

白血病中 P16基因突变的检测^①

李 巍^② 杜传书

(中山医科大学医学遗传教研室; 广州, 510089)

摘 要 用聚合酶链反应-单链构象多态性 (PCR-SSCP)、DNA直接测序和多重 PCR法,检测了 18例慢性粒细胞白血病 (CML), 1例 K562细胞株, 9例急性粒细胞性白血病 (AML), 6例急性淋巴细胞性白血病 (ALL), 2例多发性骨髓瘤 (MM)患者外周血 培养细胞 DNA中 P16基因的点突变和基因缺失。用 PCR-SSCP共筛选出 5例 CML中 P16基因的异常,突变率为 27.8% (5/18),对其中 1例外显子 2异常者经测序证实为第 151密码子 CCG→CGC的转换,导致 P_{Trp}→A_{Arg}的错义突变;并检出 1例 MM中 P16基因外显子 3的异常;受检的 ALL, AML, K562细胞株中,未检出突变。各病例中均未检出 p16基因的缺失。本文探讨了白血病中 p16基因突变的意义。

主题词 白血病 遗传学; 突变; 基因,抑制,肿瘤 遗传学; 序列分析, DNA

中图分类号 R 730

P16是一种新近发现的周期蛋白依赖激酶 (CDK)抑制物^[1],参与细胞周期的调节。P16的失活可导致生长失控而引发肿瘤。自 1993年 p16基因被克隆以来,已报道许多肿瘤细胞株或原发性肿瘤中存在 P16基因的缺失或突变,并认为 P16基因与 p53基因一样,也是一种抑癌基因。不少作者指出,白血病中 P16基因的改变主要表现为纯合或杂合性缺失,点突变较少见,且多分布于淋巴细胞性白血病^[2,3]。p16基因突变在粒细胞性白血病中的变化尚有争议。本研究利用聚合酶链反应-单链构象多态性 (PCR-SSCP),结合 DNA直接测序的方法检测了以粒细胞性白血病为主的 p16基因的点突变,并用多重 PCR(mPCR)法检测基因缺失,以探讨 P16基因的改变在白血病中的意义。

1 材料与方法

1.1 标本采集

慢性粒细胞性白血病 (CML) 18例,急性淋巴细胞性白血病 (ALL) 6例,急性粒细胞性白血病 (AML) 8例,多发性骨髓瘤 (MM) 2例,培养的 K562细胞株 1例共 35例为实验对象,健康体检者 4例作对照。分别采集 4 mL外周血或富集培养细胞进行实验。

1.2 DNA的提取

按常规方法进行^[7]。

1.3 P16基因突变筛查的 PCR-SSCP法

P16基因扩增引物序列、产物大小、退火温度见表 1

表 1 P16基因扩增引物、产物大小、退火温度

外显子	引物代号	引物序列 (5'→3')	产物大小 (bp)	退火温度 (°C)
E1	1A	TCTGCGGAGAGGGGGAGAGCAG	280	58
E1	1B	GCGCTACCTGATTCCAATTC		
E2	2A	ACAAGCTTCCTTCCGTCATG	243	60
E2	2C	CCAGGCA TCGCGCACGTCC A		
E2	2B	TTCCTGGACACGCTGG TGG T	242	60
E2	2D	TCTGAGCTTTGGAAGCTCTCAG		
E2	2A-2D		423	60
E3	3A	GGATGTTCCACACATCTTTG	189	52
E3	3B	ATGAAAAC TACGAAAGCGGG		

① CM B基金资助课题; ② 第一作者, 1966年出生,男,博士生

2.2 p16基因突变的直接测序结果

进一步对筛查出的 1例 SSCP异常样本 (L2)进行测序鉴定。2次独立进行的实验证实该例 P16基因的突变为 cDNA 第 446位 G→G 转换,导致密码子 151Pro→Arg 改变,见图 3(以 P16 2D反义引物作测序引物,凝胶直读为其互补链 3'→5'顺序)。

G A T C

	互补链
3'	5'
-T	A
T	A
C	G
C	G
A	T
G	C
G/C	C/G(446)
G	C
A	T
G	C
-T-	A
5'	3'

图 3 L2标本 DNA直接测序结果
以 2D为测序引物, P16基因序列为其互补链

图中突变点仍可见正常的 C碱基,表明此突变为杂合性抑或由于外周血中同时存在正常细胞之故。这种突变方式尚未见文献报道^[3]。其它 SSCP (+)标本尚有待于进一步测序证实。

2.3 p16基因缺失的检测

对 36例标本经 3重 PCR和 E2缺失检测法筛查,均未发现缺失标本,不排除缺失标本中因混有正常细胞而出现正常扩增带所致的假阴性。

3 讨论

P16基因是 1993年发现的 1种新的抑癌基因,定位于 9p21,有 3个外显子,分别长 150 bp(E1), 307 bp(E2), 11 bp(E3),编码 156个氨基酸的 P16蛋白。P16是一种 CDK抑制物,能与周期蛋白 D1-CDK4/6复合物结合,抑制 CDK对 Rb的磷酸化而阻遏细胞由 G1相进入 S相,从而参与细胞周期的

调控^[1]。对 P16的结构与功能关系的研究,发现其氨基酸序列中存在 4个锚蛋白(ankyrin)的重复序列,位于 E1和 E2的编码区,为蛋白间相互作用所必需^[8]。定点突变结果显示 4个锚蛋白之外的区域的缺失不影响 P16在体外实验中的活性;N端的 8个氨基酸和 C端第 136氨基酸后的序列的缺失对 P16的活性也无影响^[9]。

本文报道的第 151密码子的错义突变靠近 C端,不在锚蛋白区,可能对 P16的功能影响不大。由于 E3仅含 11个碱基,本文所筛查的 189 bp包含 3'非编码区和部分第 2内含子片段,目前尚无 E3突变的报道^[3],推测除多态性可能外,突变对 P16功能的影响可能不大。其确切的突变部位和对功能的影响尚有待进一步证实。

迄今有关白血病中 p16基因的缺失或点突变国外已有不少报道,国内尚未见相关报道。普遍认为缺失较常见。不同类型原发性白血病中,P16的突变率不同,0~83%不等,ALL中的缺失最常见,CML中的突变报道很少,这种淋巴细胞性白血病突变比例高的原因不明^[3]。本文在受检的 CML,AML,ALL中,仅在 CML中检出 P16基因的突变,达 27.8%;各型中均未检出缺失的标本。这种不一致可能与受检标本的数量、个体差异、突变检测方法等有关。考虑到 E3很短,多数作者未对 E3进行突变筛查,可能有所遗漏。对缺失的诊断常用含 E2的探针作 Southern印迹分析,也有用多态微卫星探针检测 9p21的杂合性丢失(LOH),或用多重 PCR或 RT-PCR检测缺失。Campbell等在检测卵巢癌 P16基因突变时,发现近一半(24/50)病例表现为 9p21的 LOH,仅 1例为 P16的纯合性缺失,提示 9p21的丢失可能与另一未知基因有关^[11]。或者 P16基因与邻近未知基因的同时缺失才引起选择生长优势^[12]。另有报道因启动子的不同,出现 2种 E1不同但 E2,E3相同的 P16转录物^[13],此时用 RT-PCR只检测其中 1种转录物,可出现缺失的假阳性。以上 2种缺失判断方法可能误使缺失率的报道提高(假阳性)。另外因外周血 DNA标本难免混有正常细胞 DNA,出现 PCR扩增产物,可掩盖对缺失的诊断,导致假阴性。因而对缺失率的报道颇不一致,诊断最好选用 2种不同方法加以验证。

从本文报道突变的部位来看,尽管 CML中存在较高比例的突变,但对 P16的功能可能影响不大。这一点支持不少作者认为 P16的失活在 CML中不很重要的观点^[2,3]。本文所报道的 5例 P16异常

CML均属慢性相,在急性相的CML中未检出。有报道P16基因缺失参与CML向ALL的急变^[14]。目前尚不清楚P16基因在白血病进展中是否有“2次突变”,以及是否参与对预后的影响或对化疗药物的抵抗等,值得作进一步深入探讨。本文经测序证实的P16基因突变部位及在1例MM病人中发现SSCP异常,尚未见文献报道。

利用PCR-SSCP法进行基因突变的筛查是目前常用的快速而简便的方法。但存在检出率低的缺点。有报道用SSCP与异源双链法联用提高突变检出率^[10]。本文利用改良的SSCP法对100~400bp大小的片段单碱基突变检出率可达90%以上,同时保留双链作对照可作为异源双链的检测,能提高检出率^[4],不失为一种简捷而有效的突变筛查方法。

参 考 文 献

- 1 李 巍,杜传书.哺乳动物细胞中周期蛋白依赖激酶抑制物的研究进展.国外医学遗传学分册,1996,19(5):237
- 2 Haidar MA, Cao XB, Manshoury T, *et al.* P16 and P15 gene deletions in primary leukemias. *Blood*, 1995, 86(1):311
- 3 Hirama T, Koeffler HP. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood*, 1995, 86(3):841
- 4 Jaksch M, Gerbitz KD, Kilger C. Screening for mitochondrial DNA (mtDNA) point mutations using nonradioactive single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Clin Biochem*, 1995, 28(2):503
- 5 Budowile B, Chakraborty R, Andren EB, *et al.* Analysis of the VNTR locus DISO80 by the PCR followed by high resolution PAGE. *Am J Hum Genet*, 1991, 48(1):137
- 6 Reischl U. A rapid protocol for DNA extraction and primer annealing for PCR sequencing. *Biotech*, 1994, 17(3):842
- 7 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 8 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory modify in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 1993, 366:704
- 9 Yang R, Gombart AF, Serrano M, *et al.* Mutational effects on the P16 (INK4a) tumor suppressor protein. *Cancer Res*, 1995, 55(6):2503
- 10 Tomas AW, Morgan R, Sweeney M, *et al.* The detection of mitochondrial DNA mutations using single stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis and heteroduplex analysis. *Human Genet*, 1994, 94(2):621
- 11 Campbell IG, Beynon G, Davis M, *et al.* LOH and mutation analysis of CDKN2 in primary human ovarian cancers. *Int J Cancer*, 1995, 63:222
- 12 Dreyling MH, Bohlander SK, Le-Beall MM, *et al.* Refined mapping of genomic rearrangements involving the short arm of chromosome 9 in acute lymphoblastic leukemias and other hematologic malignancies. *Blood*, 1995, 86(6):1931
- 13 Stone S, Jiang P, Dayananth P, *et al.* Complex structure and regulation of the P16(MTS1) locus. *Cancer Res*, 1995, 55(7):2988
- 14 Serra A, Gottardi E, Della RF, *et al.* Involvement of the cyclin dependent kinase-4 inhibitor (CDKN2) gene in the pathogenesis of lymphoid blast crisis of chronic myelogenous leukemia. *Br J Haematol*, 1995, 91(2):625

(1996-09-03收稿 1996-11-27修回)

(下转第20页)

25 μL PCR反应体系中,含 1 μL DNA样品,20 pmol引物,6% DMSO,× PCR缓冲液,0.2 mmol dNTP,1U Taq 酶 (CENDA,加拿大);97°C 变性 10 min后,94°C 30 s,退火 50 s,72°C 1 min 循环 35 次,最后 72°C 延伸 10 min;扩增产物经 1% 普通琼脂糖电泳鉴定后,按文献 [4]方法稍作改良进行 SSCP 分析。PCR产物 8 μL加 8 μL 甲酰胺变性剂 (95% 去离子甲酰胺,0.03% 溴酚蓝,0.03% 二甲胍醇),97°C 变性 5 min,-20°C 立即冷却,上样至 6% 或 8% 的聚丙烯酰胺凝胶 (Acr: Bis= 49: 1)中,以 0.5× TEB为电泳缓冲液,4°C,200 V 电泳 4~ 5 h 取胶后用银染法 [5]观察结果

1.4 PCR双链模板的直接测序

按参考文献 [6]进行。25~ 50 μL PCR产物经透析袋法 [7]纯化后,用超纯水溶解后测浓度。将此双链模板与测序引物以 1: 20浓度比混合,按美国 USB 公司的 Sequenase Ver. 2 测序试剂盒说明和北京亚辉生物医学工程公司的 α-³²P-dATP (37 TBq/ mmol, 10 Ci/L)进行标记和延伸反应。以每孔 3.5 μL 上样于含 7 mol/L尿素的 6% 聚丙烯酰胺变性凝胶中 1 200 V 电泳 3 h 放射自显影 12~ 24 h

1.5 p16基因缺失的检测

利用多重 PCR原理将上述 3个外显子扩增的 3 对引物 (E2的扩增任选 2A-2C,2B-2D,2A-2D其中之一)在同一 PCR反应体系中进行,PCR循环条件按 E1的扩增条件。正常标本可同时出现 3条带。某一条带不出现,可初步认为该外显子区域的缺失。还对 E2经 2A-2D扩增产物用 6% PAGE电泳后银染鉴定,是否出现较正常的 423 bp带更小的扩增带,以判断 E2的纯合或杂合性缺失。

2 结果

2.1 P16基因突变的 PCR-SSCP分析

应用 PCR-SSCP分别对各标本的 P16基因 Ex-on 1-3的突变进行筛查,结果发现 2例 (L2, L3) CML存在 P16 E2 2B- 2D对引物 PCR扩增产物之单链构象的变化,如图 1所示。

3例 CML(L14, L19, L34)和 1例 MM (L37)之 E3有带移现象(图 2),即共检出 5例 CML(占 27.8%) 和 1例 MM 标本 SSCP异常 其临床资料见表 2

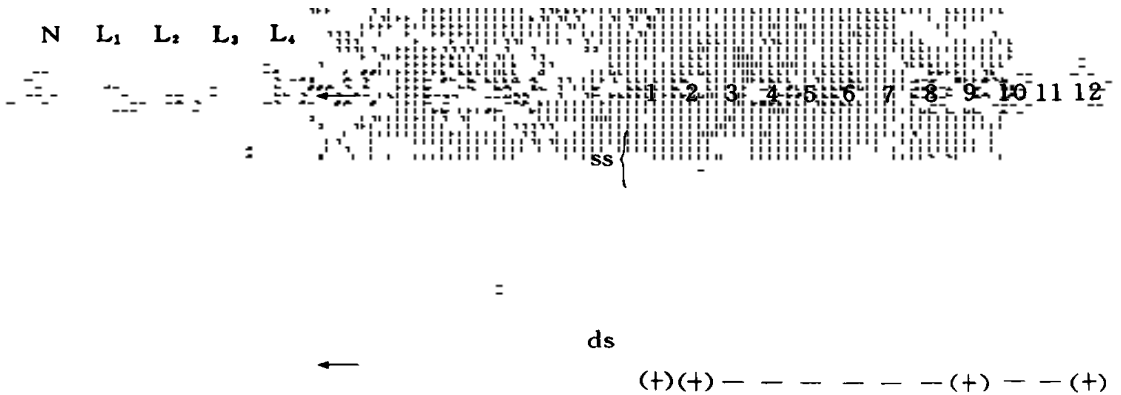


图 1 P16基因 E2(2B- 2D)PCR-SSCP
图中箭头示异常泳动带

图 2 P16基因 E3 PCR-SSCP

- 1. L14 2. L19 3. N 4. L29 5. L30 6. L31
- 7. L32 8. L33 9. L34 10. L35 11. L36 12. L37

表 2 5例 SSCP异常的 CML病例的临床资料

标本号	分期	BCR-ABL分型	WBC数(× 10 ⁹ /L)	转 归	P16基因突变
L2	CP ¹⁾	B3A2	70.0	缓解	codon151(C/G)
L3	CP	B2A2	11.8	缓解	E2 SSCP(+)
L14	CP	B2A2	7.2	缓解	E3 SSCP(+)
L19	CP	B2A2	7.4	缓解	E3 SSCP(+)
L34	CP	B3A2	7.5	缓解	E3 SSCP(+)

1) CP慢性期

of tumor cells in 85% cases. No positive staining of immediate early gene products ZEBRA were found in all cases. Early gene products EA-D were positive in 85% cases. The expression rate of late gene products VCA and MA in 20 cases was 60% and 0.5% respectively. In the positive cases, the positive signals were located in the neoplastic epithelial cells, not in the normal epithelial cells and lymphoid cells. The results confirmed a consistent association between EBV and parotid gland LELC in Guangdong, a high prevalent area of nasopharyngeal carcinoma in China. The biological significance of EBV gene expression in the parotid gland LELC was discussed.

Subject headings parotid gland neoplasms /pathology; carcinoma, squamous /pathology; herpesvirus 4, human

(上接第 16页)

MUTATION ANALYSIS OF P16 GENE IN LEUKEMIAS

Li Wei Du Chuanshu

(Department of Medical Genetics, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Using PCR-SSCP followed by DNA direct sequencing and multiple PCR, 18 cases of chronic myelogenous leukemia (CML), 9 acute myelogenous leukemia, 6 acute lymphoblastic leukemia (ALL), 2 multiple myeloma (MM), and one K562 cell line, were investigated for point mutation and deletion of the P16 gene, which encoding a cyclin dependent kinase 4/6 inhibitor. 5 cases of CML and one case of MM presented bandshifts in SSCP analysis. One case of SSCP(+) CML was verified by direct sequencing to be a C/G transition in codon 151, which resulted in missense mutation of Pro \rightarrow Arg. No deletion was found by multiple PCR in all cases. According to the positions of the detected mutations, although there was relatively high mutation frequency of P16 gene in CML (27.8%, 5/18), it may not lead to P16 inactivation. It seemed that P16 gene mutation did not play prominent role in leukemic cancerogenesis.

Subject headings leukemia /genetics; mutation; genes, suppressor, tumor /genetics; sequence analysis, DNA