

· 论 著 ·

食管鳞状细胞癌 p16 基因变异分析 *

陈丽红 李一伟 高凌云

福建医科大学病理系 (福州市 350004)

摘要 **目的:**通过对 p16 基因变异在 ESCC 中的临床病理意义的研究,为 ESCC 的临床防治提供可靠指标。**方法:**采用 PCR-SSCP 及 DNA 序列分析,检测 69 例 ESCC 的 p16 基因第一、二外显子突变。**结果:**69 例 ESCC 中 p16 基因变异者 33 例(M 组)与未变异者 36 例(N 组)在淋巴结转移率和远处转移率方面差异有显著性($P<0.05$),两组在患者年龄、性别、肿瘤长度和浸润深度方面差异无显著性($P>0.05$)。**结论:**p16 基因的变异可能是 ESCC 的晚期变化,它可作为判断 ESCC 恶性程度、发展及预后的一个重要指标,并且也为筛选高危临床病例提供客观依据。

关键词 食管癌 p16 基因 PCR-SSCP 基因突变 DNA 序列分析

中图分类号:R735.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8179(2004)24-1381-04

The Analysis of P16 Gene Deletion and Mutation in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Chen Lihong Li Yiwei Gao Linyun

Department of Pathology, Fujian Medical University, Fuzhou

Abstract Objective: To intensively investigate the clinicopathologic significance of the alternations of p16 gene in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), so as to provide a reliable indicator and create a new way for the research on clinical prevention and treatment of ESCC. **Methods:** Sixty-nine samples from the patients with ESCC were enrolled. PCR-SSCP and DNA sequencing were utilized to detect the mutation and deletion of p16 gene exon1 and exon2. **Results:** Thirty-three cases with p16 gene abnormality including sixteen point mutations and seventeen deletions, which were defined as Group M, were detected in sixty-nine cases of No p16 gene abnormality was found in the rest of thirty-six cases, which were classified as Group N. There were significant differences in lymph node metastasis and distance metastasis between these groups ($P<0.05$). However, no significant differences in sex, age, the length and invasion's depth of the tumor ($P>0.05$) were found. **Conclusions:** The mutations of p16 gene may be the late changes in ESCC. Detecting the mutation of p16 gene may serve as a marker of predicting degree of malignancy, development and prognosis. It will render an authentic evidence for the selection of the clinical cases with high risk of metastasis.

Key words Esophagus carcinoma p16 gene Gene mutation PCR-SSCP
DNA sequencing

抑癌基因是当今生命科学研究的热点。在所发现的抑癌基因中,p16 基因以其独特的结构和抑癌功能为人们所重视。p16 基因定位于 9P21 染色体,其作用是在细胞周期 G₁/S 限制点起关键负调控作

用,调节细胞的增殖^[1]。研究发现,抑癌基因 p16 的失活与食管鳞状细胞癌(ESCC)关系密切。本文采用 PCR-SSCP 技术、DNA 测序技术对 69 例 ESCC 的 p16 基因第一、二外显子(exon1,exon2)进行分析,探

* 本文课题受国家教育部骨干教师基金(编号:00A005)和福建省科技厅科研基金资助(编号:99-Z-208)

讨 p16 基因变异在 ESCC 中的临床病理意义,为 ESCC 的临床防治提供可靠的分子生物学指标。

1 材料与方法

1.1 材料

69 例来自 1997 年 1 月~2001 年 12 月本科室及省立医院已确诊的 ESCC 患者的癌组织及 36 例癌旁正常组织。男:女为 50:19,年龄 30~75 岁,中位年龄 60 岁。所有标本术前均未经放疗、化疗和免疫治疗。

1.2 DNA 的提取

见参考文献[2]。

1.3 PCR 反应

12.5μl 的反应体系含 10×Buffer 0.875μl、四种 2mmol/L dNTP 1μl、1 对 1mmol/L 引物 0.25μl、Taq DNA 聚合酶 0.125U、3.75μl DNA 模板,加 dH₂O 补足至终体积。94℃ 预变性 5min,40 个 PCR 循环 (94℃ 1min,56℃ 1min,72℃ 1min),72℃ 延伸 7min;对照 β-Globin 基因为 35 个 PCR 循环 (94℃ 1min,54℃ 1min,72℃ 2min),余同前(表 1)。

表 1 p16 基因及内对照 β-Globin 基因的引物序列及产物长度

引物	引物序列	长度(bp)
p16exon1	5' GGAGAGGGGAGAGCAGGCAG 3' 5' TCCAGAGTCGCCCGCCATC 3'	238
p16exon2 上	5' ACAAGCTTCCTTTCCGTCATGCCG 3' 5' CCAGGCATCGCTCACGTCCA 3'	244
p16exon2 下	5' TTCTGACACGCTGCTGCTG 3' 5' TCTGAGCTTTGGAAGCTCTCAG 3'	242
β-Globin	5' ACACAACTGTGTTCACTAGC 3' 5' CAACTTCATCCACGTTACAC 3'	105

1.4 琼脂糖凝胶电泳

PCR 产物用 2% 琼脂糖电泳分析。

1.5 非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAG)垂直平板电泳

用内含 5% 甘油的 8% PAG,取 PCR 产物 2μl 与 1μl 去离子甲酰胺及 3μl 加样缓冲液混匀,98℃,变性 10min 后电泳。电泳条件:室温 20℃,0.5×TBE 电泳液,稳压 400V,电泳 6h。

1.6 银染

将聚丙烯酰胺凝胶依次用下列溶液浸泡:10% 酒精 10min→1.0% 硝酸 10min→0.2% 硝酸银溶液 15min→双蒸水充分漂洗→显色液 (3% Na₂CO₃+0.02% 甲醛)至条带清晰→10% 冰醋酸终止。

1.7 p16 基因 DNA 序列分析

采用 UNIQ-5 柱离心式 DNA 胶回收试剂盒。由上海博亚生物技术有限公司测序。

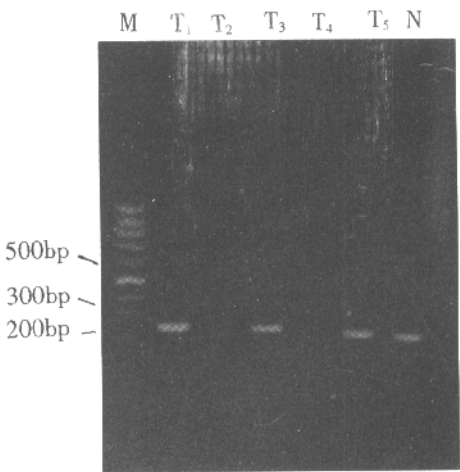
1.8 统计学方法

采用 SPSS for windows 10.0 统计软件的 χ^2 检验、Fisher's 精确检验。

2 结果

2.1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

69 例 ESCC 标本中,17 例 p16 基因纯合性缺失,exon1 有 10 例,exon2 有 14 例,其中 exon1、2 共同缺失 7 例。20 例癌旁正常组织均扩增出目的条带(图 1)。对于 p16 基因纯合性缺失的标本需以 β-Globin 和食管癌旁正常组织为内外对照予以证实。



M:标志物 T₁-T₅:癌组织 N:癌旁正常组织

图 1 p16 基因第二外显子琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 SSCP 银染技术检测 p16 基因 exon1、2 突变结果

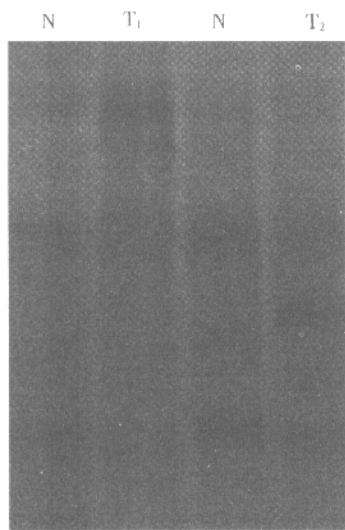
69 例 ESCC 中,经多次 SSCP 银染分析,发现 16 例 ESCC 出现条带数量或位置异常,其中 exon1 有 5 例,exon2 有 11 例(图 2)。

2.3 DNA 测序结果

SSCP 筛选出 16 例 ESCC 异常病例 DNA 测序结果(表 2,图 3)。

2.4 p16 基因 exon1、2 缺失、突变与 ESCC 临床病理行为分析结果

69 例 ESCC 标本中 17 例纯合性缺失 (24.64%),16 例突变 (23.19%)。按 p16 基因有无异常将 69 例 ESCC 分为两组,33 例 p16 基因变异组 (M 组)与 36 例 p16 基因未变异组 (N 组)。M 组淋巴结转移率 63.64%、远处转移率 51.52%;N 组淋巴结转移率 36.11%、远处转移率 16.67%,差异有显著性 ($P<0.05$),说明有 p16 基因变异的 ESCC 易发生淋巴结和远处转移;但在性别、年龄、肿瘤长度、浸润深度等方面差异无显著性 ($P>0.05$)(表 3)。



N:癌旁正常组织 T:癌组织,其中 T₁、T₂ 出现条带异常
图 2 第二外显子 PCR-SSCP 银染结果

表 2 ESCC 中 16 例 p16 基因变异后 DNA、氨基酸改变情况

病例	外显子	密码子	DNA 序列	氨基酸
M-1	1	40	GCA→TCA	Ala→Ser
M-2	1	13	AGC→AGA	Ala→Ser
M-3	2	111	GGC→AGC	Gly→Ser
M-4	2	74	GAC→TAC	Asp→Tyr
M-5	2	43	AGT→AGG	Ser→Arg
M-6	2	38	CCC→GCC	Phe→Ala
M-7	2	83	CAC→CAT	His→His
M-8	1	27	GAG→GAT	Glu→Asp
M-9	2	88	GAG→AAG	Glu→lys
M-10	2	86	GCC→GTC	Ala→Val
M-11	2	93	ACC→TCG	Thr→Ser
M-12	2	124	CGC→CAC	Arg→His
M-13	2	92	TGG→TG	frame-shift
M-14	2	96	GTG→GT	frame-shift
M-15	2	113	CTG→CATG	frame-shift
M-16	2	65	TGCT→TT	frame-shift

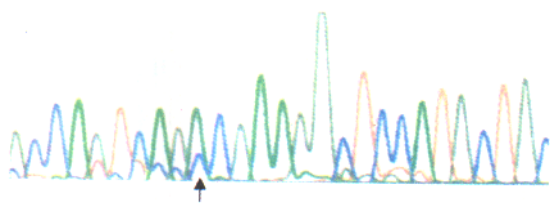


图 3 M-2 的 exon1 碱基发生突变由正常的 AGC 突变为 AGA

表 3 ESCC 中 p16 基因变异与临床病理的关系

临床病理指标	例数	M 组	N 组	P
性别				
男	50	23	27	0.521
女	19	10	9	
年龄(岁)				
<60	33	18	15	0.531
≥60	36	15	21	
肿瘤长度(cm)				
<5	53	27	26	0.417
≥5	16	6	10	
浸润深度				
粘膜下	2	0	2	0.304
肌层	18	10	8	
外膜	49	23	26	
淋巴结转移				
有	34	21	16	0.012*
无	35	12	23	
远处转移				
有	23	17	6	0.001**
无	46	16	30	

与无淋巴结转移相比*:P<0.05;与远处转移相比**:P<0.01

3 讨论

p16 基因位于人染色体 9p21 区,包括 3 个外显子和 2 个内含子,是新近肿瘤研究中热门的抑癌基因^[1]。它是细胞周期蛋白依赖性激酶 4/6(cyclin-dependent kinase 4/6,CDK4/CDK6)的抑制因子。在细胞增殖的调控中,p16 蛋白与 cyclin D₁ 竞争与 CDK4/CDK6 结合,发挥负性调节作用。研究发现,抑癌基因 p16 的失活与 ESCC 关系极为密切,Igaki 等^[3]及 Mori 等^[4]在原发性食管癌中发现 p16 基因存在较高的突变和缺失频率;同时研究表明在食管癌早期向晚期发展的过程中,p16 基因缺失或突变起十分重要的作用^[5]。另外,研究发现 p16 基因的失活将影响肿瘤的生物行为及治疗效果,这已在头颈部肿瘤、胰腺癌、乳腺癌及中枢神经系统恶性肿瘤中报道^[6-9]。

本文应用 PCR-SSCP、DNA 序列分析对 69 例 ESCC 进行检测,发现 p16 基因缺失率为 24.64%,突变率为 23.19%,而 36 例癌旁正常组织未发现 p16 基因缺失与突变,这一结果表明 p16 基因在 ESCC 中可发生缺失与突变,提示 p16 基因改变在 ESCC 的发生和发展中具有重要意义。在 ESCC 中 p16 缺失和突变检测频率有很大的差别^[3-5],缺失率和突变率可高达 65%及 93%,甚至低至无缺失突变的相关报道^[10]。其原因可归结为,一是存在地域及种族差别;二是由于检测组织的差异,细胞系标本纯,而肿

瘤中常混有正常组织成分,故前者突变检出率相对较高;三是许多研究仅限于对第二外显子的检测。这些均导致 p16 基因的缺失和突变频率报道不一致。

通过对 ESCC 临床病理指标的分析发现,p16 基因变异组在有淋巴结转移率和远处转移率明显高于无变异组,二者存在显著性差异($P<0.05$),提示 p16 基因的变异与 ESCC 的浸润、转移、预后关系密切。p16 基因的缺失、突变将导致 p16 蛋白失活,使其失去与 cyclin D₁ 竞争与 CDK₄/CDK₆ 结合,而不能发挥对细胞增殖周期的负性调控作用,使细胞无限增殖。p16 基因的变异使 ESCC 患者多表现为临床晚期,说明 p16 基因的变异是 ESCC 的晚期变化。它可作为判断 ESCC 恶性程度、发展及预后的一个重要指标,将为筛选高危临床病例提供确凿的证据和客观的分子病理学指标,并为肿瘤的治疗及深入研究提供可靠的理论依据。

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(3):704~707
- 2 高凌云,陈一峰,李一伟.简易提取石蜡包埋组织 DNA[J].福建医科大学学报, 2001,35(3):295~296
- 3 Igaki H, Sasaki H, Kishi T, et al. Highly frequent homozygous deletion of the esophageal cancer cell lines[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 203(2):1090~1095
- 4 Mori T, Miura K, Aoki T, et al. Frequent somatic mutation MTS1/CDK41 gene in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Res, 1994, 54(13):3396~3397
- 5 王克文,谢儒全,邓长生.食管癌 p16 基因突变[J].肿瘤防治研究, 1999, 26(3):174~178
- 6 Namazie A, Alavi S, Olopade OI, et al. Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK41) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors[J]. Laryngoscope, 2002, 112(3):472~481
- 7 Tsai CH, Yang CC. The correlation between alteration of p16 gene and clinical status in oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2001, 30(9):527~531
- 8 Kudoh K, Ichikawa Y, Yoshida S, et al. Inactivation of p16/CDKN2 and p15/MTS2 is associated with prognosis and response to chemotherapy in ovarian cancer [J]. Int J Cancer, 2002, 99(4):579~582
- 9 Perry A, Banerjee R, Lohse CM, et al. A role for chromosome 9p21 deletions in the malignant progression of meningiomas and the prognosis of anaplastic meningiomas[J]. Brain Pathol, 2002, 12(2):183~190
- 10 Giroux MA, Audrezet MP, Metges JP, et al. Infrequent p16/CDKN2 alterations in squamous cell carcinoma of the oesophagus[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002, 14(1):15~18

(2004-07-15 收稿)

(2004-10-20 修回)

(韩豫生校对)

征文通知

由中国抗癌协会乳腺癌专业委员会、中华医学会护理学会、天津医科大学、美国密西根大学和美国克门乳腺癌基金会共同主办,拟于 2005 年 4 月 17~19 日在中国天津举办“2005 年国际乳腺癌学术会议”。本次会议旨在诚邀国内外从事乳腺癌防治研究的医生、护士、研究人员汇聚津门,共同研讨严重影响人类女性身体健康的主要疾病“乳腺癌”的诊、防、治研究,尤其是探讨女性乳腺癌的早期发现、诊断、治疗的新方法、新技术。

一、会议征文内容:1)乳腺癌的预防、普查、早诊;2)乳腺癌的现代综合治疗;3)乳腺癌的基础及临床研究;4)乳腺癌患者术后护理和康复;5)乳腺癌患者的社会、心理支持;6)乳腺癌专科护理的作用;7)乳腺癌患者的健康教育。

二、征文要求:1)未在国内外公开发表的论文(会议、期刊);2)会议论文在 3000 字以内,附 500 字中英文摘要,加盖单位公章;3)征文要求一律用 A4 纸打印一份,附一张软盘,同时报至会务组(未寄软盘的稿件将不能收录到大会论文汇编);4)征文提交方式为:来稿信封注明“会议征文”,寄至天津医科大学附属肿瘤医院(天津市河西区体院北环湖西路)宁晓梅 赵文华收(欢迎来稿以 E-mail 形式发至 ilkjk@sina.com.cn)。5)会议征文截稿日期为 2004 年 12 月 30 日(以邮戳或电子邮件日期为准)。

三、本次会议可授予国家继续医学教育学分 8 分。欢迎从事乳腺癌防治研究工作、康复工作和护理工作的专业人员踊跃参加,并于 2004 年 12 月 30 日之前将回执寄回,以便安排食宿。

四、会议联系人及地址:联系人:宁晓梅 赵文华 联系地址:天津市河西区体院北环湖西路

天津医科大学附属肿瘤医院科教科 邮编:300060

电话/传真:022-23537796 022-23340123-215