

血浆 *p16* 基因甲基化联合 *p53* 抗体在非小细胞肺癌诊断中的价值

万玲玲¹, 梁芸¹, 贺宇彤², 米小昆², 宋国威¹, 潘婧¹

(1. 石家庄市第一医院, 河北 石家庄 050011;

2. 河北医科大学附属第四医院, 河北 石家庄 050011)

摘要: [目的] 探讨血浆 *p16* 基因甲基化联合 *p53* 抗体水平的检测对非小细胞肺癌早期诊断价值和临床意义。[方法] 选择 98 例非小细胞肺癌患者为实验组, 以 60 名健康者作对照, 分别采用巢式甲基化特异性聚合酶链反应法检测其血浆 *p16* 基因甲基化, 用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测其血浆 *p53* 抗体。[结果] 非小细胞肺癌组的 *p16* 基因甲基化率 ($\chi^2=45.709$, $P<0.001$)、*p53* 抗体表达量 ($Z=-5.786$, $P<0.001$)、*p53* 抗体定性阳性率 ($\chi^2=41.638$, $P<0.001$) 均高于健康对照组。*p16* 基因甲基化和 *p53* 抗体表达及定性检测对非小细胞肺癌预测诊断的敏感度分别为 70.41% 和 58.16%, 特异性分别为 85.00% 和 93.33%, 正确指数为 0.554 和 0.515。*p16* 基因甲基化和 *p53* 抗体定量联合检测结果对非小细胞肺癌诊断的敏感度为 82.56%, 特异性为 78.33%, 正确指数为 0.610。*p16* 基因甲基化与 *p53* 抗体检测具有相关性 ($r=0.215$, $P=0.029$)。[结论] 非小细胞肺癌患者血浆中 *p16* 基因甲基化与 *p53* 抗体可以作为非小细胞肺癌预测诊断的肿瘤标志物, 联合检测的预测敏感度高于单独检测。

关键词: *p16*; 甲基化; *p53* 蛋白; 抗体; 非小细胞肺癌

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)05-0372-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.05.B003

Methylation of *p16* Gene and *p53* Antibody as Tumor Marker in the Diagnosis of Non-small Cell Lung Cancer

WAN Ling-ling¹, LIANG Yun¹, HE Yu-tong², et al.

(1. The First Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, China; 2. Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the diagnostic value and clinical significance of *p16* gene methylation and *p53* gene in plasma of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. [Methods] *p16* gene methylation in plasma of 98 NSCLC and 60 normal controls was tested by methylation-specific PCR (MSP). All the *p53* antibody levels in plasma were detected with Elisa kit. [Results] The susceptibilities of *p16* methylation and *p53* antibody for diagnosis NSCLC were 70.41% and 58.16%, respectively, while the specificities of *p16* methylation and *p53* antibody were 85.00% and 93.33%, respectively. The accurate indications of *p16* methylation and *p53* antibody were 0.554 and 0.515. The plasma distribution of *p16* gene methylation and *p53* antibody in NSCLC patients and health controls were statistically significant ($\chi^2=45.709$, $P<0.01$) ($\chi^2=41.638$, $P<0.001$). The susceptibility and specificity of combined detection of *p16* methylation and *p53* antibody were 82.56% and 78.33%, respectively, with the accurate tration of 0.610. The methylation of *p16* gene was correlated with *p53* antibody ($r=0.215$, $P=0.029$). [Conclusion] Methylation of *p16* gene and *p53* antibody could be acted as tumor marker in the diagnosis of non-small cell lung cancer. The sensitivity of joint detection is higher than that of single detection.

Subject words: *p16*; methylation; *p53*; antibodies; non-small cell lung cancer

研究表明, 抑癌基因的失活会导致肿瘤的发生, 抑癌基因的突变、缺失、甲基化是抑癌基因失活的主

要原因。*p16* 基因和 *p53* 基因均为重要的抑癌基因, *p16* 基因 5' 端上游启动子区 CPG 岛甲基化后抑制该基因的转录, 从而使 *p16* 基因失活, *p16* 抑癌基因是人们发现的第一个直接作用于细胞周期, 抑制细胞分裂的基因, 它的失活可以造成细胞异常增殖, 肿

通讯作者: 万玲玲, 主治医师, 硕士; 石家庄市第一医院检验科, 河北省石家庄市长安区范西路 36 号 (050011); E-mail: 18903116639@163.com

收稿日期: 2016-11-18; **修回日期:** 2017-03-13

瘤的形成, *p16* 基因甲基化与肺癌等多种肿瘤的发生、发展有关^[1], 因此 *p16* 基因甲基化也有可能作为肺癌早期诊断的肿瘤标志物; 约 50%~60% 非小细胞肺癌存在 *p53* 突变^[2], *p53* 基因突变导致异常的 *p53* 蛋白产生, 可作为靶抗原引发机体的自身免疫反应产生 *p53* 抗体, 后者性质稳定, 在血浆中检测方便, 可以作为肿瘤标志物^[3]。本研究采用巢式甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 技术和酶联免疫吸附法 (ELISA), 检测了 98 例非小细胞肺癌和 60 例健康对照血浆标本中的 *p16* 基因甲基化、*p53* 抗体, 以探讨血浆中非小细胞肺癌相关基因异常作为肿瘤标志物联合检测的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

所有受检者均为我院 2013 年 1 月至 2014 年 12 月期间入院的经病理确诊的原发性非小细胞肺癌患者和健康体检者。肺癌组男性 72 例, 女性 26 例; 年龄 22~83 岁, 平均年龄 62.06 ± 10.92 岁, 鳞癌 (squamous cell carcinoma, SCC) 47 例, 腺癌 (adenocarcinoma) 及其他 51 例, 肺癌按照 TNM 临床分期, I~II 期 72 例, III 期 26 例。对照组 60 名, 均为排除恶性肿瘤等疾病的健康体检者, 其中男性 32 名, 女性 28 名; 年龄 20~82 岁, 平均年龄 61.12 ± 11.13 岁。两组在性别、年龄差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 研究方法

非小细胞肺癌患者手术或者放、化疗前收集血液标本 5~10ml, 于低温离心, 分离血清, -70°C 保存。

1.2.1 血清 DNA 制备

采用德国 Qiagen 公司的 QIAamp DNA Blood Mini Kit (cat.no.51104) 试剂盒, 按照其 blood and body fluid 方案进行操作: 即在 2ml 离心管中加入 40 μl 蛋白酶液、400 μl 血清, 400 μl 缓冲液 AL, 56°C 水浴 10min, 加入 400 μl 无水乙醇混匀后转移入 QIAamp 离心柱中 6000r 离心 1min, 弃液, 往柱中加入缓冲液 AW1 500 μl , 6000r 离心 1min, 再加入 500 μl 缓冲液 AW2 洗涤 20 000r 离心 3min, 最后用 50 μl IAE 洗脱 DNA。

1.2.2 *p16* 基因甲基化检测

按照文献描述的甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP) 方法^[4], 原理为 DNA 双链变性解链后在亚硫酸氢钠作用下碱基 C 变成 U, 但对于已发生甲基化的 C 则无此改变。

亚硫酸氢钠修饰基因提取: 含 DNA 2 μg 溶液 50 μl , 加入 4mol/L 的 NaOH 至终浓度为 0.2mol/L, 37°C 变性 10min 后加入 30 μl 新配制的 10mol/L 的氢醌及 520 μl pH5.0 的 3mol/L 的亚硫酸氢钠, 表面覆盖矿物油, 避光置于 50°C 水浴 16h。然后采用 Wizard DNA 纯化试剂盒 (Promega 公司, 美国) 纯化修饰后的 DNA, 洗脱液终加入 4mol/L 的 NaOH 至终浓度为 0.3mol/L, 放置于室温 5~20min, 最后加入 1/10 体积的 3mol/L 乙酸钠及 3 倍体积乙醇沉淀 DNA, 室温下干燥, 加适量 TE (pH8.0) 溶解, -20°C 保存。

PCR: 参照相关文献设计两对引物, 分别为 *p16* 基因甲基化引物 (有意义链 5'-TTATTA-GAGGGTGGGGCG2GATCGC 和反义链 5'-GACCCGACCGGACCGTTA, 扩增片段长度为 150bp)、*p16* 基因非甲基化引物 (有意义链 5'-TATTA-GAGGGTGGGGTGGATTGT 和反义链 5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA, 扩增长度片段为 (151bp))。PCR 反应总体积 50 μl , 反应体系为: Mgcl 21.5mmol/L、上下引物各 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、dNTP 0.2mmol/L、TaqDNA 酶 2U、模板 75ng。反应循环参数: 95°C 变性 5min, 然后 94°C 45s, 60°C 45s, 72°C 60s, 循环 35 次, 最后延伸 72°C 5min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外灯下观察结果。因前列腺癌 PC-3DNA 细胞的 *p16* 基因高度甲基化, 扩增甲基化片段以 PC-3DNA 作为阳性对照。

p53 抗体检测: *p53* 抗体检测试剂采用德国 IBL 公司 *p53*-Autoantibodies 酶联免疫吸附反应试剂盒, 应用酶联免疫吸附反应法的实验原理, 严格按照德国 IBL 公司 *p53*-Autoantibodies 酶联免疫吸附反应试剂盒说明书进行: 洗涤、包被好微孔反应板, 将稀释样品、原倍标准品、稀释标本、阴性对照各 100 μl 分别加入相应微孔内, 封板, 室温孵育 1h; 洗板 5 次, 拍干; 每孔加入酶标抗体 100 μl , 避光, 室温 30min; 每孔加 2mol/L HCl 50 μl , 终止反应。酶标仪 450nm 处测吸收光度, 按以下公式计算 *p53* 抗体 [*p53* 抗体指数 = $A_{450\text{nm}}$ (样品) - $A_{450\text{nm}}$ (低值标准) / $A_{450\text{nm}}$ (高值标准) - $A_{450\text{nm}}$ (低值标准)]。判定标准: 阳性: *p53* 抗体 > 0.428 ; 阴性: *p53* 抗体 < 0 。

1.3 统计学处理

采用 Excel 2007 进行数据整理, 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 计量资料采用表示。计量资料比较服从正态分布的使用 *t* 检验, 不服从正态分布的使用 Wilcoxon 符号秩和检验; 计数资料分布比较采用 Pearson 卡方检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中 p16 甲基化检测和 p53 抗体检测在非小细胞肺癌预测诊断中的价值

非小细胞肺癌组 p16 甲基化率高于对照组 ($\chi^2=45.709, P<0.001$), 非小细胞肺癌组的 p53 抗体水平和阳性率均高于对照组 ($Z=-5.786, P<0.001; \chi^2=41.638, P<0.001$) (Table 1)。

Table 1 Test results of p16 gene methylation and p53 antibody in plasma

Group	N	Methylation of p16 gene		p53 antibody level	p53 antibody	
		Positive	Negative		Positive	Negative
NSCLC	98	69	29	4.113±6.040	57	41
Control group	60	9	51	0.220±0.028	4	56
Statistic		$\chi^2=45.709$		$Z=-5.786$	$\chi^2=41.638$	
P value		<0.001		<0.001	<0.001	

p16 甲基化阳性预测为非小细胞肺癌的敏感度为 70.41%, 特异性为 85.00%, 约登指数为 0.554 (Table 2)。对于 p53 抗体定量检测, 将 p53 抗体定量检测结果对研究对象的临床诊断做 ROC 曲线 (Figure 1), 曲线下面积 AUC=0.783 (95%CI:0.712~0.854, P<0.001); 当 p53 抗体 ≥0.279 IU/ml 预测为非小细胞肺癌时, 此时预测的敏感度为 64.29%, 特异性为 93.33%, 约登指数为 0.576。对于 p53 抗体定性检测, 如 p53 抗体阳性预测为非小细胞肺癌时, 敏感度为 58.16%, 特异性为 93.33%, 约登指数为 0.515 (Table 2)。

Table 2 Prediction of p16 gene methylation and p53 antibody level in NSCLC

Group	N	Prediction of p16 gene methylation		Prediction of p53 antibody level	
		+	-	+	-
NSCLC	98	69	29	57	41
Control group	60	9	51	4	56
Total	158	78	80	61	97

2.2 联合检测血清中 p16 甲基化和 p53 抗体在非小细胞肺癌诊断中的价值

联合 p16 甲基化与 p53 定量检测对非小细胞肺癌的进行预测诊断, 如 p16 甲基化阳性或 p53 抗体 ≥0.279 IU/ml 即预测为非小细胞肺癌时。联合检测预测非小细胞肺癌的敏感度为 82.65%, 特异性为 78.33%, 约登指数为 0.610 (Table 3)。

Table 3 Combined detection in the diagnosis and prognosis of NSCLC

Clinical diagnose	N	Combined detection	
		+	-
NSCLC	98	81	17
Control group	60	13	47
Total	158	94	64

2.3 联合检测与单独检测在非小细胞肺癌预测诊断中的比较

p16 甲基化和 p53 抗体联合检测的敏感度高于

两个单独检测, 差异有统计学意义 ($\chi^2=14.105, P=0.001$), 三种检测方法的特异性和准确率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$) (Table 4)。

2.4 p16 基因甲基化与 p53 抗体检测关联性分析

p16 基因甲基化阳性患者的 p53 抗体水平为 4.424±5.748, 阳性率为 65.22%, p16 基因甲基化阴性患者的 p53 抗体水平为 3.375±

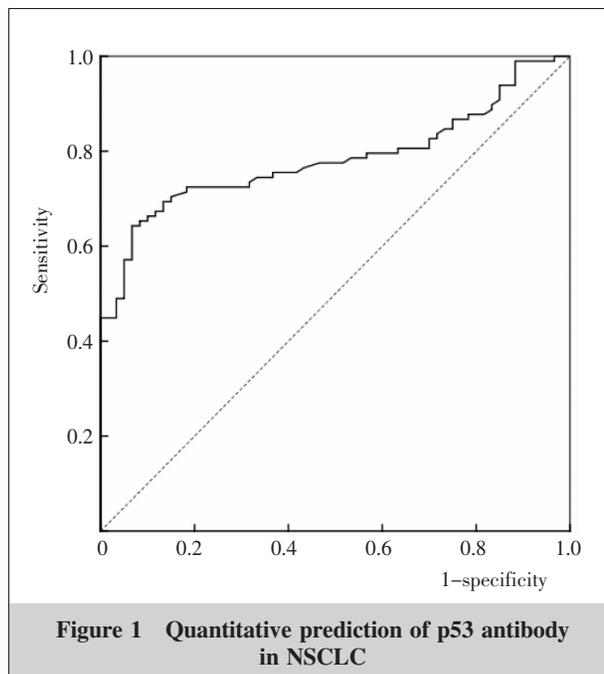


Table 4 Comparison of the combined detection and single detection of NSCLC

Diagnose method	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy rate(%)	Accuracy index
<i>p16</i> methylation detection	70.41	85.00	75.95	0.554
<i>p53</i> antibody detection	58.16	93.33	71.52	0.561
Combined detection	82.65	78.33	81.01	0.610
χ^2	14.105	5.485	3.927	-
<i>P</i> value	0.001	0.064	0.140	-

6.735, 阳性率为 58.62%。*p16* 基因甲基化阳性患者的 *p53* 抗体水平高于阴性患者, 差异有统计学意义 ($Z=-2.012, P=0.044$); *p16* 基因甲基化与 *p53* 抗体检测具有相关性 ($r=0.215, P=0.029$) (Table 5)。

Table 5 Correlation between *p16* gene methylation and *p53* antibody detection

<i>p16</i> methylation detection	N	<i>p53</i> quantitative antibody	<i>p53</i> antibody characterization	
			Positive	Negative
Positive	69	4.424±5.748	45	24
Negative	29	3.375±6.735	17	12
Statistic parameter		$Z=-2.012$	$\chi^2=4.768$	
<i>P</i> value		0.044	0.029	

3 讨论

血清肿瘤标志物在肿瘤的早期诊断中的应用正日益引起人们的关注^[5], 当前肺癌临床常用的血清学标志物包括基因和蛋白两个方面, 抑癌基因启动子区高甲基化几乎在所有肿瘤组织中都可以检测到^[6,7], 抑癌基因甲基化是指 DNA 在甲基化转移酶催化下, 将甲基基团-CH₃ 加到胞嘧啶环的第 5 位碳原子上形成 5-甲基胞嘧啶, 多发生于基因启动子区 CPG 岛。坏死的肿瘤细胞可释放 DNA 进入血液循环, 外周血游离 DNA 中 *p16* 基因甲基化检测可能是肺癌早期诊断的一种理想介质, MSP 技术灵敏度高, 在 200 μ l 血浆中至少可以检测到 0.002 μ g 的肿瘤 DNA, 因此当 106 个肿瘤细胞中的 DNA 释放入血时, 目的基因就能在血浆中检测发现。目前在肺癌的诊断中 *p53* 抗体应用到了临床, *p53* 基因定位于 17p13, 突变的 *p53* 基因编码的 *p53* 蛋白, 可诱导宿主机体的免疫应答, 产生血清 *p53* 抗体, 血清 *p53* 抗体可以间接反映 *p53* 基因突变, *p53* 抗体对肺癌的检测具有良好特异性^[8,9], 阳性结果应引起临床医生重视。血浆中检测基因和蛋白取材容易, 创伤小, 价

格低廉, 患者易于接受。在血浆中找到肿瘤标志物进行联合检测有望成为早期诊断肺癌简便有效的方法。

本研究对非小细胞肺癌患者外周血 *p16* 基因甲基化的检出率为 70.41%, 与陈首慧等^[10]研究结果一致, 提示 *p16* 基因甲基化与非小细胞肺癌的发生关系密切; *p16* 甲基化检测对非小细胞肺癌预测诊断的敏感度为 70.41%, 特异性为 85.00%, 正确指数为 0.554, 阳性预测值为 88.46%, 与姚群峰等得出的结果 (71.71% 的肺癌患者血清中检测到了 *p16* 基因甲基化, 而且具有较高的特异性 88.90%) 相似^[11]。而与 *p53* 抗体联合检测时对非小细胞肺癌预测诊断的敏感度为 82.65%, 高于单独检测 *p16* 基因甲基化的敏感度 (70.41%) 和单独检测 *p53* 抗体的敏感度 (58.16%), 表明联合检测可以提高敏感度; 而 *p53* 抗体检测特异性较高, 与其他文献^[9]一致。

本研究中对 *p16* 基因甲基化和 *p53* 抗体表达关联性分析得出结论, *p16* 基因甲基化阳性患者的 *p53* 表达水平高于阴性患者 ($Z=-2.012, P=0.044$); *p16* 基因甲基化与 *p53* 抗体定性的相关系数为 0.215 ($P=0.029$), 表示 *p16* 基因甲基化与 *p53* 抗体表达具有相关性, 说明 *p16* 基因甲基化阳性患者的 *p53* 抗体阳性率较高, *p16* 基因甲基化阳性患者, 其 *p53* 抗体大多趋于阳性, 可能提示 NSCLC 发生机制里存在多种抑癌基因同时失活的协同作用。

综上所述, 血浆 *p16* 基因甲基化和 *p53* 抗体与非小细胞肺癌密切相关, 单项血清肿瘤标志物对肺癌的诊断敏感度比较低。联合检测可能成为有价值的非小细胞肺癌的诊断指标, 联合检测能够在特异性下降不大的情况下, 有效提高检测敏感度, 亦能为影像学等其他肿瘤检测技术提供辅助方法, 更好地为临床大夫提供辅助诊断指标。

参考文献:

- [1] Kang CY, Zhou HC, Tang SP, et al. The value of detection of FHIT, *p16*, MGMT and RASSF1A genes methylation in the diagnosis of lung cancer[J]. Tumour, 2011, 31(8): 729-734. [亢春彦, 周慧聪, 汤少鹏, 等. 血浆中检测 FHIT、*p16*、MGMT 和 RASSF1A 基因甲基化在肺癌诊断中的价值[J]. 肿瘤, 2011, 31(8): 729-734.]
- [2] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics

- [J].CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90.
- [3] Du CY,Yu Y,Zhang ZL,et al.The value of serum p53 antibody combined with CEA,CYFRA-21-1 in the diagnosis of lung cancer[J]. Jiangsu Medicine,2013,39(7):785-787. [杜常燕,余勇,张增利,等.血清 p53 抗体联合 CEA、CYFRA-21-1 检测在肺癌诊断中的价值 [J]. 江苏医药,2013,39(7):785-787.]
- [4] Henman 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,1996,93:9821.
- [5] Ando S,Kimura H,Iwai N,et al.Optimal combination of seven tumour markers in prediction of advanced stage at first examination of patients with non-small lung cancer[J]. Anticancer Res,2001,21(4B):3085-3092.
- [6] Li JT,Li M,Chen SQ,et al. Methylation analysis of SEMA3B gene in non small cell lung cancer tissues and adjacent tissues [J].Chinese Journal of Surgical Oncology,2012,4(2):98-100.[李金田,李明,陈森清,等.非小细胞肺癌组织与癌旁组织 SEMA3B 基因甲基化分析[J].中国肿瘤外科杂志,2012,4(2):98-100.]
- [7] Wen JZ,Han XY,Wei HB,et al.Detection of methylation of FOXF1 gene in colon cancer and its clinical significance [J]. Journal of New Medicine,2013,44 (6):370-372.[温机智,韩晓燕,卫洪波,等.结肠癌组织 FOXF1 基因甲基化检测及其临床意义[J].新医学,2013,44(6):370-372.]
- [8] Shi GL,Hu XL,Yue SD,et al. Application of serum tumor marker in the diagnosis of lung cancer [J].Chinese Journal of Oncology,2005,27(5):299-301.[时广利,胡秀玲,岳思东,等.血清肿瘤标志物在肺癌辅助诊断中的应用[J].中华肿瘤杂志,2005,27(5):299-301.]
- [9] Wang XB,Jin LH,Han Y,et al. Detection of serum P53 protein and p53 antibody in three patients with non small cell lung cancer [J].Chinese Journal of Medicine,2013,48(3):45-47.[王晓彬,靳龙海,韩毅,等.血清 p53 蛋白、P53 抗体在Ⅲ期非小细胞肺癌患者的检测[J].中国医刊,2013,48(3):45-47.]
- [10] Chen SH,Xue SL,Jin YT,et al. Detection of methylation of P16 gene in lung cancer tissues and plasma[J]. Journal of Chinese Laboratory Diagnosis,2010,14(7):1035-1038.[陈首慧,薛绍礼,金永堂,等.肺癌患者癌组织和血浆 p16 基因甲基化的检测及其临床意义[J].中国实验诊断学,2010,14(7):1035-1038.]
- [11] Yao QF,Ning Y,Zhang LP,et al. Application of serum p16 gene methylation combined with CYFRA21-1 detection in the diagnosis of lung cancer [J]. Journal of Microcirculation,2016,16(1):29-31.[姚群峰,宁勇,张利平,等.血清 p16 基因甲基化联合 CYFRA21-1 检测在肺癌诊断中的应用[J].微循环杂志,2016,16(1):29-31.]
- [12] Wang YS,Jin YT,Xue SL,et al. Methylation of p16 gene in the pathogenesis of non small cell lung cancer[J].Anhui Yike Daxue Xuebao,2006,41(6):619-621.[汪亚松,金永堂,薛绍礼,等. p16 基因甲基化在非小细胞肺癌发病中的研究[J].安徽医科大学学报,2006,41(6):619-621.]

《肿瘤学杂志》关于“在线优先出版”的通告

为了加快学术论文传播速度,缩短出版周期,使作者研究成果的首发权及时得到确认,《肿瘤学杂志》自 2016 年实行“在线优先出版”,经同行评议通过采用的稿件,经编辑部加工处理后在中国知网(CNKI)实行电子版在线优先出版。具体如下:

(1)在线投稿接收之后,编辑部核实文稿的题目、作者、单位等版权作息,作者提供相关信息,供在线出版使用。此信息为文稿最终确认的出版信息,此后作者不再予以更改。

(2)在线出版的 PDF 全文是经作者最终校对的修改定稿。待编辑部完成整个校对流程后替换为正式出版稿,同时给出完整的发表年份、卷、期、起止页码和唯一的文献识别 DOI 号码。

(3)在线出版的文献是《肿瘤学杂志》印刷版本的在线优先网络版,完全满足国内外学术交流的在线检索和引用。

《肿瘤学杂志》编辑部