

抑癌基因 CDKN2 的变异与原发性胃癌的关系

全欣鑫 于皆平 王 萍

摘 要:目的 研究 CDKN2 基因的突变、缺失与原发性胃癌发生发展的关系。方法 用 PCR 和银染 SSCP 分析了 45 例胃癌组织和 22 例相应正常胃粘膜中 CDKN2 基因的突变和纯合性缺失情况。结果 发现 CDKN2 基因的纯合性缺失率为 28.9%，其中β 型转录子的缺失率为 15.6%；无一例有 CDKN2 基因的突变。结论 胃癌的发生发展与 CDKN2 基因纯合性缺失密切相关，与 CDKN2 基因的突变无关，β 型转录子参与维持 CDKN2 基因的正常功能，其纯合性缺失与胃癌的发生有关。

关键词:CDKN2 基因；胃癌；纯合性缺失；突变

CDKN2 基因亦称 MTS1，其蛋白产物 p16 为细胞周期蛋白依赖性激酶 cdk4 的特异性抑制蛋白^[1]，在多种人类肿瘤类型中存在频发缺失、重排、突变和基因转录缺如等变异，被认为与人类肿瘤的发生、发展过程密切相关。p16 与细胞周期蛋白 D1 竞争结合细胞周期蛋白依赖性激酶 4 或 6(CDK4/6)，抑制 Cyclin D-CDK4/6 复合物的形成，使抑癌蛋白 pRB 保持脱磷酸化状态，与转录活化因子 E2F 结合，阻止细胞通过 G1-S 检查点而滞留在 G1 期，抑制细胞的增殖^[2-3]。当 CDKN2 通过某种机制被灭活时，细胞会过多的形成 Cyclin D1-CDK4/6 复合物磷酸化 pRB，促使细胞通过 G1/S 点，进入 S 期合成 DNA。最近的研究表明在消化道肿瘤中食管癌、胰腺癌和大肠癌有 CDKN2 基因的高频率缺失、突变和甲基化^[4]。但对于原发性胃癌的 CDKN2 基因的变异情况国内外均少报道，尤其对 CDKN2 基因 5'端 CpG 岛异常甲基化在胃癌中的研究尚未见报道。为了研究 CDKN2 基因与胃癌发生、发展的关系，更多的了解胃癌的发病机制，用 PCR-银染 SSCP 法检测了 45 例原发性胃癌和 22 例相应的正常胃粘膜组织 CDKN2 基因的突变和缺失情况。

1 材料和方法

收集 1997 年 9 月~1998 年 3 月湖北医科大学附属第一、第二医院、黄石市中心医院、黄石市一医院新鲜手术切除并经病理检查证实的 45 例胃癌标本及 22 例相应正常胃粘膜组织(胃窦部)，其中胃癌标本经 HE 染色及组织学观察，按 WHO 标准分类：管状腺癌 26 例、粘液癌 9 例、未分化癌 10 例。常规提取胃癌和正常胃组织 DNA，PCR 扩增 CDKN2 基因

外显子 1α(E1α)、外显子 1β(E1β)和外显子 2(E2)，引物序列参考有关文献^[1-3]。50μlPCR 反应体系中含 50mMKCL，10mM TrisHCL (pH8.0)，0.1% TritonX-100，2.0mM Mg²⁺，200μM dNTPs，引物各 50pmol，Taq 酶 1unit，标本 DNA 2μl，同时以β-globin (268bp)作内对照。循环参数为 94 度预变性 5min，94 度 1min，59 度 (58 度 E1β、2)1min，72 度 1min，28 个循环后，72 度延伸 5min。电泳后荧光下观察结果。

PCR 扩增阳性的标本作银染-SSCP 分析：甲酰胺变性后在 5%PAGE 上 300V 电泳 1.5h，经 10%乙醇固定，1%硝酸脱色，用 0.012mol/L 硝酸银染色后显影、干胶后保存。

2 结果

2.1 原发性胃癌中 CDKN2 基因的纯合性缺失情况

PCR 扩增发现 28.9% (13/45)的原发性胃癌有 CDKN2 基因的纯合性缺失(图 1)，包括 2 例管状腺癌(缺失率 4.4%)、4 例粘液癌(8.9%)和 7 例未分化癌 (15.6%)，各外显子缺失的具体情况见附表。其中有 4 例只缺失 E2，其余 9 例均同时有两个外显子的纯和性缺失。22 例正常胃粘膜组织中 CDKN2 基因各外显子 PCR 扩增皆为阳性，无一例有缺失。所有标本的β-globin 基因 PCR 扩增均为阳性。

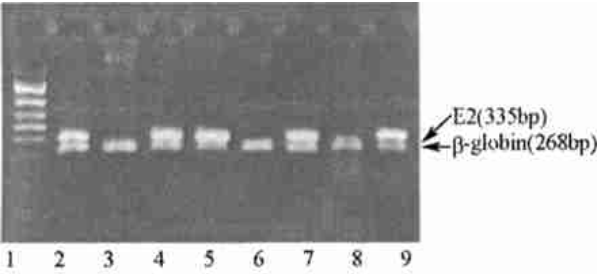
附表 原发性胃癌中 CDKN2 基因缺失的情况

CDKN2 基因	所有外显子(%)	E1α(%)	E1β(%)	E2(%)
缺 失	13(28.9)	6(13.3)	7(15.6)	9(20)
无缺失	32(71.1)	34(86.7)	34(84.4)	36(80)
总 计	45	45	45	45

2.2 原发性胃癌中 CDKN2 基因的银染 SSCP 分析

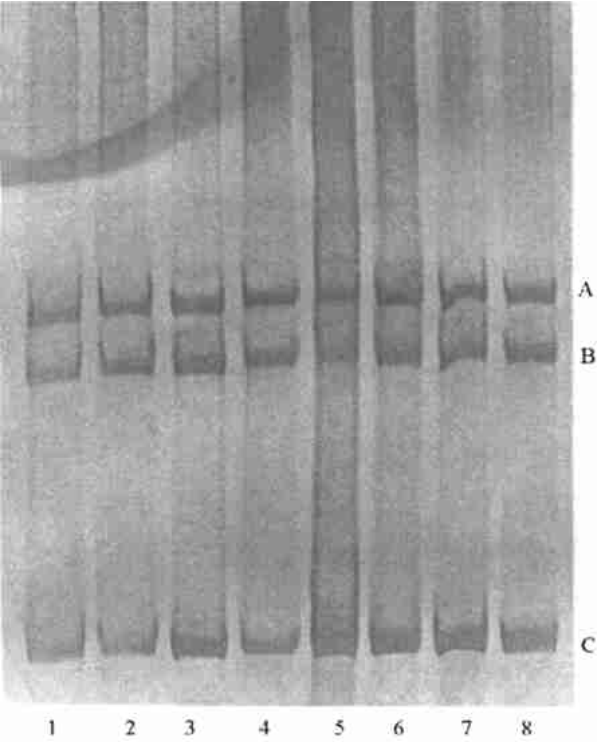
对 45 例胃癌和 22 例正常胃组织中无 CDKN2 基因缺失的 PCR 扩增产物作银染 SSCP 分析，PAGE

作者单位：430071 武汉，湖北医科大学附属第一医院消化内科
(全欣鑫、于皆平)；黄石市中心医院(王萍)



1. 标准分子量(1543, 994, 695, 515, 377, 237bp);
2-9. 胃癌标本; 3, 4, 8 标本 E2 缺失

图 1 胃癌中 CDKN2 基因外显子 E2 的扩增
凝胶电泳均未发现有异常泳动带(图 2), 结果为无一例标本发生 CDKN2 基因的突变。



1-8. 胃癌标本 A、B: 单链 DNA C. 双链 DNA
1-8 各标本无一例有异常泳动带

图 2 胃癌标本 CDKN2 基因外显子 E2 的银染-SSCP 分析

3 讨论

胃癌的发生是一个复杂的多基因变异参与的过程, 包括癌基因的激活和抑癌基因的失活, 但其分子病理水平的发病机制迄今尚未完全清楚。抑癌基因 CDKN2 通过直接调节细胞增殖周期而抑制细胞 DNA 的过多合成, 其变异与原发性胃癌的关系国内外均报道极少^[5]。本研究分析了 45 例原发性胃癌和 22 例对应的正常胃粘膜组织中 CDKN2 基因的突变缺失情况, 结果提示:

3.1 原发性胃癌中 CDKN2 基因的纯合性缺失率为 28.9%, 提示 CDKN2 基因的纯合性缺失与胃癌的发病密切相关, 胃癌中 CDKN2 基因的缺失可使其蛋白产物 p16 丧失正常的负相调节细胞周期的作用, 导

致细胞过度增殖, 参与胃癌癌变的发生过程。提示在胃癌中 CDKN2 基因可能尚有其其他的灭活机制, 包括启动子 5' 端 CpG 岛异常甲基化和非编码区的突变缺失等。

3.2 首次检测了新近发现的 β 型外显子 1(E1 β) 在胃癌中的缺失, 其缺失率达 15.6%, 而正常胃粘膜中 E1 β 无一例缺失。银染 SSCP 分析均未发现有 E1 β 的突变。说明 CDKN2 基因的 β 型转录子参与维持 p16 蛋白的正常功能, 其基因的缺失可导致其蛋白功能丧失。E1 β 的纯合性缺失与胃癌的发生发展有关。

3.3 45 例胃癌的银染 SSCP 结果表明, 无一例出现 CDKN2 基因的突变(附图 2), 提示 CDKN2 基因的突变与原发性胃癌的发生、发展无关, 这与文献报道一致^[6]。胃癌的 CDKN2 基因缺失率较食管癌等其他消化道恶性肿瘤低, 其原因可能为(1)肿瘤组织中正常的间质细胞对 CDKN2 基因缺失检出率的影响: 正常细胞的“污染”可导致 CDKN2 基因缺失率偏低。为防止此种假阴性, 本研究在实验取材中尽量小心剔除正常组织, 所有病例均经病例检测证实癌细胞百分比 $\geq 80\%$; 同时减少 PCR 扩增循环数至 28 个循环, 进一步防治正常细胞的污染;(2)在胃癌中 CDKN2 基因可能尚有其其他的灭活机制, 包括启动子 5' 端 CpG 岛异常甲基化和非编码区的突变缺失等。

3.4 银染-SSCP 法较常规采用的同位素标记法和溴化乙锭(EB)染色的 SSCP 分析相比, 克服了放射性同位素的污染和半衰期短及 EB 染色不宜于保存的条件限制, 有结果直观、宜于分析、敏感度高、方法简便、实验时间短等优点, 是检测 CDKN2 基因在肿瘤中突变的可靠而简便易行的方法。

综上所述, 本研究认为(1)胃癌的发生与 CDKN2 基因的变异有关, 纯合性缺失为 CDKN2 基因在胃癌中的主要灭活机制之一;(2)CDKN2 基因的突变与原发性胃癌的发生发展无关;(3)CDKN2 基因 β 型转录子参与维持 p16 蛋白的正常功能, 其基因的纯合性缺失与胃癌的发生发展有关。

参考文献:

[1] Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 1994, 264: 436 ~ 440
[2] Serrano M, Hannon GJ, Beach D, et al. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993, 366: 704 ~ 707
[3] Nobori T, Miura K, Wu DJ, et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1993, 368: 753 ~ 756
(下转 352 页)

The Correlation between the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor KDR and Angiogenesis in Human Gastric Carcinoma

LIU Du-hu ZHANG Xue-yong HUANG Yu-xin

Department of Gastroenterology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032

Abstract: Objective To investigate the correlation between the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) and its receptor KDR and angiogenesis. They observed the localization and distribution of VEGF and KDR in various differentiated gastric cancer tissues. **Methods** VEGF and KDR were detected in 50 gastric carcinoma (GC) by immunohistochemical ABC technique. Microvessel density was determined by immunostaining for factor VIII-related antigen. **Results** VEGF-positive rate was 50%, and VEGF was mainly localized to the cytoplasm or the membrane of the gastric cancerous cell; KDR was mainly localized in the vascular endothelial cell in gastric cancer tissues and their related Peri-Cancerous tissue. Microvessel density was significantly higher in VEGF-positive tumor (13.905 ± 7.24) than in VEGF negative tumors (6.50 ± 2.10) ($P < 0.05$). With VEGF positive intensity increasing, microvessel density become more high. **Conclusion** VEGF might have mainly paracrine effect upon the endothelial cell to promote angiogenesis. Our data also hinted at the possibility that VEGF might have an autocrine effect upon the gastric cancer cell itself.

Key words: Gastric Carcinoma; Vascular endothelial growth factor; Receptor; Immunohistochemistry

(上接 349 页)

[4] Liu Q, Yan YX, McClure M, et al. MTS-1(CDKN2) tumor suppressor gene deletion are a frequent event in esophagus squamous cancer and pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Oncogene*, 1995 19(1): 1061 ~ 1067

[5] Mao L, Merb A, Bedi G, et al. A novel p16NK4A transcript. *Cancer Res*, 1995, 55: 2995 ~ 2997

[6] Sakata K, Tamura G, Maesawa G, et al. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 9 without p16 gene mutation in gastric carcinomas. *Jpn J. Cancer Res*, 1995, 86: 333 ~ 335

[7] Igaki H, Sasaki H, Tachimori Y, et al. Mutation frequency of the p16/CDKN2 gene in primary cancers in the upper digestive tract. *Cancer Res*, 1995 55: 3421 ~ 3423

Analysis of CDKN2 Gene Alterations in Human Gastric Carcinoma

QUAN Xin-xin YU Jie-ping WANG Ping

Department of gastroenterology research, The No. 1 hospital affiliated Hubei Medical University, Wuhan 430060

Abstract: Objective In order to study the alterations of CDKN2 gene in human gastric cancer. **Methods** The deletion and mutation of CDKN2 gene in 45 gastric carcinoma and 22 normal gastric tissues were examined using PCR-SSCP analysis. **Results** 28.9% (13/45 cases) deletion were founded in gastric cancer, but no somatic mutation was present. **Conclusion** The findings suggested that CDKN2 gene deletion play a important role in the gastric tumorigenesis, whereas CDKN2 mutation is absent.

Key words: CDKN2 gene; Gastric carcinoma; Homozygous deletion; Mutation