

文章编号:1005-6947(2004)02-0098-03

· 实验研究 ·

肝门胆管癌中 p16 基因突变及蛋白表达异常的研究

高戈¹, 韦军民¹, 邹声泉², 裘法祖²

(1. 卫生部北京医院 外科, 北京 100730; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 外科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究 p16 基因突变及蛋白表达异常在肝门部胆管癌发生及浸润转移中的作用。方法 应用 PCR-SSCP 及免疫组织化学技术分析 36 例肝门部胆管癌的 p16 基因的突变及蛋白表达情况。结果 8 例在 p16 基因第 2 外显子部分存在纯合性缺失, 13 例存在点突变, 缺失及突变共占 58.3% (21/36)。8 例缺失标本呈现 p16 蛋白表达阴性, 10 例出现 p16 蛋白表达下降, 共占 50% (18/36)。结论 p16 基因突变及蛋白表达异常, 与肝门部胆管癌的发生、浸润转移临床分期有明显的关系, 且有助于判断胆管癌的恶性程度和患者的预后。

关键词:胆管肿瘤/病理学; 肿瘤转移; 基因 p16; 基因表达

中图分类号: R735.8; R73-37

文献标识码: A

Study of the relationship of alteration and expression of p16 gene and p16 protein on the hilar cholangiocarcinoma

GAO Ge¹, WEI Jun-min¹, ZOU Sheng-quan², QIU Fa-zu²

(1. Department of General Surgery, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China;

2. Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of genetic alteration (homozygous deletion and point mutation) and expression of p16 gene and p16 protein on hilar cholangiocarcinoma (HCGC). **Methods** Genetic alteration and expression of p16 protein were detected by polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and immunohistochemical method in 36 HCGC tissues. **Results** p16 gene revealed alteration in 21 of 36 HCGC tissues (58.3%), among which 8 had homozygous deletion and 13 had point mutation. In HCGC tissues, 8 revealed no p16 protein expression and 10 showed low level expression of p16 protein. **Conclusions** The alteration of p16 gene and abnormal expression of p16 protein are significantly correlated with the biological behavior and clinical staging of HCGC, and may be helpful to evaluate the malignant degree of HCGC and the patients prognosis.

Key words: BILE DUCT NEOPLASMS/pathol; NEOPLASM METASTASIS; GENE p16; GENE EXPRESSION

CLC number: R735.8; R73-37

Document code: A

肝门部胆管癌是胆道系统常见的恶性肿瘤, 病因未完全明了, 早期诊断困难, 一旦发现多为晚期, 手术切除率低, 预后差。近年来, 由于诊断水平

的提高, 病例数明显增多, 为研究本病例提供了条件。本研究采用多聚酶链反应-单链构象多态 (PCR-SSPC) 技术, 分析肝门部胆管癌 p16 基因的突变情况; 同时运用免疫组织化学 (免疫组化) 技术检测 p16 蛋白表达, 以探讨它们与肝门部胆管癌生物学行为的关系。

收稿日期: 2003-03-29; 修订日期: 2003-12-11。

作者简介: 高戈 (1964-), 男, 湖北浠水人, 卫生部北京医院副主任医师, 博士, 主要从事肝胆胰疾病方面的研究。

1 材料和方法

1.1 标本采集及临床相关资料

收集武汉同济医院 1991 年 1 月 ~ 2000 年 12 月间手术切除的肝门部胆管癌组织标本 36 例。男 23 例,女 13 例;年龄 25 ~ 75 (平均 45) 岁,大于 50 岁者 29 例;有肝、胰、胆囊转移者 9 例;既往有乙型肝炎者 4 例。同时选择同期因胆胰管合流异常行手术治疗的慢性炎症胆管壁 6 例。10% 福尔马林液固定,常规石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片备用。42 例标本均进行 p16 基因的 PCR-SSCP 分析,p16 蛋白免疫组化检测。

1.2 方法

1.2.1 DNA 模板的制备 基因组 DNA 提取按常规酚/氯仿/异戊醇方法提取。石蜡标本连续切片 4 μ m \times 10 片,脱蜡、水化、再接酚/氯仿/异戊醇方法提取。提取后分别用琼脂糖凝胶(含 EB)电泳,定性检查有无降解,并用 DU-70 紫外分光光度计进行定量检测纯度,以 A260/A280 值在 1.5 ~ 1.9 为较佳。

1.2.2 PCR-SSCP 银染 p16 基因第 2 外显子 PCR 扩增引物 5' ACAAGCTTCCTTTCCGTCATGC3' 5' GCACCACCAGCCTGTCCACC3' 由华美公司合成,引物稀释成 10 pmol/ μ l。反应体系为 10 \times 反应缓冲液 5 μ l, DMSO 2.5 μ l, 25 mol/L Mg²⁺ 1.5 μ l, 10 mol/L dNTP 1 μ l, 10 pmol 上下游引物各 4 μ l, 基因组 DNA 0.3 μ g (6 μ l), TaqDNA 聚合酶 2.5 U, 总体积 50 μ l。循环参数: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 75 s; 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 12 μ l 的 PCR

扩增产物, 2% 琼脂糖凝胶电泳, 以 100 bp DNA ladder marker 作标记, 检测 PCR 扩增产物的浓度及纯度, 有无出现缺失。取未发生缺失的 PCR 产物变性后经 7.5% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶恒压 500 V, 温度 15 $^{\circ}$ C 电泳 5 h, 银染分析。

1.2.3 免疫组化 采用 SABC 法, p16 多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotech 公司及博士德公司。石蜡包埋组织作 4 μ m 厚的切片, 常规脱蜡水化。36 例肝门部胆管癌标本及 6 例慢性炎症胆管壁组织进行 p16 蛋白的免疫组织化学分析。以已知乳腺癌阳性片作阳性对照, 以 PBS 代替一抗作阴性对照。胞浆或核内染成棕色为阳性判断标准, 阳性细胞数 \geq 10% 为 p16(+), 无阳性细胞或阳性细胞数 < 10% 为 p16(-)。

1.3 统计分析

计数资料根据四格表精确概率法进行处理, 根据 FI 值决定 P 值大小。

2 结果

2.1 p16 基因 PCR-SSCP 银染筛查结果

36 例肝门部胆管癌标本行 PCR 扩增, 有 8 例标本缺失(图 1)。对未发现缺失的 PCR 产物行 SSCP 银染筛查, 有 13 例出现单链 DNA 泳动速度的变化(图 2)。总变异率为 58.3%。

2.2 免疫组化结果

36 例肝门部胆管癌标本中 8 例 p16 基因缺失标本显现 p16 蛋白表达阴性, 有 10 例 p16 蛋白表达下降, 阳性率 50.0% (18/36), 蛋白丢失率 50.0% (图 3)。

M: 标记物 N: 癌旁正常组织 T: 癌组织

图 1 p16 基因外显子 2 缺失

图 2 p16 基因外显子 2 SSCP 结果

图 3 p16 蛋白阳性表达(ABC \times 200)

2.3 p16 基因变异及蛋白表达与人肝门部胆管癌的关系

统计分析表明 p16 基因突变与肝门部胆管癌患者性别年龄无关,而与临床类型、分化程度、浸润程度及淋巴结转移有明显的关系(附表)。

附表 肝门胆管癌生物学行为与 p16 基因突变及蛋白表达的关系(n)

生物学行为	p16 基因		p16 蛋白	
	突变	未突变	表达下降	表达正常
Bismuth 分型				
I 型	2	3	2	3
II 型	4	6	4	6
III a + b 型	6	3	4	5
IV 型	9	3 [†]	8	4 [†]
分化程度				
高	6	6	5	7
中	46	5	3	6
低	11	4 [†]	10	5 [†]
浸润程度				
累及肝脏	13	6 [†]	12	7 [†]
未累及肝脏	8	9	6	11
淋巴结转移				
有	11	6 [†]	10	7 [†]
无	10	9	8	11

注:†:与同一生物学行为的其他组比较, $P < 0.05$

3 讨论

p16 基因的抑癌机制与细胞周期调控密切相关,在许多人类恶性肿瘤中存在变异,如神经胶质瘤、白血病、黑色素瘤、间皮瘤、肺癌、膀胱癌等。各种原发瘤 p16 的变异频率为 20.7% (206/994),而细胞株为 56.4% (83/147);细胞株中 p16 变异频率明显高于原发瘤,故 p16 变异曾被认为是体外建株选择的结果^[1]。但许多研究已初步证实 p16 基因变异是多种原发肿瘤中的频发事件^[2]。p16 变异的主要形式为纯合性缺失,另有杂合性缺失、点突变等。Yoshida 等^[3]发现在 2 株胆管癌的细胞株中均有 p16 基因缺失,25 例原发性胆道癌手术标本中 63% 肝门部胆管癌有 p16 基因突变,而 p15 基因和 K-ras 及 p53 基因的突变率很低^[4,5]。因此,推测 p16 基因失活在肝门部胆管癌的发生中起主导作用。本组资料结果显示在 6 例慢性炎症胆

管壁中未发现 p16 基因变异及蛋白丢失,而在 36 例肝门部胆管癌中,p16 基因的总变异率为 58.3%。

p16 蛋白(156 个氨基酸)主要由 4 个锚蛋白重复系列(ankyrin repeat)构成,重复序列在抑制作用中占主要地位。体外实验^[6]同样证明,在锚蛋白重复序列以外区域发生 p16 基因的变异对 p16 蛋白功能没有影响^[6],此说明锚蛋白重复系列决定 p16 蛋白的功能。本研究中第 126 位密码子突变和外显子缺失刚好在重复区域范围内,从而影响 p16 蛋白功能。笔者用 SABC 法检测 36 例肝门胆管癌 p16 蛋白的表达,p16 蛋白表达丢失率达 50.0%,因而不能抑制肿瘤的生长和转移。其中 2 例 p16 蛋白表达下降,但并未发现基因突变。可能有两种原因:(1)p16 外显子 1 或 3 发生改变;(2)p16 基因除缺失突变外,有其他机制如甲基化的参与^[7]。

本研究结果显示,p16 基因变异频率和 p16 蛋白丢失率的符合率为 93%,表明肝门胆管癌中 p16 基因与蛋白表达的协同性,证实了 p16 基因突变参与胆管癌的发生。一般认为胆管癌分化程度低,浸润广泛的患者预后较差。本资料表明,p16 基因的突变及蛋白表达异常与胆管癌患者性别、年龄无明显关系,而与 Bismuth 分型、分化程度、浸润程度及淋巴转移有明确关系。但 p16 基因的检测对人肝门胆管癌的诊断及预后判断的临床意义尚待随访后进一步探讨。

参考文献:

- [1] Cairns P, Mao L, Merlo AM, *et al.* Rates of p16 (MTS1) mutation in primary tumors with 9p loss [J]. *Science*, 1994, 265 (5129): 415 - 418.
- [2] Walker DG, Duan W, Popovic EA, *et al.* Homozygous deletion of the multiple tumor suppressor gene 1 in the progression of human astrocytomas [J]. *Cancer Res*, 1995, 55 (1): 20 - 23.
- [3] Yoshida S, Todorki T, Ichikawa Y, *et al.* Mutation of p16 and p15 gene in biliary tract cancers [J]. *Cancer Res*, 1995, 55 (13): 2756 - 2760.
- [4] 彭淑瞞. 努力提高胆道系统恶性肿瘤的诊治水平 [J]. *中国普通外科杂志*, 2001, 10 (1): 2 - 5.
- [5] Igaki H, Sasaki H, Tachimori Y, *et al.* Mutation frequency of the p16/CDKN2 gene in primary cancers in the upper digestive tract [J]. *Cancer Res*, 1995, 55 (15): 3421 - 3423.
- [6] Yang R, Combart AF, Serrano M, *et al.* Mutational effects on the p16 tumor suppressor protein [J]. *Cancer Res*, 1995, 55 (12): 2503 - 2506.
- [7] Muscarella P, Melvin WS, Fisher WE, *et al.* Genetic alteration in gastrinomas and nonfunctioning pancreatic neuroendocrine tumor: a analysis of p16/MTS1. tumor suppressor gene inactivation [J]. *Cancer Res*, 1998, 58 (2): 237 - 240.