

原发性肝癌患者血清 p16 和 DAPK 基因启动子甲基化的研究

陈龙邦¹, 林 劼¹, 唐永明², 王 晶²

Analysis of Promoter Hypermethylation of p16 Gene and DAPK Gene in Sera from Primary Liver Cancer Patients

CHEN Long-bang¹, LIN Qing¹, TANG Yong-ming², WANG Jing²

1. Department of Medical Oncology, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, China; 2. Laboratory of Clinical Immunology, Nanjing 454 Hospital of Nanjing Army

Abstract: **Objective** To analyze the aberrant methylation of p16 gene and DAPK gene in sera from primary liver cancer patients and to evaluate the clinical significance. **Methods** A methylation-specific PCR was performed for the detection of promoter hypermethylation of p16 gene and DAPK gene in blood DNA from 64 cases of PLC patients. The relation of the aberrant methylation of p16 gene and DAPK gene and the clinical pathological data was analyzed. **Results** 76.6% (49/64) of the sera from 64 cases of PLC patients showed hypermethylation for p16 promoter and 40.6% (26/64) the same for DAPK promoter, whereas no methylated p16 gene and DAPK gene were found in sera from liver benign diseases patients and normal control. Methylated p16 gene and DAPK gene promoters in sera did not strongly correlate with HBsAg, stage, metastasis and differentiation in PLC; but strongly correlated with AFP. **Conclusion**

Detection of the aberrant methylation of p16 and DAPK gene in serum from PLC patients might offer an effective method for the earlier auxiliary diagnosis of the malignancy.

Key words: PLC; p16 gene; DAPK gene; Serum; DNA methylation

摘 要: **目的** 研究原发性肝癌患者血清 p16 和 DAPK 基因启动子甲基化的改变状况及其临床意义。 **方法** 运用甲基化特异性 PCR 技术, 检测 64 例 PLC 患者血清 p16 基因和 DAPK 基因启动子甲基化, 并分析与临床病理资料的关系。 **结果** PLC 患者血清 p16 基因和 DAPK 基因甲基化检出率分别为 76.6% (49/64) 和 40.6% (26/64), 而正常对照组和良性肝病组血清未检出 p16 基因和 DAPK 基因甲基化; p16 基因和 DAPK 基因甲基化检出率与 HBsAg、分期及转移状态无明显关系, 而与 AFP 有关联。 **结论** p16 基因和 DAPK 基因启动子异常甲基化参与了 PLC 的发生发展过程, 并可作为 PLC 早期辅助诊断的分子标志物之一。

关键词: 原发性肝癌; p16 基因; DAPK 基因; 血清; DNA 甲基化

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578 (2006)03-0175-03

0 引言

p16 基因是一个重要的肿瘤抑制基因^[1], 参与细胞周期的调控, 控制细胞生长和分化。死亡相关蛋白激酶 (death-associated protein kinase, DAPK) 基因是一种钙调蛋白调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是凋亡的正性调节因子之一^[2,3], 现已发现在多种肿瘤组织存在 p16 和 DAPK 基因启动子的甲基化, 提示这些基因的甲基化可能与肿瘤的发生发展

有关。本文运用甲基化特异性 PCR (MSP) 技术检测原发性肝癌 (PLC) 患者血清循环核酸中 DAPK 基因、p16 基因甲基化的状况, 并探讨检测血清 DAPK 基因、p16 基因甲基化的临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象 64 例 PLC 患者均为住院病例, 其中男性 44 例, 女性 20 例, 年龄 38~82 岁, 中位年龄 64 岁。所有病例均有组织病理学和/或细胞学诊断依据。按 1997 年 UICC 标准分期, Ⅰ期 5 例, Ⅱ期 23 例, Ⅲ期 15 例 (其中 25 例接受手术治疗)。HBsAg 阳性的 36 例, 阴性为 28 例; AFP > 400 μg/L 的 30 例, 31 μg/L < AFP < 400 μg/L 的 15 例, AFP 正常的 19 例; 对照组为 20 例正常人和 15 例良性肝病疾病患者 (其中 10 例为慢性乙肝患者, 3

收稿日期: 2005-05-13; 修回日期: 2005-06-22

基金项目: 南京军区南京总医院科研基金重点资助项目 (2003017)

作者单位: 1. 210002 南京军区南京总医院肿瘤科; 2. 南京空军 454 医院检验科免疫实验室

作者简介: 陈龙邦 (1955-) 男, 博士, 教授, 主要从事肿瘤内科专业

例为慢性血吸虫肝硬化,2 例为肝炎后肝硬化)。

所有病例均于入院后次日留取血清标本,其中手术病例在术后 2 周留取第二次血清标本,所有标本保存于-30 冰箱待检。

1.2 试剂与仪器 DNA 提取及清洁使用杭州维特洁生化公司提供的试剂盒;Taq 酶购自 Promega 公司;DNA 分子量 Marker 购自华美生物工程公司;电泳琼脂糖为 Sigma 公司产品;其余试剂均为国产分析纯。主要仪器包括 PTC-100 型 PCR 仪,ECPS3000/150 电泳仪,TXT-20M 凝胶成像系统(UVP)等。

1.3 DNA 制备 试剂盒提取 DNA,紫外分光光度计测定 DNA 含量,吸光度 $A_{260}/A_{280} > 1.8$ 。

亚硫酸处理按照 Herman's 的经典方法^[4],处理后 DNA 标本用清洁试剂盒纯化,所得 DNA 用 3mol/L 氢氧化钠碱化,冷乙醇沉淀,适量双蒸水溶解修饰处理的 DNA,立即扩增或-20 保存。

1.4 PCR 反应体系 见表 1。

表 1 PCR 引物^[5]:引物顺序及 PCR 产物大小

Gene	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')	Size(bp)
DAPK(M*)	GGA TAGTCG GA TCGAGTTAACGTC	CCCTCCCAAACGC- CGA	98
DAPK(U)	GGA GGA TA GTTGGA T- TGA GTTAA TGTT	CAAA TCCTC- CCAAACACCAA ACCCGAC-	108
p16(M)	TTA TTA GA GGGT- GGGCGGA TCGCGTGC	CCC GAACCGCGAC- CGTAA	150
p16(U)	TTA TTA GA GGGT- GGGTGGA TTGT	CAACCCCAAACCA- CAACCA TAA	151

*M = methylated-specific primers; U = unmethylated-specific primers

PCR 扩增:反应总体积 50μl,反应体系为:甲基化处理过的 DNA 模板 5μl, 6mmol/L MgCl₂, 1.6μmol/L PCR primers, 2.5 units HotStar Taq DNA polymerase (Promega), 0.1mmol/L dNTP₅。循环参数:96 变性 5min,后加入 Taq 酶,接着96 45s,62 50s,72 90s,循环 35 个循环,最后 72 延长 10min。

水代替 DNA 作为空白对照,健康献血者 DNA 作为未甲基化分析的阳性对照,外周血中的淋巴细胞的 DNA 经 SssI 甲基化酶处理后作为甲基化分析的阳性对照。扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外光照显带。

1.5 统计学处理 用 SPSS 10.0 软件进行分析,不同组别 DAPK 基因甲基化检出率的比较采用 R × C 表²检验。

2 结果

2.1 不同组别两基因甲基化检出率的比较 64 例

PLC 患者血清经 MSP 法检测后,49 例在 p16 基因 5' 端启动子区域的 CpG 岛存在甲基化,见图 1。检出率为 76.6%;26 例在 DAPK 基因 5' 端启动子区域的 CpG 岛存在甲基化,见图 2。检出率为 40.6%;而 20 例正常人和 15 例良性肝部疾病患者血清均未检出两基因甲基化,PLC 患者与正常人和良性肝部疾病患者血清两基因甲基化检出率比较有显著性差异($P_{p16} = 0.000, P_{DAPK} = 0.000$)。

2.2 两基因甲基化检出率与 HBsAg 的关系 HBsAg 阳性组血清 p16 基因和 DAPK 基因甲基化检出率分别为 75.0% (27/36) 和 41.7% (15/36), HBsAg 阴性组血清 p16 基因和 DAPK 基因甲基化检出率分别为 78.6% (22/28) 和 39.3% (11/28),两组检出率均无统计学差异($P_{p16} = 0.738, P_{DAPK} = 0.847$)。

2.3 两基因甲基化检出率与临床病期的关系 为便于统计学处理把 I、II 期合并分析,p16 基因 I+II 期甲基化检出率为 75.0% (21/28), III 期为 76.2% (16/21), IV 期为 80.0% (12/15), DAPK 则为 42.9% (12/28), 38.1% (8/21), 40.0% (6/15),经统计学处理,不同的病期间两基因甲基化检出率无显著性差异($P_{p16} = 0.933, P_{DAPK} = 0.944$)。

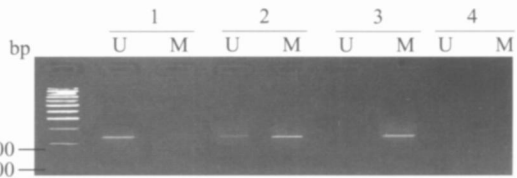


图 1 PLC 患者及对照组血清 p16 甲基化的检测结果

U:p16-U 特异性引物进行扩增; M:p16-M 特异性引物进行扩增;1:健康献血者血标本;2:肝癌患者血标本;3:p16-M 阳性对照;4:水的空白对照

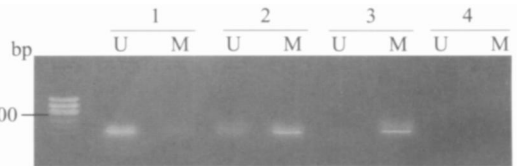


图 2 PLC 患者及对照组血清 DAPK 甲基化的检测结果

U:DAPK-U 特异性引物进行扩增; M:DAPK-M 特异性引物进行扩增;1:健康献血者血标本;2:肝癌患者血标本;3:DAPK-M 阳性对照;4:水的空白对照

2.4 两基因甲基化检出率与 PLC 远处转移的关系 远处转移组血清 p16 基因和 DAPK 基因甲基化检出率分别为 80.0% (12/15) 和 40.0% (6/15),未转移组为 75.5% (37/49) 和 40.8% (20/49),无统计学意义($P_{p16} = 0.719, P_{DAPK} = 0.955$)。

2.5 手术前后两基因甲基化检出率的比较 手术患者术前血清 p16 基因和 DAPK 基因甲基化检出率分别为 72.0% (18/25) 和 36.0% (9/25),术后 2 周

则为 68.0 % (17/25) 和 28.0 % (7/25), 术前、术后甲基化检出率无显著差异 ($P_{p16} = 0.758$, $P_{DAPK} = 0.544$)。

2.6 两基因甲基化检出率与 AFP 的关系 p16 基因甲基化检出率 AFP > 400ug/L 的为 90.0 % (27/30)、31ug/L < AFP < 400ug/L 的为 73.3 % (11/15)、AFP 正常的为 57.9 % (11/19), DAPK 基因甲基化检出率则分别为 63.3 % (19/30)、20.0 % (3/15)、21.1 % (4/19), AFP > 400ug/L 的 PLC 患者两基因甲基化检出率与 AFP < 400ug/L 的有统计学差异 ($P_{p16} = 0.033$, $P_{DAPK} = 0.002$)。

2.7 两基因甲基化检出率的比较 两种指标均阳性的 15 例, 而 p16 基因甲基化阳性、DAPK 基因甲基化阴性的 34 例, DAPK 基因甲基化阳性而 p16 基因甲基化阴性的 11 例, 64 例 PLC 患者至少一种指标阳性的为 60 例, 达 93.8 %。

3 讨论

研究表明, 60 % 的人类基因 5' 端启动子区存在 CpG 岛, 这些 CpG 岛的甲基化可引起染色质结构、DNA 构型、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白因子相互作用方式的改变从而控制基因表达。当 DNA 处于高甲基化状态时, 基因表达受抑制, 相反则基因表达可顺利进行。因此, DNA 异常甲基化的检测已成为探讨肿瘤发生机制的新的研究热点。

DAPK 基因其产物是钙调素依赖激酶, 参与细胞凋亡过程, 研究表明其 CpG 岛异常甲基化可导致基因低表达或缺失可能是参与细胞癌变的重要机制之一。

p16 基因其产物是细胞周期蛋白依赖性激酶的抑制因子, 其失活是肝癌中常见的遗传学改变。它失活机理除基因缺失和突变外, 5' 端启动子区域 CpG 岛的甲基化使其不能转录, 是该基因表达异常或失活的另一途径。

Alonso 等^[5]研究证实只有肿瘤组织标本基因高度甲基化阳性, 其血液标本才可能阳性。由此可证明循环核酸的来源极可能是肿瘤细胞, 而检测循环核酸为非侵入性肿瘤诊断试验提供了可能性。

AFP 是数十年来一直沿用的常规血清学检测指标, 目前统计数据显示 AFP 诊断原发性肝癌的阳

性率为 60 % ~ 70 %, 灵敏度 70 % 左右^[6], 有研究表明当血清 AFP 含量大于 45 ng/ml 其标本 p16 甲基化检测也均异常, 而血清 AFP 含量小于或等于 45 ng/ml 其标本 p16 甲基化检测 57 % 异常^[1], 可以看出 DNA 甲基化检测比传统血清蛋白肿瘤指标检测更灵敏, 更有利于肿瘤早期发现及诊断。本实验中 AFP > 400ug/L 的 PLC 患者两基因甲基化检出率与 AFP < 400ug/L 的有统计学差异, AFP < 400ug/L 的(包括 AFP 正常的)两基因甲基化检出率低于 AFP > 400ug/L 的两基因甲基化检出率。64 例 PLC 患者有 93.8 % 至少一种基因指标阳性, 提示 p16 基因和 DAPK 基因与 AFP 联合检测, 可明显提高 PLC 患者的早期发现率。

本研究发现, PLC 患者血清 DAPK 基因、p16 基因甲基化检出率分别为 40.6 % (26/64)、76.6 % (49/64), 而正常对照组和良性肝部疾病患者组血清未检出 DAPK 基因、p16 基因甲基化, 提示检测 PLC 患者的循环核酸中 DAPK 基因、p16 基因甲基化可作为 PLC 早期诊断的分子生物学标志物, 且其方法基本无创, 病人易于接受, 从而临床有推广可能, 当然也可用于高危人群的筛选确立。

参考文献:

- [1] Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell cancer patients[J]. Nat Med, 1996, 2(9): 1033-1035.
- [2] P. Gonzalez-Gomez, M.J. Bello, J. Lomas, et al. Aberrant methylation of multiple genes in neuroblastic tumours: relationship with MYCN amplification and allelic status at 1p[J]. European Journal of Cancer, 2003, 39(10): 1478-1485.
- [3] 林勃, 陈龙邦. 最新的肿瘤预警指标: 死亡相关蛋白激酶[J]. 中国临床康复, 2004, 8(23): 4815-4817.
- [4] 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.
- [5] Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in oligodendrogliomas and ependymomas[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2003, 144(2): 134-142.
- [6] 成胜权, 王文亮, 晏伟, 等. 凋亡抑制基因 Survivin 在人肝细胞肝癌中的表达及其临床意义[J]. 医学研究生学报, 2004, 17(4): 296-299.

[编辑: 贺文]