

# 恶性淋巴瘤中 MTS1/p<sup>16</sup> 基因的缺失

黄毓秦雪闭慎金黄天衡

**摘要:** 目的 研究 MTS1/p<sup>16</sup> 基因在恶性淋巴瘤中的变化。方法 采用多重 PCR 检测 34 例非何杰金淋巴瘤 (NHL) 和 15 例健康人体外周血 DNA 的 p<sup>16</sup> gene Exon2 纯合子缺失。结果 34 例 NHL 中有 4 例有 p<sup>16</sup> gene Exon2 纯合子缺失。结论 MTS1/p<sup>16</sup> gene 变异可能在非何杰金淋巴瘤的发生发展中起作用。

**关键词:** 非何杰金淋巴瘤; MTS1/p<sup>16</sup> gene; 基因缺失

肿瘤的发生和发展是由于多种遗传改变的积累造成的。遗传改变包括肿瘤抑制基因失活和原癌基因的激活。研究表明 MTS1/p<sup>16</sup> 基因在许多肿瘤细胞和肿瘤组织中有缺失和点突变<sup>[1]</sup>, 但有关 MTS1/p<sup>16</sup> 基因在恶性淋巴瘤中的改变的报道较少, 为此, 我们用多重 PCR 方法检测了 34 例非何杰金淋巴瘤 (NHL) 外周血 DNA p<sup>16</sup> 基因的缺失情况, 现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 标本来源 34 例非何杰金淋巴瘤均为我院血液科及化疗科住院的病人, 男 25 例, 女 9 例, 年龄 17~68 岁, 中位年龄 41 岁, 其中 T-cell NHL8 例, B-cell NHL21 例, 非 T 非 B NHL5 例, 所有病例均经病理确诊, 治疗前取外周静脉血 5ml, 对照组 15 例, 为健康人外周静脉血。

1.2 标本 DNA 提取 参照《分子克隆实验指南》<sup>[2]</sup> 提取高分子量 DNA, 用 TE (PH8.0) 溶解, 紫外分光光度计测其 OD 值, 调整浓度至 50ng/μl, 以备 PCR 扩增。

1.3 引物 根据 p<sup>16</sup> gene 基因组序列<sup>[3]</sup>, 在第二外显子两侧设计一对扩增引物 (PCR 产物长度 480bp)。

PS<sub>1</sub>: 5'-GGA AAT TGG AAA CTG GAA GC-3'

PS<sub>2</sub>: 5'-TCT GAC CTT TGG AAG CTC T-3'。

引物由中国科学院上海生化所合成。

1.4 PCR 扩增 在扩增 p<sup>16</sup> 的同时, 用 DMD Exon51 引物 (PCR 产物 388bp) 做内对照。PCR 反应混合液含 10×PCR Buffer, 200μ mol/L dNTP, 1μ mol/L primer, 200ng 模板 DNA, Taq DNA2.5U, 加 H<sub>2</sub>O 至终体积 50μl, 在 DNA 扩增仪上进行如下循环:

95°C 预变性 5', 95°C 1, 58°C 1', 72°C 1'30", 30 个循环。取 5μl PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶 (加 EB0.5μg/ml) 上电泳分析 (Taq DNA 聚合酶为美国 Life Technologies 产品)。

## 2 结果

PCR 显示: 在 34 例 NHL 标本中有 4 例在 480bp 处无 PCR 扩增带, 为 PCR 扩增阴性, MTS1/p<sup>16</sup> Exon2 缺失率为 11.8% (4/34), 其中 8 例 T-cell NHL 标本有 1 例 p<sup>16</sup> Exon2 缺失, 缺失率为 12.5% (1/8), 21 例 B cell NHL 标本有 3 例 p<sup>16</sup> Exon2 缺失, 缺失率为 14.3% (3/21)。对照组 15 例 DNA 标本在 480bp 处均有 PCR 扩增带, 见附图:



多重 PCR 分析 NHL 血 DNA MTS1/p<sup>16</sup> gene Exon2 纯合子, PCR 扩增 MTS1/p<sup>16</sup> gene Exon2 产物为 480bp, DMD Exon51 388bp, 2% 琼脂糖凝胶电泳 EB 染色。

### 1. 分子量标志

2~10 为 NHL 血 DNA 标本, 其中 6, 7, 8, 9 为 MTS1/p<sup>16</sup> gene Exon2 纯合子缺失, 即为扩增阴性, 1, 2, 3, 4, 5, 10 为扩增阳性。

## 3 讨论

MTS1/p<sup>16</sup> 是 CDK<sub>4</sub> 的抑制因子。CDK<sub>4</sub> 与 Cyclin D 结合后能使细胞周期进入 G<sub>1</sub> 期, 而 p<sup>16</sup> 蛋白能与 CDK<sub>4</sub>-cyclin D 复合物结合, 而使 CDK<sub>4</sub> 激活功能丧失, 从而使细胞生长停滞。实验证明, p<sup>16</sup> 基因在多种肿瘤标本及细胞系中有改变, 改变形式有缺失、重排、点突变、甲基化。另外, 还发现在肿瘤细胞中 p<sup>16</sup> 基因表达水平下降<sup>[1]</sup>。

本实验检测 34 例 NHL 标本, 结果发现 4 例

NHL 有 MTS1/p<sup>16</sup> Exon2 缺失, 缺失率 11.8% (4/34)。其中 8 例 T-cell NHL 中有 1 例存在 MTS1/p<sup>16</sup> Exon2 缺失, 缺失率为 12.5% (1/8), 21 例 B-cell NHL 中有 3 例存在 MTS1/p<sup>16</sup> Exon2 缺失, 缺失率为 14.3% (3/21)。在人类的造血系统肿瘤中存在 MTS1/p<sup>16</sup> 基因的缺失和突变, 不同肿瘤 MTS1/p<sup>16</sup> 失活的频率不一。文献报道, p<sup>16</sup> 基因缺失率在 NHL 中为 2.5%~13%<sup>[4]</sup>。在恶性度高的 NHL 如弥漫性大 B 细胞 NHL 及混合性 T 细胞 NHL 中比率较高。Ogawa<sup>[5]</sup> 等用 Southern 印迹法对 410 例原发性血液系统肿瘤病人进行 MTS1/p<sup>16</sup> 基因缺失的检测, 发现有 59 例 p<sup>16</sup> 基因缺失, 59 例中有 54 例为淋巴系统肿瘤, 占淋巴系统肿瘤病人的 30%, 33 例 NHL 中有 4 例存在 p<sup>16</sup> gene 的纯合缺失, 缺失率为 12%。

本实验 4 例有 p<sup>16</sup> gene 纯合缺失的 NHL 中, 其中 3 例临床分期为 IV<sub>B</sub> 期, 1 例为 III<sub>B</sub> 期, 均为高度恶性期, 这提示 p<sup>16</sup> 基因失活可能出现于 NHL 的相对较晚期, MTS1/p<sup>16</sup> 基因的缺失有可能使肿瘤细胞获得生长的优势, 恶性程度增加, 与疾病的进展有较为密切的关系<sup>[6]</sup>。本文研究表明, p<sup>16</sup> 基因缺失

与 NHL 的发生发展可能有关。

#### 参考文献:

- [1] 傅松滨. 多重肿瘤抑制基因 MTS1/p<sup>16</sup>CDK4 I 与细胞周期调节. 国外医学遗传学分册, 1996, 19: 6
- [2] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著, 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996, 465~467
- [3] Kamb A, Gruis NA, Feldhaus JW, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994, 264: 436
- [4] Gombart AF, Morosetti R, Miller CW, et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase inhibitor genes p<sup>16</sup> INK<sub>4</sub>A and p<sup>16</sup> INK<sub>4</sub>B in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1995, 86: 1534
- [5] Ogawa S, Hangaiishi A, Miyawaki S, et al. Loss of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (p<sup>16</sup>: MTS1) gene is frequent in and highly specific to lymphoid tumors in primary human hematopoietic malignancies. *Blood*, 1995, 86: 1548
- [6] Stranks G, Height S, E, Mitchell P, et al. Deletions and rearrangement of CDKN<sub>2</sub> in lymphoid malignancy. *Blood*, 1995, 85: 893

## Deletions of MTS1/p<sup>16</sup> Gene in Lymphoma

HUANG Yu, QIN Xue, BI Shen-jin, et al

The first affiliated hospital, Guangxi medical University, Nanlin 530021

**Abstract:** **Objective** To investigate the alteration of MTS1/p<sup>16</sup> gene in lymphoma. **Methods** A total of 34 non-Hodgkin's lymphoma and 15 controls DNA specimens were examined for homozygous deletion of MTS1/p<sup>16</sup> gene Exon2 by Differential PCR. **Results** The results showed that 4 of 34 non-Hodgkin's lymphoma DNA specimens were found the deletion of MTS1/p<sup>16</sup> gene Exon2, with a 11.8% (4/34) MTS1/p<sup>16</sup> gene EXon2 deletion rate. **Conclusion** The results suggest that MTS1/p<sup>16</sup> gene alterations may play a role in the progression of non-Hodgkin's lymphoma.

**Key words:** Non-Hodgkin's lymphoma; MTS1/p<sup>16</sup> gene; Gene deletion

(上接 358 页)

in the cell and sub-cell level were similar, which were significantly higher than in the normal tissue. The higher of the malignant degree, the stronger of the  $\beta$ -Glucuronidase expression in cancer tissue ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion** The increasing of  $\beta$ -Glucuronidase level in the hepatic carcinoma tissue was accompanied by the increasing of metabolize of the cancer cell. As a enzymatic marker in vivo,  $\beta$ -Glucuronidase detection has its clinical significance to the diagnosis of hepatic carcinoma and the determination of malignant degree.

**Key words:**  $\beta$ -Glucuronidase; Hepatic cell carcinoma; Immunohistochemistry; Immunoelectroscopy