DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.015

文章编号: 1000-5404(1999)11-0813-05

25例原发性肝细胞性肝癌中 P16基因失活的研究

黄建钊[1],沈文律[2],李 波[1],罗义刚[2],廖少希[3],张 文[3],程 娘[4] ([1]第三军医大学附属西南医院普通外科,重庆 400038;华西医科大学附属一院:[2]普通外科;[3]临床分子生物学研究中心;[4]病理科,成都 610000)

【提要】 目的: 调查 P16基因是否与原发性肝细胞性肝癌(PHCC)的发生有关。方法: 采用多重 PCR分析法、单链构象多态性(Single strand conformation polymorphism, SSCP)分析法及以 PCR为基础的甲基化分析法对 25例原发性肝细胞性肝癌(PHCC)标本及其相应的非肿瘤肝组织标本中 P16基因的缺失、点突变及甲基化情况进行检测。用免疫组织化学法对 35例(包括前述已作基因检测的 25例)原发性 HCC肿瘤标本及其相应的非肿瘤组织标本中 P16蛋白的表达情况进行了调查。结果: 25例 HCC肿瘤标本中,3例有 P16基因缺失,其中 2例为纯合子缺失,1例为半合子缺失。另发现 1例 P16基因无缺失者有 D9S162缺失。无 P16基因缺失的 22例肿瘤标本中均未发现有 P16基因点突变存在。肿瘤标本中基因的甲基化发生率为 24%(6/25),而全部非肿瘤组织均未出现 P16基因甲基化。在 35例 HCC肿瘤标本中发现 P16蛋白表达缺失 16例(45.7%),而全部非瘤组织 P16蛋白均表达阳性。P16蛋白表达缺失与肿瘤的病理分级有关,分级高者(Ⅲ、Ⅳ级)比分级低者更易发生($P<0.01$)。在 25例作了 P16基因检测的肿瘤中,3例有 P16基因缺失及 6例有 P16基因甲基化者,全部表现 P16蛋白表达缺失,另有 3例未检出 P16基因异常者也发现有 P16蛋白表达缺失。结论: P16基因的失活与 P16蛋白表达的丧失与原发性肝细胞性肝癌的发生及发展有关。

关键词 肝癌;P16基因;聚合酶链反应;免疫组织化学
中图法分类号 R394;R735.7 文献标识码 A

现已知道,P16基因的异常改变发生在许多肿瘤中,包括黑色素瘤,胰腺癌,食管磷状细胞癌,脑肿瘤及造血系统肿瘤等[1,2]。P16基因的失活机制较多,包括基因缺失,点突变及 5′CpG岛高甲基化[1,3],不管其失活机制如何,最终将表现为 P16蛋白表达缺失。因为 P16蛋白在细胞周期中起负性调节作用,P16基因的失活可能是导致细胞生长失控并癌变的主要因素之一。虽然已有几个研究小组报道了 P16基因在 HCC中的作用地位。然而不同国家的报道结果差异较大[4,5]。本文报道中国西南地区人群中原发性肝细胞性肝癌中 P16基因的状况与 P16蛋白的表达。

1 材料与方法

1.1 组织标本

35例原发性肝细胞性肝癌(Primary hepatocellular carcinoma, PHCC)肿瘤标本及其相应的非瘤肝组织标本均为华西医科大学外科手术切除标本。按 Edmonson与 Steiner标准进行分级,其中Ⅰ级 3例,Ⅱ级 17例,Ⅲ级 11例,Ⅳ级 4例。全部标本均用免疫组织化学法作 P16蛋白表达的检测,其中 25例用作 P16基因异常改变的检查,DNA的提取按标准方法进行。

1.2 比较多重 PCR分析

将 P16基因第 1与第 2外显子分别与用作内对照的微卫星多态性双核苷酸重复序列 D9S162同时扩增,引物的设计参照文献[6],其序列及 PCR产物片断大小如下:

P16第 1外显子	5′GAAGAAAGAGGAGGGGCTG3′
	5′GCGCTACCTGATTCCAATTC3′
	(340 bp)
P16第 2外显子	5′GGAAATTGGAAACTGGAAGC3′
	5′TCTGAGCTTTGGAAGCTCT3′
	(509 bp)
D9S162	5′GCAATGACCAGTTAAGGTTC3′
	5′AATTCCCACAACAAATCTCC3′
	(172~196 bp)

PCR反应体积为 25μl,反应混合物含 10 mmol/L Tris(pH8.3),1.5 mmol/L MgCl2,50 mmol/L KCl,200μmol/L dNTPs,5% DMSO;1.0 U Taq聚合酶(Boeringer Mannheim,德国),1μmol/L引物,100 ng DNA模板。PCR反应条件为,95°C预变性 5 min后,按如下参数循环,95°C变性 30 s,56°C复性 30 s,72°C延伸 30 s,循环 30次后,72°C再延伸 5 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后,用 Bio-Rad公司的 GS-250 Molecular analysis程序使 PCR产物条带在计算机上显像并计算 P16与 D9S162条带密度比。若肿瘤组织中该密度比为用作对照的非肿瘤肝组织的 10%以下或 50%以下,则分别判为 P16基因纯合子缺失或半合子缺失。

1.3 SSCP分析

对未发现 P16基因缺失的肿瘤标本作 SSCP分析,检测 P16基因第 2外显子突变(许多肿瘤中 P16基因突变 95%以上发生在第二外显子)。PCR反应条件同前,PCR产物经 10 U限制性内切酶 *Sma*I(Boeringer Mannheim,德国)25°C消化 8 h,

基金项目: 华西医科大学博士点基金
作者简介: 黄建钊,男,35岁,主治医师,讲师,博士
收稿日期: 1998-10-05;修回日期: 1999-05-14

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

取 6μl消化产物加入 15μl变性缓冲液中,96℃变性 10 min,冰上骤冷。行非变性聚丙稀酰胺凝胶电泳,室温 1.5 W过夜。采用银染法显示凝胶中 DNA单链条带。

1.4 以 PCR为基础的甲基化分析

参照已发表的文献,采用 PCR法检测位于 5′CpG岛(富含 GC的区域)内 P16基因第 1外显子的甲基化情况,先用甲基敏感的限制性内切酶 SmaⅠ 消化 1μg基因组 DNA SmaⅠ 在 P16基因第 1外显子内有 1个酶切位点,当该位点未甲基化时,将被 SmaⅠ 切断。用 10 U *Sma*Ⅰ 在 25℃消化 8 h后,再用 10 U *Sma*Ⅰ 消化过夜,以保证模板的彻底消化。以消化好的基因组 DNA作模板,按前述方法同时扩增 P16基因第 1外显子与内对照 D9S162(不含 *Sma*Ⅰ 酶切位点)。PCR产物行 1.8%琼脂糖凝胶电泳。

1.5 免疫组化分析

采用免疫组化 LSAB法,对 35例肿瘤标本及其相应的非肿瘤标本中 P16蛋白的表达进行检测。标本经福尔马林固定,石膜包埋,4μm切片,铺在 0.02% poly-l-lpsine打底的载玻片上。

免疫组化染色按药盒说明书进行,第一抗体为兔抗人 P16多克隆抗体(SantaCaruz公司),稀释度 1∶100 以 PBS代替一抗设立阴性对照,用已知的 P16蛋白表达阳性的乳癌组织作阳性对照。显微镜下观察,以阳性着色细胞数 <10%为阴性。

2 结果

2.1 P16基因的缺失频率

在 25例肿瘤标本中,共发现 3例 P16基因第 1外显子与第 2外显子缺失,缺失率为 12%。其中纯合子缺失 2例,半合子缺失 1例。1例未发现 P16基因缺失的肿瘤标本显示 D9S162缺失。图 1显示一组有代表性的 DNA样品中 P16基因第 2外显子与 D9S162多重 PCR扩增的结果。6、8泳道肿瘤标本 P16基因第 2外显子密度明显减低,几至消失。判为纯合子缺失。图 2显示 1例肿瘤组织中 P16基因半合子缺失。

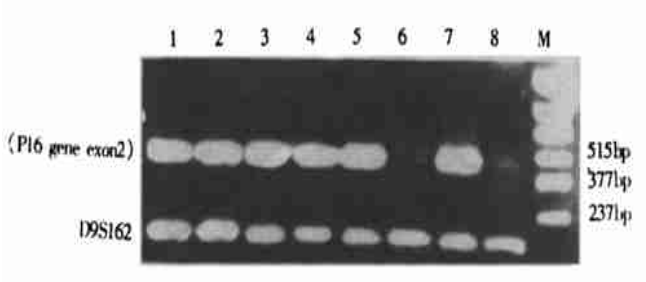


图 1 多重 PCR扩增结果

2、4、6、8道:肿瘤组织标本;1、3、5、7道:对应的非癌肝组织标本;M:分子量参照物;6、8道:P16基因第 2外显子纯合子缺失

Fig 1 Result of multiplex polymerase chain reaction

Lanes 2, 4, 6, 8 tumor sample; Lanes 1, 3, 5, 7 sample of correspondant non-tumor liver tissue; M: PCR Markers; Lanes 6, 8 homozygous deletions of P16 gene exon 2

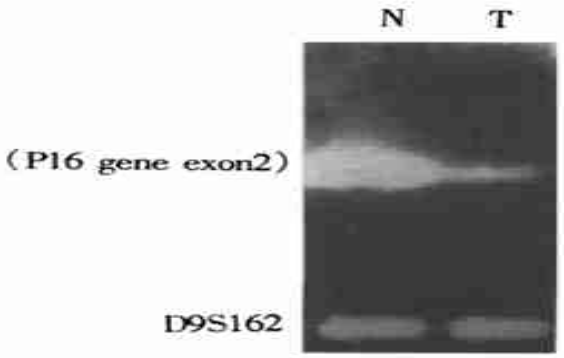


图 2 多重 PCR扩增结果

T:肿瘤标本;N:相应的非癌肝组织标本;图示肿瘤组织 P16基因第 2外显子半合子缺失

Fig 2 Results of multiplex polymerase chain reaction

T: Tumor sample; N: sample of non-tumor liver tissue; Tumor sample showed hemizygous deletion of P16 gene exon 2

2.2 P16基因突变分析

对未发现 P16基因缺失的 22例肿瘤标本作 P16基因第 2外显子的突变检查。PCR产物经限制性内切酶 *Sma*Ⅰ 切成 252 bp与 257 bp两个片断后,作 SSCP凝胶分析。全部标本中均未发现有异常泳动的单链 DNA条带。即未发现有突变存在,见图 3

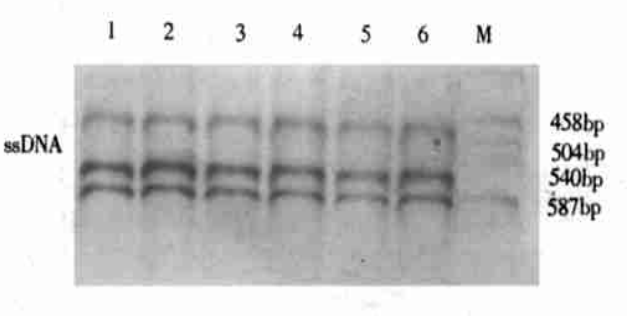


图 3 SSCP分析结果

1、3、5道:肿瘤标本;2、4、6道:相应的非肿瘤组织标本;M:分子量参照物(PBR 322/HaeⅢ Markers,华美生物工程公司);SS DNA:单链 DNA

Fig 3 Results of single strand conformational polymorphism analysis

Lanes 1, 3, 5 tumor sample; Lanes 2, 4, 6 sample of correspondant non-tumor liver tissue; M: PCR Markers; ss DNA: Single strand DNA

2.3 P16基因甲基化情况

采用多重 PCR法对 P16基因 5′CpG岛甲基化进行分析。若 P16基因第 1外显子被甲基化,则不会被 *Sma*Ⅰ 切断,而出

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

现 PCR扩增产物,本组肿瘤标本中有 6例出现甲基化,占 24%(6/25)。而全部非肿瘤标本中则未发现有甲基化存在。图 4显示 4例肿瘤标本中 P16基因出现甲基化(泳道 2,6,8,10)。

2.4 P16蛋白表达的检测

我们对全部 35例肿瘤标本及其相应的非瘤肝组织标本中 P16蛋白表达情况进行了检测。16例肿瘤标本出现 P16蛋白表达缺失,缺失率为 45.7%,见图 5。而全部非瘤组织中 P16蛋白表达均为阳性,见图 6。

在 25例作了 P16基因异常改变检查的肿瘤标本中,3例有 P16基因缺失及 6例有 P16基因甲基化者,P16蛋白表达均为阴性。另有 3例未发现 P16基因异常改变的肿瘤标本也出现 P16蛋白表达缺失。

P16蛋白表达缺失与患者年龄、性别、肿瘤大小及 HBsAg是否阳性无明显关系,但与肿瘤的病理分级有关,分级高者(Ⅲ、Ⅳ级),比分级低者(Ⅰ、Ⅱ级)更易发生,相差非常显著($P<0.01$,资料未列出)。

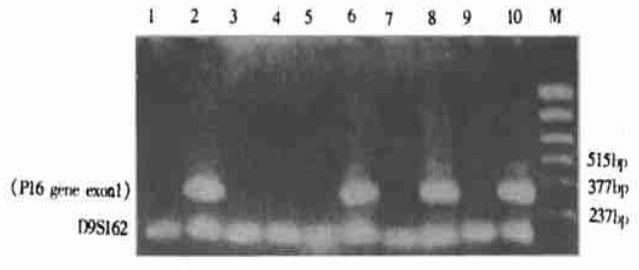
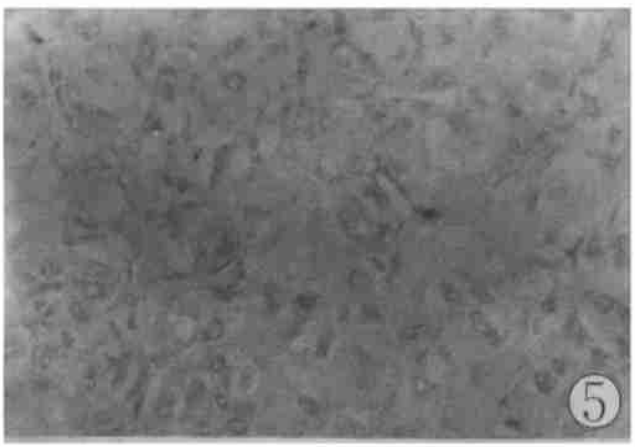


图 4　P16基因甲基化情况

2 4 6 8 10道:癌组织标本;1 3 5 7 9道:相应的非癌肝组织标本;M: PCR分子量参照物 Markers。2 6 8 10道: P16基因甲基化

Fig 4　Analysis of P16 gene methylation

Lanes 2, 4, 6, 8, 10 tumor samples; Lanes 1, 3, 5, 7, 9 sample of correspondant non-tumor liver tissue; M: PCR Markers; Lanes 2, 6, 8, 10 methylation of P16 gene



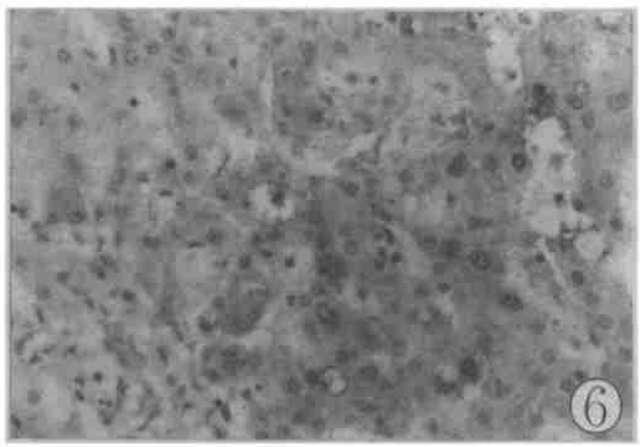


图 5　PHCC肿瘤组织中 P16蛋白表达阴性　(该例肿瘤组织中 P16基因有甲基化)　(S-P染色× 400)

Fig 5　Negative expression of P16 protein in the tumor sample

(In this case the P16 gene showed methylation　(S-P stain× 400)

图 6　同一病例非瘤肝组织中 P16蛋白表达阳性　(S-P染色× 400)

Fig 6　Possitive expression of P16 protein in the non tumor liver tissue sample of the same case　(S-P analysis× 400)

3 讨论

本研究对原发性肝细胞性肝癌中 P16基因的状态进行了分析,包括基因缺失、突变与甲基化情况。P16基因的缺失在膀胱癌,乳腺癌及前列腺癌中被认为是主要的失活机制。本研究发现 3例 PHCCs肿瘤标本中 P16基因第 1外显子与第 2外显子缺失,缺失率为 12%(3/25)。Qin等在 24例 PHCCs肿瘤标本中发现 2例有 P16基因第 2外显子缺失(8.3%)[4]。瑞典的一个研究小组发现 19例 PPHCCs中有 4例(21%)出现 P16基因杂合子缺失[7]。然而,Biden等在 23例澳大利亚人 PHCCs中未发现有 P16基因缺失[8],Kaino等在 5例日本人 PHCC细胞标中也未发现有 P16基因缺失[5]。我们的结果及其它研究者报道的结果的差异可能与不同地区 PHCC的致癌因素不同有关。另外,我们尚在 1例未发现 P16基因缺失的肿瘤中发现 9p21区标记点 D9S162缺失。其它研究者也在 PHCCs中发现 9p21-22区许多微卫星标记点有杂合子缺失[8]。提示 9p21-22区可能尚有其它的抑癌基因参与 PHCCs的发生与发展。

突变作为 P16基因的失活方式在 PHCCs中似乎较为少见。Qin等报道 24例 PHCCs中有 8例(33.

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

3%)出现 P16基因第 2外显子突变外[8],然而在本研究及其它许多研究中均未发现有 P16基因突变[5,8,9]。

P16与 P15基因 5′CpG岛高甲基化常伴随其 mRNA表达缺失[3]。P16基因的甲基化不仅发生在纯合子缺失较为常见的一些肿瘤,如乳癌及肾细胞癌中,而且在 P16基因纯合子缺失罕见的肿瘤,如结肠癌及前列腺癌中也有发现[3]。我们对 P16基因第 1外显子内的 *Sma*I 位点的甲基化情况作了检查,发现在无 P16基因缺失的 22例肿瘤中有 6例出现甲基化,而非肿瘤标本则无甲基化出现。这提示,甲基化作为 P16基因失活的另一方式,在 PHCCs的发生与发展中可能起重要作用。

新近的研究表明,P16基因的失活尚可由其它失活机制引起,如转录水平出错[10]或转录后出错[9]。不管 P16基因的失活机制如何,其结果均表现为 P16蛋白表达缺失。本研究用免疫组织化学法对 P16蛋白的表达情况作了检测,在 35例肿瘤标本中检出 16例 P16蛋白表达缺失,缺失率为 45.7%,而非肿瘤组织 P16蛋白均为阳性。P16蛋白表达缺失在分级高的肿瘤组织中比分级低的肿瘤组织中更易见到。表明 P16蛋白表达的缺失在 PHCCs的发展中可能起重要作用,且与肿瘤的恶性表型有关。另外,在直径≤ 5 cm的 8例早期小肝癌中发现 3例(37.5%)有 P16蛋白表达缺失,提示 P16的失活可能参与 PHCCs的早期发生。由多重 PCR法检出的 P16基因缺失及甲基化与用免疫组化法发现的 P16蛋白表达缺失是密切相关的。本研究中,有 P16基因异常改变的肿瘤标本,其 P16蛋白表达也为阴性。然而在 3例未发现 P16基因异常改变的肿瘤标本,其 P16蛋白表达缺失,机制尚不清楚。虽然 P16*Sma*I 位点在许多肿瘤中是常见的甲基化位点。但不排除这 3例肿瘤标本中出现其它位点甲基化的可能。当然,也可能有其它的失活机制,如转录水平或转录后出错与这 3例肿瘤组织 P16蛋白表达缺失有关。

参考文献

[1] Platz A, Hansson J, Mansson B E, *et al*. Screening of germaline mutation in CDKN2A and CDKN2B genes in Swedish families with hereditary cutaneous melanoma [J]. J Natl Cancer Inst, 1997, 89(4): 679-702.

[2] Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, *et al*. Tumor suppressive pathways in pancreatic carcinoma [J]. Cancer Res, 1997, 57(8): 1731-1734.

[3] 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): 4525-4530.

[4] Qin L, Tang Z, Liu K, *et al*. Alterations of CKDN2 (P16 MTS1) exon 2 in human hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Rep, 1997, 3(3): 405-408

[5] Kaino M. Alterations in the tumor suppressor genes p53, Rb, P16/MTS1 and p15/MTS2 in human pancreatic cancer and hepatoma cell lines [J]. J Gastroenterol, 1997, 32(1): 40-46.

[6] Kamb A, Gruis N, Feldhaus J, *et al*. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types [J]. Science, 1994, 264(3): 436-440.

[7] Chaubert P, Gayer R, Zimmermann A, *et al*. Germ-line mutations of P16 INK4 (MTS1) gene occur in a subset of patients with hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 1997, 24(5): 1376-1381.

[8] Biden K, Young J, Buttenshaw R, *et al*. Frequency of mutation and deletion of the tumor suppressor gene CDKN2A (MTS1/P16) in hepatocellular carcinoma from an Australian population [J]. Hepatology, 1997, 25(3): 593-597.

[9] Hui A M, Sakamoto M, Kanai Y, *et al*. Inactivation of $P16^{INK4}$ in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 1996, 24(3): 575-579.

[10] Chen Y J, Chang J G, Shin L S, *et al*. Frequent detection of aberrant RNA transcripts of CDKN2 gene in human gastric adenocarcinoma [J]. Int J Cancer, 1997, 71(2): 350-354.

(编辑 王 红)

Study of inactivation of P16 gene in 25 cases of primary hepatocellular carcinoma

HUANG Jian-zhao, SHEN Wen-li, LI Bo, LUO Yi-gang, LAO Shao-xi, ZHANG Wen, CHENG Niang (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To determine whether P16 is involved in the genesis of hepatocellular carcinoma (PHCC). **Methods**: Specimens of PHCC and noncarcinomatous liver tissues were collected from 25 cases of PHCC. The deletion of P16 gene exon 1 and exon 2 was identified with comparative multiplex PCR, the point

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