

• 临床研究 •

p16 基因甲基化与 156 例广西巴马壮族老人长寿的关系

陈文成, 潘尚领, 覃志坚, 韦叶生, 何印蕾, 林伟雄

【摘要】 目的 探讨 p16 基因甲基化与人类长寿的关系。方法 应用甲基化特异性 PCR 技术对巴马 156 例(年龄 90~105 岁, 平均 93.2 岁, 长寿组)健康壮族长寿老人和 142 例健康壮族成年人(年龄 20~72 岁, 平均 34.8 岁, 对照组)的 p16 基因甲基化状况进行分析, 分析该基因甲基化在长寿组和对照组之间的差异及其与长寿的关系。结果 长寿组 p16 基因甲基化明显低于对照组($P < 0.05$)。结论 巴马壮族长寿老人 p16 基因甲基化程度明显降低。

【关键词】 p16 基因; 甲基化; 长寿

【中图分类号】 R34

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2010)04-03

Relationship of methylation of p16 gene with long life expectancy of Zhuang ethnic group elderly people: report of 156 cases in Guangxi Bama area

CHEN Wencheng, PAN Shangling, QIN Zhijian, et al

Department of Clinical Microbiology and Immunology, Medical Laboratory College,
Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, China

【Abstract】 Objective To explore the relationship between the methylation of p16 gene and human longevity. Methods The methylation specific polymerase chain reaction was used to analyze the methylation status of p16 gene in 156 long-lived healthy Zhuang ethnic group people (aged 90-105 years, mean 93.2 years, long-lived group, LG) and 142 healthy controls (aged 20-72 years, mean 34.8 years, control group, CG) from Bama area. The difference in p16 gene methylation between the two groups was analyzed to study the role of p16 gene methylation in human longevity. Results The methylation of p16 gene was more frequent in CG than in LG. Conclusion The methylation of p16 gene is less frequent in long-lived Zhuang ethnic group elderly people in Bama area.

【Key words】 p16 gene; methylation; longevity

人的寿命与环境因素和遗传因素均有很大的关系, 其中癌症或恶性肿瘤是老年人易患疾病之一, 并与寿限有直接关系, 而肿瘤的发生与否与机体的抑癌基因关系密切。p16 基因是一种重要的抑癌基因, 在细胞的生长周期、凋亡、衰老等过程中扮演着非常重要的角色, p16 基因缺失或突变已被证实是许多肿瘤发生的原因之一^[1]。我们于 2006 年 5 月至 2008 年 5 月进行巴马长寿老人 p16 基因甲基化研究, 以进一步揭示其与长寿的关系。

1 对象与方法

1.1 实验对象 长寿组 156(男 46, 女 110)例, 年

龄 90~105(平均 93.2)岁, 其中 ≥ 100 岁 12 例。对照组 142(男 57, 女 85)例, 年龄 20~72(平均 34.8)岁。这些研究对象均为居住在巴马县和东兰县的壮族人, 据家谱均可上溯 8 代以上。90 岁以上老人均为巴马县长寿研究所和东兰县老年局老龄办建档并长期随访的对象。健康对照组为同一地理区域内无血缘关系、随机抽样的成年人, 生活习惯及劳动条件与长寿组均基本相同。

1.2 实验方法 p16 基因甲基化的检测原理是 DNA 双链变性解链后在亚硫酸氢钠作用下碱基 C 转化成 U, 但对于已发生甲基化的 C 则无此改变, 据此设计两对不同引物进行 PCR 扩增即可检测出

基金项目: 广西科学基金(桂科自 0728160); 广西教育厅基金(No. 右科配 JYT0702006)

作者单位: 533000 百色市, 右江民族医学院医学检验学院临床微生物教研室(陈文成, 覃志坚, 韦叶生, 何印蕾); 530021 南宁市, 广西医科大学病理生理学教研室(潘尚领); 儿科血红蛋白实验室(林伟雄)

通讯作者: 潘尚领, Tel: 13807861556, E-mail: chwch3268@sina.com

此差异^[2,3]。具体步骤如下。每个实验对象采静脉血 2ml,加酸性柠檬酸盐葡萄糖(ACD)抗凝,用经典的苯酚/氯仿抽提法提取白细胞 DNA^[4],TE 溶液溶解 DNA 样本置 4℃待用。取 50 μl(2 μg) DNA 样品,加入新鲜配置的 NaOH (3 mol/L) 5. 5 μl, 42℃水浴 30 min。加入新鲜配置的氢醌(10 mmol/L) 30 μl 和亚硫酸氢钠 (3. 9 mol/L, Sigma 公司) 510 μl,加少许石蜡油避光 55℃水浴 16 h,行 DNA 修饰。采用 Wizard DNA 纯化系统(Promega)纯化 DNA。将去针头的注射器针管固定于纯化柱上,将上述 DNA 与 1 ml 纯化树脂混匀后转移至注射针管,加活塞轻推,同法用 2 ml 80%异丙醇洗涤一次,14 000 r/min 离心纯化柱 2 min。加 50 μl 预热灭菌双蒸水于纯化柱(65℃),室温放置 1 min,13 000 r/min 离心 2 min,弃纯化柱。加入 5 μl 新鲜配置的 NaOH (3 mol/L), 42℃水浴 15 min,加入乙酸铵(终浓度 3 mol/L),1 μl 糖原(10 g/L)和三倍体积的无水乙醇, -20℃过夜。于 4℃下 14 000 r/min 离心 20 min, 70%乙醇洗涤,加 50 μl 双蒸水溶解备用。引物设计参照文献^[5],p16 基因甲基化片段引物(150bp):上游 5'- TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC -3', 下游 5'- GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA -3'; p16 基因非甲基化片段引物(151bp):上游 5'- TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT -3',下游 5'- CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA-3'。反应体系为 25 μl,每个反应体系分别加入上述两对引物。PCR 反应条件:94℃预变性 4 min,94℃变性 1 min, 59. 8℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,进行 33 个循环反应。基因扩增后以 8 μl PCR 反应产物在 2%琼脂糖凝胶上电泳,电流 45 mA,电压 100 V,电泳载样缓冲液为 1×TBE 缓冲液,电泳后,在紫外线透射仪上观察,摄片并记录结果。甲基化引物扩增有 150bp 条带说明该基因发生了甲基化,非甲基化引物扩增有 151bp 条带则说明该基因未发生甲基化(图 1)。

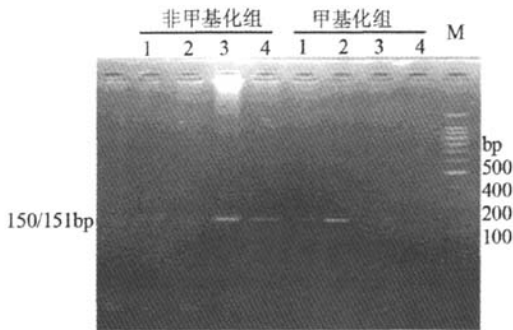


图 1 p16 基因甲基化特异性 PCR 扩增结果
M:标志物;1,2,3,4,标本号

1.3 统计学处理 长寿组和对照组的各基因频率比较分析用 χ^2 检验,用 SPSS 软件包进行分析。

2 结果

考虑到性别可能是长寿的影响因素,因此对男、女分层进行比较,以消除性别可能造成的偏倚。由于普通人群长寿的比率很低,为了增加对照组的可比性,健康对照组均为和长寿组无血缘关系、随机抽样的成年人,并将对照组分为 20~40 岁和 41~72 岁两个亚组分别与长寿组进行比较。结果显示长寿组 p16 基因甲基化显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$;表 1,表 2)。

表 1 长寿组和 20~40 岁对照组 p16 基因甲基化分布及比较[n(%)]

组别	例数	甲基化组		非甲基化组	
		男性	女性	男性	女性
长寿组	156	9(6)	22(14)	52(33)*	73(47)*
对照组	103	13(13)	28(27)	25(24)	37(36)

注:与对照组比较,* $P<0.05$

表 2 长寿组和 41~72 岁对照组 p16 基因甲基化分布及比较[n(%)]

组别	例数	甲基化组		非甲基化组	
		男性	女性	男性	女性
长寿组	156	9(6)	22(14)	52(33)	73(47)
对照组	39	4(10)	11(28)	13(33)	11(28)*

注:与对照组比较,* $P<0.05$

3 讨论

抑癌基因与细胞衰老有着密切的关系,p16 基因是目前研究较多的肿瘤抑制基因之一,它的缺失与许多肿瘤有关。p16 属于 INK4a/ARP 位点的肿瘤抑制基因,位于染色体 9p21,其编码蛋白是 CDK4 抑制物。近期的研究发现 p16 基因的失活和胃癌等肿瘤有密切的联系,已有学者对该基因与多种肿瘤的关系进行了研究^[6]。同时有研究表明 p16 基因还与细胞衰老有着紧密联系,p16 基因的大量失活是诱发细胞衰老及肿瘤的重要原因之一^[7]。

DNA 甲基化是近年的研究热点,随着研究的深入,人们认识到基因的甲基化修饰同基因缺失、突变一样,也是肿瘤发生、发展和细胞衰老凋亡调节的重要因素。目前对 DNA 甲基化的研究还处于起步阶段,DNA 甲基化的发生原因及确切机制还有待于进一步研究。甲基化是 p16 基因失活的重要机制,p16 基因 5-CpG 岛甲基化已被证实与 p16 基因

的失活有密切的关系^[8]。其机制可能与启动子区高甲基化导致的 p16 基因沉默有关。

本研究发现,长寿人群中 p16 基因甲基化率明显偏低。癌症或恶性肿瘤是老年人易患疾病之一,并与寿限有直接关系,而肿瘤的发生与否与机体的抑癌基因关系密切。可能正是由于长寿老人 p16 基因甲基化率低,使得 p16 基因失活少,从而减少患癌症等影响寿命的疾病的机会。

对男女分别比较后发现,长寿组 p16 基因甲基化率显著低于对照组,将对照组分为 20~40 岁和 41~72 岁两个年龄亚组分别与长寿组进行比较,发现 41~72 岁年龄组中只有女性组差异有意义。说明年龄因素与 p16 基因甲基化程度有一定关系。而且,在两组中女性 p16 基因甲基化均比男性高,说明不同性别人群 p16 基因甲基化程度是不一样的。亦有研究表明,长寿与性别之间存在相关关系,人类长寿显示明显的母系遗传倾向^[9]。虽然女性的长寿跟其生理特点、社会生活习惯及生活环境等有很密切的关系,但是,不可否认遗传因素在其中也起了很重要的作用^[10]。由于遗传因素在体内的作用极其复杂,因此,要想揭示其在长寿中的具体作用机制仍然需要作更进一步的研究。

总之, p16 基因甲基化与衰老的关系密切,对长寿人群体内这些基因的深入研究将有助于对老年病和肿瘤等疾病的更全面理解,为研究人类的衰老机制提供更多的理论依据,以便我们能以更好的方法治疗与细胞老化相关的疾病。另外,抗衰老过程中伴随着抑制肿瘤的机制,因此,对细胞衰老的研究也将为癌症的预防和治疗研究方法研究提供更为广阔的前景。

【参考文献】

- [1] Esteller M, Corn PG, Baylin SB, *et al.* A gene hypermethylation profile of human cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(8): 3225-3229.
- [2] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9821-9826.
- [3] 刘晓颖,汪惠园,鲁云,等. p16 基因甲基化特异检测方法的建立及其初步应用[J]. *安徽医科大学学报*, 2002, 37(1): 18-21.
- [4] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1993: 108.
- [5] Kim YS, Kim JS, Jung HC, *et al.* Regression of low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma after eradication of *Helicobacter pylori*: possible association with p16 hypermethylation[J]. *J Gastroenterol*, 2002, 37(1): 17-22.
- [6] Warltatmbe T, Nakamura M, Yonekawa Y, *et al.* Promoter hypermethylation and homozygous deletion of the p19ARF and p16INK4a genes in oligodendrogliomas[J]. *Acta Neuropathol*, 2001, 101(3): 185.
- [7] Ahmad T, Gore M. Review of the use of topotecan in ovarian carcinoma[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2004, 5(11): 2333-2340.
- [8] Kang GH, Lee S, Kim JS, *et al.* Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis[J]. *Lab Invest*, 2003, 83(5): 635.
- [9] Perls T, Kunkel L, Puca A. The genetics of aging[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(3): 362-369.
- [10] 余祥美. 巴马县 29 名高龄老人细胞遗传学分析[J]. *中华老年医学杂志*, 1982, 1(20): 70-73.

(收稿日期: 2009-02-17; 修回日期: 2010-03-25)

[1] Esteller M, Corn PG, Baylin SB, *et al.* A gene hyper-