

p¹⁶基因在原发性肝癌中丢失的研究

On the Loss of p¹⁶ Gene in Primary Hepatic Carcinoma

杨定华 彭民浩 姜海行 李绍森 卢全书 卢榜裕
Yang Dinghua Peng Minhao Jiang Haixing Li Shaosheng Lu Quanshu Lu Bangyu

(广西医科大学第一附院外一科 南宁市滨湖路6号 530021)

(Dept. of General Surgery, First Affiliated Hospital,
Guangxi Medical Univ., 6 Binhu Road, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 为了解抗癌基因 p¹⁶在原发性肝癌中的变异情况,采用差别 PCR技术研究 34例原发性肝癌及其癌周组织。结果显示: 1例原发性肝癌存在 p¹⁶ Exon1 纯合子缺失, 15例原发性肝癌存在 p¹⁶ Exon2 纯合子缺失, 其余的 19例肝癌及所有的癌周组织无 p¹⁶基因纯合子缺失。研究结果表明 p¹⁶基因的缺失与原发性肝癌的发生发展密切相关, 并提供了肝癌第 9号染色体基因变异的依据。

关键词 原发性肝癌 p¹⁶基因 丢失

Abstract To determine the alteration of p¹⁶, a novel antioncogene, in human primary hepatic carcinoma, 34 cases of primary hepatic carcinoma and tumor-adjacent tissue were examined by Differential PCR. One case was showed as homozygous deletion of p¹⁶ Exon1 and 15 cases as homozygous deletion of p¹⁶ Exon2. It is indicated that p¹⁶ gene deletion is associated with the occurring and development of primary hepatic carcinoma and provides an evidence of gene deletion of chromosome 9p in the human primary hepatic carcinoma.

Key words primary hepatic carcinoma, p¹⁶ gene, loss

中图法分类号 R735.7

1994年4月,美国圣地亚哥和盐湖城的两个研究小组同时报道了一个新型抗癌基因 MTS1 (multiple tumor suppressor), MTS 基因位于 9p²¹⁻²²区,它表达 16KD蛋白分子,故称为 p¹⁶[1], p¹⁶基因直接调控细胞周期蛋白激酶活性,抑制细胞分裂和增殖, p¹⁶基因在许多肿瘤细胞株和实体肿瘤中的频繁突变或缺失的抑制作用[2,3],吸引了肿瘤分子生物学、分子遗传学领域的科学家,从基因和临床诊治等角度,对 p¹⁶的作用进行了研究。但有关 p¹⁶基因在原发性肝癌中的变异,国内外尚未见报道,研究 p¹⁶基因的异常与原发性肝癌的关系,对阐明原发性肝癌癌变机制及寻找新的肿瘤标志物都具有重要意义。本研究用差别 PCR 技术,分析了 34例原发性肝癌组织 p¹⁶基因的缺失,现将结果报告如下:

1 材料与方 法

(1) 肿瘤组织来源与储存: 34例原发性肝癌及相

应癌旁组织标本均为广西医科大学一附院外一科病人手术切除的组织,标本离体后立即储存在 -70℃ 的超低温冰箱中,并经病理证实。34例原发性肝癌患者,男 33例,女 1例。年龄 19岁~74岁,血清 HBs Ag 均阳性, AFP (+) 20例,均有肝硬化。

(2) 组织 DNA 提取: 饱和酚-氯仿法抽提[4]。

(3) PCR 反应扩增 p¹⁶基因第 1、2 外显子,引物序列:

Exon1 (S) TCT GCG GAG AGG GGG AGA GCA GGG;

(AS) GCG CTA CCT GAT TCC AAT TC;

Exon2 (S) GGA AAT TGG AAA CTG GAA GC;

(AS) TCT GAG CTT TGG AAG CTC T;

在反应体系中同时扩增 DMD 第 5 外显子,引物序列: (S) GAA ATT GGC TCT TTA GCT TGT GTT TC; (AS) GGA GAG TAA AGT GAT TGG TGG AAA ATC, 内对照 循环参数 Exon1 为 94℃ 15", 58℃ 15", 72℃ 15", 30个循环后, 72℃ 延伸 10'。Exon2 为 95℃ 预变性 5', 95℃ 1', 58℃ 1', 72℃

1'30", 30个循环 取 2 μ L PCR产物 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB染色 分析并照相

2 结果

经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯观察,如出现 DMD 388 bp及 p¹⁶ 480 bp的两条电泳带,就表示 p¹⁶基因无纯合子缺失,如仅出现 DMD 388 bp的电泳带,就表示 p¹⁶基因存在纯合子缺失。结果: 1例存在 p¹⁶ Exon1纯合子缺失, 15例存在 p¹⁶ Exon2纯合子缺失, 全部癌旁组织无 p¹⁶基因纯合子缺失存在,总的缺失为 47.06% (16/34) 见图 1

3 讨论

p¹⁶基因又称为多种肿瘤抑制因子 1 (MTS1) 基因或 p¹⁶/CDKN2基因,位于染色体 9p²¹⁻²²区,由 2个内含子和 3个外显子组成 p¹⁶基因 cDNA 含有一个 148氨基酸的开放阅读框架,编码分子量约为 16KD的蛋白质^[5],其中外显子 1和外显子 2编码了整个 p¹⁶蛋白的 97%^[2]。有核细胞的周期是通过多种细胞周期依赖激酶 (CDKS) 调节的^[6], CDKS序列地激活和其作用物的磷酸化刺激了细胞周期的进行。由 CDK和周期蛋白 D结合形成的复合物,控制着细胞通过周期 G₁期^[5]。p¹⁶蛋白是周期依赖激酶 4抑制剂 (CDK4 I), p¹⁶基因对细胞周期进行负调节,起到了防止细胞增殖的作用^[5],它的失活将导致细胞无限制生长和肿瘤形成。

p¹⁶基因的失活包括基因的缺失和突变, p¹⁶基因的突变和缺失广泛存在于多种肿瘤中,在不同组织类型肿瘤中 p¹⁶基因失活的方式不同,已有报道,在人类原发性实体肿瘤: 神经胶质瘤^[7]、胰腺癌^[8]、鼻咽癌^[9]、乳腺癌等^[10]有不同频率的 p¹⁶基因的纯合子缺失。Cairns等^[11]的研究结果表明: 膀胱癌、头颈癌、肺癌和脑瘤 p¹⁶基因的丢失率为 10%~20%。但有关 p¹⁶基因在原发性肝癌中的变异还未见报道。本组研究检测 34例原发性肝癌,其中 16例存在 p¹⁶基因纯合子的缺失,表明 p¹⁶基因的缺失与原发性肝癌的发生发展是密切相关的,本研究结果也提供了原发性肝癌第 9号染色体基因变异的依据,为认识原发性肝癌的形成和发展提供了新视角。

参考文献

1 Spruck CH, Mirella GZ, Atsuks A et al. . p¹⁶ gene in uncul- 广西科学 1997年2月 第4卷第 期

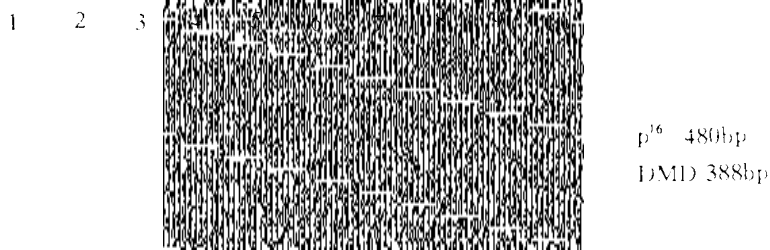


图 1 差别 PCR分析肝癌组织 p¹⁶ gene纯合子缺失

Fig. 1 p¹⁶ gene homozygous deletions tested by Differential PCR PCR扩增 p¹⁶ Exon2 480 bp, DMD Exon51 388 bp (DMD为内对照) 1 分子量标志 PGEA 3 z(+) DNA/HaeIII; 2~ 9 肝癌组织; 10 正常组织 p¹⁶ Exon2 480 bp, DMD Exon51 388 bp (DMD as intercontrol) were amplified by PCR, 1 Molecular weight mark PGEA 3 z(+) DNA/HaeIII; 2~ 9 Liver cancer tissue; 10 Normal tissue.

tured tumors. Nature, 1994, 370: 183.

- 2 Kamb A, Gruis NA, Feldhaus JW et al. . A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor type. Science, 1994, 264: 436.
- 3 Nobori T, Miura K, Wu DJ et al. . Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. Nature, 1994, 368: 753.
- 4 Laird PW, Zijderveld A, Linder K et al. . Simplified mammalian DNA isolation procedure. Nucleic Acids Res, 1991, 19: 4293.
- 5 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulation motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature, 1994, 368: 753.
- 6 Marx J. New tumor suppressor may rival p⁵³. Science, 1994, 264: 344.
- 7 Schmidt EE, Ichimura K, Geffenberger G et al. . CDKN2 (p¹⁶/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. Cancer Res, 1994, 54: 6321.
- 8 Nanmann M, Savitskaia N, Eilert C et al. . Frequent codeletion of p¹⁶/MTS1 and p¹⁶/MTS2 and genetic alterations in p¹⁶/MTS1 in pancreatic tumors. Gastroenterology, 1996, 110 (4): 1215.
- 9 Lo KW, Huang DP, Lau KM et al. . p¹⁶ gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res, 1995, 55: 2039.
- 10 Xu L, SGROID, STERNERCJ et al. . Mutational analysis of CDKN2 (MTS1/p¹⁶ ink4) in human breast carcinoma. Cancer Res, 1994, 54: 5262.
- 11 Cairns P, Li Mao, Merlo Adrian et al. . Rates of p¹⁶ (MTS1) mutation in primary tumors with 9p loss (technical comments). Science, 1994, 265: 415.

(责任编辑: 蒋汉明)