

# 人前列腺增生症中 CDKN2 基因 CpG 岛异常甲基化

邱启裕<sup>1</sup>, 高新<sup>1</sup>, 梅 骅<sup>1</sup>, Lilly Zhang<sup>2</sup>, 姚学军<sup>3</sup>

(1. 中山医科大学附属第三医院泌尿外科, 广东 广州 510630; 2. 美国贝勒生殖医学研究中心, 美国 德克萨斯 75246; 3. 湖北医科大学病毒所, 湖北 武汉 430071)

**摘要:**【目的】探讨前列腺增生症(BPH)与 CDKN2 基因 5'端 CpG 岛异常甲基化之间的关系。【方法】用 PCR-甲基化检测法检测 38 例 BPH 中 CDKN2 基因  $\alpha, \beta$  型外显子 1 的甲基化情况。【结果】38 例 BPH 标本中 16 例(42.1%)有 CDKN2 基因 CpG 岛异常甲基化, 甲基化序列主要为 CmCGG 和 CCmCGGG。【结论】CDKN2 基因 CpG 岛异常甲基化是其在 BPH 中的主要失活机制, 参与 BPH 的发生发展。

**关键词:** 前列腺增生症/遗传学; CDKN2 基因; 甲基化; 失活

中图分类号: R697.32 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0095-03

## Hypermethylation of the CDKN2 Gene in Human Benign Prostatic Hyperplasia

QIU Qi-yu<sup>1</sup>, GAO Xin<sup>1</sup>, MEI Hua<sup>1</sup>, Lilly ZHANG<sup>2</sup>, YAO Xue-jun<sup>3</sup>

(1. Department of Urology, Third Affiliated Hospital, Sun Yet-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630, China;  
2. Baylor Center For Reproductive Health, Texas 75246, U. S. A;  
3. Department of Virology, Hubei Medical University, Wuhan 430071, China)

**Abstract:** 【Objective】To study the relationship between inactivation of CDKN2 gene by *de novo* methylation and the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. 【Methods】The methylation status of DNA were analyzed by PCR-based methylation assay in 38 BPH cases. 【Results】*de novo* methylation of CDKN2 gene were detected in 16 (42.1%) of 38 patients, and the methylation sequences were CmCGG and CCmCGGG. 【Conclusion】It is suggested that *de novo* methylation is one of predominant mechanisms of inactivation of the CDKN2 gene and may be associated with the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia.

**Key words:** prostatic hyperplasia/genetics; CDKN2 gene; *de novo* methylation; inactivation

1994 年 Kamb 和 Beach 的研究小组发现在 9p21 区域有一个等位基因丢失和另一个等位基因的突变, 将此新克隆的基因称为 p16 基因, 又称为多肿瘤抑制基因, 后被人类基因组正式命名为 CDKN2 (cyclin dependent kinase inhibitor 2), 该基因是直接作用于细胞增殖周期而抑制细胞生长的基因<sup>[1]</sup>。前列腺增生症 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 的形成与其细胞的过度增殖有关, CDKN2 是直接作用于细胞增殖周期而抑制细胞生长的抑癌基因<sup>[1]</sup>, 作者在研究了该基因的突变缺失与

BPH 之间的关系后, 就 CDKN2 基因启动子区 5' CpG 岛异常甲基化与 BPH 的发病机制之间的关系作了进一步的研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 组织标本

38 例 BPH 标本为 1997 年 3 月—1999 年 12 月间湖北医科大学附属第二医院和黄石市中心医院手术切除标本, 术后均经病理学检查证实为

收稿日期: 2000-03-21

基金项目: 中国博士后基金资助项目(1999)

作者简介: 邱启裕(1963-), 男, 湖北武汉人, 医学博士, 副教授, 主要研究男科学疾病及泌尿系肿瘤。

BPH。标本在切除后 1 h 放入液氮中保存待用。

### 1.2 PCR-SSCP 分析

苯酚-氯仿/异戊醇法提取组织 DNA, 分光光度法测量 DNA 的含量。扩增 CDKN2 基因外显子 1、2, 引物序列、扩增、循环条件参见有关文献<sup>[1-3]</sup>。扩增产物经甲酰胺变性后, 在 PAGE 凝胶中电泳 300 V, 1.5 h, 硝酸银染色, 在干胶仪上干胶后保存。

### 1.3 PCR-甲基化检测法

为了检测 BPH 标本中 CDKN2 基因 5' CpG 岛甲基化的情况, 先用 20 U *Eco*R I 酶切(37 °C、1.5 h), 再分别用 40 U 的甲基化敏感酶(*Hpa* II 37 °C、*Sma* I 30 °C)、甲基化非敏感酶(*Msp* I 37 °C)完全消化 1 μg 标本 DNA 2 h, 各取消化后的 DNA 5 μL 为底物, 以 CDKN2 基因外显子 1 (包括 E1α 和 E1β) 的引物作 PCR 扩增, 扩增条件与前相同。结果在荧光下分析。

## 2 结果

### 2.1 PCR-SSCP 分析

对所有 PCR 扩增结果阳性的标本进行单链构象多态性(SSCP)电泳分析, 结果发现无一例标本出现异常泳动带, 说明这些 BPH 标本中 CDKN2 基因未发现突变和微小缺失。

### 2.2 CDKN2 基因异常甲基化分析

用 *Eco*R I 内切酶和甲基化敏感酶 *Hpa* II 和 *Sma* I 完全消化后, 在所有未甲基化的标本中可见到 0.4、0.6、0.9 和 4.3 kb 的片段, 如标本的此位点已被甲基化, 则只见到 4.3 kb 的片段。以 CDKN2 基因外显子 1 引物扩增消化后的 DNA, 如标本的外显子 1 未被甲基化, 则 PCR 无扩增产物; 如有甲基化则有 PCR 扩增产物。同时用 *Eco*R I 内切酶和甲基化非敏感酶 *Msp* I 消化组织 DNA 作为对照, 消化后作外显子 1 的 PCR 无扩增产物。

### 2.3 BPH 组织 CpG 岛异常甲基化情况

检测的 38 例 BPH 标本中有 16 例(42.1%)表现为 CDKN2 基因 CpG 岛异常甲基化(表 1)。其中外显子 E1α 甲基化为 6 例, 包括 *Hpa* II 和 *Sma* I 位点均甲基化的 2 例, 只 *Sma* I 位点甲基化的 4 例; 外显子 E1β 甲基化为 14 例(其中 4 例为 E1α 和 E1β 同时甲基化), 包括 *Hpa* II 位点甲基化的 2 例和 *Sma* I 位点甲基化的 12 例。这 16 例标本用甲

基化敏感酶消化后作 CDKN2 基因外显子 1 的扩增均有产物; 而用 *Msp* I 内切酶消化后作 PCR 均无扩增产物(图 1)。

表 1 38 例 BPH 中 CDKN2 基因的甲基化情况  
Table 1 Methylation status of CDKN2 gene in 38 BPH

CDKN2 gene	Methylation (%)	Non-Methylation (%)
E1α	6(15.8)	32(84.2)
E1β	14(36.8)	24(63.2)
E1α+ E1β	4(10.5)	34(89.5)
Total	16(42.1)	22(57.9)



图 1 BPH 组织 PCR-甲基化检测电泳

Fig. 1 Results of PCR-based methylation assays in BPH tissues

M: PCR Marker; 1, 3, 6 have *de novo* methylation. Their PCR-based methylation assay's productions is positive. 2, 4, 5, 7, 8 have not *de novo* methylation. Their PCR-based methylation assay's productions is negative.

## 3 讨论

### 3.1 DNA 甲基化与肿瘤的关系

DNA 甲基化是指胞嘧啶(cytosine, C)5 位碳和 6 位氮的腺嘌呤(adenine A)形成<sup>m5</sup>C 和<sup>m6</sup>A, 在哺乳动物中 DNA 的甲基化作用主要存在于 CG 之间, DNA 甲基化参与维持细胞表型和遗传的稳定性, 并以某种方式调节基因的转录作用<sup>[2]</sup>; 基因转录作用的能力与甲基化作用水平之间存在着负相关。肿瘤组织 DNA 常常发生异常甲基化作用, 尤其是与细胞生长分化有密切关系的癌基因和抑癌基因的甲基化改变均可引起一系列的生理和病理变化, 参与肿瘤的发生发展。DNA 的甲基化异常包括 DNA 低甲基化和高甲基化, 致癌因子一方面和 DNA 相互作用使癌基因的甲基丢失, 另一方面又可激发 DNA 的再甲基化作用使抑癌基因的某些 5'

端调控区 CpG 岛发生异常甲基化而导致该基因的失活<sup>[3, 4]</sup>。

### 3.2 CDKN2 基因在人 BPH 中的主要失活机制

CDKN2 基因是参与调节细胞周期 G1/S 检查点的肿瘤抑制基因, 其蛋白产物 p16 与 CDK4/6 结合抑制抑癌蛋白 RB 的磷酸化, 使细胞停滞在 G1 期, 阻止 DNA 的合成。p16 蛋白的失活则导致细胞无限制的生长引起肿瘤的发生。

本研究已检测了 CDKN2 基因在人 BPH 中的变异情况, 结果发现 CDKN2 基因纯合性缺失是其在 BPH 中的主要失活机制之一。本研究进一步检测了 CDKN2 基因 5' 端 CpG 岛异常甲基化的情况, 发现有 42.1% 的 BPH 存在 CDKN2 基因 CpG 岛异常甲基化, 说明 CDKN2 基因的甲基化亦是其在 BPH 中的主要失活机制之一, 可能导致 BPH 中 p16 蛋白表达的缺如而丧失正常的细胞增殖抑制功能, 参与 BPH 的形成。BPH 中异常甲基化的位点主要在 5' 端 CG 丰富区<sup>[5]</sup>, *Hpa* II 切割的位点为 CCGG, *Sma* I 切割的位点为 CCCGG, *Msp* I 切割的位点为 CCGG 和 CmCGG, 实验结果表明 BPH 中 CDKN2 基因甲基化的序列主要为 CmCGG 和 CCmCGGG。

PCR-甲基化检测法<sup>[6]</sup>的灵敏度高, 但可能由于酶切不完全而引起假阳性, 我们则用过量的酶量(每 1 μg DNA 用 40 U 酶)完全消化组织 DNA 来防止假阳性。

简言之, 本研究包括: ①首次检测了人 BPH 中 CDKN2 基因 5' 端 CpG 岛异常甲基化的情况; ②发现 42.1% (16/38) 的 BPH 中存在 CDKN2 基因异常甲基化, 认为 CpG 岛异常甲基化是 CDKN2 基因

在 BPH 中的主要失活机制; ③BPH 中 CDKN2 基因异常甲基化的序列主要为 CmCGG 和 CCmCGGG。

### 参考文献:

- [1] Kamb A, Gruis N A, Weaver-Feldhaus J, *et al*. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types [J]. *Science*, 1994, 264(15): 436.
- [2] Gonzalez-Zulueta M, Bender C M, Yang A S, *et al*. Methylation of 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing [J]. *Cancer Res* 1995, 55: 4531.
- [3] Herman JG, Merlo A, Mao L, *et al*. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers [J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 4525.
- [4] Costello J F, Berger M S, Huang H S, *et al*. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation [J]. *Cancer Res* 1996, 56: 2405.
- [5] Reed A L, Califano J, Cairns P, *et al*. High frequency of p16(CDKN2/MTS1/LNK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Res* 1996, 56: 3630.
- [6] Maesawa C, Tamura G, Nishizuka S, *et al*. Inactivation of the CDKN2 gene by homozygous deletion and *de novo* methylation is associated with advanced stage esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 3875.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 94 页)

- [3] Zhou X F, Cameron D, Rush R A. Endogenous neurotrophin-3 supports the survival of a subpopulation of sensory neurons in neonatal rat [J]. *Neuroscience*, 1998, 86(4): 1155.
- [4] 董志宏, 任惠民, 胡海涛, 等. 人神经营养索-3 成熟蛋白基因克隆及序列分析 [J]. *西安医科大学学报*, 1999, 20(4): 433.
- [5] 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1996. 845-849.
- [6] 姜泊, 张亚历, 周殿元, 主编. 分子生物学常用实验方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 88-89.
- [7] Martinez-Serrano A, Bjorklund A. *Ex vivo* nerve growth factor gene transfer to the basal forebrain in presymptomatic middle-aged rats prevents the development of cholinergic neuron atrophy and cognitive impairment during aging [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(4): 1858.
- [8] McDonald N Q, Hendrickson W A. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif [J]. *Cell*, 1993, 73(3): 421.

(编辑 刘清海)