

骨肉瘤 p21^{WAF1/CIP1} 基因 DNA 序列分析及其 mRNA、p21 蛋白表达

张春林^{1,2}, 廖威明¹, 李佛保¹, 曾炳芳², 曾益新³

(1. 中山大学附属第一医院骨科, 广东 广州 510080; 2. 上海交通大学附属第六人民医院骨科, 上海 200233;

3. 中山大学附属肿瘤医院, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】通过检测骨肉瘤组织中 p21^{WAF1/CIP1} 基因的表达及其 DNA 序列变化, 探讨它们与骨肉瘤生物学特性之间的关系及其对预后的评价。【方法】采用原位杂交及免疫组化法检测 45 例人骨肉瘤 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 及 p21 蛋白的表达。采用 PCR-SSCP 方法检测骨肉瘤 p21^{WAF1/CIP1} 基因 DNA 变化。采用双脱氧核苷酸末端终止法进行 DNA 的直接测序。【结果】① p21 蛋白表达阳性率在骨肉瘤中为 18% (8/45); ② p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 表达阳性率在骨肉瘤中为 42% (19/45); ③ DNA 序列分析结果显示, 骨肉瘤中 p21^{WAF1/CIP1} 基因第三外显子 (exon3) 的 cDNA 全长序列的 609 位碱基处发生 C→T 改变, 发生率为 47% (17/36)。exon2a 的 cDNA 全长序列的 187 位、303 位碱基处发生 G→T 改变, 发生率为 6% (2/36)。exon2b 的 cDNA 全长序列的 522 位碱基处发生 G→A 改变, 发生率为 2.7% (1/36)。【结论】①随着骨肉瘤恶性度的升高, p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 及 p21 蛋白的表达下降。② p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 在骨肉瘤中的表达对预后有影响。③本实验对中国人群骨肉瘤 p21^{WAF1/CIP1} 基因 DNA 多态性位点进行了新的定位, 这些位点可能会对今后对该基因的研究提供有意义的参考。

关键词: p21^{WAF1/CIP1} 基因; 骨肉瘤; 原位杂交; 聚合酶链反应; 单链构象多态性; 序列分析, DNA

中图分类号: R738.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)05-445-06

p21^{WAF1/CIP1} Gene DNA Sequencing and Its mRNA and p21 Protein Expression in Human Osteosarcoma

ZHANG Chun-lin^{1,2}, LIAO Wei-ming¹, LI Fo-bao¹, ZENG Bing-fang², ZENG Yi-xin³

(1. Department of Orthopedics Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Department of Orthopedics Surgery, The Sixth Affiliated Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China;

3. The Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the expression of p21^{WAF1/CIP1} gene in human osteosarcoma and p21^{WAF1/CIP1} gene DNA sequence alteration and their relationships with the biological characteristic and evaluation of clinical prognosis. 【Methods】The p21^{WAF1/CIP1} gene mRNA and p21 protein were investigated by using *in situ* hybridization and immunohistochemistry respectively in 45 cases with osteosarcoma. p21^{WAF1/CIP1} gene DNA alteration in osteosarcoma specimens was examined by using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) silver staining. The PCR products with aberrantly migrating SSCP bands were directly sequenced by using the dideoxy chain termination method directly. 【Results】① The positive rate of p21 protein in osteosarcoma was 18% (8/45); the positive rate of p21^{WAF1/CIP1} mRNA expression in osteosarcoma was 42% (19/45). ② The p21^{WAF1/CIP1} gene DNA sequencing of amplified production showed C→T change in the cDNA sequence in position 609th of human osteosarcoma p21^{WAF1/CIP1} gene exon3. The incidence was 47% (17/36). The changes of G→T in position 187th and 303rd were found in exon2a,

收稿日期 2003-02-01

基金项目: 卫生部科学研究基金资助项目(1966-37)

作者简介: 张春林 (1972 -) 男, 江西信丰人, 博士生, 主治医师, 李佛保 教授, 导师. E-mail: zhchllige@21cn.com

and the incidence was 6% (2/36) the change of G→A in position 522th was demonstrated, and the incidence was 2% (1/36). **【Conclusion】** ① Accompanying with the increase of malignancy, and the expression of p21^{WAF1/CIP1} mRNA and p21 protein in osteosarcoma tend to decrease. ② The expression of p21^{WAF1/CIP1} gene mRNA might influence the prognosis of human osteosarcoma. ③ The research defines the novel location of p21^{WAF1/CIP1} gene polymorphism of the osteosarcoma patients in Chinese population, and these locations can provide meaningful references for the further research of p21^{WAF1/CIP1} gene.

Key words: p21^{WAF1/CIP1} gene ; osteosarcoma ; in situ hybridization ; polymerase chain reaction ; polymorphism, single-stranded conformational ; DNA sequencing

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(5): 445 – 450]

一个名为野生型 p53 激动片段 1—p21^{WAF1/CIP1} 的基因 (又叫做 p21, WAF1, CIP1 or SDI1), 它直接受 p53 调节, 自身也可以在细胞培养中抑制肿瘤细胞的生长^[1, 2]。诱导 p21^{WAF1/CIP1} 基因的表达, 可能是使有 DNA 受损的细胞停止生长, 以便修复受损的 DNA 或者是使细胞发生凋亡的重要方式。基于 p21^{WAF1/CIP1} 基因的突变和基因表达的变化在肿瘤的发生、发展过程中 (尤其是在骨肉瘤中) 起作用这一假说, 我们研究了 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA, p21 蛋白和 DNA 序列变化, 结合临床随访和临床病理资料, 对 p21^{WAF1/CIP1} 基因与骨肉瘤生物学特性及临床预后的关系进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验研究 45 例骨肉瘤实体瘤标本、10 例骨纤维结构不良标本和 50 例正常人血标本。来源: 45 例骨肉瘤标本、10 例骨纤维结构不良标本来自 1993 – 1998 年中山医科大学附属第一医院手术切除标本; 50 例正常人血标本来自中山大学法医系物证教研室。每次实验前取 0.1 g 骨肉瘤组织, 在严格的无菌条件下进行, 并用焦磷酸二乙酸酯 (DEPC) 水处理以防止 RNase 的污染。将实体瘤标本进行石蜡包埋和切片。再次经病理诊断后, 开始进行实验。按照前人已经采用的方法^[3]抽提基因组 DNA, 用于 PCR-SSCP 及 DNA 测序。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法研究 p21 蛋白的表达 采用免疫组织化学 LSAB 法。一抗采用 p21 鼠抗人单克隆 IgG1 抗体 (Santa Cruz Corporation)。本实验采用 DAKO EnvisionTM + System, peroxidase (DAB) Kit (DAKO Corporation) 免疫组织化学染色试剂

盒。

1.2.2 原位杂交方法研究 p21^{WAF1/CIP1} mRNA 的表达 原位杂交方法采用前人报道的方法^[4]。生物素寡核苷酸标记的 cRNA 探针由北京大学病理学教研室提供。

1.2.3 PCR-SSCP 分析法初步筛查 p21^{WAF1/CIP1} DNA 突变 PCR-SSCP 分析法采用前人报道的方法并加以改良^[5]。p21^{WAF1/CIP1} 基因内含子 - 外显子序列边界的寡核苷酸引物被用来扩增 p21^{WAF1/CIP1} 基因的第二外显子和第三外显子, 因为 p21^{WAF1/CIP1} 基因开放读写框仅仅包括这两个外显子^[1]。这些引物的序列是: exon2a, 338 bp: primer 1, 5' -CATAGTGTCTAATCTCCGCCGT-3', primer 2, 5' -GCCTGCCTCCTCCCAACTCATC-3'; exon2b, 318 bp: primer 3, 5' -TGCCCAAGCTCTACCTTCCAC-3', primer 4: 5' -AGCCCTTGGACCATGGATTCTG-3'; exon3, 212 bp: primer 5: 5' -GTCTTCCTCAGTTGGGAGCTC-3', primer 6: 5' -AGACACACAAA CTGAGACTAAG-3'。PCR 混合物包括 DNA 100 ng, 引物各 0.5 pmol/μL, 4 种脱氧核苷酸三磷酸盐 (250 μmol/L), Taq DNA 聚合酶 (0.05 U/μL) (GIBCO BRL Inc. Gaithersburg, MD) 溶于 20 μL 含 1.5 mmol/L MgCl₂ 的专用缓冲液。PCR 扩增程序为: 变性 40 s, 94 °C, 退火 30 s, 59 °C, 延伸 120 s, 72 °C。共 35 个循环。

1.2.4 PCR-扩增片段的序列分析 我们对 p21^{WAF1/CIP1} 基因的 PCR 扩增产物进行测序。选择在 SSCP 分析中有 DNA 条带迁移改变的样本, 采用前述方法重新扩增, 并且运用 TA 克隆系统 (Invitrogen, San Diego, CA) 进行微克隆, 然后采用标准的双脱氧法方法进行 DNA 序列分析^[6]。采用的测序酶是 α-35S Datp (NEN Research Products, Boston, MA)。测序仪器为 ABI PRISM 377XL, PE

Corporation)。同时, 正常人血的 p21^{WAF1/CIP1} 基因 exon2a, exon2b 和 exon3 被采用 PCR 方法扩增、微克隆和测序。

1.3 统计学方法

用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析, 计数资料两组间比较用 χ^2 检验, 生存分析采用 Kaplan-Meier 曲线 Log Rank 分析法。

2 结果

2.1 免疫组化

2.1.1 p21^{WAF1/CIP1} 基因表达产物 p21 蛋白在骨肉瘤及骨纤维结构不良组织中的表达 ① 免疫组化阳性信号呈棕黄色, 主要分布在胞核 (图 1a, 1b); ② 45 例骨肉瘤组织中 p21 蛋白阳性 8 例, 阳性率 17.7%; 10 例骨纤维结构不良中 p21 蛋白阳性 5 例, 阳性率为 50%。两者阳性率之间的差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.70$, $P < 0.05$)。

2.1.2 p21 蛋白表达与骨肉瘤临床病理指标的关系 统计分析 p21 蛋白表达与骨肉瘤临床病理指标 (包括组织分化、病理分型、有无肺转移、Enneking 临床分期等) 的关系后, 仅发现骨肉瘤组织中高/中分化组与低分化组的 p21 蛋白阳性表达率之间的差异有统计学意义。高/中分化组的 p21 蛋白阳性表达率 40% (4/10) 高于低分化组的 p21 蛋白阳性表达率 11.4% (4/35), 两者阳性率之间的差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.344$, $P < 0.05$)。

2.2 原位杂交

2.2.1 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 在骨肉瘤及骨纤维结构不良组织中的表达 ① 原位杂交阳性信号呈棕色颗粒或团块, 主要分布在胞浆, 少数分布于核内 (图 1c, 1d); ② 原位杂交结果显示, p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 在 45 例骨肉瘤中有 19 例阳性表达, 阳性率为 42%; 在 10 例骨纤维结构不良中有 8 例阳性表达, 阳性率为 80%。两者阳性率之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

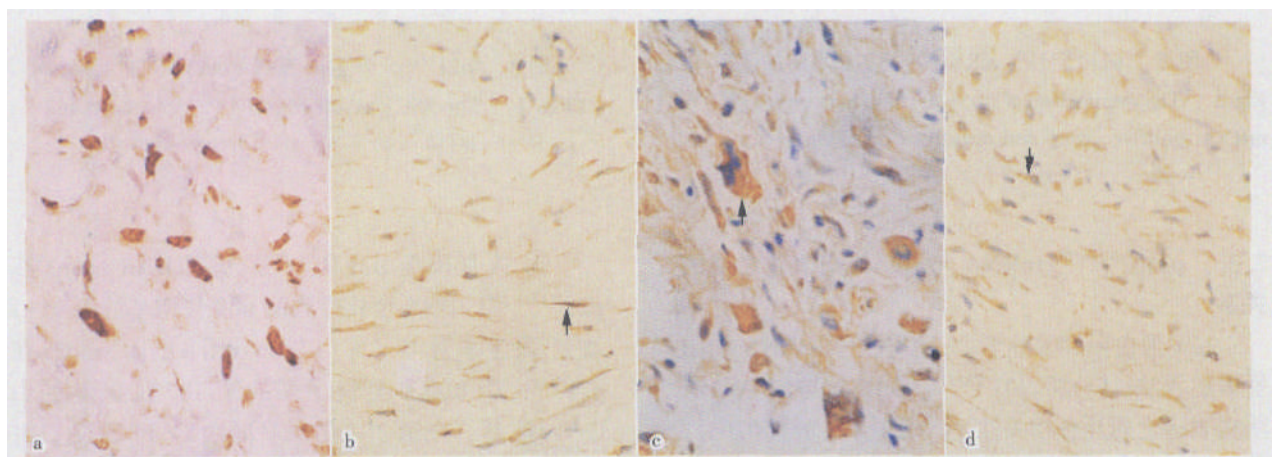


图1 骨肉瘤组织与骨纤维不良维组中显示的 p21 蛋白和 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 阳性表达

Fig. 1 The positive expression of p21 protein in osteosarcoma and p21^{WAF1/CIP1} gene mRNA in osteosarcoma

a. The positive expression of p21 protein in osteosarcoma; b. The positive expression of p21 protein in fibrous dysplasia of bone; c. The positive expression of p21^{WAF1/CIP1} mRNA in osteosarcoma; d. The positive expression of p21^{WAF1/CIP1} mRNA in fibrous dysplasia of bone. LSAB $\times 400$

2.2.2 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 表达与骨肉瘤临床病理指标的关系 统计分析 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 表达与骨肉瘤临床病理指标 (包括组织分化、病理分型、有无肺转移、Enneking 临床分期等) 的关系后, 仅发现骨肉瘤组织中高/中分化组与低分化组的 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 阳性表达率之间的差异有统计学意义。高/中分化组的 p21 mRNA 阳性表达率 60% (6/10) 高于低分化组的 p21 mRNA 阳性表达率 37.1% (13/35), 两者阳性率之间的差异有统计学意义 ($\chi^2 = 20.6$, $P < 0.01$)。

2.2.3 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 与随访结果之间的关系 表 1 采用 Log Rank 方法分析, 表 1 结果见图 2。从表 1 的统计结果图 2 可以看到: 在术后任一生存时间点上作比较, p21^{WAF1/CIP1} mRNA 表达阳性者的生存率均高于 p21^{WAF1/CIP1} mRNA 表达阴性者的生存率。p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 表达阳性者术后生存时间与 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 表达阴性者术后生存时间之间的差异有显著性 ($\chi^2 = 4.28$, $P < 0.05$)。术后生存时间越长, p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 表达率越高。

表 1 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 表达与随访结果之间的关系

Table 1 The relationship between p21^{WAF1/CIP1} mRNA expression and the result of follow-up

<i>t</i> _{Interval} / (month)	Total death in the period	Number of censor	Number of beginning	Number of p21 ^{WAF1/CIP1} mRNA positive	Positive rate(%)
0 ~ 12	6	1	45	19	42
13 ~ 24	10	1	38	18	47
25 ~ 36	5	2	27	16	59
37 ~ 48	4	1	20	15	75
49 ~ 60	2	1	15	12	80

$\chi^2 = 4.28, P < 0.05$

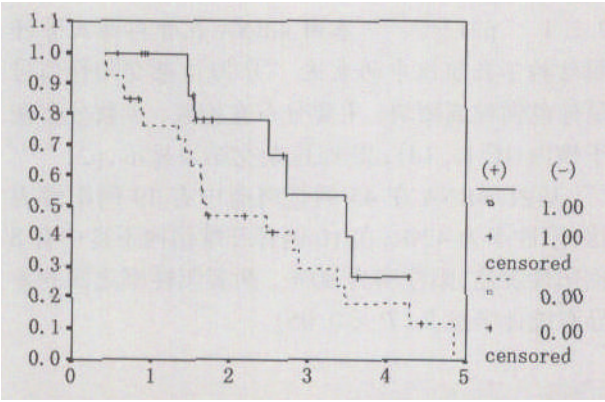


图 2 p21^{WAF1/CIP1} mRNA 与随访结果的关系

Fig. 2 The comparison of survival curve between p21^{WAF1/CIP1} mRNA positive group and negative expression group

(+) : positive; (-) : negative $\chi^2 = 4.28, P = 0.0386$

2.3 p21^{WAF1/CIP1} mRNA 与 p21 蛋白表达之间的关系

p21 蛋白阳性表达者, p21^{WAF1/CIP1} mRNA 均阳性表达。经统计分析, p21^{WAF1/CIP1} mRNA 与 p21^{WAF1} 蛋白表达之间具有相关性 ($\chi^2 = 17.80, P < 0.05$); 但是, p21^{WAF1/CIP1} mRNA 阳性表达率 42% 远高于 p21 蛋白阳性表达率 18%, p21^{WAF1/CIP1} mRNA 较 p21 蛋白敏感, 二者阳性率之间的差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.40, P < 0.05$)。

2.4 PCR-SSCP 检测

① PCR 扩增产物 (exon2a, exon2b, exon3) 在琼脂糖电泳中的条带扩增成功; ② 通过对 36 例人类骨肉瘤标本以及 10 例正常人血进行 PCR 扩增 p21^{WAF1/CIP1} 基因的编码区域, 并进行 SSCP 分析。我们发现在人骨肉瘤 exon2 和 exon3 中有异常泳动带的变化出现 (图 3)。外显子 exon2a 出现异常泳动带 4 例 (11%); exon2b 出现异常泳动带 1 例 (2%); exon3 出现异常泳动带 16 例 (44.4%)。

2.5 DNA 序列分析

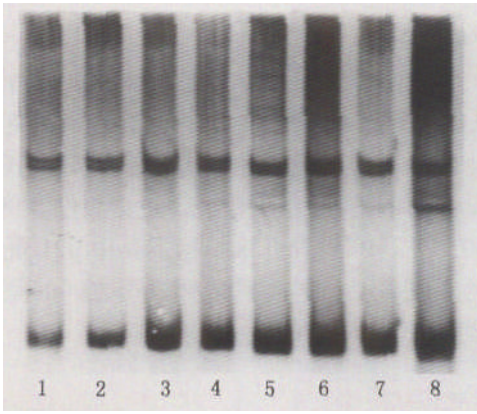


图 3 p21^{WAF1/CIP1} gene 基因 exon3 SSCP 结果

Fig. 3 The SSCP result of p21^{WAF1/CIP1} gene exon3

1 ~ 6 : Normal strap; 7 : Abnormal electrophoresis strap

① 人骨肉瘤 p21^{WAF1/CIP1} 基因 DNA exon3 在 p21^{WAF1/CIP1} cDNA 全长序列的 609 位碱基处由 C→T 改变, 发生率为 47.2% (17/36) (图 4); ② exon2a 在 p21^{WAF1/CIP1} cDNA 全长序列的第 187 位碱基处由 C→A 改变, 在第 303 位碱基处由 G→T 改变, 发生率为 5.4% (2/36); ③ exon2b 在 p21^{WAF1/CIP1} cDNA 全长序列第 522 位碱基处由 C→A 改变, 发生率为 2.7% (1/36); ④ 正常人血的 DNA 标本在

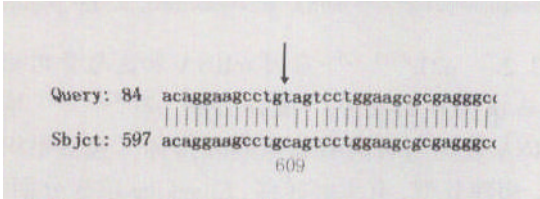


图 4 人骨肉瘤 p21^{WAF1/CIP1} 基因 DNA exon3 序列 Blast 两两比对

Fig. 4 The blast search result of p21^{WAF1/CIP1} gene DNA exon3 sequence of osteosarcoma

The substitution of C→T occur on the 609th base position of p21^{WAF1/CIP1} gene cDNA (arrow); Query: acquired by DNA sequencing method; Sbjct: consult in GeneBank

p21^{WAF1/CIP1} cDNA 全长序列的第 609 位碱基处发生 C→T 的改变,发生率为 80% (8/10)。

3 讨论

p21^{WAF1/CIP1} 基因是 1993 年底由 Harper 及 El Deiry 发现的一种抑癌基因^[1, 2], 其机制在于 p21^{WAF1/CIP1} 基因的表达产物——p21 蛋白是细胞周期蛋白-细胞周期蛋白依赖性激酶复合物抑制剂, 通过这一作用达到抑制细胞的无限增殖。p21^{WAF1/CIP1} 基因定位于染色体的 6p21.2, 其编码蛋白相对分子质量 $M_r = 21 \times 10^3$ 。近年来的研究显示细胞周期蛋白及其相关的细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶在控制细胞周期中起着十分重要的作用^[7]。由 p53 活化的 p21^{WAF1/CIP1} (Cip1, SDI1, Pic1, mda-6, p21) 基因, 通过抑制细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶, 导致了细胞周期的抑制^[1-8]。同时, p21^{WAF1/CIP1} 也是基因调节的直接参与者 (包括: 细胞生长抑制、衰老、老化)^[7, 8]。p21^{WAF1/CIP1} 基因产物可能是一种结合 p53 的重要成分, 并对细胞周期进行调控。这样就导致细胞生长的抑制。因此, p21^{WAF1/CIP1} 基因的突变可能会导致细胞从这些负性生长调控中解除, 使具有正常 p53 的细胞发生转变。这种在 DNA 破坏后经 p53 通路诱导的细胞生长抑制的改变, 可能导致了肿瘤细胞对化疗的耐药性。

p21^{WAF1/CIP1} 基因对肿瘤生长的抑制作用是确切的, 这在最近的实验中得到了证实。Ramirez 等^[9]将 p21^{WAF1/CIP1} 和 p53 转染卵巢癌细胞, 观察到了卵巢癌细胞生长的抑制; Tvrdik 等^[10]观察到 p21^{WAF1} 抑制淋巴瘤细胞的生长。近年来, 研究者检测了 p21^{WAF1/CIP1} 基因在各种疾病中的表达情况, 譬如乳腺癌^[11]、喉乳头状瘤^[12]、胃癌^[13]、肾移植等^[14]。然而, 关于 p21^{WAF1/CIP1} 基因在人骨肉瘤中表达的情况及其 DNA 序列分析的情况还鲜见报道。本研究显示, 高、中分化骨肉瘤组 p21 蛋白阳性表达率明显高于低分化骨肉瘤组 p21 蛋白阳性表达率, 它提示 p21 蛋白的表达可能与骨肉瘤的分化相关。此结果从一个侧面显示了 p21 蛋白的肿瘤抑制作用。应用原位杂交技术, 我们检测了 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 在骨肉瘤的表达情况, 发现 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 的表达率为 42%, 明显低于骨纤维结构不良的阳性表达率 80%。骨肉瘤恶

性程度越高者, 则 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 阳性表达率越低。我们认为, 肿瘤细胞分化与 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 表达密切相关, 提示 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 表达的减弱可以导致细胞增殖失去有效监控, 从而导致肿瘤细胞恶性表型的增加。通过随访 45 例骨肉瘤患者, 发现术后生存时间越长者其 p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 表达率越高。我们认为, p21^{WAF1/CIP1} 基因 mRNA 的表达, 发挥了 p21^{WAF1/CIP1} 基因的抑癌作用。从而揭示了 p21^{WAF1/CIP1} 基因表达与骨肉瘤患者临床预后之间存在密切相关性, 为今后将 p21^{WAF1/CIP1} 基因的检测应用于临床作为对患者预后评价的一个指标作了初步的探索。此外, 有研究表明: 肺癌中 p21 (WAF1) 和 p53 蛋白的表达能够作为有显著意义的预后指标^[15], p21 蛋白表达与无淋巴结转移的直肠癌的 5 年生存率相关^[16]; 但也有观点认为: p21 不受 p53 调节, p21 表达对乳腺癌患者的预后意义不大^[17]。

在研究了 p21^{WAF1/CIP1} 基因及其蛋白质和 mRNA 水平的表达情况, 以及与临床病理指标和术后生存时间的关系后, 为了进一步阐明 p21^{WAF1/CIP1} 基因在骨肉瘤中表达变化的本质。我们采用“PCR-SSCP-DNA 直接测序方法”, 对 p21^{WAF1/CIP1} 基因 DNA 水平的变化情况进行了检测。本试验首次报告黄种人 p21^{WAF1/CIP1} 基因 DNA 多态性的定位在于 exon3 第 609 位碱基处由 C→T 改变, 不同于国外报道的白种人的 exon3 的第 509 位碱基由 C→T 改变和 exon2 的第 31 位碱基的改变^[18]。此外, exon2a 定位在 cDNA 第 302 位碱基处 G→T 改变, exon2b 定位在 cDNA 第 522 位碱基处 G→A 改变, 以前未见报道; 这也是我们检测到 p21 基因新的多态性, 但均与骨肉瘤的发生发展不相关。本实验对中国人群骨肉瘤中的 p21^{WAF1/CIP1} 基因的 DNA 多态性位点进行了新的定位, 这些位点可能会对今后对该基因的研究提供有意义的参考。在对 36 例人骨肉瘤和 10 例正常人血的研究中未发现 p21^{WAF1/CIP1} 基因 DNA 的突变, 提示 p53 基因可能激活了其他关键的肿瘤抑制通路, 或者可能是细胞周期机制中的转换因素发生混乱, 譬如细胞周期蛋白或细胞周期蛋白依赖性激酶的异常表达^[19]。另外, DNA 受损后 p21 蛋白表达的诱导缺失, 可能会导致在某些肿瘤中的 p53 通路的阻滞和缺失^[8]。

为什么没有发生 p21^{WAF1/CIP1} 基因的突变呢? 因为 p21^{WAF1/CIP1} 基因是一个广泛的细胞周期蛋白

依赖性激酶 (cyclin-dependent kinases, CDKs) 抑制剂。可能 p21^{WAF1/CIP1} 基因的突变和失活对细胞来说都是灾难性的, 它将导致细胞的死亡。p21^{WAF1/CIP1} 基因编码区域的突变在大量的人类肿瘤中没有检测到, 大多数肿瘤有正常的 p53 基因, 这提示 p21^{WAF1/CIP1} 基因的变化, 一般是由非直接的, 通过 p53 突变, 而非通过其内源性的 p21^{WAF1/CIP1} 基因自身的突变来实现^[18]。进一步说, p21^{WAF1/CIP1} 突变可能表现为一种肿瘤的亚型, 而这种亚型, 我们暂时还无法检测到。例如, 已知道的人类第六号染色体短臂和野生型 p53 的缺失, 以及虽然没有 p53 的突变, 但是在遭受 DNA 的破坏后却没有 G1 期的阻滞。可以想象的是, 人类染色体 6P 的缺失或 6P 一个等位基因的丢失, 可能导致 p53 诱导的 p21^{WAF1/CIP1} 基因缺失。更有可能的是 p21^{WAF1/CIP1} 基因蛋白水平和 mRNA 水平对于细胞周期发展的负性调节作用是更为至关重要的^[2]。

已有的研究为我们揭示了 p21^{WAF1/CIP1} 基因的诱导途径和生物学功能, p21^{WAF1/CIP1} 基因在 p53 的抑癌过程中所起的不可缺少的重要作用已得到了证实^[1]。我们将进一步研究, 将 p21^{WAF1/CIP1} 基因转染骨肉瘤细胞株, 以探索 p21^{WAF1/CIP1} 基因使骨肉瘤细胞发生恶性逆转的可能性。

参考文献:

- [1] el-Deiry W S, Tokino T, Velculescu V E, *et al.* WAF1 a potential mediator of p53 tumor suppression[J]. *Cell*, 1993, 75(4): 817-25.
- [2] Harper J W, Adain G R, Wei N, *et al.* The P21 cdk-interacting protein cip1 is a potent inhibition of G1 cyclin-dependent kinases [J]. *Cell*, 1993, 75(4): 805-16.
- [3] Wilczynski S P, Bergen S, Walker J, *et al.* Human papillomaviruses and cervical cancer: analysis of histopathologic features associated with different viral types. [J]. *Human Pathol*, 1988, 19(6): 697-704.
- [4] 苏慧慈. 原位杂交 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 59-64.
- [5] Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA[J]. *PCR Methods Appl*, 1991, 1(1): 34-48.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning. A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor. [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 629-40.
- [7] Weinberg W C, Denning M F. P21Waf1 control of epithelial cell cycle and cell fate[J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002, 13(6): 453-64.
- [8] Kester H A, Sonneveld E, van der Saag P T, *et al.* Prolonged progestin treatment induces the promoter of CDK inhibitor p21 Cip1, Waf1 through activation of p53 in human breast and endometrial tumor cells[J]. *Exp Cell Res*, 2003, 284(2): 264-73.
- [9] Ramirez P T, Gershenson D M, Tortolero Luna G. Expression of cell-cycle mediators in ovarian cancer cells after transfection with p16(INK4a), p21(WAF1/Cip-1), and p53[J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 83(3): 543-8.
- [10] Tvrdik D, Djaborkhel R, Nagy A, *et al.* Cyclin D-cdk6 complex is targeted by p21(WAF) in growth-arrested lymphoma cells[J]. *J Struct Biol*, 2002, 140(1-3): 49-56.
- [11] Winters Z E, Hunt N C, Bradburn M J, *et al.* Subcellular localisation of cyclin B, Cdc2 and p21(WAF1/CIP1) in breast cancer association with prognosis[J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(18): 2405-12.
- [12] Erdamar B, Keles N, Kaur A, *et al.* Expression of the the cyclin-kinase inhibitors p21(WAF1) and p27(Kip1) and the p53 tumor suppressor genes in adult-onset laryngeal papillomas[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2002, 259(10): 516-20.
- [13] Baldus S E, Schneider P M, Monig S P. p21/waf1/cip1 in gastric cancer: associations with histopathological subtypes, lymphonodal metastasis, prognosis and p53 status [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2001, 36(9): 975-80.
- [14] Chkhotua A B, Altamari A, Gabusi E, *et al.* Increased expression of p21 (WAF1/CIP1) cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor gene in chronic allograft nephropathy correlates with the number of acute rejection episodes[J]. *Transpl Int*, 2003, 16(8): 502-6.
- [15] 张 晖, 卢 方, 岳 文, 等. P53 蛋白和 P21 (WAF1) 在非小细胞肺癌的表达及其临床意义 [J]. *中华病理杂志* 2000, 29(5) 328-30.
- [16] Schwandner O, Bruch H P, Broll R. Prognostic significance of p21 and p27 protein, apoptosis, clinical and histologic factors in rectal cancer without lymph node metastases[J]. *Eur Surg Res*, 2002, 34(6): 389-96.
- [17] Pellikainen M J, Pekola T T, Ropponen K M, *et al.* p21WAF1 expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation, and prognosis[J]. *J Clin Pathol*, 2003, 56(3): 214-20.
- [18] Shiohara M, El Deiry W S, Wada M, *et al.* Absence of WAF1 mutation in a variety of human malignancies[J]. *Blood*, 1994, 84(11): 3781-4.
- [19] Kralj M, Husnjak K, Korbler T, *et al.* Endogenous p21 (WAF1/CIP1) status predicts the response of human tumor cells to wild-type p53 and p21(WAF1/CIP1) overexpression[J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(6): 457-67.

(编辑 张敏瑞)