

子宫颈癌抑癌基因 *p16* 第一外显子 CpG 岛异常甲基化

The Exon 1 CpG Island of the Tumor Suppressor *p16* Gene Aberrant Methylation in Cervical Carcinogenesis

潘泽民/PAN Ze-min, 程静新/CHEN Jing-xin, 潘晓琳/PAN Xiao-lin, 李 军/LI Jun, 宋维永/SONG Wei-yong, 段 玮/DUAN Wei, 彭小玲/PEN Xiao-ling, 杨 磊/YANG Lei, 周祖钊/ZHOU Zu-zhao, 何 玲/HE Ling

石河子大学医学院, 新疆石河子 832002

School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

[摘要] 利用限制性核酸内切酶-PCR 方法分析 33 例肿瘤组织和 15 例正常组织抑癌基因 *p16* 第一外显子 *Sac* II 和 *Sma* I 酶切位点甲基化, 应用 SPSS 软件进行统计分析。结果显示, 18 例子宫颈癌在抑癌基因 *p16* 第一外显子 *Sac* II 位点甲基化, 8 例子宫颈癌在 *Sma* I 位点甲基化。正常组织仅有两例在抑癌基因 *p16* 第一外显子 *Sac* II 位点甲基化, 正常组织在 *Sma* I 位点没有甲基化。另外, 抑癌基因 *p16* 第一外显子 *Sac* II 和 *Sma* I 酶切位点甲基化易发生在肿瘤的早期。抑癌基因 *p16* 第一外显子 *Sac* II 和 *Sma* I 酶切位点甲基化与子宫颈癌相关。

[关键词] 子宫颈癌, *p16* 抑癌基因, 第一外显子 CpG 岛甲基化

[中图分类号] Q75, R737.33

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2005)10-0045-03

Abstract: Restriction endonuclease PCR method was utilized to analyze 33 cases tumor tissue and 15 cases normal tissue. The data was analyzed by SPSS Software. At last, it shows that there are 18 cases cervical tumor methylation in *Sac* II cleavage site and 8 cases cervical tumor methylation in *Sma* I cleavage site, on the contrary, there are 2 normal tissue methylation in *Sac* II cleavage site and no normal tissue methylation in *Sma* I cleavage site. In addition, the early stage cervical tumor are more ease methylation in those two CpG island. In a word, the exon 1 of *p16* gene *Sac* II and *Sma* I CpG island methylation related with cervical tumor carcinogenesis.

Key Words: cervical tumor, *p16* suppressor gene, exon 1, CpG island methylation

CLCNumbers: Q75, R737.33

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2005)10-0045-03

1 引言

子宫颈癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤, 在世界范围内, 子宫颈癌严重危害妇女健康, 其患病率仅次于乳腺癌, 位居第二位^[1]。子宫颈癌的病因研究一直为国内外学者所重视, 感染高危型人乳头状瘤病毒(HPV)是导致子宫颈癌发生的主要因素之一。HPV 感染宿主细胞后, 其 DNA 整合入宿主细胞基因组中, 表达产生 E6 蛋白与细胞中的 P53 蛋白结合, 通过泛素途径将 P53 蛋白降解灭活^[2]。

INK4A 基因, 是一条抑癌基因, 定位于染色体 9p21, *INK4* 家族环化依赖激酶抑制物包括 *p16*, *p15*, *p18* 和 *p19* 蛋白质。因而又将 *INK4A* 基因称为 *CDKN2A* 基因。其中, 第一外显子有 E1a 和 E1b。通过同外显子 2 和 3 组合可以编码不同的蛋白质。E1a 同外显子 2 和 3 结合可编码出 15.845-kd 的蛋白质, 故称为 *p16* 蛋白质。*p16* 蛋白质是细胞周期抑制性调节因子, 可以抑制周期素依赖性蛋白激酶 4(cyclin-dependent kinase, CDK4)和 CDK6,

进而阻止视网膜母细胞瘤蛋白质(retinoblastoma, RB)磷酸化, 将细胞周期阻止于 G1 期^[3]。

在癌的发展过程中, 抑癌基因的失活是常见的事件, 其中, 包括点突变和染色体缺失。除了点突变和染色体缺失外, 抑癌基因启动子高度甲基化导致基因的失活在肿瘤中也常见。抑癌基因 *p16* 异常的启动子 CpG 岛甲基化, 与癌细胞中蛋白质表达失活相关。另外, 研究者发现很多肿瘤组织中, 多种抑癌基因启动子出现了异常 CpG 岛甲基化^[4]。本研究通过分析 *p16* 基因第一外显子两个甲基化 CpG 岛位点与子宫颈癌的关系, 初步了解子宫颈癌的发病机制。

2 材料与方法

2.1 实验材料

其中, 33 例为子宫颈癌组织, 包括 18 例维吾尔族子宫颈癌, 癌组织均由病理学检查确诊。15 例为正常子宫颈组织。基因组抽提试剂盒购自上海生工生物工程公司。限制性核酸内切酶购自

收稿日期: 2005-05-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(30260036)

作者简介: 潘泽民, 男, 新疆石河子大学医学院新疆地方与民族高发病省部共建教育部重点实验室副教授, 华中科技大学同济医学院博士, 主要从事肿瘤病因学和砷化物与基因研究; E-mail: penzemin89@126.com

杨 磊(通讯作者), 男, 石河子大学, 教授, 主要从事环境与基因的研究; E-mail: yanglei62@yahoo.com

潘晓琳(通讯作者), 女, 石河子大学, 教授, 主要从事肿瘤病理学的研究; E-mail: xiao-sh@mail.xj.cninfo.net

Promega 公司。基因组抽提:按试剂盒步骤说明操作。

2.2 限制性核酸内切酶 PCR 法进行甲基化分析

2.2.1 酶切

总体积 20 μ l, 分别选择限制性核酸内切酶 *Sac* II 和 *Sma* I 进行基因组酶切, 基因组 DNA 5 μ l, 缓冲液 2 μ l, BSA 0.2 μ l, MilliQ 水 12.2 μ l, 酶 0.6 μ l。 *Sac* II 37 $^{\circ}$ C 酶切 16 h, *Sma* I 25 $^{\circ}$ C 酶切 16 h。

2.2.2 DNA 酶切产物沉淀

各管加入 50 μ l 无水乙醇, 混匀, -80 $^{\circ}$ C 冷冻 3 h, 10 000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 加 5 μ l MilliQ 水, 作为 PCR 反应模板。

2.2.3 PCR 扩增

总体积 20 μ l, MilliQ 水 9.87 μ l, 缓冲液 2 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l, dNTP 2.5 μ l, Taq 酶 0.13 μ l, 正向和反向引物各 1 μ l, 模板 2 μ l。反应参数: 预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 32 个循环。72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

2.3 电泳

1.7% 琼脂糖凝胶电泳 30 min, 观察结果。DNA Marker 选用 PUC19 DNA/Msp I (Hpa II) Marker。

2.4 统计分析

统计软件采用 SPSS 统计分析软件。

3 结果

3.1 *p16* 基因第一外显子 *Sac* II 和 *Sma* I 酶切位点

p16 基因第一外显子限制性核酸内切酶 *Sac* II 和 *Sma* I 酶切位点(图 1 划线部分)从图中可见限制性核酸内切酶作用位点

```
1 gaagaaagag gagggctggc ctggcaccac gagggctggg cggacgcgt gcgcctggc
61 gctcgggaga gggggagagc aggcagcggg cggcggggag cagcatggag ccggcgccgc
121 ggagcagcat ggagccttgc gctgactggc tggccacggc cgc/ggccc/gg ggctgggtag
181 aggaggtcgc ggcgctgctg gaggcggggg cgtgcccac cgcaccgaat agttacggtc
241 ggagccgat ccaggtgggt agaggtctg cagcggggag aggggatggc gggcgactct
301 ggagcagaa gtttcaggg gaattggaat caggtagcgc
```

图 1 *p16* 基因第一外显子序列(GenBank 登录号为 U12818) *Sac* II 酶切位点为 ccgc/gg, *Sma* I 酶切位点为 ccc/ggg 图中已标示

3.2 限制性核酸内切酶 PCR 法进行甲基化分析

图 2 和图 3 酶切后 PCR 反应扩增 *p16* 基因第一外显子, 能扩增出 340bp 条带表明该 CpG 岛甲基化。结果表明, *Sac* II 酶位点, 33 例子宫颈癌有 18 例检测出甲基化, 阳性检出率为 (54.55%), 其中 18 例维吾尔族子宫颈癌患者检测出 8 例。15 例正常子宫颈组织检测出 2 例 *Sac* II 酶位点甲基化。 *Sma* I 酶切位点, 33 例子宫颈癌有 8 例检测出甲基化, 阳性检出率为 (24.24%)。18 例维吾尔族子宫颈癌患者检测出 7 例甲基化。15 例正常子宫颈组织未检测出 *Sma* I 酶位点甲基化。

3.3 子宫颈癌各期 *p16* 基因第一外显子甲基化水平

从表 1 可以看出 I 期子宫颈癌的甲基化例数较其它期例数高。

3.4 *p16* 基因第一外显子 *Sac* II 和 *Sma* I 酶切位点甲基化分析

子宫颈癌组织和正常子宫颈组织中 *p16* 基因第一外显子 *Sac* II 和 *Sma* I 酶切位点甲基化分析见表 2 和表 3。表 2 表明 *p16*

表 1 33 例子宫颈癌各期甲基化水平

分期	例数	甲基化检出例数	百分比(%)
I	9	7	77.8
II	14	7	50
III	10	4	40

基因第一外显子 *Sac* II 酶切位点 CpG 岛甲基化, 子宫颈癌组织较子宫颈正常组织高, 差异有显著性。

表 2 子宫颈癌组织和子宫颈正常组织 *Sac* II 酶切位点甲基化分析

组别	总例数	<i>Sac</i> II 酶切位点甲基化		阳性检出率 (%)
		甲基化	非甲基化	
子宫颈癌	33	18	15	54.55
正常组织	15	2	13	13.33

P=0.007, P<0.01, 结果有显著性差异

表 3 表明 *p16* 基因第一外显子 *Sma* I 酶切位点 CpG 岛甲基化, 子宫颈癌组织较子宫颈正常组织高, 差异有显著性。

表 3 子宫颈癌组织和子宫颈正常组织 *Sma* I 酶切位点甲基化分析

组别	总例数	<i>Sma</i> I 酶切位点甲基化		阳性检出率 (%)
		甲基化	非甲基化	
子宫颈癌	33	8	25	24.24
正常组织	15	0	15	0

4 讨论

新疆是全国各省区子宫颈癌死亡率前 6 位唯一处于西北边疆的地区, 维吾尔族妇女发病率^[5]。子宫颈癌组织细胞许多基因表达发生了变化。阮永华等^[6]发现癌基因 *c-myc* 的高表达与抑癌基因 *p16* 的失活在子宫颈癌的发生、发展过程中起着重要的作用。Ivanova T 等^[7]发现抑癌基因视黄酸受体 β 2 (retinoic acid receptor β 2, *RAR- β 2*) 在子宫颈鳞状细胞癌表达减少。通过实验证实 *RAR- β 2* 基因启动子和第一外显子甲基化导致该基因在子宫颈癌中不表达。并且发现 *RAR- β 2* 基因 5' 区域的甲基化是在子宫颈癌早期形成过程中产生的。另外, Ras 相关结构域家族 1A 基因 (Ras association domain family 1A gene, *RASSF1A*) 定位于染色体 3p21.3, 是一条抑癌基因。研究发现, 在子宫颈癌组织中出现 *RASSF1A* 基因表达失活, 失活的 *RASSF1A* 基因可引发细胞恶性转化从而导致肿瘤。其中, *RASSF1A* 基因表达失活的原因是启动子甲基化, *RASSF1A* 基因启动子高度甲基化及同型或杂合型缺失是该基因表达失活的主要机制, 在子宫颈癌组织中少见该基因发生突变^[8]。最近研究发现干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ) 基因第一内含子 CA 二核苷酸重复多态性与个体子宫颈癌易感性相关, 这种多态性也与 HPV 感染的类型相关^[9]。Bhattacharya N 等^[10]的研究表明: 染色体 8p21.3-8p23 缺失可以激活 *c-myc* 基因, 从而导致子宫颈癌。

许多的研究者对子宫颈癌的 *p16* 基因启动子甲基化进行了研究。Yang HJ^[11]等发现子宫颈癌中 *p16* 基因启动子甲基化是较常见的现象。分析早期肿瘤组织标本和血浆 *p16* 基因启动子甲基化, 发现结果相互一致, 表明检测血浆中 *p16* 基因启动子甲基化可以预测癌的发生。

Lea JS 等^[12]发现早期鳞状细胞癌中 *p16* 基因启动子甲基化明显高于高级别鳞状细胞癌。癌组织中, *p16* 基因启动子甲基化水平明显高于正常组织。同时发现半数以上鳞状细胞癌与主动吸烟有关。可以推论, 吸烟可能导致了 *p16* 基因启动子甲基化而导致子宫颈癌。

Tripathi A 等^[13]研究发现, 由于 *p16* 基因启动子甲基化和突变及杂合型缺失导致了 *p16* 基因失活。结果显示, 没有发现 HPV 感染与 *p16* 基因改变相关。因而, 可以认为 *p16* 基因失活可以直接导致子宫颈癌的发生。Nuovo GJ 等^[14]使用原位杂交甲基化特异性 PCR 方法 (methylation-specific PCR in situ hybridization, MSP-ISH), 研究子宫颈癌抑癌基因 *p16* 甲基化。研究结果表明,

p16 基因高度甲基化易发生在早期癌中。由于基因甲基化而导致了 *p16* 蛋白表达缺失,从而导致早期癌发展为侵袭癌。这些发现表明,*p16* 基因在子宫颈癌的发生中发挥着重要作用。

本研究针对 33 例子宫颈癌和 15 例子宫颈正常组织进行了 *p16* 基因第一外显子的两个 CpG 岛位点甲基化水平研究,结果表明:癌组织中甲基化率明显高于正常组织。表明 *p16* 基因第一外显子的这两个 CpG 岛位点甲基化与子宫颈癌的发生相关。另外,表 1 结果显示,在早期的子宫颈癌组织的甲基化水平高于其它期的子宫颈癌组织。可能预示第一外显子这两位点 CpG 岛甲基化是早期事件。这一结果和上述研究者研究 *p16* 基因启动子甲基化结果一致。表明 *p16* 基因由于广泛的 CpG 岛甲基化,而导致了 *p16* 基因的失活,最终导致了癌的发生。

本研究同时对 18 例维吾尔族子宫颈癌进行了 *p16* 基因第一外显子的两个 CpG 岛位点甲基化水平检测。发现 *Sac* II 酶切位点有 8 例甲基化,而 *Sma* I 酶切位点有 7 例发生了第一外显子的 CpG 岛位点甲基化。其中 4 例两个位点都发生了甲基化。预示维吾尔族子宫颈癌组织 *p16* 基因同其它民族一样可能发生 CpG 岛位点的甲基化。由于本文仅研究了第一外显子两个 CpG 岛位点,在启动子和第一外显子还有多个位点未研究,且 Peng Hou 等^[15]用甲基化基因芯片分析法发现 *p16* 基因第一外显子的 7 个 CpG 岛位点癌组织中甲基化水平明显高于正常组织,所以,对 *p16* 基因甲基化与子宫颈癌的发病机制有待深入研究。

5 结论

p16 基因第一外显子 *Sac* II 酶切位点和 *Sma* I 酶切位点异常甲基化与子宫颈癌相关。

参考文献 (References)

- [1] Mike F J, Hervy E A. Cervical cancer: prevention, diagnosis and therapeutics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2001, 51(2): 92~114
- [2] Southern S A, Herrington C S. Disruption of cell cycle control by human papillomaviruses with special reference to cervical carcinoma[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2000, 10(4): 263~274
- [3] JKourea H P, Orlow I, Scheithauer B W, et al. Deletions of the *INK4A* gene occur in malignant peripheral nerve sheath tumors but not in neurofibromas [J]. *American Journal of Pathology*,

1999, 155(6): 1 855~1 860

- [4] Dong S M, Kim H S, Rha S H, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the Uterine cervix [J]. *Clinical Cancer Research*, 2001, 7(7): 1982~1986
- [5] 李庭芳, 古丽那. 库尔班, 王涛, 等. 新疆伽师县夏普桃勒乡妇女子宫颈癌防治的研究[J]. *新疆医学院学报*, 1996, 19(3): 199~203
- [6] 阮永华, 魏万里, 张华献, 等. 子宫颈癌组织中癌基因 *c-myc* 与抑癌基因 *P16* 的对比分析[J]. *癌症*, 2003, 22(6): 602~606
- [7] Ivanova T, Petrenko A, Gritsko T, et al. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor- $\beta 2$ gene in cervical cancer [J]. *BMC Cancer*, 2002, 2: 1~7
- [8] Kuzmin I, Liu L, Dammann R, et al. Inactivation of RAS association domain family 1A gene in cervical carcinomas and the role of human papillomavirus infection [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(8): 1 888~1 893
- [9] Lai HC, Chang CC, Lin YW, et al. Genetic polymorphism of the interferon- γ gene in cervical carcinogenesis [J]. *Int J Cancer*, 2005, 113(5): 712~718
- [10] Bhattacharya N, Singh R K, Mondal S, et al. Analysis of molecular alterations in chromosome 8 associated with the development of uterine cervical carcinoma of Indian patients[J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 95(2): 352~362
- [11] Yang H J, Liu V W, Wang Y, et al. Detection of hypermethylated genes in tumor and plasma of cervical cancer patients[J]. *Gynecol Oncol*. 2004, 93(2): 435~440
- [12] Lea J S, Coleman R, Kurien A, et al. Aberrant *p16* methylation is a biomarker for tobacco exposure in cervical squamous cell carcinogenesis[J]. *Am J Obstet Gynecol*. 2004, 190(3): 674~679
- [13] Tripathi A, Banerjee S, Roy A, et al. Alterations of the *P16* gene in uterine cervical carcinoma from Indian patients [J]. *Int J Gynecol Cancer*. 2003, 13(4): 472~429
- [14] Nuovo G J, Plaia T W, Belinsky S A, et al. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the *p16* gene as an early event in oncogenesis. [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96(22): 12 754~12 759
- [15] Hou P, Ji M J, Liu Z C, et al. A microarray to analyze methylation patterns of *p16lnk4a* gene 5 -CpG Islands [J]. *Clinical Biochemistry*, 2003, 36(3): 197~202

(责任编辑 王 芷)

· 图片科技新闻 ·

台风和飓风给受灾国和地区造成重大损失

9月11日下午,2005年第15号台风“卡努”从浙江省台州市登陆,经由台州、金华南部、绍兴,到达杭嘉湖地区,而后进入江苏省,并影响到安徽省、上海市、山东省。受“卡努”影响最大的浙江省,全省由于恶劣天气的影响死亡14人,失踪9人,705.6万人受灾,直接经济损失达79.5亿元人民币。“卡努”也使江苏、安徽两省暴雨成灾,农作物受灾面积达574.4 km²,绝收12.6 km²,560万人受灾,直接经济损失16亿元人民币。

据统计,1988~2004年,我国年均因台风造成的死亡人数达440人,直接经济损失高达233.5亿元人民币。2005年以来,先后有“海棠”、“麦莎”、“彩蝶”和“卡努”等台风对我国沿海地区造成影响。美国登陆飓风研究计划制定小组通过详尽分析1976年至1998年间各种天气数据后发

现,青藏高原积雪通过影响高原上的热力过程改变连接高原和西太平洋的大气环流,对影响我国的台风的形成有相关性;若青藏高原冬春季的积雪多,则当年夏秋季影响中国的台风就少;若积雪少,则当年夏秋季影响中国的台风就多。

根据发生地的不同,气象学上热带海面上强烈发展的天气尺度的气旋被划分为“台风”和“飓风”。发生在西太平洋的被称为“台风”,发生在东太平洋和大西洋的被称为“飓风”。近年来,台风和飓风给受灾国造成的损失呈上升趋势,成为人类面临的重大自然灾害之一。8月29日的飓风“卡特里娜”就使美国路易斯安纳州新奥尔良市遭受灭顶之灾,人员和经济损失惨重,预计灾区重建至少将耗资2 000亿美元。

(本刊记者 黄永明)



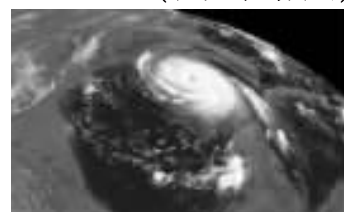
台风“卡努”掀起的巨浪



严阵以待防台风



青藏高原积雪



“卡特里娜”飓风卫星云图