

恶性淋巴瘤中 MTS1 /p¹⁶ 基因的缺失

黄 毓 秦 雪 闭慎金 黄天衡

摘 要：目的 研究 MTS1 /p¹⁶ 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 p¹⁶ gene Exon2 纯合子缺失。结果 34 例 NHL 中有 4 例有 p¹⁶ gene Exon2 纯合子缺失。结论 MTS1 /p¹⁶ 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 /p¹⁶ 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 /p¹⁶ 基因在许多肿瘤细胞和肿瘤组织中有缺失和点突变^[1]，但有关 MTS1 /p¹⁶ 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 p¹⁶ 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 NHL 8 例，B-cell NHL 21 例，非 T 非 B NHL 5 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》^[2] 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 p¹⁶ gene 基因组序列^[3]，在第二外显子两侧设计一对扩增引物（PCR 产物长度 480bp）。

PS₁ 5'-GGA AAT TGG AAA CTG GAA GC-3'

PS₂ 5'-TCT GAC CTT TGG AAG CTC T-3'。

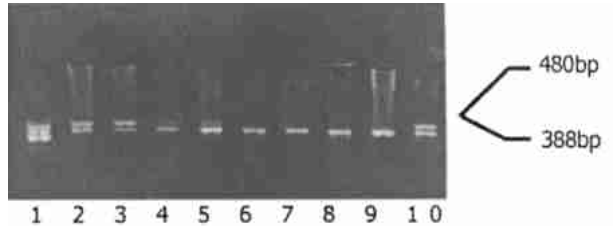
引物由中国科学院上海生化所合成。

1.4 PCR 扩增 在扩增 p¹⁶ 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，200μmol/L dNTP，1μmol/L primers，200ng 模板 DNA，Taq DNA2.5u，加 H₂O 至终体积 50μl，在 DNA 扩增仪上进行如下循环：

95℃ 预变性 5'，95℃ 1，58℃ 1'，72℃ 1'30"，30 个循环。取 5μl PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶（加 EB0.5ug/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 /p¹⁶ Exon2 缺失率为 11.8%（4/34），其中 8 例 T-cell NHL 标本有 1 例 p¹⁶ Exon2 缺失，缺失率为 12.5%（1/8），21 例 B cell NHL 标本有 3 例 p¹⁶ 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 /p¹⁶ gene Exon2 纯合子，PCR 扩增 MTS1 /p¹⁶ 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. 2~10 为 NHL 血 DNA 标本，其中 6，7，8，9 为 MTS1 /p¹⁶ gene Exon2 纯合子缺失，即为扩增阴性，2，3，4，5，10 为扩增阳性。

3 讨论

MTS1 /p¹⁶ 是 CDK₄ 的抑制因子。CDK₄ 与 Cyclin D 结合后能使细胞周期进入 G₁ 期，而 p¹⁶ 蛋白能与 CDK₄-cyclin D 复合物结合，而使 CDK₄ 激活功能丧失，从而使细胞生长停滞。实验证明，p¹⁶ 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 p¹⁶ 基因表达水平下降^[1]。

本实验检测 34 例 NHL 标本，结果发现 4 例

NHL 有 MTS1/p¹⁶ Exon2 缺失, 缺失率 11.8% (4/34)。其中 8 例 T-ccl NHL 中有 1 例存在 MTS1/p¹⁶ Exon2 缺失, 缺失率为 12.5% (1/8), 21 例 B-ccl NHL 中有 3 例存在 MTS1/p¹⁶ 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/p¹⁶ 基因的缺失和突变, 不同肿瘤 MTS1/p¹⁶ 失活的频率不一。文献报道, p¹⁶ 基因缺失率在 NHL 中为 2.5%~13%^[4]。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^[5] 等用 Southern 印迹法对 410 例原发性血液系统肿瘤病人进行 MTS1/p¹⁶ 基因缺失的检测, 发现有 59 例 p¹⁶ 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 p¹⁶ gcnc 的纯合缺失, 缺失率为 12%。

本实验 4 例有 p¹⁶ gcnc 纯合缺失的 NHL 中, 其中 3 例临床分期为 IV_B 期, 1 例为 III_B 期, 均为高度恶性期, 这提示 p¹⁶ 基因失活可能出现于 NHL 的相对较晚期, MTS1/p¹⁶ 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^[6]。本文研究表明, p¹⁶ 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/p¹⁶CDK4 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 tyges. Science 1994, 264: 436

[4] Gombart AF, Morosetti R, Miller CW, et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase inhibitor genes p¹⁶ INK₄A and p¹⁶ INK₄B in non-Hodgkin's lymphomas. Blood 1995, 86, 1534

[5] Ogawa S, Hangaishi A, Miyawaki S, et al. Loss of the cyclin dependent kinase 4 inhibitor (p¹⁶: 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 CDKN₂ in lymphoid malignancy. Blood, 1995, 85, 893

Deletions of MTS1/p¹⁶ 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/p¹⁶ gene in lymphoma. **Methods** A total of 34 non-Hodgkin's lymphoma and 15 controls DNA specimens were examined for homozygous deletion of MTS1/p¹⁶ 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/p¹⁶ gene Exon2, with a 11.8% (4/34) MTS1/p¹⁶ gene EXon2 deletion rate. **Conclusion** The results suggest that MTS1/p¹⁶ gene alterations may play a role in the progression of non-Hodgkin's lymphoma.

Key words: Non-Hodgkin's lymphoma; MTS1/p¹⁶ 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 β-Glucuronidase expression in cancer tissue (P<0.01). **Conclusion** The increasing of β-Glucuronidase level in the hepatic carcinoma tissue was accompanied by the increasing of metabolize of the cancer cell. As a enzymatic marker in vivo, β-Glucuronidase detection has its clinical significance to the diagnosis of hepatic carcinoma and the determination of malignant degree.

Key words: β-Glucuronidase; Hepatic cell carcinoma; Immunohistochemistry; Immunoelectroscopy