

锌指蛋白 216、A20 及 P53、P16 基因突变/缺失与肝癌的相关性研究

胡娟 王启军

基金项目:国家“十一五”重点课题,英国 Bulunier 项目基金(CNCD-1023)

作者单位:610083 成都市,成都军区临床检验中心

【摘要】 目的 检测肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者血清中锌指蛋白(zinc finger proteins, ZNF)216(ZNF-216)、A20(ZNF-A20)水平, P53 基因突变及 P16 基因缺失情况,探讨其与 HCC 发生、发展的关系。方法 选择 41 例 HCC 患者为 HCC 组, 45 例健康体检者为对照组。采用 PCR 法扩增 P53 基因外显子 5~8, SP 免疫组织化学方法检测 P16 蛋白, 并对其突变和缺失进行分析; 采用重组 cDNA 表达文库的血清学分析法获取人类锌指蛋白 ZNF216、ZNF-A20 抗原, 经间接 ELISA 方法分析 HCC 患者血清中 ZNF216、ZNF-A20 抗体的表达水平。结果 HCC 组 ZNF216 抗体和 ZNF-A20 抗体水平高于对照组, 两组差异均有统计学意义(P 均 < 0.01); 在 41 例 HCC 患者中, 有 23 例发生 P53 基因突变, 且 HCC 有转移病灶患者的突变率(81.81%)高于 HCC 无转移病灶患者的突变率(26.31%)。41 例 HCC 患者中 P53 基因突变热点区外显子以第 8 外显子居多(36.4%), 其次为第 7 外显子(29.4%); HCC 无转移病灶患者中 P16 基因缺失的阳性率(31.57%)大于 HCC 有转移病灶患者中 P16 基因缺失的阳性率(9.09%), 差异具有统计学意义($\chi^2 = 6.095, P < 0.01$)。结论 ZNF-216 和 ZNF-A20 的高表达提示其与 HCC 的发生过程相关, 而血浆 P53 基因突变和 P16 基因缺失与 HCC 的发生及病灶转移有相关性, 突变机率在临床鉴别诊断和治疗预后中具有参考价值。

【关键词】 肝癌; 锌指蛋白 216; 锌指蛋白 A20; P53 基因; P16 基因

The correlative research for ZNF-216, ZNF-A20 expression and P53, P16 gene change in liver cancer patients

Hu Juan, Wang Qi-jun. Chengdu Military General Hospital. Chengdu, Sichuan 610083, China

【Abstract】 Objective To test the levels of ZNF-216 and ZNF-A20 in hepatocellular carcinoma(HCC) patient's serum and the mutation rate of P53 gene and the deletion rate of P16 gene, to explore their correlation with onset and development of HCC. **Methods** 41 cases HCC patients and 45 cases healthy persons were selected as HCC group and control group. PCR was used to amplify gene P53 exon 5~8. The SP immunohistochemistry was used to determine the deletion of gene P16, and the condition of mutation and deletion were analyzed. ZNF-216 and ZNF-A20 were obtained by serological analysis of recombinant cDNA expression library (SEREX) technic and detected by Indirect-ELISA method. **Results** The levels of antibody to ZNF-216 and ZNF-A20 in HCC group was higher than in control group, the difference had statistical significance ($P < 0.01$). The rates of gene P53 mutation (81.81%) in HCC with metastasis group was higher than in HCC without metastasis group (26.31%). The 8 exon (36.4%) was the hotspot region of gene P53 mutation, and the 7 exon (29.4%) took the second place of hotspot region. The deletion of gene P16 in HCC with metastases group was 31.57% and in HCC without metastasis group was 9.09%, the difference had statistical significance ($P < 0.01$). **Conclusion** The high expression of ZNF-216 and ZNF-A20 show that they are concerned with HCC's happening. There is a correlation between HCC and P53 gene mutation, P16 gene deletion. The mutation rate may have the reference value in identification diagnosis and treatment and prognosis of HCC.

【Key words】 Hepatocellular Carcinoma; ZNF-216; ZNF-A20; P53 gene; P16 gene

肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一。目前,临床中用于诊断肝癌的标志物仅有甲胎蛋白(alpha fitoprotein, AFP), 且还有 30% 的漏诊率^[1,2]。因此,临床迫切需要新的具有特异

性的诊断 HCC 的标志物,这对于肝癌早期诊断和治疗将具有重要的指导意义。

近年来,锌指蛋白(zinc finger proteins, ZNF)家族由于其在抗肿瘤免疫反应中的高频出现率已倍受

人们关注,但其作用机制至今尚未定论,且报道较少。本文检测血清中 ZNF-216、ZNF-A20 的含量,探讨其与 HCC 发生、发展的相关性;同时本文还检测 P53 的基因突变,观察基因 P16 缺失的情况,从分子水平阐明其作用机制,为 HCC 的基因诊断和基因治疗提供实验依据。

1 资料和方法

1.1 临床资料 选择我院 2005 年 3 月至 2009 年 12 月原发性 HCC 患者 41 例,男 32 例,女 9 例,年龄 28~79 岁(均经腹部 B 超、CT 或 MRI 影像学诊断,癌胚抗原、AFP 多项肿瘤标志物蛋白检测确诊);其中,HCC 无转移患者 19 例,HCC 合并肺、胃、肠、脑等部位有转移癌患者 22 例。正常对照组选择健康献血员共 45 例,男 24 例,女 21 例,年龄 24~45 岁。两组研究对象年龄、性别具有可比性,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 仪器及试剂 1、凝胶成像系统(英国生产);2、PCR 扩增仪(美国 PE 公司);3、离心机(美国贝克曼);4、紫外分光光度计(日本生产);5、液氮;6、手术切除的肝癌组织;7、Tripure 试剂(德国生产);8、液氮;9、A20 及内参照引物(上海生卫公司合成)等。

1.2.2 总 RNA 抽提 液氮保存的组织块 300~350 mg,边研磨边加入液氮,在低温中保存 RNA 信息,防止降解。经研磨的粉末加入 Tripure 试剂 3~4 ml,进行匀浆,5 min 后在经 DEPC 处理过的离心管中加入氯喹 0.6 ml 振荡 15 s。静置 10 min 后低温 4℃,离心半径 16.6 cm,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液置离心管,加入冻存的异丙醇混匀,10 min 后取 RNA 沉淀。

1.2.3 PCR 扩增 再行 4℃离心半径 16.6 cm,3 500 r/min 离心 20 min。离心沉淀 RNA 弃去上清后,与等体积的 75%乙醇混合,置于 DH₂O 中-80℃低温冰箱保存,用于 RT-PCR。

引物设计参照序列^[3]如下:P53 基因外显子 5,扩增第 5 个显子(P5.1 和 P5.2)序列上游引物顺序 5'-TTC CTC CTG CAG TAC C-3',214 bp,上游引物顺序 5'-GCC CCA GCT GCT CAC CAT-3';P53 基因外显子 6,扩增第 6 个显子(P6.1 和 P6.2)序列上游引物顺序 5'-CAC TGA TTG CTC TTA GGT CT-3',144 bp,上游引物顺序 5'-AGT TGC AAA CCA GAC CTC AGG-3';P53 基因外显子 7,扩增第 7 个显子(P7.1 和 P7.2)序列上游引物顺序 5'-TCT CCT AGG TTG GCT CTG AC-3',133 bp,上游引物顺序 5'-CAA

GTG GCT CCT GAC CTG GA-3';P53 基因外显子 8,扩增第 8 个显子(P8.1 和 P8.2)序列上游引物顺序 5'-CCT ATC CTG AGT ACT GGT AA-3',166 bp,上游引物顺序 5'-GTC CTC CTT GCT TAC CTC G-3'。

1.2.4 DNA 提取 采集静脉血 2.5 ml,EDTA-K₂ 抗凝,混匀后离心半径 16.6 cm,3 500 r/min 离心 10 min,分离血浆低温-20℃保存。DNA 提取试剂盒(由博华公司提供 QLAmp DNA minikit,Germany),按使用说明书进行操作。PCR 扩增循环条件:95℃40 s,60℃30 s,75℃40 s,重复循环 32 次,70℃10 min 完成延伸反应。再经非变性聚丙烯酰胺凝胶 SSCP 电泳,银染,应用凝胶自动成像系统分析。阳性(基因突变)条带进行基因测序。

免疫组织化学方法采用 SP 方法,P16 单克隆抗体及 SP 试剂购自成都医药工业总公司。P16 蛋白以细胞核染棕色为阳性,每张切片中以东西南北中五个高倍镜下视野计数,按 100%计算。判定标准为阳性细胞数≥5%。阳性对照同批实验对照。

1.2.5 ZNF 的检测 采用重组 cDNA 表达文库的血清学分析法 (serological analysis of re-combinant cDNA expression library, SEREX) 获取人类锌指蛋白 ZNF216、ZNF-A20 抗原,经间接 ELISA 方法分析 HCC 患者血清中 ZNF216、ZNF-A20 抗体的表达水平。经诱导表达含质控 BL21 的单克隆菌液,过柱纯化(BO TALOW metal affinity resins user manual)包被试验用 E 板。单抗人 IgG 浓度为 1:5 000,终止液为 2 mol/L H₂SO₄。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料组间比较采用 χ^2 检验;计量资料组间比较采用两样本 t 检验,组内比较采用配对 t 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC 组与对照组血清中 ZNF-216、ZNF-A20 抗体检测水平的比较 HCC 组 ZNF-216、ZNF-A20 抗体检测水平高于对照组,经 t 检验,差异均具有统计学意义(P 均 <0.01),见表 1。

表 1 HCC 组与对照组 ZNF-216、ZNF-A20 抗体检测水平($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	ZNF-216	ZNF-A20
HCC 组	41	0.2475±0.1168*	0.2641±0.0965*
对照组	45	0.1633±0.0714	0.1842±0.0817

注:*表示与对照组比较差异具有统计学意义, $P<0.01$

2.2 HCC 患者 P53 基因突变的概率 22 例有转移癌的 HCC 患者中 P53 基因突变的有 18 例 (18/22, 81.81%), 19 例无转移癌的 HCC 患者中 P53 基因突变的有 5 例 (5/19, 26.31%), 见表 2。

表 2 41 例 HCC 患者 P53 基因突变的概率[例(%)]

P53 基因突变	例数	阳性	阴性
HCC 有转移病灶	22	18(81.81)	4(18.19)
HCC 无转移病灶	19	5(26.31)	14(73.69)

2.3 在 41 例 HCC 患者中, P53 基因突变热点区外显子的分布情况 P53 基因突变热点区外显子的分布以第 8 个外显子居多 (36.4%), 其次是第 7 个外显子 (29.4%), 第 5、第 6 外显子较低 (均 17.1%), 见表 3。

表 3 41 例 HCC 患者 P53 基因突变热点区外显子突变的分布情况

外显子	例数	百分率 (%)
第 5 个外显子	7	17.1
第 6 个外显子	7	17.1
第 7 个外显子	12	29.4
第 8 个外显子	15	36.4

2.4 P16 基因缺失程度与 HCC 转移的相关性 在高倍视野下, 细胞核内染为呈均匀分布棕蓝色颗粒为阳性。随采样位置显示, 无转移癌的 HCC 患者中 P16 基因缺失的阳性率 (6/19, 31.57%) 大于有转移癌的 HCC 患者中 P16 基因缺失的阳性率 (2/22, 9.09%), 差异具有统计学意义 $\chi^2 = 6.095, P < 0.01$, 见表 4。

表 4 P16 基因缺失程度与 HCC 转移的相关性[例(%)]

P16 基因	例数	阳性	阴性
HCC 有转移病灶	22	2(9.09)	20(90.91)
HCC 无转移病灶	19	6(31.57)	13(68.43)

3 讨论

自 1983 年首次在转录因子 IIIA 中发现锌指结构以来, 现已知种类达 10 种以上。锌离子可在适合条件下与氨基酸小于 50 个残基长度的多肽片段, 自身不能折叠的结构区形成稳定结合并发挥其功能。这种与蛋白 DNA、RNA 位点结合并调节特殊生理功能的蛋白质片段即为锌指。锌指家族约占人类基因产物的 1%。含有锌指结构的蛋白则为锌指蛋白^[4]。锌指蛋白家族包括了 N180、N36、ZNF-216 和 ZNF-A20 等。锌指蛋白具有广泛的生物功能, 如 DNA 识

别、RNA 包装, 转录及转录后调控, 蛋白折叠和装配, 脂质结合, 并参与肿瘤的形成和机体免疫干预等。

锌指识别 DNA 是由于其三维结构所致, 它的结合区域与 DNA 双螺旋结构互补, 环绕在 DNA 周围。锌指-DNA 复合物存在不同的结合位点, 本身空间也不尽相同, 对目的 DNA 的识别有特殊性的规律。锌指与 RNA 的结合则受到限制, 其识别性能受到 RNA 本身二级和三级结构的复杂性影响, 虽有报道锌指可与 5S RNA 结合的研究, 但涉及的资料不多, 探索有限。而锌指之间或锌指蛋白之间的相互作用, 证实是为了识别或阻止其同 DNA 结合, 完成基因转录水平的调控。本文研究 HCC 患者血清中的 ZNF-216 和 ZNF-A20 水平的表达, 探究其与 HCC 发生、发展的关系, 为机体内源性保护机制的深入探索提供了实验数据。本文实验结果显示, HCC 患者血清中的 ZNF-216 和 ZNF-A20 的水平远高于健康对照组, 经统计学处理, 差异具有统计学意义 (P 均 < 0.01)。从而进一步说明 HCC 患者血清中的 ZNF-216 和 ZNF-A20 参与了 HCC 的发生。

目前临床确认已知的抑癌基因有数十种, 随着人类基因组计划的进行, 其数目不断增加^[5]。P53 有抑制细胞生长的作用, 在人体的各种细胞中都有 P53 蛋白质表达, 由于含量很低、半衰期很短, 一般检测方法无法测到^[6,7]。从本文实验结果可知, 在 41 例 HCC 患者中, 有 23 例 P53 基因发生突变, 占 56.10%。HCC 患者 P53 基因发生突变, 抑制细胞生长的作用随之降低, 导致癌细胞的快速增长, 在同等条件下, HCC 发生病灶转移的机率将比 P53 基因未发生突变的大。本文实验数据显示, 22 例有 HCC 转移病灶的患者 P53 基因发生突变占 81.81%, 19 例无转移病灶的患者 P53 基因发生突变占 26.31%, 两组差异具有统计学意义 ($P > 0.05$)。表明在 HCC 患者中, HCC P53 基因突变与癌转移有一定的相关关系。

人类 P53 基因的突变形式表现为点突变、缺失突变、移码突变和基因重排等。突变位点多集中在第 5~8 外显子^[8,9]。实验显示在 41 例 HCC 患者 P53 基因突变中, 第 5 个外显子占 17.1%, 第 6 个外显子也占 17.1%, 第 7 个外显子占 29.4%, 第 8 个外显子占 36.4%。P53 基因突变的一个特点是引起蛋白质功能改变的错义突变, 少数是无义突变或终止突变^[10]。在原发性 HCC 中, P53 基因点突变是最为频发的事件, P53 等位基因杂合型缺失频率可达 25%~60%。随着技术方法的不断进步和研究的不断深入, 癌基

因、抑癌基因的检测在肿瘤的早期发现、鉴别诊断、疗效评估和康复干预等具有重要价值^[11]。

P16 基因 (MTS1, CDR41, CDRN2) 是细胞周期调控基因家族中的重要成员, 是近年来新发现的抑癌基因, P16 的主要作用是特异地抑制细胞周期素 D-细胞周期素依赖性交合体对细胞 G1 期到 S 期的调控, 当其缺失或失活时, 交合体则持续高活性的存在于细胞内导致 PRB 基因的磷酸化, 释放转录因子 E2F 等, 激活多种细胞增殖的相关因子, 从而导致细胞 G1 期到 S 期的失控, 细胞发生异常增殖, 导致最后的恶变^[11-13]。故研究 P16 基因的缺失程度对研究肝癌的发生、发展、诊断、治疗和康复具有重要的意义。本文实验结果表明, 随采样位置显示: HCC 无转移癌 P16 基因缺失阳性率 31.6% (6/19) > HCC 有转移癌 P16 基因缺失阳性率 9.09% (2/22), 经统计学处理 $\chi^2 = 6.095$, $P < 0.01$, 差异具有统计学意义。进一步说明 P16 基因的缺失程度与 HCC 的发生、发展具有相关性。

本文在国内较早研究 HCC 患者血浆中 P53 基因突变以及 P16 基因缺失的情况, 同时检测 ZNF-216、ZNF-A20mRNA 的表达水平, 不仅从分子水平阐明了 HCC 的发病机制, 也为该病的基因诊断和基因治疗提供了实验依据。尽管目前仍存在一定的局限性, 尚不能确定特异的对应关系, 但无疑是一个前景广阔的发展方向。

4 参考文献

- 1 胡娟, 魏敏, 张鸣山, 等. 肝癌组织 HCC-X 基因表达和相关标志蛋白 NMR-1H 谱特征. 第四军医大学学报, 2003, 24: 1766-1768.
- 2 顾香芳, 余德才. 肝癌患者血清和癌组织中锌指蛋白 216 表达增加. 基础医学与临床, 2008, 28: 610-613.

- 3 Jassem E, Niklinski J, Rossell R, et al. Types and localisation of P53 gene mutations a report on 332 non-small cell lung cancer patient. Lung Cancer, 2001, 34: 47-51.
- 4 Tewari M, Wolf FW, Seldin MF, et al. Lymphoid expression and regulation of A20, an inhibitor of programmed cell death. J Immunol, 1995, 154: 1699-1706.
- 5 Bertorelle R, Esposito G, Del Mistro A. Association of P53 gene and protein alterations with metastases in colorectal cancer. Am J Surg Pathol, 1995, 19: 463-471.
- 6 Searbrough R. Use of antisense oligodeoxy-nucleotides to study biological rhythms method. Journal of pathology diagnostic, 2002, 22: 225-260.
- 7 胡娟, 王超, 曾平, 等. 血浆循环核酸 P53 基因突变与肝癌的相关性研究. 临床血液学杂志 (输血与检验版), 2007, 4: 150-152.
- 8 Ceisler JP, Ceisler HE, Wisemann MC, et al. P53 expression as a prognostic indicator of 5-year survival endometrial cancer. Gynecol Oncol, 1999, 74: 468-471.
- 9 胡娟, 王启军. 肝癌患者血清锌指蛋白和 P53 高表达的临床意义. 中华实用诊断与治疗杂志, 2009, 23: 430-431.
- 10 Soria Jc, Lee HY, Lee JI, et al. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. Clin Cancer Res, 2002, 8: 1178-1184.
- 11 Ahmad T, Gore M. Review of the use of topotecan in ovarian carcinoma. Expert Opin Pharmacother, 2004, 5: 2333-2340.
- 12 Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, et al. The P16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. J Med Invest, 2004, 51: 146-153.
- 13 胡娟, 刘媛. p53 基因突变和 p16 基因缺失与肝癌的相关性. 第四军医大学学报, 2007, 28: 160-162.

(收稿日期: 2010-05-25)

(本文编辑: 杨军)

消 息

《实用检验医师杂志》广告业务招商

《实用检验医师杂志》于 2009 年 7 月 21 日获得中华人民共和国新闻出版总署批准的中华人民共和国期刊出版许可证, 京期出证第 5864 号; 2009 年 8 月 19 日获得天津市工商局批准的广告经营许可证, 许可证号: 1201034000665。广告经营范围: 设计、制作印刷品广告, 利用自有《实用检验医师杂志》发布广告。本刊为新刊, 国内外公开发行。目前本刊编辑部已开发广告业务, 欢迎需要在本刊刊登广告的客户联系我们。联系电话: 022-60577728; 022-60577729。

本刊编辑部