

# 检测痰脱落细胞 p16 基因甲基化对周围型肺癌的诊断价值

张文 孙玉鸮 卢光明

**【摘要】** 目的 探讨检测痰脱落细胞 p16 基因甲基化对周围型肺癌的诊断价值。方法 应用甲基化特异性 PCR( methylation-specific PCR, MSP )对 50 例周围型肺结节患者及 20 例正常人痰脱落细胞 p16 基因甲基化改变进行检测,将检测结果与术后病理报告相对照。结果 周围型肺癌痰脱落细胞 p16 MSP 阳性率( 27/44, 61.4% )明显高于良性周围型肺结节( 1/6, 16.7% )及正常人( 3/20, 15.0% )( $\chi^2$  值分别为 4.281 和 11.869,  $P < 0.05$ ), 良性周围型肺结节 p16 MSP 阳性率与正常人无显著性差异( $\chi^2 = 0.136, P > 0.05$ )。鳞癌和腺癌患者痰脱落细胞 p16 MSP 阳性率无显著性差异( $\chi^2 = 3.416, P > 0.05$ )。如果以痰脱落细胞 p16 MSP 阳性作为判断肺结节恶性的标准,其诊断周围型肺癌的阳性预测值为 96.4%, 阴性预测值 22.7%, 灵敏度 61.4%, 特异度 83.0%。结论 检测痰脱落细胞 p16 基因甲基化对周围型肺癌具有辅助诊断价值。

**【关键词】** 肺肿瘤 痰 p16 基因 甲基化

**【中图分类号】** R655.3, Q75

## The diagnostic value of determination of p16 methylation of sputum exfoliated cells for peripheral lung cancer

ZHANG Wen, SUN Yu 'e, LU Guangming. Department of Thoracic Surgery, PLA General Hospital, Beijing 100853, P. R. China

**【Abstract】 Objective** To study the diagnostic value of detection of p16 methylation of sputum exfoliated cells for peripheral lung cancer. **Methods** Before operation, p16 methylation of the sputum exfoliated cells was detected in 20 normal persons and 50 patients with peripheral pulmonary nodi by p16 methylation-specific PCR( MSP ) for judging the nature of the nodi. The results were compared with pathological reports after operation. **Results** The p16 MSP positive rate of sputum exfoliated cells of peripheral lung cancer patients ( 27/44, 61.4% ) was much higher than that of benign pulmonary nodi ( 1/6, 16.7% ) and normal persons ( 3/20, 15.0% ) ( $\chi^2 = 4.281$  and 11.869 respectively, both  $P < 0.05$ ). No significant difference of p16 MSP positive rate of sputum exfoliated cells was found between benign pulmonary nodi and normal persons ( $\chi^2 = 0.136, P > 0.05$ ). No significant difference of p16 MSP positive rate of sputum exfoliated cells was found between squamous cell carcinoma ( 13/18, 72.2% ) and adenocarcinoma ( 8/19, 42.1% ) ( $\chi^2 = 3.416, P > 0.05$ ). If the positive p16 MSP of sputum was chosen as criterion for peripheral lung cancer, its positive predictive value, negative predictive value, sensitivity and specificity were 96.4%, 22.7%, 61.4% and 83.0% respectively. **Conclusion** The detection of p16 methylation of sputum exfoliated cells is contributable to the diagnosis of lung cancer.

**【Key words】** Lung neoplasms Sputum p16 gene Methylation

目前对周围型肺癌的诊断以痰脱落细胞、影像学检查及穿刺活检为主要手段,但早期诊断率仍处于比较低的水平。寻找一种有效、安全、无创的辅助诊断手段是临床所迫切需要的。p16 基因是一种抑癌基因,研究表明,p16 基因甲基化发生在肺癌形成的早期阶段<sup>[1-3]</sup>,并且 p16 基因甲基化在肺癌和正常肺组织中有明显差异<sup>[4-6]</sup>。本实验对 50 例周围型肺结节患者

的痰脱落细胞 p16 基因甲基化改变进行了检测,将检测结果与术后病理报告相对照,以探讨痰脱落细胞 p16 基因甲基化检测对周围型肺癌的辅助诊断价值。

### 1 材料与方法

**1.1 标本** 选取 2000 年 2 月至 2000 年 12 月在我院胸外科住院治疗的 50 例周围型肺结节患者的痰液作为检测对象,另选 20 例正常人作为对照。50 例患者术前都在我科行纤维支气管镜检查,但均无法取到病变组织。其中男性 36 例,女性 14 例,年龄 29 ~ 77 岁,

作者单位:100853 北京,解放军总医院胸外科(通讯作者:张文,现在空军总医院胸外科)

平均(56 ± 12)岁。肺结节直径最小者为 1.0 cm,最大者为 7.5 cm,平均(3.5 ± 1.5)cm。20 例正常人中,男性 14 例,女性 6 例,年龄 21 ~ 68 岁,平均(50 ± 11)岁。

**1.2 试剂** DNA 提取试剂盒“QIAamp DNA Mini Kit”购自德国 QIAGEN 公司;DNA 纯化试剂盒“Wizard Plus Minipreps”购自美国 Promega 公司;100 bp 梯度 DNA 分子量标准参照物(100 ~ 1000 bp)购自华美公司。其它试剂均为国产分析纯试剂。

**1.3 p16 引物** 引物设计参考文献 7,由上海生工生物工程公司合成。其序列如下。

野生型(p16-W)产物为 140 bp:

Sense 5'- CAGAGGGTGGGGCGGACCGC-3'

Antisense 5'- CGGGCCGCGGCCGTGG-3'

非甲基化型(p16-U)产物为 151 bp:

Sense 5'- TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'

Antisense 5'- CAACCCCAAACCACAACCATAA-3'

甲基化型(p16-M)产物为 150 bp:

Sense 5'- TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'

Antisense 5'- GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'

**1.4 主要仪器** GeneAmp PCR System 9600(美国 PE 公司),凝胶成像系统(美国 UVP 公司),台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司),DYY-III 电泳仪(北京六一仪器厂),紫外分光光度计(日本日立公司)。

## 1.5 实验方法

**1.5.1 痰液留取** 患者晨起漱口后,留取第一口咳出的深部痰,连续取 3 天。痰液留取后立即消化处理。

**1.5.2 痰液消化处理** 参考文献 8。取痰标本 1 ml,加入 7 ml 消化液(消化液成分 2% NaOH,1.45% 柠檬酸钠,0.5% N-乙酰基-L-半胱氨酸),室温静置 15 min,4 000 r/min 15 min 离心,将沉淀物移至 1.5 ml Eppendorf 管中,12 000 r/min 离心 10 min,离心后弃上清。

**1.5.3 痰脱落细胞基因组 DNA 的提取** 按照试剂盒说明书所述方法抽提 DNA。紫外分光光度计测定 DNA 的含量和纯度。

**1.5.4 甲基化特异性 PCR(MSP)<sup>[7]</sup>** 其原理是双链 DNA 变性解链后,亚硫酸盐作用下发生 C→U 转化,C 若已有甲基化则无此改变;甲基化修饰只发生于 5'→3'方向 C-G 相联结构的 C 上,因此,在亚硫酸盐作用后,DNA 若无甲基化,则序列中的改变为 C→U,CG→UG,若已有甲基化则为 C→C,CG→CG,用不同的引物做 PCR,即可检测出这种差异,从而确定基因有无 CpG 岛甲基化。先将提取的基因组 DNA(5 μg)加到终浓度 0.2 mol/L NaOH 的 50 μl 碱裂解液中,37℃ 保温 10 min,然后将 3 mol/L 亚硫酸氢钠(pH5.0)520 μl 与 10

mmol/L 氢醌 30 μl 轻轻混合,立即加入碱变性后的 DNA,上面覆盖一层矿物油,50℃ 保温 16 h,对基因组 DNA 的碱基进行亚硫酸氢钠修饰。再用 DNA 纯化试剂盒脱盐,将 DNA 洗脱进 50 μl 水中。最后将含有磺化尿嘧啶的 DNA 在碱性条件下(NaOH 终浓度 0.3 mol/L)室温处理 5 min,再用乙醇沉淀。DNA 重新溶于 50 μl 水中,取少部分定量,其余 -20℃ 冻存。按文献 7 所述方法进行 MS-PCR 扩增,反应体积均为 50 μl,PCR 循环在 PE9600 扩增仪上完成。预变性 95℃ 2 min,主循环 35 次[变性 95℃ 30 s,退火温度(p16-W、p16-M 和 p16-U 分别为 67℃、65℃ 和 62℃)40 s],末次延伸 72℃ 4 min。反应完成后,将 PCR 产物与上样液按 6:1 混合后,于 2% 琼脂糖凝胶上跑电泳,于凝胶成像系统下检测、照相。

**1.6 统计学方法** 各组 p16 基因甲基化率之间的比较采用  $\chi^2$  检验方法,以  $P < 0.05$  作为差别有显著意义的检验标准。

## 2 结果

图 1、2 分别为 50 例患者及 20 例正常人痰脱落细胞 MSP 电泳图,箭头标记处为用 p16-M 为引物的 MSP 反应阳性电泳带,其产物长度为 150 bp,与引物设计一致。

表 1 为 20 例正常人痰分析结果及 50 例患者术后病理及痰分析结果。从表 1 中可以看出,50 例周围型肺结节患者中,44 例为恶性肿瘤,其中 27 例痰脱落细胞 p16 MSP 阳性,阳性率为 61.4%;6 例良性周围型肺结节患者中,1 例痰脱落细胞 p16 MSP 阳性,阳性率为 16.7%;而 20 例正常人中,3 例痰脱落细胞 p16 MSP 阳性,阳性率为 15.0%。经  $\chi^2$  检验,周围型肺癌痰脱落细胞 p16 MSP 阳性率明显高于良性周围型肺结节及正常人( $\chi^2$  分别为 4.281 和 11.869,  $P$  均  $< 0.05$ ),良性周围型肺结节 p16 MSP 阳性率与正常人无明显差异( $\chi^2 = 0.136, P > 0.05$ )。

肺恶性肿瘤各病理类型的痰脱落细胞 p16 MSP 阳性率之间的比较:18 例鳞癌患者中,13 例 MSP 阳性,阳性率为 72.2%,而 19 例腺癌患者中,8 例 MSP 阳性,阳性率为 42.1%,但经  $\chi^2$  检验,二者无明显差异( $\chi^2 = 3.416, P > 0.05$ )。由于其它病理类型例数太少,未进行比较。

如果以痰 p16 MSP 阳性作为判断肺结节恶性的标准,那么它对周围型肺癌的阳性预测值为 96.4%,阴性预测值 22.7%,灵敏度 61.4%,特异度 83.0%。

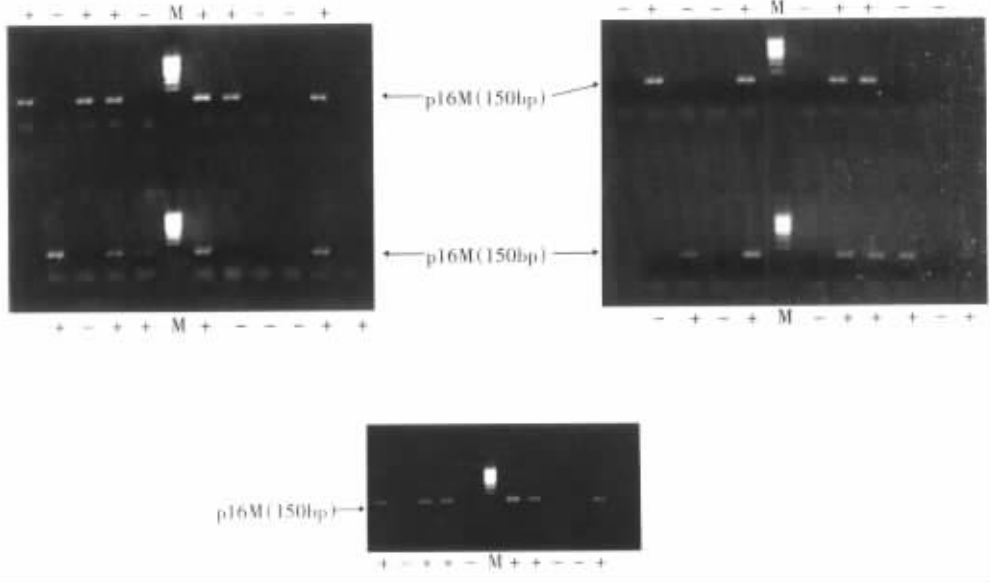


图 1 50 例周围型肺结节患者痰脱落细胞 p16 MSP 电泳图

Fig 1 p16 MSP electrophoretogram of sputum exfoliated cells of 50 patients with peripheral pulmonary nodi



图 2 20 例正常人痰脱落细胞 p16 MSP 电泳图

Fig 2 p16 MSP electrophoretogram of sputum exfoliated cells of 20 normal persons

表 1 正常人及周围型肺结节患者术后病理及痰液检测结果

Tab 1 Pathological and p16 MSP results of sputum exfoliated cells in patients with peripheral pulmonary nodi and normal persons

Pathology	n	p16 MSP( + ) ( positive rate )
Squamous cell carcinoma	18	13( 72.2% )
Well-differentiated	5	4
Moderate-differentiated	8	6
Poor-differentiated	5	3
Adenocarcinoma	19	8( 42.1% )
Well-differentiated	4	2
Moderate-differentiated	5	3
Poor-differentiated	6	3
Bronchoalveolar carcinoma	4	0
Adeno squamous cell carcinoma	2	2( 100.0% )
Large cell carcinoma	2	2( 100.0% )
Small cell lung cancer	2	1( 50.0% )
Atypical carcinoid	1	1( 100.0% )
Benign nodi	6	1( 16.7% )
Tuberculosis	3	0
Hamartoma	1	0
Inflammation	2	1
Normal persons	20	3( 15.0% )
Total	70	31

### 3 讨论

通过痰检诊断肺癌已有很长历史。人们最早采用的方法是痰脱落细胞检查,它对痰液中脱落细胞的形态进行直接的观察,通过找出异形的肿瘤细胞而对肺癌进行诊断。这种检查方法具有直观的特点,通过它还可以确定肺癌的组织学类型,而且还能发现肺部其它疾病的线索。但是,这种方法假阴性率较高(约 20% ~ 60%),并有一定的假阳性(约 2%)。随着分子生物学的进展及对肺癌发病遗传机制的逐步了解,人们开始想到能否避开具体的细胞形态而以肿瘤的某一特异标记来识别之。PCR 技术使得人们能够用很少的组织或脱落细胞进行有关的分子生物学研究,从而使检测痰标本中肺癌相关基因等标记物成为可能。

p16 基因是一种肿瘤抑制基因,它位于人染色体 9P21 区,全长 8.5 kb,由三个外显子和两个内含子组成,它们共同编码 148 个氨基酸组成的 15.8 kU 的 p16 蛋白<sup>[9,10]</sup>。p16 基因的失活会导致细胞无限制分裂增殖<sup>[11]</sup>。在许多肿瘤细胞系和原发性肿瘤中都有 p16

基因的改变。p16 基因第一外显子和第二外显子部分区域富含 C 和 G, 形成 CpG 岛, 是 p16 基因甲基化的重要结构基础。研究表明, p16 基因甲基化发生在肺癌形成的早期阶段, 并且 p16 基因甲基化在肺癌和正常肺组织中有明显差异。本研究发现肺癌患者痰脱落细胞 p16 基因甲基化阳性率明显高于肺良性病变及正常人, 说明可以通过检测痰液中脱落细胞 p16 基因的甲基化改变情况来帮助区分肺癌和正常肺组织。

如果把痰脱落细胞 p16 基因 MSP 阳性作为判断周围型肺癌的标准, 其阳性预测值很高 (96.4%), 也就是说, 当痰脱落细胞 p16 基因的 MSP 阳性时, 要高度怀疑肺结节为恶性。但是此诊断标准的阴性预测值低 (22.7%), 即当痰脱落细胞 p16 基因的 MSP 阴性时, 绝不能简单地认为肺结节为良性, 仍然需要作其它检查以排除恶性可能。总的来说, 痰脱落细胞 p16 基因的甲基化检测可以作为肺癌诊断的一项很好的辅助检查, 但还不能作为筛选标准。

#### 参 考 文 献

- 1 Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, et al. Aberrant methylation of p16 (INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(20): 11891-11896.
- 2 Niklinska W, Chytczeuski L, Laudanski J, et al. Detection of p16 abnormality in early stage non-small cell lung cancer. *Folia HistochemCytobiol* 2001, 39 Suppl 2: 30-32.
- 3 Su CQ, Shan XN. Correlation of inactivation of CDKN2/p16 gene by methylation and lung cancers. *Chin J Med Genet* 2000, 17(1): 36-38. [苏长青, 单祥年. CDKN 2/p16 基因甲基化失活与肺癌关系的研究. *中华医学遗传学杂志* 2000, 17(1): 36-38.]

- 4 Kashiwabara K, Oyama T, Sano T, et al. Correlation between methylation status of the p16/CDKN2 gene and the expression of p16 and Rb proteins in primary non-small cell lung cancers. *Int J Cancer*, 1998, 79(3): 215-220.
- 5 Kurakawa E, Shimamoto T, Utsumi K, et al. Hypermethylation of p16 (INK4a) and p15 (INK4b) genes in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2001, 19(2): 277-281.
- 6 Wu J, Liang B, He JY, et al. Study on detection of aberrant promoter hypermethylation of p16 and DAP kinase in serum DNA from patients with non-small cell lung cancer. *Chin J Lung Cancer* 2002, 5(3): 188-190. [伍俊, 梁标, 何建猷, 等. NSCLC 患者血清中 p16、DAP 基因甲基化的研究. *中国肺癌杂志* 2002, 5(3): 188-190.]
- 7 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(18): 9821-9826.
- 8 Cheng SJ, Ma Y, Pan YX, et al. The application of PCR on the diagnosis of tuberculosis and silicosis tuberculosis. *Chin J Epidemiol*, 1992, special issue(2): 164-166. [程绍基, 马屿, 潘毓喧, 等. PCR 在肺结核和矽肺结核诊断中的应用. *中国流行病学杂志*, 1992, 13(特2): 164-166.]
- 9 Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 1994, 264(5157): 436-440.
- 10 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 1993, 366(6456): 704-707.
- 11 Gazzeri S, Gouyer V, Vourèh C, et al. Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene*, 1998, 16(4): 497-504.

(收稿 2002-09-25 修回 2003-02-15)

(本文编辑 张世雯)

· 启事 ·

## 第七届全国电视胸腔镜学术研讨会 征 文 通 知

为增进我国电视胸腔镜手术及胸部微创手术届的学术交流, 经中华医学会胸心血管外科学分会胸腔镜外科学组第一次工作会议讨论决定, 第七届全国电视胸腔镜学术研讨会将于 2004 年 8 月 5 ~ 8 日在新疆乌鲁木齐市举办。欢迎胸外科医师踊跃投稿。征文内容包括未在正式刊物发表的有关胸腔镜、纵隔镜、胸部小切口手术等胸部微创技术的手术经验介绍、实验研究、并发症分析、长期疗效观察等方面的论文。截稿日期 2004 年 6 月 30 日。

中国肺癌杂志  
www.lungca.org