不同观点。同时与其它抑癌基因常因点突变失活不同,p16 基因以小片段的缺失及 5′ CpG 岛甲基化为其失活的主要机制[1]。目前这方面的报道不多,且结果存在很大分歧。本文对 P16 蛋白和 p16 基因 5′ CpG 岛甲基化状况与乳腺癌病理因素关系进行了研究,以明确乳腺癌的发生发展机制并为预后判断提供检测指标。

1　材料与方法

1.1　组织来源

来自重庆医科大学附属第一医院新鲜乳腺浸润性导管癌根治手术标本 45 例及乳腺良性病变（乳腺病及乳腺纤维腺瘤）15 例;另 15 例乳腺导管内癌,和 2 例乳腺良性病变来于重庆医科大学病理教研室 1998~2003 年石蜡组织块。并进行组织学分级,45 例乳腺浸润性导管癌中 14 例为 Ⅰ 级,14

作者介绍：周林艳(1977-　),女,硕士研究生,
主要研究方向:乳腺癌发生发展机制。

基金项目：2003年度校创新基金项目(CX200316)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

例为Ⅱ级,17 例为Ⅲ级(组织学分级依据腺管形成、细胞核多形性及每 10 个高倍镜视野下的核分裂像计数分别评分相加,3～5 分为高分化,6～7 分为中分化,8～9 分为低分化)。

1.2 P16 蛋白表达水平的免疫组织化学检测

采用链霉素抗生物素蛋白－过氧化物酶(SP 法)。操作步骤参照 SP 试剂盒(购自福州迈新公司)说明进行。一抗为单克隆抗体(即用型,购自福州迈新公司)。抗原采用柠檬酸钠－微波修复,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精淡染。以已知的阳性片作为阳性对照,以 PBS 缓冲液代替第一抗体作空白对照。采用双人盲法,分别判定。

1.3 免疫组织化学结果判断标准

以胞核胞浆着色为阳性细胞。采用二级计分法,阳性细胞计数 <5%,0 分,5%～25%,1 分,25%～50%,2 分,50%～75%,3 分,>75%,4 分。染色强度:淡黄色 1 分,黄或深黄色 2 分,褐或棕褐色 3 分,两者计分相乘,0 分为无表达,1～4 为弱表达,5～7 分为中等表达,8～12 分为强表达[11]。在与甲基化结果比较时,将无表达和弱表达一起作为弱表达,中等表达和强表达作为过表达。

1.4 DNA 提取

切取癌组织 10～20mg(用国软组织和脂肪组织已剔除)后剪碎,在冰冷细胞裂解液中研磨至悬浊液,倒入离心管内,加入 3μl 蛋白酶 K 后在 55℃水浴箱放置 3～16h。消化液离心后将上清液至 600μl 异丙醇的新离心管内,充分混匀,离心后收集 DNA 沉淀,再加入 600μl 70%的乙醇漏倒数次后离心,吸去上清液,空气干燥 15min,溶于 100μl TE。抽提物稀释一定倍数后,用紫外分光光度仪测 A260 和 A280,计算 DNA 含量和纯度。根据结果,稀释为 1μg/μl,4℃保存备用。

1.5 聚合酶链反应(PCR)

1μg 基因组 DNA 作为模板备用。合成 p16 cDNA 第一外显子包括 CpG 岛的一段序列的引物,其中包含两个甲基化敏感的限制性酶 HpaⅡ位点和一个限制性酶 SacⅡ位点。正义链引物为 5′–CGG AGC AGC ATG GAG CCG–3′,反义链引物为 5′–CTG GAT CGG CCT CCG ACC GTA–3′,目的片段为 159bp。94℃预变性 5min 后,进行 35 个循环如下:94℃ 30s,57℃ 30s,72℃ 1min。扩增完成后,在 1.7%凝胶上分析 PCR 产物,以确定基因组 DNA 成功提取。

1.6 限制性内切酶消化

1μg 基因组 DNA 用 HpaⅡ、SacⅡ、MSPⅠ(甲基化不敏感的内切酶,对发生甲基化的 DNA 片段仍能切开,可作为酶切完全的对照)37℃水浴消化过夜后,消化产物作为模板备用。

1.7 p16 基因甲基化的检测

用上述消化产物分别作为模板,同样的引物,同样的扩增条件(如上)进行 PCR 反应。反应产物在紫外灯下观察,记录结果,部分病例用紫外成像仪拍照。

1.8 结果判断

在实验中用 MSPⅠ作为酶切完全的对照,以防止因为酶切不完全而导致的 DNA 甲基化假阳性。只有在 MSPⅠ消化产物作为模板时没有相应的片段扩增出,才能认为酶切完全,判断结果有意义。如果 HpaⅡ、SacⅡ两个位点发生甲基化,则酶切不能完成,那么 PCR 就能扩增出相应片段,据此我们认为是甲基化阳性。而如果未发生甲基化,则 DNA 将能被消化,那么 PCR 不能扩增出相应片段,认为是甲基化阴性。

1.9 统计方法

采用 SAS8.0 统计分析软件中 χ^2 检验及 Fisher's 精确检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 P16 的免疫组织化学结果

导管内癌中 p16 过表达较乳腺良性病变有明显升高表 1。而浸润性导管癌中 p16 表达较导管内癌有明显降低(图 1,2)。

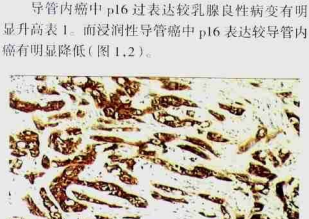


图 1 浸润性导管癌中 p16 蛋白免疫组化染色,强阳性表达,×100。

表 1 乳腺良恶性病变中 P16 蛋白的表达情况

项 目	例数	P16 蛋白表达				χ^2	P
		强表达数	中等表达数	弱表达数	过表达率(%)		
浸润性导管癌	45	25	3	17	62.2		
导管内癌	15	12	2	1	93.3	3.81	0.025
良性病变	17	1	5	11	35.3	9.11	<0.005

注:过表达率为(强表达数+中等表达数)/例数。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2　乳腺浸润性导管癌中 P16 蛋白与病理因素的关系

项　目	例数	p16 蛋白表达				χ^2	P
		强表达数	中等表达数	弱表达数	过表达率(%)		
组织学分级							
Ⅰ	14	12	0	2	85.7		
Ⅱ	14	7	2	5	64.2		
Ⅲ	17	6	1	10	41.2	6.51	0.03
淋巴结转移							
有	25	11	1	13	48		
无	20	14	2	4	80	4.84	0.02
肿块直径							
<3cm	18	14	1	3	83.3		
≥3cm	27	11	2	14	48.1	5.688	0.01
ER蛋白表达							
阳性	17	11	0	6	64.7		
阴性	28	14	3	11	60.7	0.07	0.07

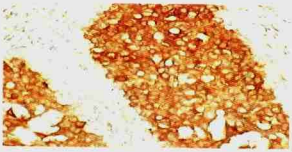


图 2　乳腺导管内癌 p16 蛋白免疫组化染色，强阳性表达，×100。

2.2　P16 蛋白的表达与乳腺浸润性导管癌组织学分级间的关系

组织学Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级 P 16 蛋白表达有明显差异（表 2）。

2.3　浸润性导管癌中淋巴结转移与否间 P16 蛋白表达的比较

发生淋巴结转移的 p16 蛋白表达明显低于未发生淋巴结转移（表 2）。

2.4　浸润性导管癌中 ER 蛋白表达与 P16 蛋白表达的关系

ER 阳性与 ER 阴性组间 P16 蛋白表达无显著性差异（表 2）。

2.5　浸润性导管癌中肿块大小与 P16 蛋白表达的关系

癌肿直径大于 3cm 的 p16 蛋白明显低于癌肿直径小于 3cm（表 2）。

2.6　良恶性乳腺组织中 p16 基因的甲基化状况

两者间发生甲基化无显著性差异（表 3，图 3，4）。

表 3　乳腺良恶性病变中 p16 基因甲基化的比较

	n	p16 甲基化		
		阴性	阴性	阳性率(%)
乳腺良性病变	15	2	13	13.3
浸润性导管癌	45	10	35	22.2

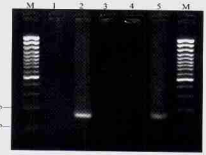


图 3　p16 基因目的片段（159bp）扩增产物电泳分析示 HjaⅡ位点发生甲基化

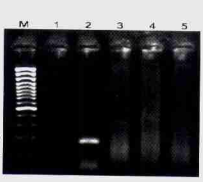


图 4　p16 基因目的片段（159bp）扩增产物电泳分析示 HpaⅡ位点未发生甲基化

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.7 浸润性导管癌中 p16 基因甲基化与 P16 蛋白表达间的关系

两者有明显的负相关关系（表 4）。

表 4 p16 甲基化与乳腺癌 p16 蛋白表达的关系

		n	p16 蛋白表达		P value
			阳性	阴性	
P16 甲基化	阳性	10	1	9	
	阴性	35	27	8	$P<0.05$

2.8 p16 甲基化与组织学分级的关系

组织学Ⅰ和Ⅱ、Ⅲ级发生甲基化有明显差异（表 5）。

2.9 p16 甲基化与癌肿大小的关系

两者发生甲基化并无显著性差异（表 5）。

2.10 p16 基因甲基化与淋巴结转移的关系

发生淋巴结转移的和未发生淋巴结转移的 p16 甲基化无显著性差异（表 5）。

表 5 p16 甲基化与乳腺癌病理因素的关系

	例数	p16 甲基化			χ^2	P
		阳性数	阴性数	阳性率(%)		
组织学分级						
Ⅰ	14	0	14	0		
Ⅱ	14	3	11	21.4		
Ⅲ	17	7	10	41.2	4.09	0.01
肿块直径						
<3cm	18	3	15	16.7		
≥3cm	27	7	20	25.9	0.13	0.22
淋巴结转移						
有	25	8	17	32		
无	20	2	18	10	1.97	0.06

3 讨 论

肿瘤的发生发展与癌基因的活化及抑癌基因的失活有密切关系，p16 是人类发现的第一个直接参与细胞周期调控的抑癌基因。对于 p16 蛋白在原发性乳腺癌中的表达及意义的观点并不一致。以前大多文献认为癌组织中 p16 表达下降，与肿瘤的发生发展具有相关性。而 Hui [3]和 Munot[4]报道 p16 过表达是肿瘤预后不良的指标之一，与肿瘤的分级，淋巴结转移，ER 失表达具有相关性，P16 蛋白的升高降低了肿瘤对雌激素的反应性。但也有学者[5]研究认为 p16 蛋白表达与肿瘤的大小，组织学分级，肿瘤类型，淋巴结转移等病理参数无关，它只是乳腺癌中众多异常表现较普通的一个指标。

本实验观察到虽然原发性乳腺癌相对于乳腺的良性病变来说 P16 蛋白表达增加，但随着组织学分级的增高，淋巴结的转移，肿瘤的增大，P16 蛋白表达有明显的降低。这在一定程度上解释了 p16 基因作为抑癌基因的功能。可将其失表达作为临床判断预后的指标之一。即 P16 蛋白的失表达是乳腺癌发展中的晚期事件。

p16 基因失活的机制包括基因纯合缺失，高甲基化及突变。在不同的肿瘤中 p16 基因失表达的机制各不相同。原发性乳腺癌 p16 基因失表达的机制中，发现纯合缺失和突变率极低，分别为 1.9%和 1.0%[6]。且 Gorgoulis[7]认为 p16 基因其纯合子的缺失及转录沉默是由于其抑制基因启动子的异常甲基化，这是乳腺癌中 p16 基因失活的主要机制。因此研究乳腺癌中 p16 基因的甲基化情况，及其在肿瘤发生发展过程中作用具有非常重要的意义。

作者通过对 45 例原发性乳腺癌患者及 15 例乳腺良性病变 p16 基因甲基化的情况及其与肿瘤大小、组织学分级、有无淋巴结转移的关系进行检测分析，结果显示 22.2%的乳腺癌组织发生甲基化，这与文献报道的结果一致[8]。而在 15 例乳腺良性病变中有 2 例（13%）发生 p16 基因甲基化，两者间不存在显著的差异（$P>0.05$）。这与 Di Vinci [9]报道是一致的。甲基化位点常发生在 HpaⅡ位点。因此，p16 的甲基化与乳腺上皮的恶性转化可能并不相关。Holst [10]也报道 p16 基因甲基化同样发生在正常的乳腺上皮内，即它可能是发生在乳腺导管上皮的一个正常事件，该作者也提出这可能会低估 p16 基因甲基化在肿瘤进程中的地位，它可能是发生在众多分子改变（如基因突变）之前的分子事件。本实验观察到 p16 基因的甲基化主要发生在 p16 蛋白弱表达（9/10）的病例中，表明两者间存在相关性。同时，组织学分级Ⅰ和Ⅱ、Ⅲ级中 p16 基因发生甲基化有显著差异，随组织学分级增加，甲基化增加。这与作者在检测 p16 蛋白表达时发现随组织学分级升高，p16 蛋白表达降低是相吻合的，认为 p16 基因甲基化是其失表达的可能机制之一。有无淋巴结转移、癌肿大小与 p16 基因发生甲基化不存在显著的差异（$P>0.05$）。但在实验中发现 p16 基因的甲基化多发生在有淋巴结转移的病例（80%），在一定

维普资讯 http://www.cqvip.com

程度上提示 p16 基因甲基化可能参与了肿瘤的转移。有学者认为在检测 p16 基因甲基化时只涉及了第一外显子的甲基化情况，并未检测全部上游启动子区域，而这些区域与基因的表达更相关[3]。张静[11]等人提出在检测 p16 基因甲基化时应多检测几个酶切位点，以更具说服力，本实验只检测了 p16 基因中第一外显子内的全部酶切位点，包括两个 HpaⅡ位点和一个 SacⅡ酶切位点，虽然该区域与 p16 基因的转录表达有密切关系，但不是 p16 基因全部上游启动子区域，要更加明确 p16 基因甲基化在原发性乳腺癌中的作用，尚需作进一步研究。

通信作者：张　徽（Email: zhanghui200157@sina.com），重庆医科大学病理教研室
第一作者现工作单位：常州市肿瘤医院病理科

参 考 文 献

[1] Woodcock DM, Linsenmeyer ME, Doherty JP, et al. DNA methylation in the promoter region of the p16 gene in human breast tumors [J]. Br J Cancer, 1999;79:251-256.

[2] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel anti-apoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumula-tion in gastric carcinomas [J]. Cancer Res, 1998;58(9):1808-1812.

[3] Hui R, Macmillan RD, Kenny FS, et al. INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16 messenger RNA is a marker of poor prognosis [J]. Clinical Cancer Res, 2000;6(7):2777-2787.

[4] Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, et al. Over-expression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype [J]. Breast Cancer Res and Treatment, 2001;67(1):61-70.

[5] Geradts J, Wilson PA. High frequency of aberrant p16 expression in human breast cancer[J]. AM J Pathology, 1996;149(1):15-20.

[6] Ruas M, Peters G. The p16 INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives [J]. Biochim Biophys Acta, 1998;1378(2):F115-177.

[7] Gorgoulis VG, Koutroumbi EN, Kotsinas A, et al. Alterations of p16-pRb pathway and chromosome locus 9p21-22 in sporadic invasive breast cancinomas [J]. Mol Med, 1998;4:807-822.

[8] 郭山春，廖松林，孟振行，等. 乳腺癌 p16 基因的纯合缺失，高甲基化，突变及其表达[J]. 中华病理学杂志，1999;28(2):105-108.

[9] Di Vinci A, Perdelli L, Banelli B, et al. p16 (INK4a) promoter methylation and protein expression in breast fibroadenoma and carcinoma [J]. Int J cancer, 2005;114(3):414-421.

[10] Holst CR, Nuovo GJ, Esteller M, et al. Methylation of p16 promoters occurs in vivo in histologically normal human mammary epithelia [J]. Cancer Res, 2003;63(7):1596-1601.

[11] 张　静，来茂德，陈　俭. 结直肠癌及结直肠黏膜 p16 基因 5′ CpG 岛甲基化状态的研究[J].中华病理学杂志，2000;29(2):95-98.

（上接第 168 页）

cence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells [J]. Cancer Res, 2005;65(3):84.

[9] Ueda Y, Wang S, Dumont N, et al. Overexpression of HER2 (erbB2) in human breast epithelial cells unmasks transforming growth factor beta-induced cell motility[J]. J Biol Chem, 2004;279(23):24505-24513.

[10] Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells [J]. Nature, 1988;335:440-442.

[11] Chen Y, Kayano T, Takagi M. Dysregulated expression of bcl-2 and bax in oral carcinomas: evidence of post-transcriptional control [J]. Oral Pathol Med, 2000;29:63-69.

[12] Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death [J]. Nature, 1990;348:334-336.

[13] Giarnieri E, Mancini R, Pisani T, et al. Msh2, Mlh1, Fhit, p53, Bcl-2, and Bax expression in invasive and in situ squamous cell carcinoma of the uterine cervix [J]. Clin Cancer Res, 2000;6(9):3600-3606.