DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.025
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
1182 2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)10-1182-03

肝细胞癌中 p16 基因及其甲基化的检测与意义

张艳玲[1],肖 文华[2],张艳梅[3],梁 后杰[1] ([1]第三军医大学附属西南医院肿瘤血液科,重庆 400038;[2]解放军第304医院肿瘤科,北京,100037;[3]云南省曲靖地区第一人民医院检验科,曲靖,655000)

提 要:目的 研究P16、P16甲基化在肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)与癌旁组织中的表达特点,探讨其与HCC生物学行为的关系。方法 分别以免疫组化及PCR技术检测33例人肝细胞癌及其癌旁组织中p16基因表达及其甲基化的水平,并结合临床资料进行分析。结果 肝癌的p16基因表达率(63.64%)明显低于癌旁组织(100%)($P<0.05$);p16基因阳性表达率在无转移的肝癌中为85.7%,有转移组为25.0%;高、中和低分化的肝癌分别为52.4%,28.6%和19.1%。p16基因阳性表达在肝癌患者高分化与中和低分化比较有显著性差异($P<0.05$),转移与非转移组比较有非常显著性差异($P<0.01$)。33例HCC组织中11例发生p16甲基化,均伴肿瘤转移,其中高、中和低分化肿瘤各占2、4、5例;相应癌旁组织中未发现p16基因甲基化。结论 p16基因异常表达及其甲基化在肝细胞癌的发生、发展过程中起重要作用。

关键词:肝细胞癌;p16;甲基化;
中图法分类号:R3942;R735.704 文献标识码:A

Detection and significance of p16 and its methylation in primary hepatocellular carcinoma

ZHANG Yan-ling, XIAO Wen-hua, ZHANG Yan-mei, LIANG Hou-jie (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate p16 gene expression and its methylation in primary hepatocellular carcinoma (HCC) and in the corresponding tumor-adjacent tissues, and evaluate their significance in biological behaviors of the tumor. Methods Immunohistochemical and PCR based methylation analysis were performed on 33 HCC samples and their corresponding tumor-adjacent specimens for p16 and its methylation. Results The expression of p16 was much lower in tumor tissues (63.64%) than tumor-adjacent tissues (100%) ($P<0.05$). The positive expression of p16 was 25.0% in the carcinoma with metastasis and 85.7% without metastasis. p16 gene expression in highly, moderately and poorly differentiated HCC was 52.4%, 28.6% and 19.1% respectively, with an obvious difference between highly differentiated and poorly differentiated HCC ($P<0.05$), and between groups with and without metastasis ($P<0.01$). Methylation of p16 was found in 11/33 samples obtained from the metastatic tumors, including highly-differentiated (2), moderately-differentiated (4) and poorly-differentiated HCC (5). However, no methylation of p16 was detected in all the tumor-adjacent tissues. Conclusion Methylation of p16 may be one of the main mechanisms of the inactivation of P16 protein and play an important role in the genesis and progression of HCC.

Key words: primary hepatocellular carcinoma; p16; methylation

p16基因是20世纪90年代发现的一个参与细胞周期调控的抑癌基因,其抑癌作用和在恶性肿瘤中的高频率突变,提示参与了肿瘤的发生与发展过程。近来发现,p16基因甲基化可能是p16基因失活的重要原因。为此,检测了33例原发性肝细胞肝癌(Primary hepatocellular carcinoma, HCC)中p16基因的分布与表达,对HCC中p16基因甲基化进行研究,并结合临床资料探讨p16在HCC发生、发展过程中的作用,以期为临床开展基因治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 标本收集与临床资料

33例HCC平均年龄46.5岁,男21例,女12例。瘤体直径小于或等于3 cm的小HCC 3例,大于3 cm且不伴肝内、外转移并能手术切除的中期HCC 23例,伴肝内、外转移手术多不能切除的晚期HCC 7例。在33例HCC中,高分化14例,中分化12例,低分化7例。取术中活检或手术切除的癌组织及距肝癌2 cm的相应癌旁肝组织,部分速置-80℃冻存,部分置10%福尔马林固定。33例HCC标本均为本院肝胆外科提供并经病理确诊。手术切除标本组织DNA和石蜡包埋组织DNA依常规方法提取。

1.2 免疫组化染色

10%福尔马林固定标本,常规石蜡包埋,厚4 μm连续切片,HE染色及P16免疫组化染色。P16兔抗为美国Santa cruz产品,S-P试剂盒购自福州迈新生物技术公司,DAB显色试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品。用PBS代替一抗做空白对照。以细胞呈清晰棕色着色为阳性标准,主要在胞浆。每张切片随机观察10个高倍视野,结果以阳性细胞数所占百分比表示,即每视野计数100个细胞,按阳性细胞百分数分为4个等级,低于5%为阴性(-),5%~25%为(+),25%~50%为(++),50%以上为(+++)。

1.3 DNA提取

参照《分子克隆实验指南》方法提取基因组DNA。测定A_{260}与A_{280}比值在1.4~1.9。

1.4 以PCR为基础的甲基化分析

p16基因引物由上海生工生物工程公司合成,其序列及合成的DNA片段大小分别为:p16基因第2外显子 5′-CTG CTT GGC GGT GAG GGG G-3′ 5′-CCT CAC CTG AGG GAC CTT C-3′;扩增产物长度410 bp。我们用此法分析位于5′CpG岛内的p16基

作者简介:张艳玲(1966-),女,云南省昆明市人,硕士,主治医师,主要从事消化道肿瘤的基础与临床研究,发表论文8篇。电话:(023)68754000-73133

收稿日期:2002-03-06;修回日期:2002-06-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

因第 2 外显子的甲基化情况, 采用在 p16 基因第 2 外显子序列内有 3 个酶切位点的甲基化敏感酶 *Hpa* Ⅱ 作为基因组 DNA 的消化酶, 甲基化者酶切位点不被切开, PCR 可扩增出相应的基因产物。

1.5　p16 基因第 2 外显子甲基化状态的检测

在两个 0.5 ml 离心管中加入 0.75～1.00 μg 模板 DNA, 再各加入限制性内切酶反应缓冲液 1 μl, 内切酶 *Hpa* Ⅱ 10 U, 混匀, 37 ℃孵育 2 h。取酶切后及未酶切的 DNA 各 50 ng 进行 p16 基因第 2 外显子扩增反应。反应体系及条件同前。取 5 μl 反应产物, 分别作常规 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。将未经酶切的 DNA 与经 *Hpa* Ⅱ 酶切的 DNA 在相同条件下扩增、电泳, 作为阳性对照。与未酶切的标本相比较, 特异扩增带无明显减弱者为甲基化阳性, 无阳性扩增带, 为甲基化阴性。

1.6　统计学处理

采用两样本率比较的 χ^2 检验。

2　结果

2.1　P16 蛋白在肝癌及癌旁组织中的表达

P16 阳性物质呈棕黄色颗粒, 主要分布在胞浆, 见图 1, 2; 33 例肝细胞癌组织中 P16 蛋白染色阳性 21 例, 阳性强度以(＋)～(＋＋)为主, 癌组织与癌旁组织阳性表达率见表 1, 两者有显著性差异($P<0.05$)。



图 1　肝细胞癌组织中 **P16** 蛋白全胞浆、胞核阳性　(S-P× 100)

Fig 1　P16 expressions of in all cytoplasm and nucleus of HCC tissues　(S-P× 100)

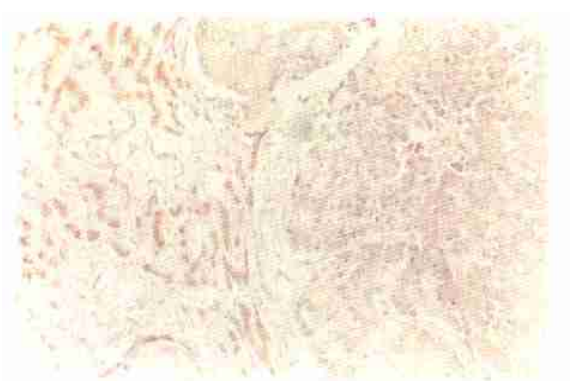


图 2　肝细胞癌组织中 **P16** 蛋白全弱阳性表达, 癌周肝细胞全强阳性表达　(S-P× 100)

Fig 2　P16 weakly expressed in HCC and strongly expressed in the corresponding tumor-adjacent tissues　(S-P× 100)

表 1　**HCC** 及癌旁组织中 **P16** 蛋白的表达

Tab 1　Expression of P16 in HCC and corresponding tumor-adjacent tissues

Group	*n*	Expression of P16				Positive rate(%)
		-	＋	＋＋	＋＋＋	
HCC tissues	33	12	18	3	0	63.64*
Tumor-adjacent tissues	33	0	12	17	4	100

*: $P<0.05$ *vs* Tumor-adjacent tissues

2.2　P16 蛋白表达与肝细胞癌分化的关系

33 例 HCC 中, 21 例 P16 蛋白阳性表达的肝癌, 其高、中和低分化阳性例数分别为 11, 6 和 4 例, 阳性率分别为 52.4%, 28.6% 和 19.1%。p16 基因表达的阳性率随肝细胞癌分化程度降低而减少。高分化与中分化比较、高分化与低分化比较、高分化与中分化＋低分化比较, 差别显著 $P<0.05$; 中分化与低分化比较, 无明显差别 $P>0.05$, P16 蛋白表达阳性率在高分化中明显高于中分化及低分化者。

2.3　P16 蛋白表达与肝细胞癌转移的关系

将未转移组与转移组作比较, 未转移组肝癌中 P16 蛋白的阳性率为 85.7%; 转移组则为 25%, 两组比较, 有极显著性差异 $P<0.01$, 见表 2。

表 2　**P16** 蛋白表达与 **HCC** 转移的关系

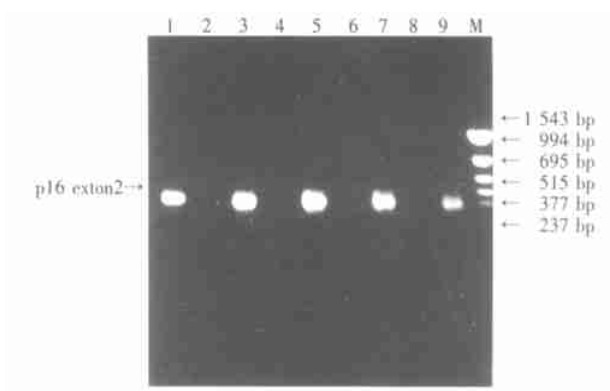
Tab 2　Expression of P16 in the tissues of HCC with and without metastases

Group	*n*	Expression of P16				Positive rate(%)
		-	＋	＋＋	＋＋＋	
Metastasis	12	9	2	1	0	25.00*
Non-metastasis	21	3	16	2	0	85.70

*: $P<0.05$ *vs* Non-metastasis

2.4　p16 甲基化情况

用 PCR 为基础的甲基化分析法在 33 例 HCC 组织中检出 11 例 p16 基因 5′ CpG 岛甲基化, 该 11 例标本均来源于 HCC 转移患者, 其中高、中和低分化肿瘤各占 2、4、5 例; 而全部癌旁组织中均未发现 p16 基因甲基化存在。图 3 显示, 有 5 例肿瘤组织出现 p16 基因外显子 2 的扩增产物, 提示有甲基化, 而其相应的癌旁组织均未见 p16 基因外显子 2 的产物。



M: Standard of molecular weights; 1, 3, 5, 7, 9: Tumor samples with Exon 2 an amplification product of p16, indicating methylation; 2, 4, 6, 8: Corresponding tumor-adjacent tissues

图 3　以 **PCR** 为基础的甲基化分析结果

Fig 3　Methylation of p16 with PCR

3　讨论

细胞周期调控研究确立了细胞调控进程的分子机

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

制。这一机制涉及细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖激酶家族(Cyclin dependent kinases, CDKs)以及 CDKs 抑制蛋白(CKIs),主要是 CDKs 的活性表达和调控。作为 CKIs 成员之一的 P16,又称 MTS1(Mulitiple tumor suppresser gene 1),其编码蛋白是 CDK4 的抑制剂[1],与 CDK4 结合后,抑制 CDK4-D 型周期蛋白复合物的催化活性,从而发挥抑制细胞恶性转化的作用。失活的 p16 基因失去了负性调控细胞周期功能,细胞易于发生恶性转化,促进肿瘤的发生与发展。本研究显示,P16 蛋白在 HCC 组织表达的阳性率仅为 36.36 %,且表达的阳性率不仅与 HCC 组织分化程度有关,且与 HCC 有否转移亦有关,说明细胞发生恶变时伴有 p16 基因的失活,使 P16 蛋白表达水平降低或不表达,利用免疫组化技术在癌细胞内检测不到 P16 蛋白,结果提示 HCC 发生与发展过程中伴有 p16 基因的失活。

DNA 甲基化在基因表达调控、细胞增殖、分化发育、基因组印迹等方面起着重要作用,并与肿瘤的发生发展密切相关,因而成为当前分子生物学的研究热点之一。现今已知所有持家基因和一些组织特异基因的 5′端调控区均有 CpG 岛,并估计人类基因组中约有 45 000个 CpG 岛,而 CpG 岛甲基化对基因转录调控起着重要作用[2]。DNA 甲基化有高低之分。20 世纪 70 年代以来的研究发现,肿瘤组织具有普遍的 DNA 低甲基化,同正常组织相比,散在的 CpG 的甲基丢失是瘤细胞的重要特征。归结 DNA 低甲基化与肿瘤的关系有[3,4]:①肿瘤组织具有普遍的 DNA 低甲基化,主要表现为散在的 CpG 的甲基丢失。②DNA 低甲基化导致因染色质异常。③癌基因的表达程度、转移能力与其甲基化程度成负相关。④肿瘤恶性程度愈高,癌基因甲基化程度愈低。在肿瘤细胞里,DNA 的局部高甲基化与普遍的低甲基化是共存的。DNA 的局部高甲基化与抑癌基因失活密切相关。而癌细胞中存在着的局部高甲基可分为三类[3]:①抑癌基因,如 P16、Rb;②CpG 岛系列,如 ER;③组织特异因子,如 C21。DNA 甲基化的最终结果是使基因转录沉寂,并通过染色体的破坏,点突变和等位基因丢失而失去基因功能。因此,研究 CpG 岛甲基化状态是了解基因正常或异常表达的重要途径。研究发现,p16 基因 5CpG 岛甲基化是 p16 基因失活的重要机制之一,在多种肿瘤的发生发展中起重要作用[3,2 5],特别是在过去未发现 p16 基因缺失与突变的肿瘤,如结肠癌中,也发现 p16 基因甲基化而引起的基因失活[6 7],但目前,有关 HCC 中 p16 基因甲基化的报道不多。本研究结果发现 33.33 %(11/33 例)的肿瘤组织有 p16 基因甲基化存在,且均为已有转移的 HCC,而全部癌旁组织则未检出有 p16 基因甲基化存在,提示 p16 基因甲基化在 HCC 的发生与发展过程中起着重要作用。

综上所述,在 HCC 的发生与发展过程中,均伴有 p16 基因的缺失和甲基化变异。由于细胞失去了负性调控作用,从而增殖过度易于发生恶性转化和肿瘤转移,因而导入正常 p16 基因可能对突变细胞向表型的良性转化有一定价值,并为临床开展肿瘤抑癌基因治疗提供依据。

参考文献:

[1] Marx J. New tumor suppressor may rival P53[J]. Science, 1994, 264(5157): 344—345.
[2] Bird A P. CpG-richisland and the function of DNA methylation[J]. Nature, 1986, 321(6 067): 209—213.
[3] Szyf M. The DNA methylation machinery as a target for anticancer therapy[J]. Pharmacol Ther, 1996, 70(1): 1—37.
[4] 肖文华, 刘为纹, 吕有勇, 等. 肝细胞癌 c-myc 基因 DNA 甲基化模式的研究[J]. 中华医学杂志, 1996, 76(7): 501—503.
[5] Herman J G, Merlo A, Mao L, *et al*. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers[J]. Cancer Res, 1995, 55(20): 4 525—4 530.
[6] Lo K W, Cheung S T, Leung S F, *et al*. Hypermethylation of the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Res, 1996, 56(12): 2 721—2 725.
[7] Martinez-Delgado B, Fernandez-Piqueras J, Garcia M J, *et al*. Hypermethylation of 5′CpG island of p16 is a frequent event in non-Hodgkin′s lymphoma[J]. Leukemia, 1997, 11(3): 425—428.

(编辑 陈聪连)

(上接 1181 页)

3.2.3 观察病人的视力及眼症状 插管至眼动脉以上,主要是为了防止化疗药物对眼动脉的损害。一旦对眼动脉损害,病人可出现眶部胀痛、结膜充血、流泪,甚至失明。

3.2.4 对脑损害症状的观察 观察有无偏瘫、失语、癫痫发作及定向障碍。脑动脉插管给药,由于流程短,速度快,药物在血流中的分部极不均匀,可能会有过高浓度的药物流至脑血管的某个分支而造成脑组织的损害;而插管部位越高,血管就越细,药物在血流中的浓度越高,对肿瘤细胞产生大量杀伤,对正常脑组织也产生相应毒性。

3.2.5 为了防止脑血栓及导管内血栓形成,整个过程是在全身肝素化下进行的。化疗后应观察全身皮肤有无出血点、瘀点、瘀斑,有无咳血、咯血及黑便等现象。

3.2.6 定时检查血象 化疗药物对骨髓的抑制作用,导致机体的抵抗力下降。每周检查血象 2~3 次,正常后每周 1 次。

3.2.7 胃肠道反应 仍有部分患者在化疗后有轻度恶心、食欲不振。多次灌注者恶心程度越厉害。有呕吐者给予肌注胃复安或静脉推注盐酸恩丹西酮。

3.2.8 出院指导 出院后注意休息,加强营养;坚持服用抗癫痫药物,不能随意停止,防止癫痫发生;注意随访,按时来院行下一疗程的化疗,以巩固疗效。

关键词:脑胶质瘤;介入治疗
中图法分类号:R473.74 文献标识码:B

参考文献:

[1] 王忠诚. 神经外科学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 1—2.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net