

# 巢式甲基化特异性 PCR 检测食管癌病人血清中 p16 基因启动子区过甲基化

姚群峰<sup>1</sup>, 康新江<sup>1</sup>, 郝巧玲<sup>1</sup>, 曾卫<sup>2</sup>, 周宜开<sup>1\*</sup>

Detection of Promoter Hypermethylation in the Serum of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Patients by Nested Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction

YAO Qun-feng<sup>1</sup>, KANG Xin-jiang<sup>1</sup>, HAO Qiao-ling<sup>1</sup>, ZHOU Yi-kai<sup>1\*</sup>, ZENG Wei<sup>2</sup>

1. Institute of Environment Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China; 2. Clinical Laboratory, Hubei Cancer Hospital (\* Corresponding Author)

**Abstract:** **Objective** This study was designed to detect the methylation status of the promoter region of p16 gene in DNA extracted serum from esophageal squamous cell carcinoma (SCC), and evaluate the role of p16 gene promoter hypermethylation in esophageal SCC screening and early diagnosis. **Methods** Nested methylation-specific PCR (nMSP) was used to detect p16 promoter hypermethylation in serum DNA from 56 esophageal squamous cell carcinoma (SCC) and control serum samples from 22 healthy individuals. Compared methylation-specific PCR (MSP), nMSP was more sensitive. **Results** Aberrant promoter methylation of the p16 gene was found in 34 of 56 serum samples using nMSP, and only 15 cases were detected using MSP. No aberrant promoter methylation was detected in the peripheral serum of the healthy individuals. **Conclusion** The detection of p16 gene promoter hypermethylation in the serum of esophageal SCC patients can give the useful information for tumor early diagnosis, follow-up study of esophageal SCC patients. nMSP is a simple, sensitive, and specific method for rapid analysis of the promoter methylation status of many genes.

**Key words:** Esophageal squamous cell carcinoma; Methylation; p16; Polymerase chain reaction

**摘要:** **目的** 检测食管鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC) 患者外周血清中 p16 基因启动子区的甲基化状态, 探讨 p16 基因启动子的过甲基化在食管鳞状细胞癌筛查及早期诊断中的意义。 **方法** 利用巢式甲基化特异性 PCR (nMSP) 法检测食管鳞状细胞癌患者外周血清与正常人血清中 p16 基因启动子的甲基化状态, 并与普通甲基化特异性 PCR (MSP) 法进行了比较。 **结果** 56 例 SCC 血清样品中 nMSP 法发现 34 例 p16 基因启动子的过甲基化, MSP 法只检出 15 例, 而 22 例正常人血清中均未检测到 p16 基因启动子的过甲基化。测序结果进一步验证了方法的可靠性。 **结论** 利用巢式 MSP (nMSP) 法检测外周血清中 p16 基因启动子的甲基化, 可为食管癌的筛查、早期诊断及预后判断提供有价值的信息。

**关键词:** 食管鳞状细胞癌; 甲基化; p16 基因; 聚合酶链反应

中图分类号: R735.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)08-0463-04

## 0 引言

食管癌是世界范围内癌相关死亡的第五大死因, 其中约一半食管癌发生在中国, 尤其在华北地区太行山南部一带, 食管癌发病率居世界首位<sup>[1]</sup>。按组织病理学分类, 鳞状细胞癌 (SCC) 超过所有病例的 95%。目前食管癌的主要治疗方法仍然是手术切除, 但由于出现症状时, 70% 的食管癌患者已到了晚期, 手术治疗预后差、易复发。因此, 食管癌的早期检测对治疗及预后具有重要意义。近年来的分子

生物学研究已发现许多与食管癌的发生、发展相关的基因, 其中 p16 基因的表达失活与食管癌的发生密切相关, 而 p16 基因启动子区的过甲基化是导致其表达失活的重要原因<sup>[2]</sup>。许多研究已显示肿瘤的发生过程中伴随有抑癌基因启动子的过甲基化, 由于肿瘤细胞可以释放大量游离 DNA 到血清或血浆中<sup>[3]</sup>, 因此检测肿瘤患者血清或血浆中抑癌基因的甲基化状态将有助于了解肿瘤的发生发展过程。本研究用改进的巢式甲基化特异性 PCR (nMSP) 检测了 56 例食管鳞状细胞癌 (SCC) 患者外周血清中 p16 基因启动子区的甲基化状态, 探讨了其在食管鳞状细胞癌 (SCC) 的筛查及早期诊断中的意义。

收稿日期: 2004-09-10; 修回日期: 2005-02-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39990570)

作者单位: 1. 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院环境医学研究所; 2. 湖北省肿瘤医院检验科 (\* 通讯作者)

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

标本收集与处理:56 例食管鳞状细胞癌(SCC)患者血清来自湖北省肿瘤医院,手术或放疗前收集肿瘤患者血液标本 2~5 mL 于 EDTA 抗凝管中,迅速于低温离心分离血清,将血清于 -70℃ 保存。22 例正常人外周血血清来自健康体检者。人移行细胞膀胱癌细胞株(T-24)购自武汉大学典藏中心。

主要试剂: Wizard DNA 纯化试剂盒(Promega 公司), DMEM 培养基,小牛血清,购自 Gibco 公司。Taq DNA 聚合酶、dNTP、100bp DNA ladder (Promega 公司),蛋白酶 K、Tris-base、RNaseA、琼脂糖凝胶及 NaHSO<sub>3</sub> (分析纯)等均购自武汉大风生物工程公司。PCR 引物序列见实验方法,引物由大连宝生物工程公司合成。

仪器: PCR 扩增仪(Biometra 公司),凝胶成像系统(VILBER LOURMAT, France),紫外分光光度计(SHIMADZU, UV-2401PC),荧光显微镜(O-L YMPUS BX60F-3)。

### 1.2 方法

1.2.1 血清中 DNA 的提取 参考文献[4]取 1.0 mL 血清,加入约 10 mL DNA 缓冲抽提液(140 mmol/L Tris, 140 mmol/L EDTA, 0.57% SDS),加入蛋白酶 K 至终浓度为 100 μg/mL,放入 37℃ 水浴振荡过夜,然后用酚-氯仿抽提法提取 DNA,测定 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值并定量。全血及肿瘤细胞中 DNA 的提取参考文献[5]方法。

1.2.2 基因组 DNA 的亚硫酸氢盐修饰<sup>[6]</sup> 血清中肿瘤细胞释放的 DNA 以及细胞株 DNA 经过亚硫酸氢盐修饰,CpG 中未甲基化的胞嘧啶将被转变为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则不发生变化。修饰过程:(1)碱变性:取含 DNA 约 1~2 μg 的溶液 50 μL,加入 4 mol/L 的 NaOH 至终浓度为 0.2 mol/L,37℃ 变性 10 min。(2)硫化与脱氨:加入 30 μL 新配制的 10 mmol/L 的氢醌及 520 μL pH 5.0 的 3 mol/L 的 NaHSO<sub>3</sub>,混匀,表面覆盖矿物油,避光,置于 50℃ 水浴 16 h。(3)纯化与脱硫:利用 Wizard DNA 纯化试剂盒纯化修饰后的 DNA。然后于室温下加入 4 mol/L 的 NaOH 至终浓度为 0.3 mol/L,放置 5~20 min 脱硫。(4)沉淀回收 DNA:加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠及冰乙醇沉淀 DNA,室温下干燥,加适量 TE(pH 8.0)溶解,-20℃ 保存。

1.2.3 引物序列<sup>[7]</sup>及巢式 PCR 扩增 用于巢式 PCR 扩增 p16 基因的引物序列,见表 1。反应总体积 50 μL,包括经 NaHSO<sub>3</sub> 修饰的模板 DNA 约 50 ng,各引物 300 ng,dNTP 为 0.25 mmol/L,1 ×

PCR 缓冲液(50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris-HCl,pH 9.0 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.1% TritonX-100)。第一轮 PCR 使用外侧引物,反应条件为 95℃ 热启动 10 分钟,加入 1.0 U TaqDNA 聚合酶,然后于 95℃、60℃、72℃ 各 30 s 循环 40 次,最后于 72℃ 延伸 10 分钟。将第一轮 PCR 产物适当稀释(50 倍),取 2 μL 进行第二轮 PCR 反应,退火温度增加到 65℃,反应时间减少为 25 s,其它条件与第一轮相同。同时以正常人外周血淋巴细胞(PBL)DNA 作阴性对照,以水作空白对照。人移行细胞膀胱癌细胞株(T-24)的 p16 基因启动区是高度甲基化的<sup>[8]</sup>,故以 T-24 细胞 DNA 作为阳性对照。

表 1 巢式 PCR 扩增 p16 基因的引物序列

Primer set	Primer sequence(5' - 3')	Size, bp
p16-F	GAA GAA GA GGA GGG GTT GG	280
p16-F	CTACAAACCTCTACCCACC	
p16-M	TTATTA GA GGGTGGGCGGA TC GC	150
p16-M	GACCCGAACCGCGACCGTAA	
p16-U	TTATTA GA GGGTGGG GTT GG	151
p16-U	CAACCCCAAACCAACAACCA TAA	

注:p16-F:外侧引物;p16-U:非甲基化特异性内侧引物;p16-M:甲基化特异性内侧引物

1.2.4 凝胶电泳分析 取 10 μL PCR 产物,用 2.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳,溴化乙锭染色。用凝胶成像分析仪进行拍照分析。

1.2.5 PCR 产物序列分析 为验证 MSP 及 nMSP 法的检测结果,另扩增一包含以上 CpG 位点的 DNA 片段(443 bp),直接由大连宝生物工程公司测序,利用引物设计软件 PRIMER 设计测序引物:上游序列 5'-GGTTGGTTA TTA GA GGGTG-3',下游序列 5'-AACTCCTCA TTCCTCTTCC-3'。

## 2 结果

利用巢式甲基化特异性 PCR 检测食管鳞状细胞癌(SCC)病人血清中 p16 基因的甲基化状态。首先用 p16-F 外侧引物扩增出一个 280 bp 的 p16 基因启动子区片段,此外侧引物序列所对应的未修饰 DNA 模板中含有胞嘧啶(经亚硫酸氢盐修饰后变为胸腺嘧啶),但不含有 CpG 位点,因此此外侧引物既可以扩增甲基化的 DNA 模板,又可扩增非甲基化的 DNA 模板,结果全部 DNA 标本中均可扩增出相应片段。然后分别用 p16-M 和 p16-U 特异性引物进行第二次扩增,对于阳性(甲基化)标本,用甲基化和非甲基化引物扩增,都有特异性扩增产物;对于阴性(非甲基化)标本,只有非甲基化引物的扩增产物,见图 1。

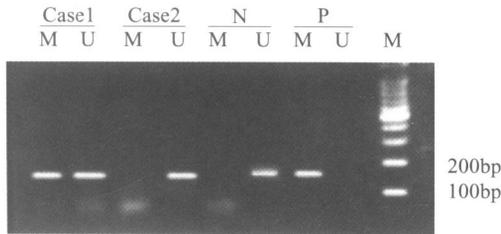


图1 nMSP法检测食管鳞状细胞癌病人血清中 p16 基因的甲基化状态

M:用 p16-M 特异性引物进行扩增;U:用 p16-U 特异性引物进行扩增。Case1:甲基化血清标本;Case2:非甲基化血清标本;P:阳性对照(T-24 细胞);N:阴性对照(正常人外周血淋巴细胞 DNA);M:100bp DNA Ladder。

虽然肿瘤细胞可以释放许多游离 DNA 到外周血中,但与肿瘤组织样品相比,外周血血清样品中 DNA 的量仍然是较低的,加之在用 NaHSO<sub>3</sub> 修饰的过程中大部分 DNA 将被降解,因此,对于血清样品,普通 MSP 法的灵敏度仍需进一步提高。本文分别用 MSP 和 nMSP 法检测了 56 例食管鳞状细胞癌患者的血清中 p16 基因的甲基化状态,MSP 和 nMSP 法甲基化检出率分别为 26.8% (15/56) 和 61% (34/56)。19 例 MSP 法检测为非甲基化的血清标本经 nMSP 法扩增出了甲基化的 DNA 片段(电泳结果见图 2)。而 22 例正常人外周血血清则都未检测出启动子区的过甲基化。结果显示 nMSP 法具有更高的灵敏度,适于检测血清标本中 DNA 的甲基化状态。

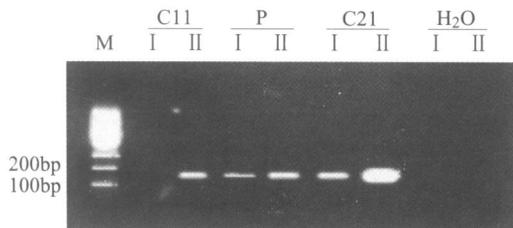


图2 MSP法与 nMSP法的扩增结果比较 (使用甲基化特异性引物 p16-M)

、分别表示 MSP 法与 nMSP 法扩增结果,P 为阳性对照(T-24 细胞);对于样品 C11,MSP 法为阴性,而 nMSP 法则扩增出目的片段;对于样品 C21,MSP 法为弱阳性,nMSP 法则可见明显的片段。M 为 100bp DNA Ladder。

为验证 MSP 及 nMSP 法的检测结果,选择一份甲基化标本另扩增一包含以上 CpG 位点的 DNA 片段(AF527803,19901-20343,443bp),直接由大连宝生物工程公司对 PCR 产物测序,测序结果(互补链,图略)进一步证实 MSP 及 nMSP 的检测结果完全正确。

### 3 讨论

肿瘤细胞可以释放大量的游离 DNA 到外周血

循环,并富集于血清或血浆中。肿瘤病人血清中游离 DNA 的量平均约为正常人的 4 倍<sup>[3]</sup>,因此可以通过检测肿瘤病人血清中游离 DNA 异常为肿瘤的早期发现提供有意义的信息。如在非小细胞肺癌(NSCLC)及头颈部肿瘤病人血清中可以检测到微卫星不稳定和/或杂和性缺失(LOH)<sup>[9,10]</sup>,在结肠癌、胰腺癌患者血清中可以检测到 K-ras 及 p53 基因的点突变等<sup>[11,12]</sup>。近年来的许多研究显示基因启动子区的过甲基化是导致其转录失活的一个重要原因,已有报道<sup>[13-15]</sup>证实多种肿瘤组织及其患者血清中都存在基因启动子区的过甲基化,其中血清中甲基化的比例远小于肿瘤组织中甲基化的比例,我们认为这与甲基化的检测方法有关。甲基化特异性 PCR(MSP)法是目前检测 CpG 岛异常甲基化的主要方法,具有较高的灵敏度(对于任一 CpG 岛位点,可检测到 1/1000 的甲基化的等位基因)<sup>[6]</sup>,操作也比较简便。但 MSP 法的影响因素也很多,由于 MSP 法是以将未甲基化的胞嘧啶全部转化为尿嘧啶为前提的,所以若用亚硫酸氢钠修饰 DNA 时不彻底,将导致假阳性的产生。但修饰 DNA 时的条件若过于剧烈或时间过长,样品 DNA 将大量降解。MSP 法中,未甲基化胞嘧啶的转化率大于 99%,而在此条件下已有 84%~96% 的 DNA 已被降解<sup>[16]</sup>。此外,甲基化特异性引物的设计是以该区域的胞嘧啶全部甲基化为前提的,如果存在未甲基化的胞嘧啶,将导致扩增困难。本研究采用改进的巢式甲基化特异性 PCR(nMSP)对待测区域进行两次扩增,提高了检测的特异性和灵敏度。我们检测了 56 例食管鳞状细胞癌患者的血清中 p16 基因的甲基化状态,甲基化检出率(61%)显著高于 MSP 法(26.8%)。

基因启动子异常甲基化是肿瘤形成过程中的一个早期、频发事件,与肿瘤的发生、发展及预后关系密切。启动子过甲基化比其它各种类型的 DNA 分子异常(如点突变、基因缺失、微卫星序列改变、基因异常扩增及染色体异常等)都更加广泛地存在于几乎所有种类的肿瘤中。特别是可以同时于肿瘤病人外周血血浆/血清、肿瘤累及器官相关的体液(如唾液、痰等)中检测到肿瘤组织中存在的肿瘤相关基因的启动子异常甲基化,因此被认为是一种潜在的肿瘤分子标志物。但是肿瘤的发生是一个多步骤多因素参与的复杂生物学过程,涉及到许多基因的异常,不同种类的肿瘤中可能都存在某一基因的启动子异常甲基化。因此将检测血清中 DNA 甲基化状态用于肿瘤的筛查、早期诊断及预后判断,尚需要大样本的深入研究。Esteller 等<sup>[17]</sup>最近研究了 12 种肿瘤

相关基因的过甲基化与不同类型的肿瘤之间的相关性,发现每种肿瘤都有一个独特的甲基化基因谱。如对于食管鳞状细胞癌,可以同时检测 p16、MGMT、GSTP1 以及 DAP 等基因的甲基化状态,将大大提高检测的敏感度和特异性。此外,还可将此指标与其他类肿瘤标志物以及影像学检测方法配合,将为食管癌的筛查、早期诊断及预后判断提供非常有价值的信息。

#### 参考文献:

- [1] Lu XJ, Chen ZF, Guo CL, et al. Endoscopic survey of esophageal cancer in a high-risk area of China[J]. World J Gastroenterol, 2004, 15;10(20):2931-2935.
- [2] Gonzalzo M L, Bender C M, You E H, et al. Low frequency of p16/CDKN2A methylation in sporadic melanoma: comparative approaches for methylation analysis of primary tumors [J]. Cancer Res, 1997, 57(23):5336-5347.
- [3] Leon S A, Shapiro B, Sklaroff D M, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy [J]. Cancer Res, 1997, 37(3):646-650.
- [4] Geady WM, Rajput A, Lutterbough JD, et al. Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer [J]. Cancer Res, 2001, 61(3):900-902.
- [5] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第1版. 北京:高等教育出版社, 1993. 95-102.
- [6] Herman J G, Graff J R, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(18):9821-9826.
- [7] Palmisano W A, Divine K K, Saccomanno G, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum[J]. Cancer Res, 2000, 60(21):5954-5958.
- [8] Rein T, Depamphilis M L, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes [J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(10):2255-2264.
- [9] Chen X Q, Stroun M, Magnanat J L, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients [J]. Nat Med, 1996, 2(9):1033-1035.
- [10] Nawroz H, Koch W, Anker P, et al. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients [J]. Nat Med, 1996, 2(9):1035-1037.
- [11] Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, et al. K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of colorectal cancer patients [J]. Gastroenterology, 1997, 112(4):1114-1120.
- [12] Mulcahy H E, Lyautey J, Lederrey C, et al. Prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(2):271-275.
- [13] Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients [J]. Cancer Res, 1999, 59(1):67-70.
- [14] Wong I H N, Dennis Y M, Zhang J, et al. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients [J]. Cancer Res, 1999, 59(1):71-73.
- [15] Zou H Z, Yu B M, Wang Z W, et al. Detection of aberrant p16 methylation in the and serum of colorectal cancer patients [J]. Oncogene, 2002, 8(1):188-191.
- [16] Grunau C, Clark S F and Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters [J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(13):E65-5.
- [17] Esteller M, Corn P G, Baylin S B, et al. A gene hypermethylation profile of human cancer [J]. Cancer Res, 2001, 61(8):3225-3229.

[编辑:贺文]

## · 动态 · 简讯 ·

### 欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是国家级核心期刊和权威的文献源期刊,主要刊登药理学研究论文。多次荣获国家及华东地区优秀科技期刊奖,2003、2005年两获国家期刊奖百种重点期刊奖;被国家权威机构认定为医学类、药学类核心期刊,并被几乎所有国内相关检索性期刊及数十种国外著名检索期刊收录、利用。连续9年名列美国《CA千种表》,1997年摘引量曾名列美国《CA千种表》收录的中国医药期刊第1名。本刊1999、2002、2004年分别获国家自然科学基金和中国科协资助基础性和高科技期刊专项资金资助。

医师用药要懂药理,药师药研人员更要懂药理。中国药理学通报,医师药师都需要。

《中国药理学通报》为月刊,大16开128页,彩色铜版纸印刷,每期定价15.00元(零售:20元/期),全年180.00元。邮发代号:26-52,请及时向当地邮局订阅,漏订读者请直接汇款至我刊编辑部(零售价:每期20元),免收邮寄费。地址:安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部,邮编:230032,联系人:吴慧、程西望、武明静。电话:0551-5161221、5161222,电子信箱:cpb@ahmu.edu.cn。