

原位雜交檢測抑癌基因 P¹⁶ 在砷角化病表皮中的表達

烏日娜^{1,*} 劉振祥² 呂新翔¹ 李曉娥³
呼 德⁴ 羅 夏¹

RI-NA WU^{1,*}, ZHEN-XIANG LU², XIN-XIANG LU¹, CHIAU-ER LI³, HUDUO⁴, XIA LUO¹

¹ 內蒙古醫學院第一附屬醫院皮膚性病科, 010050 內蒙古呼和浩特市通道北街1號
Department of Dermatology and Sexual Disease, First-Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical College.

² 北京醫科大學第三臨床醫院皮膚科
Department of Dermatology, Third-Affiliated Hospital, Beijing Medical University.

³ 河北省立醫院皮膚科
Department of Dermatology, Hebei Province Hospital.

⁴ 內蒙古第三建築公司醫院
Third Building Company Hospital, Inner Mongolia.

* 通訊作者Correspondence author.

目標：欲了解抑癌基因P¹⁶在砷角化症中扮演的角色。**方法：**採用原位雜交技術，對38例地方性砷中毒病人的砷角化病皮損進行了抑癌基因P¹⁶的檢測，並設兩組陰性對照。**結果：**發現38例中有24例呈陽性表達，14例呈弱陽性表達。**結論：**砷角化病的病人有P¹⁶基因的減少或部分丟失，有癌變傾向。(中華衛誌 1999；18(附冊 1)：87-88)

關鍵詞：原位雜交、砷角化病、P¹⁶基因。

Expression of the tumor suppressor gene P¹⁶ in arsenic keratosis by hybridization in situ

Objectives: To realize the role of tumor suppressor gene P¹⁶ in keratosis caused by arsenic.

Methods: The tumor suppressor gene P¹⁶ in skin lesions was detected in 38 cases of arsenic keratosis by hybridization in situ and two negative controls were worked out. **Results:** We found 24 cases of positive expression and 14 cases of weak positive expression. **Conclusions:** Patients of arsenic keratosis show that they were loss or decrease of the P¹⁶ gene and tender to canceration. (Chin J Public Health. (Taipei): 1999;18(suppl 1):87-88)

Key words: hybridization in situ, arsenic keratosis, P¹⁶ gene.



前 言

砷角化病是慢性砷中毒引起。砷是致癌物質，砷角化病皮損常常繼發皮膚鱗狀細胞癌和基底細胞癌。我們曾對該病進行了流式細胞光度分析，證實砷角化性斑塊的DNA指數及細胞增殖週期的S期與癌變皮損之間有共同之處。為進一步探討砷角化病的癌變機制，我們檢驗了抑癌基因P¹⁶的表達，現將結果報告如下。

材料和方法

- (一) 病例：38例標本均取自內蒙古巴彥諾爾盟地方性砷中毒病區。經臨床、病理等檢驗確診病人的砷角化斑塊。
- (二) 標本製作：將石蠟標本切成4 μm 薄厚的切片，貼於黏膠的載玻片上，烤乾備用。
- (三) 探針標記：P¹⁶cDNA克隆在P^{Blue}script M₁₃的ECORI & HXOI位點，由美國冷泉港Bert Vogelstein饋贈。探針標記採用體外轉錄法(in Vitrotranscription) Biotin-21-uTP隨轉錄進程而摻入新合成的CRNA探針，長為800bp。
- (四) 原位雜交方法：切片常規脫蠟至水；0.2NHCL，10分鐘；蛋白酶K(Sigma公司，100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，37°C，10分鐘；DNA雜交：每片加探針50ng，50%甲胺10 μL ，20 \times SSC4 μL ，0.1葡聚糖硫酸脂2 μL ，5 \times Denhart 2 μL ，0.1%變性鯊精DNA1nL，42°C，純甲酰胺濕盒中孵化16-24小時；洗片後加Anti-Dig-AP複合物抗體(1:500)，37°C，1小時；NBT/BCIP避光顯色，陽性顆粒呈紫蘭色戒指狀分布。
- (五) 設對照組：設立兩組陰性對照，(1)探針特异性陰性對照，即不加探針，其餘步驟同。(2)抗體特异性陰性對照，即用PBS取代Anti-Dig-AP複合物，其餘步驟同。另外，有兩例正常人腹部皮膚標本，製片過程同前。

結 果

38例砷角化病的角化性斑塊表皮中24例呈陽性表達，佔63.13%。鏡下胞漿呈清晰的戒指狀分布的紫蘭色顆粒或紫褐色顆粒。14

例呈弱陽性表達佔36.84%顏色較淺或顆粒較少。兩組陰性對照均呈陰性，正常腹部皮膚對照呈紫色顆粒呈戒指狀分布。

討 論

P¹⁶基因是一種抑癌基因，定位於人類染色體9P²¹，是cDK₄的抑制物，參與對正常細胞週期演進的調控[1]。在許多腫瘤中已發現有P¹⁶基因的突變和缺失，說明P¹⁶基因功能的失活與腫瘤的起因和惡化有關。有報導示，來源於肺、乳腺、腦、骨、皮膚、膀胱、腎等部位的癌腫細胞株均出現高頻率的P¹⁶基因缺失。據統計75%的癌細胞株有P¹⁶基因缺失或突變[2]，超過了P⁵³基因50%的突變率。砷角化性斑塊是癌前期病變，流式細胞光度分析顯示，其表皮細胞DNA指數及細胞週期S期均有異常，與已經癌變皮損變化相似[3]。我們在隨訪中發現，有的病人的角化性斑塊幾年後發生了鱗狀細胞癌。為進一步深入探討砷角化病易癌變的機制。我們用原位染交方法檢測了P¹⁶基因的表達情況。從38例皮損結果來看砷角化性斑塊的表皮中P¹⁶基因大多呈正常陽性表達，但有14例呈弱陽性表達，推測有P¹⁶基因的部份丟失或失活。此結果進一步說明砷角化病是癌前期病變。這14例弱陽性表達者儘管尚無明顯組織病理上的惡變，但從分子生物學水平上分析已經有了P¹⁶基因的異常。我們將在以後的醫療過程中加強隨訪和檢查。

致 謝

在此感謝北京醫科大學基礎111分子免疫病理室陸哲明老師的大力協助。

參考文獻

1. 陸哲明：P¹⁶抑癌基因的發現及研究。國外醫學腫瘤學分冊1995；22：321。
2. 侯宇：抑癌基因新發現和致癌機制新觀點。國外醫學腫瘤學分冊1995；22：65。
3. 烏日娜、朱學駿、鄭鳳蘭等：地方性砷中毒皮損表皮細胞核DNA含量的流式細胞分析。中華皮膚科雜誌1995；28：20。