

Relationships between Methylation of p16 Gene , Her-2 Expression and Serum CA125 Level with Clinicopathological Characteristics in Endometrial Carcinoma

子宫内膜癌中 p16 甲基化、Her-2 表达及血清 CA125 水平与临床病理特征的关系

周 莉/黄 萍/朱安娜

(汕头大学医学院附属肿瘤医院妇科, 广东 汕头 505031)

ZHOU Li , HUANG Ping , ZHU An-na
(Department of Gynecologic Surgery, Affiliated Tumor Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China)

【摘要】背景与目的：研究子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)组织中抑癌基因 p16 的甲基化和癌基因 Her-2 的表达及血清肿瘤标志物 CA125 水平及其与临床病理特征间的关系。 材料与方法：收集手术切除标本 EC 组织 38 例及内膜对照组织 20 例，采用甲基化特异性 PCR 法检测 p16 的甲基化状态；用免疫组化法检测 Her-2 蛋白的表达；对所有病例术前均采用免疫放射法测定血清 CA125 水平，并分析三者与临床病理特征之间的关系。 结果：20 例对照组织中 p16 的甲基化、Her-2 表达、血清 CA125 均阴性(0/20)，而 38 例 EC 组织中三者阳性率分别为 57.9% (22/38)、60.5% (23/38)、23.7% (9/38)，与对照组比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。p16 甲基化、Her-2 表达的阳性率以及血清 CA125 阳性率均与 EC 临床分期有相关关系(P 均 < 0.05)，p16 甲基化和血清 CA125 阳性率与病理分化有相关关系(P 均 < 0.05)，血清 CA125 水平与宫外淋巴结转移有关(P < 0.05)，三者与肿瘤浸润深度均显著相关(P 均 < 0.05)。Spearman 相关分析结果显示 Her-2 与 CA125 之间呈正相关关系 (rs = 0.323, P = 0.048)，与 p16 甲基化之间呈负相关关系 (rs = -0.362, P = 0.026)。 结论：p16 的甲基化、Her-2 表达、血清 CA125 的阳性率反映了肿瘤不同阶段中各基因及肿瘤标志物的不同表现，联合检测对指导术后治疗具有一定的意义。

【关键词】子宫内膜癌；p16；Her-2；CA125；甲基化

中图分类号：R737.33 文献标识码：A 文章编号：1004-616X(2009)02-0141-04

【ABSTRACT】BACKGROUND AND AIM: To study the correlations between p16 gene methylation, Her-2 expression and serum CA125 level in endometrial carcinoma(EC) and clinicopathological characteristics. MATERIALS AND METHODS: A total of 38 EC tissues and 20 normal controls (NC) were analyzed. We studied the p16 gene methylation by methylation specific PCR (MSP) and Her-2 expression by Envision method, and the preoperative serum CA125 levels were checked by radio-immunity in all cases. The correlations of expression levels and EC clinicopathological characteristic were studied. RESULTS: The positive rates of p16 methylation, Her-2 expression and serum CA125 level were 57.9% (22/38), 60.5% (23/38) and 23.7% (9/38), respectively, in 38 cases of EC, but were not detected in 20 normal controls, the difference was significant (P < 0.05). Methylation of p16 gene, Her-2 expression and serum CA125 level were all statistically related to clinical stage of EC in test group (P < 0.05), methylation of p16 gene and the level was statistically related to histological grade (P < 0.05). Serum CA125 levels were statistically related to pelvic lymph node metastasis (P < 0.05), the 3 indexes were all statistically related to the depth of tumor invasion (P < 0.05). Spearman correlation revealed there was a statistically positive relationship between Her-2 and serum CA125 level (P = 0.048) and negative correlation between methylation of p16 gene and Her-2 expression (P = 0.026). CONCLUSION: The measurements of p16 methylation, Her-2 expression and serum CA125 level may reflect different behaviors of genes

收稿日期：2008-09-27；修订日期：2008-11-11

基金项目：广东省卫生厅科研计划项目(粤卫 2006 第 129 号)

作者简介：周莉(1972-)女，湖南省湘乡市人，硕士，副主任医师，研究方向：妇科肿瘤。Tel: 0754-88555844-1197, E-mail: zlyyzl@126.com

and tumor markers at different stages of tumor pathogenesis. They may be useful tools for providing information about the malignant degree, prognosis, and may guide postoperative treatment for patients with EC.

【KEY WORDS】endometrial carcinoma ; p16 ; Her-2 ; CA125 ; methylation

子宫内膜癌 (endometrial carcinoma, EC) 作为一个与内分泌密切相关的恶性肿瘤,其发生、发展涉及多基因改变和多阶段累积的复杂的生物学过程。分子标志物为 EC 的诊断和治疗提供了新的思路和诊治手段。我们采用 DNA 甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 分别对 38 例 EC 及 20 例内膜对照组织 (normal controls, NC) 中抑癌基因 *p16* 启动子区甲基化进行检测;用 Envision 免疫组化法检测癌基因 Her-2 蛋白的表达;对所有病例术前均测定血清 CA125 水平,并分析 3 者与临床病理特征之间的关系,以期为子宫内膜癌的诊治及预后判断提供基础实验依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料 38 例 EC 及 20 例 NC 标本均来自汕头大学附属肿瘤医院 2006 年 1 月至 2007 年 6 月间手术切除标本,新鲜组织标本迅速保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱以备提取组织 DNA。38 例 EC 患者年龄 46~67 岁,平均年龄 53.25 岁。病理标本分级按 1988 年 FIGO 提出的标准分为 G_1 10 例、 G_2 26 例和 G_3 2 例,病理类型均为腺癌,且病理类型和病理分级均经该院病理科核实;宫外淋巴结转移 29 例,浸润深度 $\geq 1/2$ 者 14 例。临床分期按 1989 年 FIGO 公布的方法分为 I 期 22 例、II 期 7 例、III 期 7 例和 IV 期 2 例。选择 20 例 44~64 岁患者的内膜组织 (包括炎性息肉、增生子宫内膜各 5 例及正常内膜 10 例) 作为正常对照。

1.2 主要试剂和仪器 组织 DNA 提取试剂盒 (安徽优晶生物工程有限公司), 氢醌 (Sigma 公司) 及 Wizard DNA Clean-Up System 试剂盒 (Promega A7280), 免疫组化试剂盒购自上海长岛生物技术公司 (型号: R-0196, 即用型), CA125 检测试剂为德国罗氏生产 (批号: 18128704); PCR 仪 (德国 eppendorf 公司, 型号: Mastercycler gradient), CA125 检测仪 (德国罗氏 Ecl2010)。

1.3 子宫内膜组织 *p16* 甲基化的检测 (MSP 法)

按试剂盒说明书提取组织 DNA。取 $2\text{ }\mu\text{g}$ 模板 DNA 加蒸馏水至 $50\text{ }\mu\text{l}$, 加入新配置的 2 mol/L NaOH $5.5\text{ }\mu\text{l}$ (使终浓度为 0.2 mol/L), 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。加入 $30\text{ }\mu\text{l}$ 10 mmol/L 新鲜配制的氢醌, 溶液呈淡黄色。再加入 $520\text{ }\mu\text{l}$ 新配制的 3 mol/L 亚硫酸氢钠 (Sigma)。充分混匀后, 离心, 盖矿物油于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴箱孵育 16 h。经

修饰的 DNA 按 Wizard DNA Clean-Up System 试剂盒说明书操作纯化并溶解在终体积为 $50\text{ }\mu\text{l}$ 的 TE 溶液中以备洗盐。纯化后的 DNA 加入 $5.5\text{ }\mu\text{l}$ 3 mol/L 的 NaOH 溶液, 室温孵育 15 min。然后加入 10 mol/L 醋酸氨 $33\text{ }\mu\text{l}$ 混合, 再加入 3 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜), 离心, 用 70% 的 $200\text{ }\mu\text{l}$ 无水乙醇洗盐并室温干燥。最后用 $20\text{ }\mu\text{l}$ 去离子水溶解 DNA, 放 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

参照文献 [1] 合成 *p16* 甲基化引物序列, 甲基化引物序列为 $5'\text{-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'}$ 和 $5'\text{-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'}$; 非甲基化引物序列为 $5'\text{-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'}$ 和 $5'\text{-CAACCCCAACCACAACCATAA-3'}$, 分别用于扩增 *p16* 基因启动子区 CpG 岛甲基化和非甲基化的等位基因, 扩增产物长度分别为 150 bp 和 151 bp。内参照 β -actin 引物自行设计, 序列为 $5'\text{-CTGCCGTTTTGCGTAGGAC-3'}$ 和 $5'\text{-AGGC GTACAGGGATAGCAC-3'}$, 扩增产物长度为 428 bp。以上引物均由上海生物工程公司合成。

PCR 反应混合物体系 $50\text{ }\mu\text{l}$: $10\times$ PCR Buffer $5\text{ }\mu\text{l}$, 25 mmol/L dNTP $2.5\text{ }\mu\text{l}$, 10 mmol/L 上下游引物 P1/P2 (P16-MF/R 或 P16-UF/R) 各 $1\text{ }\mu\text{l}$, 去离子水 $38.5\text{ }\mu\text{l}$, 修饰过的 DNA $2\text{ }\mu\text{l}$, 2.5 U Taq 酶 $1\text{ }\mu\text{l}$ 。以正常子宫内膜组织 DNA 为对照, 以去离子水代替模板 DNA 作空白对照。扩增条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s; $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。将 $8\text{ }\mu\text{l}$ 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (100 V , 20 min), 紫外成像分析仪下观察扩增结果。

1.4 Her-2 表达的检测 采用免疫组化二步法对子宫内膜癌石蜡标本进行 Her-2 蛋白表达检测, 严格按照说明书操作。判断标准: 阳性细胞染色为棕黄或棕褐色, 在高倍镜下, 取 10 个视野进行细胞计数, 每个视野计数 100 个肿瘤细胞, 按阳性细胞所占百分比确定。肿瘤细胞染色 $\leq 10\%$ 为阴性 (-); 肿瘤细胞染色 $> 10\%$, 不完整胞膜染色为阳性 (+); 肿瘤细胞染色 $> 10\%$, 较弱但完整胞膜染色为阳性 (++) ; 肿瘤细胞染色 $> 10\%$ 较强的完整胞膜染色为阳性 (+++)。

1.5 血清 CA125 的检测 (免疫放射法) 对 58 例患者术前均采用免疫放射法检测血清 CA125 水平, 严格按照说明书操作, 正常值为 $< 35\text{ mIU/L}$ 。

1.6 统计学方法 利用 SPSS 13.0 软件处理数据, 各基因表达与 EC 临床病理因素间的关系采用 χ^2 精

确概率法 相关性分析采用 Spearman 等级相关。

2 结果

2.1 MSP 法对 *p16* 基因启动子区 CpG 岛甲基化的检测结果 基因组 DNA 经 1.5% 琼脂糖电泳, 结果表明完整性较好, 且 A_{260}/A_{280} 均在 1.5~1.8 之间。MSP 法电泳分析结果见图 1。 β -actin 为内参照(图 1A), 甲基化 (M) 和非甲基化 (U) 扩增产物分别为 150 bp 和 151 bp(图 1B)。38 例 EC 组织中 *p16* 基因全部甲基化 12 例 (31.6%), 部分基因甲基化 10 例 (26.3%), 未发生甲基化 16 例 (42.1%), 而 20 例对照组织均未检测到甲基化 (0/20), 两组间甲基化率差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 Her-2 蛋白表达的免疫组化结果 Her-2 蛋白表达于细胞膜上, 见图 2。38 例子官内膜 EC 组织中 Her-2 的表达阴性及阳性分别为 39.5% (15/38) 和 60.5% (23/38)。而 20 例对照组织中 Her-2 的表达均为

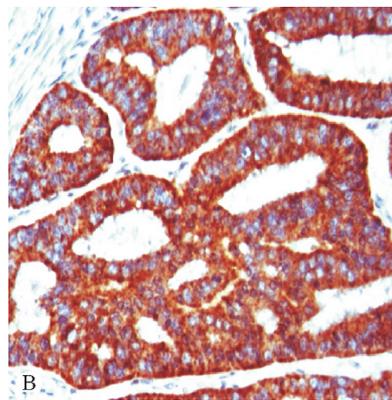
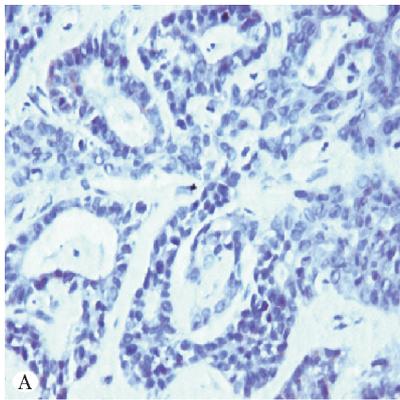


图 2 Her-2 蛋白表达的免疫组化结果 ($\times 400$)。图 A: 子宫内腺癌 Her-2 蛋白阴性 (-); 图 B: 子宫内腺癌 Her-2 蛋白阳性 (+++)。Figure 2 Immunohistochemical staining for Her-2 protein expression ($\times 400$). A: Her-2 negative expression endometrial carcinoma tissue (-); B: Her-2 positive expression endometrial carcinoma tissue (+++)

2.3 血清 CA125 检测的结果 EC 组血清 CA125 为 1.45~238.5 mIU/L, 其中 9 例 > 35 mIU/L 为阳性, 而对照组血清 CA125 为 7.8~24.5 mIU/L, 均为阴性。EC 组织中的 CA125 阳性率显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

2.4 *p16* 的甲基化、Her-2 表达及血清 CA125 水平与子宫内膜癌临床病理因素间的关系 见表 1。*p16* 的甲基化、Her-2 表达阳性率、血清 CA125 阳性率与 EC 临床分期 (FIGO 分期) 均呈相关关系 (r_s 依次为 -0.352, 0.580, 0.653, P 均 < 0.05), *p16* 的甲基化及血清 CA125 与病理分化有相关关系 ($r_s = -0.389, 0.333, P < 0.05$), 而血清 CA125 水平与宫外淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 3 者与 EC 浸润深度均显著相关 (P 均 < 0.05)。

阳性 (0/20), 癌组织中的 Her-2 表达阳性率显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

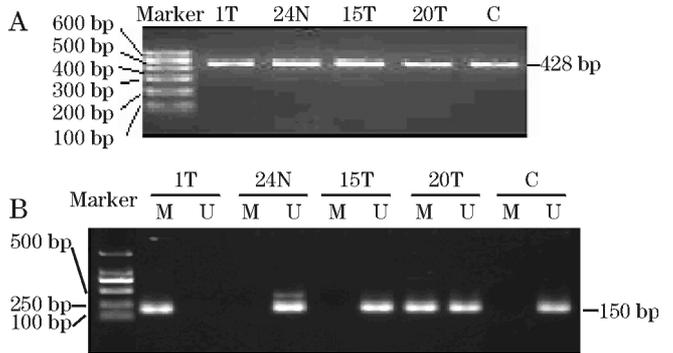


图 1 MSP 法对 *p16* 基因启动子区 CpG 岛甲基化的检测结果。泳道 1T, 15T, 20T 为 EC 组织, 泳道 24N 为增生的子宫内膜组织, 泳道 C 为完全正常子宫内膜组织。A: 内参照 β -actin; B: *p16* 基因, M 表示甲基化, U 表示非甲基化; 其中 20T 表示存在部分基因甲基化; 1T 表示全部甲基化; 15T, 24N, C 表示 *p16* 全部未甲基化

Figure 1 The methylation results of the CpG islands of *p16* promoter by MSP. 1T, 15T, 20T: EC tissue; 24N: simple hyperplasia tissue; C: normal endometrium tissue. A: β -actin; B: *p16* gene, M: methylation; U: unmethylation; 20T: some methylation; 1T: complete methylation; 15T, 24N, C: no methylation.

2.5 *p16* 甲基化、Her-2 表达及血清 CA125 水平之间的相关关系 Her-2 与 CA125 之间呈正相关关系 ($r_s = 0.323, P = 0.048$)。Her-2 与 *p16* 甲基化之间呈负相关关系 ($r_s = -0.362, P = 0.026$), 而 *p16* 甲基化与 CA125 之间显示负相关关系, 但差异无统计学意义 ($r_s = -0.277, P = 0.092$)。

3 讨论

大量实验证实, 抑癌基因启动子区域 CpG 岛高甲基化出现在肿瘤发生的早期阶段, 在肿瘤发生、发展的过程中可能发挥着关键作用, 并且在肺、食管、卵巢等多种恶性肿瘤中已得到证实^[2]。本研究结果显示, *p16* 基因在 EC 及 NC 组织中甲基化率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 在正常或炎性内膜组织中无甲基化出现,



表 1 p16基因的甲基化、Her-2表达、血清CA125阳性率与临床病理因素间的关系

Table 1 Correlations between positive rates of p16 gene methylation, Her-2 expression, serum CA125 level and clinicopathological characteristics

Index	n	p16 methylation		P	Her-2		P	CA125		P
		± ~ +	%		+	%		+	%	
FIGO stage				0.030			0.000			0.000
stage I	22	16	72.7%		8	31.8%		0	0	
stage II-IV	16	6	37.5%		15	93.6%		9	56.3%	
Pathologic grade				0.025			0.122			0.042
grade 1	10	9	90.0%		4	40.0%		0	0%	
grade 2 and 3	28	13	46.4%		19	67.9%		9	32.1%	
Pelvic lymph node metastasis				0.128			0.061			0.000
-	29	19	65.5%		15	51.7%		1	3.4%	
+	9	3	33.3%		8	88.9%		8	88.9%	
Depth of invasion				0.047			0.002			0.000
< 1/2	24	17	70.8%		10	41.7%		1	4.2%	
≥ 1/2	14	5	35.7%		13	92.9%		8	64.3%	

而在 EC 组织中,全部甲基化发生率为 31.6%,与国内文献报道相似^[3-4]。实验结果同时提示临床分期越早期,病理分化越好,浸润深度越浅,p16 基因甲基化率越高,而且差异有统计学意义($P < 0.05$) (见表 1),说明了 p16 基因甲基化在 EC 的发生、发展过程中可能是一个早期事件。此结果与周晓春等^[3-4]报道在 EC 中,p16 基因甲基化多集中在早期,分化较好病例中相符。

癌基因 Her-2/C-erbB-2 编码的蛋白属于表皮生长因子受体家族,正常情况下处于非激活状态,参与细胞生长调节,当受到某些致癌因素作用后,主要以基因扩增的形式被激活而具有肿瘤转化活性。本研究中 38 例子官内膜癌组织 Her-2 阳性率为 60.5% (23/38),临床分期 I 期与 II~IV 期比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),与是否存在宫外淋巴结转移以及肿瘤浸润深度亦有关 ($P < 0.05$),在不同病理学分级间,1 级与 2~3 级比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。此结果可能与病例数较少有关。因此我们推测 Her-2 的表达与子宫内膜癌恶性程度可能有关,即细胞分化越差,Her-2 的表达越强,并随临床分期的升高表达亦增强。这提示 Her-2 在子宫内膜癌的生物行为中可能有着重要的地位,可作为判断子宫内膜癌预后的重要指标。

CA125 是胚胎期体腔上皮的抗原,子宫内膜癌来源于体腔上皮的苗勒管上皮,早期因病灶小而多呈阴性反应,当子宫内膜癌扩散至子宫外时,可呈较强阳性反应。目前 CA125 已被认为是子宫内膜癌的最有用的肿瘤标志物。子宫内膜癌患者的血清 CA125 水平与临床分期、病理类型及病灶转移和浸润深度有关,研究结果表明若血清 CA125 < 35 mIU/L,90%的病人为临床早期,可以考虑尽量手术治疗;如血清 CA125 > 100 mIU/L,有 82.4%~89%的病人有宫外转移,术后多需进一步辅

助治疗^[5-7]。我们的研究中,CA125 阳性患者 88.9%有宫外转移,75%有宫外转移患者 CA125 > 100 mIU/L。

综上所述,抑癌基因 p16 高甲基化出现在肿瘤发生的早期阶段,与 EC 临床分期、病理分化和浸润深度有关,且随着临床分期和病理分级的升高而呈下降趋势。相反 Her-2 在临床分期和病理分级较高的 EC 病例中高表达,其过度表达和肿瘤转移及复发可能相关。而 CA125 与临床各病理特征密切相关,也是判断子宫内膜癌预后的重要指标。3 者的差异反映了肿瘤不同阶段中各基因及肿瘤标志物的不同表现,联合检测对指导术后治疗具有一定的意义。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Wang SJ, Du J, Liu YJ. P16 gene deletion and 5'CpG island methylation in endometrial carcinoma [J]. Tumor, 2002, 22(3): 213-214.
- [3] 周晓春, 孙建衡, 陆士新, 等. 子宫内膜癌中 MTS1/p16 基因缺失的研究 [J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(3): 228-231.
- [4] 原继荣, 傅松滨, 傅红, 等. p16 基因甲基化与表达在子宫内膜癌中的意义 [J]. 遗传学报, 2004, 31(5): 454-459.
- [5] 李艳芳, 李孟达. 子宫内膜癌患者 CA125 及 CA199 水平与预后因素关系 [J]. 中华妇产科杂志, 1998, 33(6): 376-377.
- [6] 张曲屏, 王建六, 魏丽, 等. 肿瘤标记物癌抗原 125 癌蛋白-2 和血清唾液酸在子宫内膜癌的应用 [J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(1): 33-35.
- [7] Xie Z, Zhang J, Tan A, et al. Relationship between serum CA125 level and prognosis in the patients with uterine endometrial carcinoma [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2001, 81(23): 1456-1457.