维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)03－0250－03

原发性膀胱移行细胞癌中 p16 基因状态的研究

胥 飙[1],邓远忠[2]

(1.重庆医科大学临床学院检验科 重庆 400016;2.重庆医科大学临床学院泌尿科 重庆 400016)

【摘 要】目的:研究原发性膀胱移行细胞癌中 p16 基因的状态。方法:采用多重 PCR 分析法、SSCP 分析法及以 PCR 为基础的甲基化分析法,分别对 40 例原发性膀胱移行细胞癌及其相应的癌旁组织中 p16 基因的缺失、突变及甲基化情况进行了检测。结果:40 例肿瘤标本中,发现 7 例(17.5%)p16 基因缺失,3 例(7.5%)发生了突变,9 例(22.5%)有甲基化存在。全部相应的癌旁组织中均未发现有 p16 基因缺失、突变或甲基化存在。结论:p16 基因的异常改变在原发性膀胱移行细胞癌的发生与发展中可能起重要作用。

【关键词】 膀胱癌;p16 基因;缺失;突变;甲基化

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2000－12－01

The status of p16 gene in primary transitional cell carcinoma of bladder

XU Biao, et al

(Department of Laboratory Medicine, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】 ***Objective***: To investigate the status of p16 gene in primary transitional cell carcinoma of bladder (TCCB). ***Methods***: A total of 40 TCCB samples with correspondent tumor－adjacent specimens were screened for p16 gene deletions, mutations and hypermethylations by using multiplex polymerase chain reaction(PCR), single strand conformational polymorphism (SSCP) and PCR－based methylation analysis, respectively. ***Results***: Among 40 TCCB samples, 7 deletions , 3 mutations and 9 hypermethylations were detected, and their rates were 17.5%, 7.5% and 22.5%, respectively. However, no deletions, mutations or hypermethylations were found in all the tumor－adjacent tissues. ***Conclusion***: The abnormal alterations of p16 gene may play an important role in the carcin ogenesis of TCCB.

【Key words】 Bladder neoplasms; p16 gene; Deletion; Mutation; Hypermethylation.

p16 基因,也称 MTS1/CDKN2/p16INK4,定位于人染色体 9P21 区,基因编码蛋白为 p16,作为 CDK4 与 CDK6 的抑制因子,在细胞周期调控中起负性调节作用,防止细胞过度增殖。实验证实 p16 基因在许多肿瘤细胞株和原发肿瘤组织中有缺失和点突变[1~3]。近来研究发现许多肿瘤中 p16 基因 5'CpG 岛(富含 G、C 的区域)常表现高度甲基化并伴随基因失活[4~6]。甲基化作为 p16 基因的另一失活方式已引起重视,有关原发性膀胱移行细胞癌(Transitional Cell Carcinoma of Bladder, TCCB)中 p16 基因的状态的报道较少见,本文对 40 例 TCCB 标本及其癌旁组织中 p16 基因外显子 1 和外显子 2 的缺失、突变及甲基化情况进行了检测,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 本院泌尿外科手术切除标本 40 例,其中男性 28 例,女性 12 例.年龄 31～77 岁,平均 62 岁。40 例标本均经病理证实为 TCCB 者,癌旁正常组织病理证实不含癌细胞。

1.2 DNA 提取 按常规方法将术中切除组织块研碎、匀浆,蛋白酶 K 消化,酚、氯仿抽提,乙醇沉淀 DNA,TE 溶解后,测定 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.8～2.0 之间。

1.3 PCR 分析 用 PCR 法检测 40 例 TCCB 肿瘤组织中基因外显子 1 及外显子 2a、2b 的缺失情况,以 β－actin 基因作为内对照,全部引物均由北京赛百盛公司合成,其序列及所扩增 DNA 片段大小如表 1。

作者介绍:胥 飙(1969－),男,重庆人,主管技师。主要研究方向:临床实验室诊断学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 p16 基因及 β－actin 基因引物序列

外显子*	极性	引物序列	片段大小(bp)
p161A	+	5'TCTGCGGAGAGGGGGAGAGCAG3'	280
p161B	−	5'GCGCTACCTGATTCCAAGTC 3'	
p162A	+	5'ACAAGCTTCCTTTCCGTCATGCCG3'	244
p162C	−	5'CCAGGCATCGCTCACGTCCA3'	
p162B	+	5'TTCCTGGACACGCTGGTGGT3'	240
p162D	−	5'TCTGAGCTTTGGAGGCTCTCA3'	
β－actin A	+	5'CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC3'	589
β－actin B	−	5'AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC3'	

* 引物 p16 1A 与 p16 1B 为外显子 1，引物 p16 2A 与 p16 2C 为外显子 2a
引物 p16 2B 与 p16 2D 为外显子 2b

将用于扩增 p16 基因外显子 1 与外显子 2a、2b 的引物分别与作为内对照的 β－actin 的引物混合加入 PCR 反应体系中同时扩增，PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后，用 Bio－Rad 公司的 GS－250 Molecular Image System 使电泳带在计算机上显象并作分析。

1.4 单链构象多态性分析(SSCP) 取 10μl 基因 PCR 扩增产物进行变性，行 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。电泳结束后，银染并作分析。

1.5 以 PCR 为基础的甲基化分析 此法参照文献[6~9]分析位于 5'CpG 岛内的 p16 基因外显子 1 的甲基化情况，采用在 p16 基因外显子 1 序列内有酶切位点的甲基敏感的限制性内切酶 Sma I 作为基因组 DNA 的消化酶，以不含 Sma I 位点的染色体 9P 标记点多态性双核苷酸序列，β－actin 作为内对照。扩增所用的 p16 基因外显子 1 与 β－actin 的引物均同前。取 1ug 基因组 DNA，以 10U Sma I 25℃ 消化 8h 后，再以 10U Sma I 消化过夜，以此消化好的 DNA 作为模板，同时扩增 p16 基因外显子 1 与 β－actin。若出现 p16 基因外显子 1 的扩增产物，则提示有甲基化存在。

2 结 果

2.1 p16 基因缺失情况 经 PCR 扩增后发现 TCCB 肿瘤组织中 7 例有 p16 基因缺失，其中外显子 1 为 2 例，外显子 2a 为 3 例，外显子 2b 为 2 例。说明这些肿瘤组织中存在较大片段的 p16 基因外显子 1、外显子 2 共三个目的基因扩增片段的丢失或在引物位置的小片段缺失，缺失率为 17.5%(7/40)。

2.2 p16 基因突变情况 用 SSCP 对外显子 1、外显子 2a 及外显子 2b 三个目的基因的 PCR 扩增片段进行分析，仅在外显子 2a 片段中检测到 3 例(3/40，7.5%)异常移动电泳带，而相应的 3 例癌旁组织外显子 2a 未出现异常移动电泳带，故判断这 3 例有突变存在。

2.3 p16 基因甲基化情况 用 PCR 为基础的甲基化分析法在 40 例 TCCB 肿瘤组织中检出 9 例(9/40，22.5%)p16 基因 5'CpG 岛甲基化，而全部癌旁组织中均未发现有 p16 的甲基化存在。

3 讨 论

p16 基因是近年来发现的最为广泛的抑癌基因之一，参与多种肿瘤的发生与发展。p16 基因的失活机制包括 p16 基因的缺失、突变及 5'CpG 的异常甲基化。有关 p16 基因在 TCCB 中状态的研究报道较少，且结果差异较大。我们在 40 例 TCCB 肿瘤标本中发现 7 例(17.5%)有 p16 基因缺失，3 例(7.5%)有突变，相应的癌旁组织中则均未发现有缺失和突变，提示 p16 基因的缺失与突变在 TCCB 的发生、发展中可能起一定的作用。而文献[9~11]所报道的 p16 基因在人类肿瘤中的缺失与突变的结果存在较大差异的原因可能有：(1)p16 基因改变的频率随组织类型不同而异；(2)p16 失活的机制不同，如缺

维普资讯 http://www.cqvip.com

失导致 p16 蛋白表达缺失，点突变导致 p16 蛋白异常表达，DNA 甲基化改变基因表达的效率；(3)p16 基因在肿瘤晚期被灭活；(4)p16 基因与体外培养和细胞衰老有关；(5)p16 基因突变被肿瘤组织中非癌细胞粘染所掩盖；(6)可能有其它抑癌基因在 9P21 位点上。

近年研究 p16 基因另一重要失活机制，即 5' CpG 高甲基化，在多种肿瘤的发生与发展中起重要作用，特别是在一些过去未发现有 p16 基因缺失与突变的肿瘤或突变、缺失率较低的肿瘤中，如：结肠癌、前列腺癌中也发现 p16 基因甲基化而引起的基因失活且频率较高。我们用 PCR 为基础的甲基化分析法，对本组标本中 p16 基因外显子 1 内的 Sam I 位点的甲基化情况作了检测，结果发现有 9 例 (22.5%)肿瘤组织有 p16 基因甲基化存在，而全部癌旁正常组织则未检出有甲基化存在。提示 p16 基因的甲基化在 TCCB 的发生与发展中可能起重要作用。进一步研究 p16 基因的各种异常改变对 TCCB 的治疗作用具有重要意义。

参 考 文 献

[1] Kamb A, Cruis NA, feldhaus JW, et al. A Cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J]. Science, 1994; 264: 436 - 438.

[2] Spuck CH, Gonzalez - Zulueta M, Shipata A, et al. p16 gene in uncultured tumors[J]. Nature, 1994; 370: 183 - 184.

[3] Carins P, Polascik TJ, Eby Y, et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumors [J]. Nature Genet, 1995; 11: 210 - 214.

[4] Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. Inactivation of the CDKN2/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers[J]. Cancer Res, 1995; 55(20): 4525 - 4530.

[5] Lo KW, Cheung ST, Leung SF, et al. Hypermethylation of the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma [J], Cancer Res, 1996; 56(6): 2721 - 2725.

[6] Delgado BM, Piqueras JF, Garcia MJ, et al. Hpermethylation of 5' CpG island of p16 is a frequent event in non - hodgkin's lymphoma[J]. Leukemia, 1997; 11(3): 425 - 428.

[7] Lo KW, Huang DP, Lan KW. p16 gene alternations in nasopharyngeal carcinoma [J]. Cancer Res, 1995; 55(10): 2039 - 2043

[8] Gonzalez - Zulueta M, Bend CM, Yang AS, et al. Methylation of the 5'CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing[J]. Cancer Res, 1995; 55(10): 4531 - 4535.

[9] Kamb A, Liu QY, Harshman K, et al. Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumor with 9P loss(Response). Science, 265; 415 - 417.

[10] Kai M, Arakawa H, Sugimoto Y, et al, Infrequent somatic mutation of the MTS1 gene in primary bladder carcinomas [J]. Jpn J Cancer Res, 1995; 86: 249 - 251.

[11] Okamoto A, Hussain SP, Hagiware K, et al. Mutation in the p16INK4/MTS1/CDKN2, p15 INK4B/MTS2 and p18 gene in primary and metastatic lung cancer[J]. Cancer Res, 1995; 55(7): 1448 - 1451.