

胃癌组织中 *p16* 基因甲基化状态及临床意义

吕萍^{1,2}, 凌志强^{1,3}, 余江流¹, 韩静¹, 王实¹, 王新宝¹, 余齐鸣¹, 方铄华¹

(1. 浙江省肿瘤医院, 浙江省肿瘤研究所, 浙江 杭州 310022; 2. 舟山市人民医院, 浙江 舟山

202451; 3. 浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 探讨胃癌患者癌组织、癌旁组织以及对照正常胃黏膜组织中 *p16* 基因的甲基化状态, 及其与临床病理参数及预后的关系。[方法] 应用甲基化特异性实时荧光聚合酶链反应技术检测 92 例胃癌患者癌组织及配对癌旁组织中 *p16* 基因启动子区 5'-CpG 岛甲基化状态, 分析 *p16* 基因异常甲基化与患者临床病理特征以及预后之间的关系。[结果] 胃腺癌患者癌组织中检测到 *p16* 基因甲基化 79 例(85.9%), 癌旁组织 11 例(12.0%), 胃炎患者组织 10 例(20.8%), 健康人未检测到甲基化。*p16* 基因甲基化与肿瘤大小、分化程度、是否淋巴管侵犯、T 分期、有无淋巴结转移、有无远处转移、临床分期有关($P < 0.05$)。*p16* 基因甲基化影响患者预后, 但不是胃癌患者无病生存的独立预后因子。[结论] 胃腺癌患者 *p16* 基因甲基化与肿瘤的生物学行为有关, 提示肿瘤进展, 恶性程度高, 预后欠佳。

关键词: 胃肿瘤; *p16* 基因; 甲基化

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)05-0332-04

Methylation Status of *p16* Gene in Gastric Cancer Tissue and Its Clinical Significance

LV Ping^{1,2}, LING Zhi-qiang^{1,3}, YU Jiang-liu¹, et al.

(1. Zhejiang Cancer Hospital, Zhejiang Cancer Research Institute, Hangzhou 310022, China; 2. Zhoushan People's Hospital, Zhoushan 202451, China; 3. Zhejiang Key Laboratory of Diagnosis & Treatment Technology on Thoracic Oncology (Lung and Esophagus), Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the aberrant methylation status of *p16* gene in gastric adenocarcinoma tissues, normal gastric mucosa and cancer adjacent normal tissues, and the relationship with clinicopathological characteristics and prognosis. [Methods] The methylation status of *p16* gene 5'-CpG island in gastric adenocarcinoma tissue and paired cancer adjacent tissue in 92 gastric cancer patients were examined by real-time methylation-specific polymerase chain reaction (qMSP). The relationships of *p16* gene methylation with clinicopathologic features or prognosis were analyzed. [Results] Seventy-nine cases (85.9%) of cancer tissue had *p16* gene methylation; 11 cases (12.0%), cancer adjacent tissue; 10 cases (20.8%), gastritis patients; and 0 case, healthy control. *p16* gene methylation correlated with tumor size, degree of differentiation, lymphatic vessel invasion, T stage, lymphatic metastasis, clinical stage and distant metastasis ($P < 0.05$). [Conclusion] Ectopic methylation of *p16* gene in gastric adenocarcinoma correlates with tumor biological behavior. *p16* gene methylation affects the prognosis of patients with gastric adenocarcinoma, but it is not an independent predictor of disease-free survival.

Subject words: gastric neoplasms; *p16*; methylation

胃癌的发生发展是多基因多阶段的过程, 与多种抑癌基因的甲基化失活有关。*p16* 基因又称多种肿瘤抑制基因 (multiple tumor suppressor 1, *MTS1*), 是近年来发现的一个重要抑癌基因, 在细胞周期中发挥重要的调节作用^[1,2], 而 *p16* 甲基化失活后促进了细胞的无限制生长进而促进肿瘤的发生和增殖。因此, 本文探讨胃癌患者癌组织、癌旁组织以及对照正常胃黏膜组织中 *p16* 基因的甲基化状态, 以及与临床病理参数及预后的关系。

基金项目: 浙江省科技计划资助项目(2009C33143); 浙江省医药卫生平台骨干人才计划项目(2011RCA009)

通讯作者: 凌志强, 副研究员, 博士; 浙江省肿瘤医院肿瘤研究所, 浙江省杭州市半山桥广济路 38 号(310022); E-mail: lingzq@hotmail.com.

收稿日期: 2013-03-27; **修回日期:** 2013-05-02

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究标本取自浙江省肿瘤医院 2008 年 1 月至 2009 年 12 月的 92 例首诊为胃腺癌的患者, 所有病例均经术前胃镜活检病理确诊, 术后组织标本经病理切片诊断证实为胃腺癌。术前均未接受放、化疗。其中男性 53 例、女性 39 例, 年龄 36~73 岁, 平均 53.9 岁。肿瘤位置胃底贲门 30 例, 胃体 31 例, 胃窦 31 例; 肿瘤直径 < 5cm 者 60 例, ≥ 5cm 者 32 例。高中分化腺癌 62 例, 低分化腺癌 30 例; 肿瘤生长方式膨胀型者 20 例, 浸润型者 72 例。Hp 感染者 42 例,

Hp 未感染者 50 例。按照 2010 NCCN 指南 pTNM 分期标准进行术后病理分期: I 期 17 例, II 期 29 例, III 期 37 例, IV 期 9 例。全部患者均由专人跟踪随访, 具有完整的随访资料, 随访至患者死亡或截止至研究结束日。同期选取 88 例胃镜检查已排除恶性肿瘤者作为对照组, 其中 40 名为健康者, 男性 24 名, 女性 16 名; 48 例为非萎缩性胃炎患者, 男性 30 例, 女性 18 例。

1.2 实验方法

1.2.1 获取实验的目标细胞

患者手术切除标本后, 即由专人负责收集标本组织。癌组织标本取自癌灶, 癌旁正常组织距肿瘤边缘约 3~5cm。对照组为胃镜活检组织。切取后立即置于-76℃冰箱保存。此后标本在室温下给予解冻, 光学显微镜下采用 27G 号针从胃腺癌肿瘤组织中挑取少许癌巢细胞, 同时在癌旁正常组织中挑取少许正常细胞。分别获取 1 000~2 000 个细胞, 将其置入 DNA 提取液中。

1.2.2 基因组 DNA 提取

采用经典苯酚、氯仿方法按 MagaBio 试剂盒说明书提取基因组 DNA, 并置于-20℃保存。

1.2.3 DNA 亚硫酸氢盐修饰

修饰前先用紫外分光光度计测定 DNA 浓度及纯度, 吸光度值 A_{260}/A_{280} 比值大于或等于 1.8 的 DNA 为合格样本。基因组 DNA 亚硫酸氢盐修饰及纯化按 EpiTect Bisulfite 试剂盒(Qiagen)说明书进行操作。

1.2.4 实时定量 MSP 分析标本甲基化状态

根据 *p16* 基因序列设计其因 5'-CpG 岛特异的甲基化和非甲基化引物如下: *p16_M(F)*: 5'-TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC-3'; *p16_M(R)*: 5'-GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA-3', 扩增产物为 150bp; *p16_U(F)*: 5'-TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT-3'; *p16_U(R)*: 5'-CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A-3', 扩增产物为 151bp。

所有引物由 Invitrogen 公司合成。PCR 反应体系为 20μl, 在 ABI 7500 PCR(美国 ABI 公司生产)仪上进行实时荧光 MSP 分析。反应条件: 95℃预变性 10min; 95℃变性 15s, 60℃退火 1min, 72℃延伸 1min, 共 40 个循环; 72℃延伸 10min。检测启动子区域 5'-CpG 位点是否处于甲基化状态。每个样本的甲基化、非甲基化引物进行定量分析, 根据所测 CT 值通过

标准曲线计算各样本 DNA 甲基化的拷贝数。甲基化百分率计算公式如下: 甲基化百分率(M%)=甲基化 DNA 拷贝数/甲基化与非甲基化 DNA 拷贝数之和。甲基化 DNA 拷贝数+非甲基化 DNA 拷贝数=靶基因 DNA 总拷贝数。M%≤20.0%为 0 分, 20.0%<M%≤40.0%为 1 分, 40.0%<M%≤60.0%为 2 分, 60.0%<M%≤80.0%为 3 分, M%>80.0%为 4 分; 0 分定义为非甲基化, 1~3 分为部分甲基化, 4 分为完全甲基化。PCR 反应结束后由溶解曲线判定扩增结果。用在体外经 *SssI* 甲基转移酶处理过的人类基因组 DNA (NEB 公司) 作为阳性对照、未处理的正常人外周血 DNA 作为阴性对照, 蒸馏水代替模板作为空白对照。

1.3 统计学处理

应用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析, 计数资料各组间率的比较用 χ^2 检验、似然比 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。生存曲线绘制用 Kaplan-Meier 法, 终点事件为肿瘤恶化或患者死亡, 观察无进展生存期。生存曲线比较用 Log-Rank 法, 采用 Cox 比例风险模型进行多因素生存分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 *p16* 基因甲基化发生率

92 例胃腺癌癌组织及其配对癌旁组织、48 例非萎缩性胃炎患者组织及 40 名健康志愿者胃黏膜中 *p16* 基因启动子区域 CpG 岛甲基化发生率分别为 85.9%(79/92)、12.0%(11/92)、20.8%(10/48) 和 0。将胃炎和健康人同记为对照, *p16* 基因甲基化率为 12.5%, 癌组织与癌旁组织及对照组 *p16* 基因甲基化率有显著差异(P 均<0.000), 癌旁组织和对照组 *p16* 基因甲基化水平无差异(P=0.435)(Figure 1)。

2.2 *p16* 基因甲基化与胃腺癌临床病理特征的关系

p16 基因启动子区域的甲基化状态与肿瘤大小、分化程度、是否有淋巴管侵犯、T 分期、有无淋巴结转移、临床分期、有无远处转移有关(P<0.05), 与患者的年龄、性别、肿瘤生长部位、生长方式、是否静脉侵犯及是否幽门螺杆菌感染无关(P>0.05)(Table 1)。

2.3 胃腺癌组织中 *p16* 基因甲基化状态与患者预后的关系

Kaplan-Meier 法分析胃癌组织 *p16* 基因甲基化单因素与胃癌预后的关系, 结果表明 *p16* 基因未甲

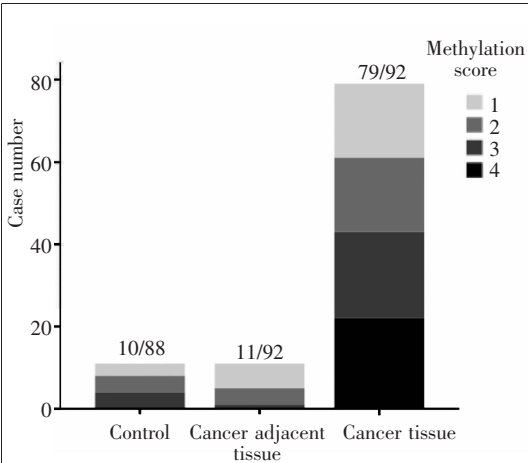


Figure 1 p16 gene methylation comparison between control, cancer adjacent tissue and cancer tissue

基化患者无病生存率优于 p16 基因甲基化患者($\chi^2=15.984, P<0.000$)(Figure 2);另外,T 分期、有无淋巴结转移、有无远处转移、临床分期、肿瘤大小、生长方式、分化程度、有无淋巴管侵犯、有无静脉侵犯均与患者的预后有关(P 均 <0.05)(Table 2)。但经 Cox 多因素分析显示只有临床分期是独立的预后因子($RR=307.058, 95\%CI:21.190\sim4449.397$)。

3 讨论

胃炎患者组织中 p16 基因甲基化 10/48 例(20.8%),健康人无一例甲基化,两者比较

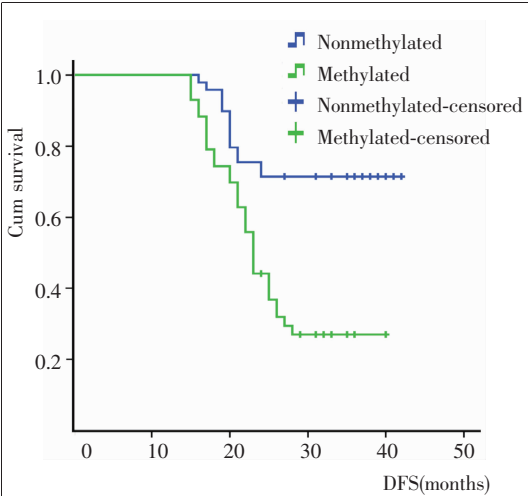


Figure 2 DFS curve of GC patients with methylated or nonmethylated p16 gene

Table 1 p16 gene methylation and clinicopathological characteristics

Clinicopathologic features	n	p16 gene		χ^2	P
		nonmethylated	methylated		
Gender					
Male	53	27	26	0.270	0.604
Female	39	22	17		
Age(years)					
≤60	70	36	34	0.395	0.530
>60	22	13	9		
Hp infection					
-	50	30	20	1.998	0.157
+	42	19	23		
Lesion site					
Cardia	30	16	14	0.000	0.992
Corpus/Antrum	62	33	29		
Tumor size(cm)					
≤5	60	40	20	12.453	<0.000
>5	32	9	23		
Growth type					
Intumescent	20	13	7	1.415	0.234
Infiltrating	72	36	36		
Differentiation					
Well/Moderate	62	39	23	7.101	0.008
Poor	30	10	20		
Lymphatic invasion					
No	67	42	25	8.800	0.030
Yes	25	7	18		
T stage					
T ₁ /T ₂	38	30	8	17.159	<0.000
T ₃ /T ₄	54	19	35		
Lymphatic metastasis					
No	46	33	13	12.619	<0.000
Yes	46	16	30		
Clinical stage					
I / II	46	35	11	19.256	<0.000
III / IV	46	14	32		
Distant metastasis					
No	85	49	36	8.634	0.003
Yes	7	0	7		
Vein invasion					
No	69	40	29	2.460	0.117
Yes	23	9	14		

有差异($P<0.05$)。对于 p16 基因异常甲基化的这部分胃炎患者,特别是有胃癌高危因素者,需加强随访,定期复查胃镜,指导改变不良生活习惯。p16 基因的甲基化检测有助于胃癌的早期诊断。以往研究也有类似发现,p16 基因甲基化的发生从正常、癌前病变到胃癌有逐渐增加的趋势。因此,p16 基因甲基化可能是胃癌形成的早期事件^[3]。p16 基因甲基化状态改变通常在组织恶变之前发生,有助于肿瘤的早期诊断^[4]。

p16 为抑癌基因,p16 基因启动子区 5'-CpG 岛异常甲基化使基因失活,促进了肿瘤的增殖。从本研究中分析 p16 基因甲基化与肿瘤大小、分化程度、是否淋巴管侵犯、TNM 分期、临

Table 2 Correlation between clinicopathologic features and disease-free survival

Clinicopathologic features	n	n of event	χ^2	P
Gender				
Male	53	28	0.250	0.617
Female	39	17		
Age (years)				
≤60	70	36	0.684	0.408
>60	22	9		
Hp infection				
No	50	22	0.700	0.403
Yes	42	23		
T stage				
T ₁ /T ₂	38	6	26.265	<0.000
T ₃ /T ₄	54	39		
Lymphatic metastasis				
No	46	1	88.886	<0.000
Yes	46	44		
Distant metastasis				
No	85	38	46.869	<0.000
Yes	7	7		
Clinical stage				
I / II	46	0	104.239	<0.000
III/IV	46	45		
Tumor size (cm)				
≤5	60	23	9.778	<0.000
>5	32	22		
Growth type				
Intumescent	20	1	16.530	<0.000
Infiltrating	72	44		
Differentiation				
Well/Moderate	62	20	19.881	<0.000
Poor	30	25		
Lymphatic invasion				
No	67	20	41.931	<0.000
Yes	25	25		
Vein invasion				
No	69	28	12.963	<0.000
Yes	23	17		
Lesion site				
Cardia	30	14	0.080	0.778
Corpus/Antrum	62	29		

床分期等有关($P<0.05$)。而与性别、年龄、Hp 感染状况以及肿瘤部位、生长方式、是否静脉侵犯等无关($P>0.05$)。*p16* 基因甲基化提示肿瘤恶性程度高,病情进展,无进展生存期较短,应加强术后随访,早期发现转移能及早治疗。

p16 基因甲基化与是否静脉侵犯无关,我们可以推测 *p16* 基因甲基化的胃癌以淋巴结转移为主,与远处转移无关。既往研究也有类似发现,Kang 等^[5]研究发现有转移的与无转移的胃癌 *p16* 基因甲基化率相比较无显著性差异,提示 *p16* 基因甲基化与胃

癌的转移无关,*p16* 基因甲基化可能发生在转移之前。

单因素分析表明 *p16* 基因甲基化影响胃癌患者的术后无病生存期,但 Cox 模型分析,*p16* 不能作为独立的预后因素,需结合其他抑癌基因如 *TIMP-3*、*CDH1*、*Syk* 等制定甲基化谱,用于分析胃癌的预后,必定也是将来对胃癌患者进行生存分析的方向之一,可联合众多胃癌相关抑癌基因做进一步研究分析。

有研究表明用去甲基化药物如 5Aza-dC 逆转 *p16* 基因甲基化控制肿瘤增长甚至达到治愈的目的,获得外源性 *p16* 基因表达的癌细胞,出现 G₁ 期阻滞,即细胞周期中 G₁ 期细胞比例明显增加,而 S 期细胞比例下降。同时,获得外源性 *p16* 基因表达的癌细胞,其对放化疗的敏感性也得到提高,这将有助于联合 *p16* 基因治疗和其他综合治疗手段,进一步提高肿瘤的治疗效果^[6]。

综上所述,检测胃黏膜组织 *p16* 甲基化状态可用于胃癌的早期诊断,检测胃癌组织的 *p16* 甲基化状态可提示肿瘤局部增殖速度,反映疾病进展程度,远处转移机率。通过抑制 *p16* 基因的甲基化是否能抑制或减缓肿瘤进展,进行肿瘤的基因治疗,把 *p16* 基因尽快地应用于临床实践中正是我们致力于 *p16* 基因研究的方向和目的。

参考文献:

- [1] Johnson DG, DeGregori J. Putting the oncogenic and tumor suppressive activities of E2F into context[J]. *Curr Mol Med*, 2006, 6(7): 731-738.
- [2] DeGregori J, Johnson DG. Distinct and overlapping roles for E2F family members in transcription, proliferation and apoptosis[J]. *Curr Mol Med*, 2006, 6(7): 739-748.
- [3] Liu WT, Jiao HL, Yang YL, et al. Correlation of p16 hypermethylation with tumorigenesis and the development of gastric cancer[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2007, 15(26): 2839-2843. [刘文天, 焦焕利, 杨玉龙, 等. p16 基因高甲基化在胃癌发展中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(26): 2839-2843.]
- [4] Zhou J, Su YW. S-adenosylmethionine, DNA methylation and tumor[J]. *Modern Oncology*, 2008, 16(11): 2019-2021. [周静, 苏玉文. S2 腺苷甲硫氨酸、DNA 甲基化与肿瘤[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(11): 2019-2021.]
- [5] Kang GH, Shim YH, Jung HY, et al. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(7): 2847-2851.
- [6] Kim O, Park M, Kang H, et al. Differential protein expressions induced by adenovims-mediated p16 gene transfer into Balb/c nude mouse[J]. *Proteomics*, 2003, 3(12): 2412-2419.