维普资讯 http://www.cqvip.com

368-370

(13)

文章编号：0253-3626(2000)04-0368-03

R734.202

非小细胞肺癌组织p16基因缺失及突变的临床意义

杜 铭[1]，李 静[2]，曾昭淳[3]，李良彬[1]，张雪梅[3]

（1. 重庆医科大学临床学院胸心外科 重庆 400016；2. 重庆市第三人民医院肿瘤科 重庆 400014；
3. 重庆医科大学基础医学院生化教研室 重庆 400016）

摘 要：目的 探讨人类非小细胞肺癌组织中p16基因缺失及突变情况及其与临床病理的关系。**方法** 应用控制模板DNA量的银染PCR-SSCP技术检测40例非小细胞肺癌手术切除标本中p16基因第2外显子。**结果** 40例中有13例发生纯合缺失，3例发生突变，缺失及突变率为40%。其缺失及突变率与肺癌的临床病理分期有密切关系（$P<0.05$）。**结论** p16基因的缺失及突变可能在非小细胞肺癌的发生、发展及转移中起重要作用。

关键词： 非小细胞肺癌；p16基因；PCR-SSCP；缺失；突变

中国图书分类法分类号： Q754；R734.2 **文献标识码：** A **收稿日期：** 2000-02-21

基因缺失 基因突变

Study on the deletion and mutation of p16 gene in human non-small cell lung cancer and its clinical significance

DU Ming, et al

（Department of Thoracic Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400016）

Abstract: Objective To study the relationship between the deletion and mutation of p16 gene and clinicopathologic manifestations of human non-small cell lung cancer(NSCLC). **Methods** Silver staining PCR-SSCP method of control amount of template DNA was used to detect exon 2 of p16 gene in human NSCLC tissue specimens. **Results** The deletion of p16 gene was identified in 13 out of 40 specimens. Of the 40 specimens, 3 showed a variant band indicative of the mutation. There was significant correlation between the frequency of the deletion and mutation(40%) and clinicopathologic stage($P<0.05$). **Conclusion** The deletion and mutation of p16 gene may play an important role in carcinogenesis, development and metastasis of human NSCLC.

Key Words: Non-small cell lung cancer; p16 gene; PCR-SSCP; Deletion; Mutation

近年的研究表明，抑癌基因的功能丧失在肿瘤发生中起重要作用。许多研究已经证明p53基因的缺失及突变和多种恶性肿瘤的发生、发展有关，新发现的p16基因位于人类9号染色体的短臂21区，全长8.5kb，由2个内含子组成的间隔顺序分为3个外显子，其编码的蛋白质为Mr15.7103的单链多肽，由148个氨基酸残基组成[1]。国外许多研究表明，P16蛋白能直接和周期蛋白依赖性激酶4（cyclin dependent Kinase 4, CDK4）相结合而影响细胞的增殖，我们从40例非小细胞肺癌手术标术中提取DNA，利用聚合酶链反应-单链构象多态性分析（Polymerase chain reaction-single strand confomation polymorphism, PCR-SSCP）对p16基因第2外显子进行研究，现将结果报告如下。

作者介绍： 杜 铭（1968- ），男，主治医师，硕士

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集我院胸外科手术切除并经病理检查确诊的40例NSCLC的癌组织（含远离肿瘤的正常肺组织标本），患者术前均未行放、化疗，男30例，女10例；60岁以下22例，60岁以上18例，平均58岁。

1.2 基因组DNA提取

手术切除标本离体半小时内置-80℃保存备用。DNA提取方法如下：0.1g组织块碾碎，加入TES 300μl充分混匀；加入5mol/L高氯酸钠80μl及100g/L SDS 100μl充分混匀，37℃水浴10min，65℃水浴15min，加入等体积酚/氯仿/异戊醇（25：24：1）抽提2次，氯仿抽取1次，抽取上清液加入1/2体积7.5mol/L 乙酸铵，加入二倍体积无水乙醇沉淀，TE溶解，-20℃保存备用。所有DNA样品经紫外分光光度计检测，260nmOD/280nmOD值大于1.8。

1.3 p16基因第2外显子扩增

维普资讯 http://www.cqvip.com

用PCR扩增p16基因第2外显子。

P1：5-TG TTCTCTCTGGCACCTCAT-3；

P2：5-CTCAGATCATCAGTCCTCAC-3。

扩增片段长342bp。引物和4种10mmol/L dNTP混合液购自上海Sangon公司，Taq DNA聚合酶购自上海普洛麦公司。50μl，50ml/L DMSO（终浓度），Taq DNA聚合酶1u。94℃变性5min，58℃复性30s，72℃延伸30s，1个周期；94℃变性30s，58℃复性30s，72℃延伸30s，39个周期；94℃变性30s，58℃复性30s，72℃延伸10min，1个周期。取扩增产物5μl，直接经25g/L琼脂糖电泳，溴乙锭染色，紫外线下观察并拍照。

1.4 PCR产物的SSCP分析

SSCP分析是在Sugano等[12]报道方法的基础上加以改进，具体操作如下：①制胶：配制8%聚丙稀酰胺凝胶（Acr/Bis=49：1），加入50ml/L甘油（终浓度）。②预电泳：1xTBE缓冲液中100V电泳30min。③PCR产物单链电泳：取5μl扩增产物加入15μl变性缓冲液（900ml/L甲酰胺、20mmol/L EDTA、0.5g/L溴酚兰、0.5g/L二甲苯晴蓝），置于94℃水浴5min，冰浴骤冷，加样于已预电泳的凝胶中，150V，循环水控制在17℃，电泳6～7h。④银染：凝胶浸泡于100ml/L乙醇和100ml/L乙酸中固定20min，10ml/L硝酸脱色5min，漂洗2次，0.12mol/L硝酸银染色30min，蒸馏水漂洗2次，加入0.28mol/L碳酸钠及0.19ml/L甲醛显影10min，100ml/L乙醇和100ml/L乙酸固定5min，蒸馏水漂洗5min，真空干燥后可照相及保存。

1.5 统计学分析

计数资料采用χ^2检验。

2 结 果

2.1 PCR扩增

我们以正常对照的不同的DNA模板量进行PCR，明确了DNA模板量为0.1μg时为本体系的最小模板量。以0.1μg DNA作为模板，发现40例NSCLC中有13例未见相应的扩增产物，而相应的正常自身对照均见342bp处清晰的单带、无扩增产物的标本均重复两次试验，该结果说明这些肿瘤组织中存在较大片段的p16基因丢失或引物位置的小片段的缺失，其纯合率为32.5%。

2.2 SSCP分析

PCR产物经25g/L琼脂糖电泳EB染色呈现342bp处清晰的单带，未见明显非特异性泳带。SSCP银染示正常对照的泳带有两种类型：一种为双带即纯合子类型，另一种为4条带即杂合子类型。3例出现异常泳动带（即SSCP阳性），表明存在p16基因突变。突变率为7.5%。

2.3 p16基因缺失及突变与临床病理因素的关系

研究表明NSCLC p16基因的缺失及突变率为40%（16/40），其与性别、年龄、吸烟及病理分型无明显关系，而与临床病理分期有密切关系（$P<0.05$）。ⅢaⅢb期的纯合缺失及突变率为64.3%（见表1）。

表1 NSCLC p16基因的缺失及突变率与临床病理特征的关系

组别		例数	p16基因缺失及突变
性别	男	30	12(40%)
	女	10	4(40%)
年龄	<60岁	22	9(40.9%)
	>60岁	18	7(38.9%)
吸烟	是	34	14(41.2%)
	否	6	2(33.3%)
病理分型	鳞癌	20	9(45%)
	腺癌	12	4(33.3%)
	腺鳞癌	8	3(37.5%)
术后TNM分期	Ⅰ+Ⅱ	26	7(26.9%)
	ⅢaⅢb	14	9(64.3%)*

*$P<0.05$

3 讨 论

p16基因的功能执行者P16蛋白，P16蛋白在细胞增殖周期中起负调控作用，在细胞生长过程中维持着细胞的正常增殖和分化。当p16基因失活即P16蛋白表达缺失或功能异常时，细胞增殖的负调控减弱，从而导致细胞的过度增殖，甚而恶变。p16基因失活和肿瘤的发生、发展关系密切，已在众多研究中得到证实[3~6]。有研究表明p16基因结构异常如纯合缺失、突变等及转录异常如调控区5'CpG岛的过度甲基化是导致p16基因失活的主要原因[7]。

所谓纯合缺失，即两条等位基因同时丢失，从而导致p16基因失活即P16蛋白表达缺失，Nobori等[8]利用STS-PCR技术检测了肺癌细胞株p16基因，其纯合缺失率36.4%。而Washim等[9]报道NSCLC p16基因纯合缺失率为30%。我们利用PCR技术检测NSCLC p16基因，其纯合缺失率32.5%，与国外报道接近，为避免标本中正常细胞干扰p16基因缺失

维普资讯 http://www.cqvip.com

的检出，我们采取了如下措施：首先尽可能去掉肿瘤标本的正常组织，其次在PCR扩增过程中，采用了PCR体系所能扩增出正常对照目的基因片段的最小模板DNA量，并对p16基因缺失的标本进行两次重复试验，不仅结果可靠，而且也最大限度也消除了正常细胞对肿瘤细胞p16基因缺失的掩盖。

除上述综合缺失所致p16基因失活外，p16基因编码区突变所引起的异常的、无功能的P16蛋白表达也是p16基因失活的重要原因。Hayashi[10]报道了64例NSCLC中有p16基因突变。Xiao等[11]利用FISH技术也检出了NSCLC中有p16基因突变。我们应用PCR-SSCP银染技术对标本的p16基因突变进行检测。该法较序列分析简便、省时，而且敏感度比溴乙锭法高5～10倍[12]。SSCP分析不仅能分析是否存在突变，而且能将突变定位于特定的片段，如需了解突变位点及序列改变情况，只需将SSCP分析筛出的阳性标本进行序列分析即可。为提高PCR-SSCP的敏感度及控制假阳性，我们在设计引物时，已把扩增片段控制在345bp以内，据文献[13]报道，PCR-SSCP银染对176～345bp片段的突变敏感度最高，并且每个肿瘤标本均设立正常自身对照以减少正常多态性的干扰。我们结果显示SSCP的阳性率为7.5%。较上述国外报道低，可能与只检测了第2外显子有关。

国外学者用免疫组比法对P16蛋白在NSCLC中的表达进行研究，结果显示未表达率为51%～66%[13-15]，而本组纯合缺失及突变率（40%）明显低于之。这也就间接提示，p16基因结构异常以外的原因如调控区5 CpG岛过度甲基化等可能也是导致p16基因失活的原因。

Kratzke等[14]报道p16基因失活与NSCLC的临床分期关系密切，Ⅰ期失活率为39%，Ⅱ期63%，Ⅲ期75%。本组结果与上述报道类拟。提示p16基因失活与肿瘤的恶性进展及转移有一种内在联系，可能是细胞增殖周期中G1期至S期转换的负调控减弱，促进了肿瘤的恶性进展及转移的发生。其确切机理有待进行更深入的研究加以证实。

参 考 文 献

[1] Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4 [J]. Nature, 1993;366(6456): 704-707.

[2] Sugano K, Kyogoku A, Fukayaina N, et al. Method in laboratory investigation: Rapid and simple detection of C-Ki-ras2 gene codon 12 mutations by non-radioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis[J]. Laboratory investigation, 1993;68(3):361-366.

[3] Marx J. New tumor suppressor may rival P53[J]. Science, 1994;264 (5157): 344-345.

[4] Okamot A, Huscain SP, Hogiwara K, et al. Mutations in the p16INK4/CDKN2, MTS2, and p18 genes in primary and metastatic lung cancer[J]. Cancer Res, 1995;55(7): 1448-1451.

[5] Dreyling MH, Bohlander SK, Adeyaniu MO, et al. Detection of CDKN2 deletions in tumor cell lines and primary glioma by interphase fluresence in situ hyhridezation[J]. Cancer Res, 1995; 55(5): 984-988.

[6] Xu L, Sgroi D, Stemer CJ, et al. Mutational analysis of CDKN2 in human breast carcinomas[J]. Cancer Res, 1994;54 (20): 5262-5264.

[7] Gonzalez-Zulueta M, Bander CM, Yang AS, et al. Methylation of 5-CpG island of p16/CDKN2 tumor suppressor gene in nomal and transformed human tissues correlates with gene silencing[J]. Cancer Res, 1995;55(20): 4531-4535.

[8] Nobori T, Miura N, Wu DJ, et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase4 inhibitor gene in multiple human cancers[J]. Nature, 1994;368(6473): 753-755.

[9] Washim O, Nagatake M, Osade H, et al. In vivo occurrence of p16(MTSI) and p15(MTS2) alterations perferentially in NSCLC[J]. Cancer Res. 1995;55(3): 514-518.

[10] Hayashi M, Sugimoto Y, Tsuchiya, et al. Somatic mutations of the MTS1/CDK4I gene in human primary non-small cell lung carcinoma[J]. Biochem Bio-phys Res Comman, 1994; 202(3): 1426-1430.

[11] Xiao S, Li DZ, Corson JM, et al. Codeletion of p16 and p15 genes in primary NSCLC[J]. Cancer Res, 1995;55(14): 2968 -2971.

[12] Spagnolo DV, Turbett GR, Dix B, et al. Polymerase,chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP): A novel means of detecting DNA mutations[J]. Adv Anat Pathol, 1994;2(1): 61-64.

[13] Shapiro G1, Edwards CD, Kodzik L, et al. Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines[J]. Cancer Res, 1995;55(3): 505-509.

[14] Kratzke RA, Greatens TM, Rubins Tb, et al. Rb and p16INK4a expression in resected non-small cell lung tumors[J]. Cancer Res, 1996; 56(15): 3415-3420.

[15] Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin dependent kinase4 ingibitor p16INK4[J]. Cancer Res, 1994;54(22): 5816-5820.