

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.01.008

非小细胞肺癌患者肿瘤和癌旁组织 p14ARF 的甲基化状态检测及临床意义

胡志亮¹ 沈毅¹ 田凯华^{1△} 李论¹ 李玮²

(¹ 青岛大学医学院附属医院, 山东 青岛 266003; ² 济宁市第二人民医院, 山东 济宁 272049)

摘要 目的 探讨非小细胞肺癌中的 p14ARF 基因启动子甲基化状态及其在非小细胞肺癌癌变中的作用。**方法** 收集非小细胞肺癌及配对的癌旁组织各 107 例, 采用改良巢式 MSP (methylation specific PCR, MSP) 检测肺癌患者肿瘤标本以及配对的癌旁组织中 p14ARF 基因外显子 CpG 岛的启动子甲基化情况。**结果** p14ARF 甲基化在 107 例肺癌中肿瘤组织中表达率为 33.6%; 而在配对的癌旁组织中表达率为 12.1%; 两组之间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 并且两者相关性极差。**结论** 肺癌的癌组织及配对的癌旁组织中 p14ARF 启动子甲基化存在明显差异, 结合其他辅助检查可提高肺癌诊断的阳性预测值。

关键词 非小细胞肺癌; p14ARF; 甲基化; 表观遗传学

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2014)02-027-03

The methylation status detected and analysis in clinic about p14ARF from non-small lung cancer tissues and its surrounding normal part

HU Zhi-liang, SHEN Yi, TIAN Kai-hua, et al

(Affiliated Hospital of Qingdao University Medical School, Qingdao 266003, China)

Abstract: Objective This study was designed to investigate promoter methylation status and protein expression of p14ARF gene in non-small cell lung cancer and value the role of p14ARF promoter methylation in carcinogenesis of non-small cell lung cancer. **Methods** The study aimed to assess the methylation status of the CpG island of P14ARF promoter using modified NMSPCR (Nested methylation specific PCR) in the training set consisted of tumor tissues and paired para-carcinoma tissue in collecting 107 non-small lung cancer. **Results** The methylation of p14ARF promoter was detected in 33.6% of tumor tissues, and 12.1% in distant-cancer mucosa respectively. The two results was a significant difference ($P < 0.05$), and the correlation of them is very poor. **Conclusion** The methylation status of p14ARF promoter exists a obvious difference in between tumor tissues and paired para-carcinoma tissues. So, it could improve PPV (positive predictive value) in clinic with other effective confirmed techniques.

Key words: lung cancer; P14ARF; Methylation; Epigenetic Change

肺癌是人类最常见的呼吸系统恶性肿瘤, 发病率日益提高, 80% 左右的肺癌患者不能得到早期诊断而失去手术治疗的时机^[1]。因此, 肺癌的早期诊断和治疗是困扰医疗人员的主要问题。肺癌的产生涉及多种因素^[2]。肺癌抑癌基因甲基化的异常升高在肺癌的发病过程中起了重要作用, 启动子区异常甲基化作为 p14ARF 基因失活的重要形式可能参与了肺癌的发生^[3]。我们检测了非小细胞

肺癌患者肿瘤和癌旁组织中 p14ARF 启动子区甲基化情况, 并对它们的临床病理意义进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

107 例肺癌组织及相应癌旁正常组织取自青岛大学医学院附属医院胸外科新鲜手术标本, 均经术后病理学确诊。男性 81 例, 女性 26 例; 年龄 35~77 岁, 中位年龄为 58.2 岁。其中鳞癌 43 例, 腺

* [基金项目] 山东省卫生厅科研项目 (编号: 2007H2035)

△ [通信作者] 田凯华, E-mail: tiankaihua@163.com

癌 56 例,其他 8 例;根据 1997 年 UICC 修订的肺癌分期标准:Ⅰ期 37 例,Ⅱ期 31 例,Ⅲ期 29 例;余参见表 1。取其癌旁(距肿瘤边缘 >10cm)正常组织 107 例。所有标本均无坏死组织,术前未进行化疗、放疗。

表 1 107 例非小细胞肺癌患者 p14ARF 启动子的甲基化状态分布(n,%)

临床特征	n	甲基化		甲基化率	χ^2	P
		+	-			
总计	107	36	71	33.6		
年龄	29~57	21	49	30	0.779	0.290
(岁)	≥57	15	22	40.5		
性别	男性	27	54	33.3	0.000	1.000
	女性	9	17	34.6		
抽烟	是	31	46	40.3	4.378	0.023
	否	5	25	16.7		
组织学	鳞癌	9	34	20.9		
类型	腺癌	25	31	44.6	6.656	0.038
	其他	2	6	25.0		
分化	中高分化	23	43	34.8	0.015	0.834
程度	低分化	13	28	31.7		
TNM	Ⅰ	13	24	35.1		
分期	Ⅱ	10	31	24.4	1.105	0.576
	Ⅲ	9	20	31.0		
肿瘤	T1	23	23	50		
大小	T2	15	18	45.5	3.379	0.176
	T3/T4	8	20	28.6		

1.2 方法

1.2.1 DNA 抽提 DNA 抽提按照《分子克隆》常规进行。

1.2.2 p14ARF 甲基化检测 巢氏甲基化特异性 PCR(NMSP):1)基因组 DNA 的亚硫酸氢盐修饰;目的使未甲基化的胞嘧啶经脱氨基变为尿嘧啶。2)PCR 为基础的甲基化分析:分别设计针对启动子区甲基化和非甲基化 DNA 的引物。

1.3 结果判定

检测甲基化特异性引物扩增产物存在为甲基化阳性;反之,不存在即为甲基化阴性,而且需非甲基化特异性引物扩增产物同时存在才可判定甲基化阴性。

1.4 统计学方法

用 SPSS18.0 统计软件对数据进 Pearson χ^2 检验和 Spearman 相关分析。

2 结果

2.1 p14ARF 启动子通过巢氏甲基化技术的表达结果

p14ARF 基因启动子的甲基化在原发性肺癌肿瘤检测组织和癌旁组织分别是 33.6%,12.1%。在肿瘤组织和癌旁组织中的 p14ARF 启动子的甲基化有显著的差异($\chi^2 = 12.811, P < 0.001$)。我们证明它们的 Pearson 相关性分析呈负相关,见表 2。

表 2 两组间甲基化分布及相关性比较(n,%)

	甲基化	非甲基化	甲基化率	χ^2	r	P
肿瘤组织	36	71	33.6	12.811	<0.001	<0.001
癌旁组织	13	94	12.1			

2.2 临床特征和 p14ARF 启动子甲基化之间的关系

p14ARF 启动子甲基化阳性、阴性在性别、年龄、TNM 分期和肿瘤大小方面无明显差异。而在吸烟和不吸烟之间有显著性差异。吸烟的明显高于不吸烟的($\chi^2 = 4.378, P = 0.023$)。如表 1。

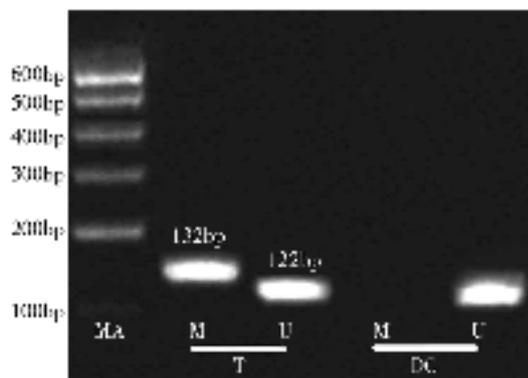
54 例腺癌中 25 例 p14ARF 启动子发生甲基化,43 例鳞癌中甲基化有 9 例,腺癌的 p14ARF 启动子甲基化明显高于鳞癌的($t = 5.059, P = 0.019$),如表 3 所示。

表 3 不同组织类型组间 p14ARF 启动子发生甲基化的比较(n)

	甲基化	非甲基化	χ^2	P
鳞癌	9	34	5.059	0.019
腺癌	25	31		

2.3 p14ARF 启动子甲基化电泳结果

107 例患者中,肿瘤组织发现 36 条甲基化带,而在癌旁组织中只有 13 条甲基化带,显示 p14ARF 启动子甲基化在肿瘤组织中的甲基化频率显著高于相应癌旁组织。在所有分组中,第 13 例患者最具有代表性,如图 1。



MA: DNA 分子量标记物
 M: 启动子 p14ARF 的甲基化
 U: 启动子 p14ARF 的非甲基化
 TT: 肿瘤组织; DC: 癌旁组织

图 1 第 13 例患者 p14ARF 启动子甲基化特异性 PCR 电泳结果

该例肺癌病人中癌组织中存在明显甲基化扩增条带(132bp),而在癌旁组织中没有甲基化条带出现。

3 讨论

随着对肿瘤发生发展机制的研究不断深入,人们发现基因突变并非肿瘤发生的唯一原因。甲基和一些核苷酸序列或组蛋白结合会改变“核酸-蛋白复合物”的形态,一些基因的表达发生改变。因此在未改变 DNA 的序列的情况下,这些变化仍然能够影响细胞的功能,被称为“表观遗传学”。表观遗传学在肿瘤发生中扮演重要角色,由此可以解释当人体遇到外界条件变化,诸如致癌物质、环境变化、精神打击等情况时,机体 DNA 序列并未发生实质的改变,但表观遗传却会发生了变化,导致细胞癌变。DNA 甲基化被认为是表观遗传学的主要机制之一,对其研究最早也最为清晰的表观遗传修饰方式^[4]。抑癌基因以及相关基因启动子区的甲基化会导致基因的失活,从而引发组织癌变和促进肿瘤形成^[5]。p14ARF 启动子区的异常甲基化同样被认为在肺癌的发生发展过程发挥了重要作用。

基因的突变、纯合型缺失、杂合型缺失和启动子区异常甲基化等是 p14ARF 基因的主要失活机制。p14ARF 启动子区甲基化在多种人类肿瘤中均有报道。Esteller 等在一组结直肠癌的研究中发现 p14ARF 启动子区甲基化阳性率为 31%^[6]。Weihauch 等检测了 19 例原发性肝血管瘤中启动子区甲基化状态,报告甲基化阳性率是 26%,曾

经指出 CpG 启动子区发生甲基化是 p14ARF 基因失活的重要方式^[7]。近来, Kim 等针对 p14ARF 启动子区甲基化情况是否吸烟的因素有关系做了检测,其结果甲基化阳性率为 9%^[8]。

资料显示 I 期肺癌患者的 5 年生存率约为 60%, II-IV 期临床肺癌的 5 年生存率从 40% 到 5% 之间^[9]。这主要归咎于缺乏可靠有效的早期发现和诊断的手段。p14ARF 基因启动子区的异常甲基化在肺癌发生发展过程中扮演了重要角色,是一个早期事件,同时被认为是可以用 MSP 技术检测到的潜在的早期诊断标志物^[10],可以作为癌症早期诊断的一种辅助方法,并对其预后具有一定预测价值^[11]。通过 Spearman 相关分析,p14ARF 启动子的甲基化情况在肿瘤组织中和相应癌旁组织中相关性极差。如果我们还可以进一步检测在血液中 p14ARF 启动子的甲基化状况与肿瘤的关系,这将对我们早期诊断肺癌提供一个血液学标准。

由于在标本中 DNA 比较稀少,我们进行了更敏感的改良巢甲基化特异性 RCR 检测方法,为肺癌的早期诊断提供依据。我们的研究与以往报告的结果几乎一致。我们发现 p14ARF 启动子的甲基化在吸烟和不吸烟患者之间有显著差异($\chi^2=4.378, P=0.023$)。目前的研究结果已经证明,吸烟是肺癌的主要促发因素,如表 1 所示,在单因素分析中,我们也证明吸烟是一个重要的危险因素。

我们的研究同样显示腺癌中的 p14ARF 启动子甲基化明显高于鳞癌。腺癌比鳞癌在应用靶向药物治疗方面更有价值、更加敏感及突出优势,临床研究也显示化疗的敏感性鳞癌明显优于腺癌。表观遗传学改变可以干扰化疗敏感性,p14ARF 启动子的甲基化可能使肺癌腺癌的化疗的敏感性下调。这提示改变 p14ARF 启动子甲基化状态可以提高化疗的敏感性。

在本文中, TNM 分期是最危险因素, p14ARF 启动子甲基化危险性排名仅次于吸烟,位于第三。在先前的研究中,还没有直接的证据可以证明 p14ARF 启动子甲基化作为诊断依据,但目前的研究结果为今后的临床和基础研究提供了一种特殊的方法。并且我们今后的研究中正在考虑通过 p14ARF 启动子去甲基化来提高化疗及放疗的敏感性,去治疗非小细胞肺癌病人。

在本文中存在着以下几个限制:首先, p14ARF 启动子甲基化需要获得组织标本, (下转第 36 页)

kle-brachial index to predict future cardiovascular outcomes: systematic review[J]. *Am J Hypertens*, 2013, 26(1):13-19.

- [5] Bonithon-Kopp C, Touboul PJ, Berr C, et al. Relation of intima-media thickness to atherosclerotic plaques in carotid arteries. The Vascular Aging (EVA) Study [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16(2):310-316.
- [6] Pedersen TR, Wilhelmsen L, Faergeman O, et al. Follow-up

(上接第 29 页)

然而对早期患者则非常困难;其次,作为前瞻性研究,对临床特征评价不够精确地;再次,收集的病例数偏少,分离组织中的 DNA 也是不完美,特别是存放已久的组织标本。因此,我们的数据的确认需要进一步验证,通过的多中心、大样本的测试方法。

通过检测 p14ARF 基因启动子甲基化在非小细胞肺癌肿瘤及癌旁组织中的表达情况,研究 p14ARF 启动子区甲基化在肺癌发生发展中的机制,我们认为检测 p14ARF 基因甲基化状态可作为肺癌早期诊断或判断预后的一个有价值的生物学标志。在将来的研究中,我们有可能寻找合适的去甲基化试剂,恢复抑癌基因的活性,为抗肿瘤治疗及基因干扰治疗提供一种思路和理论基础。

参考文献

- [1] Gatta G, Ciampichini R, Bisanti L, et al. Estimates of cancer burden in Lombardy[J]. *Tumori*, 2013, 99(3):277-284.
- [2] Wilson IM, Vucic EA, Enfield KS, et al. EYA4 is inactivated biallelically at a high frequency in sporadic lung cancer and is associated with familial lung cancer risk[J]. *Oncogene*, 2013, 10(7):1038.
- [3] Watanabe T, Nakamura M, Yonekawa Y, et al. Promoter hypermethylation and homozygous deletion of the p14ARF and p16INK4a genes in oligo dendrogomas[J]. *Acta Neuropathol*, 2001, 101(3):185-189.
- [4] Griffiths EA, Gore SD, Hooker CM, et al. Epigenetic differences in cytogenetically normal versus abnormal acute mye-

(上接第 32 页)

- [8] Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development[J]. *Genes Dev*, 1997, 11(24):3286-3305.
- [9] Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998, 14:59-88.
- [10] Callahan R. MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors; their potential relevance to human breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1996, 39(1):33-44.
- [11] Wend P, Runke S, Wend K, et al. WNT10B/ β -catenin signaling induces HMGA2 and proliferation in metastatic triple-negative breast cancer[J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(2):264-

study of patients randomized in the Scandinavian simvastatin survival study(4S)of cholesterol lowering[J]. *Am J Cardiol*, 2000, 86(3):257-262.

- [7] Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes[J]. *Circulation*, 2001, 104(3):365-372.

(收稿日期 2013-12-01)

loid leukemia[J]. *Epigenetics*, 2010, 5(7):590-600.

- [5] Tam KW, Zhang W, Soh J, et al. CDKN2A/p16 Inactivation Mechanisms and Their Relationship to Smoke Exposure and Molecular Features in Non-Small-Cell Lung Cancer[J]. *Thorac Oncol*, 2013, 8(11):1378-1388.
- [6] Esteller M, Tortola S, Toyota M, et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14 (ARF) is independent of p16 (INK4a) methylation and p53 mutational status[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(1):129-133.
- [7] Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, et al. Aberrant hypermethylation of p14ARF and O6-methylguanine-DNA methyltransferase genes in astrocytoma progression [J]. *Brain Pathol*, 2007, 17(1):5-10.
- [8] Kim HJ, Kim MH, Song MH, Song DE, Yu E. Immunohistochemical study of p53 mutation and p16, p14 alterations encoded by INK4a-ARF in mucin-hypersecreting bile duct tumor [J]. *Korean J Gastroenterol*, 2005, 45(3):189-194.
- [9] Takayama K, Inoue K, Tokunaga S, et al. A Phase II study of concurrent thoracic radiotherapy in combination with weekly paclitaxel plus carboplatin in locally advanced non-small cell lung cancer: LOGIK0401[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 72(6):1353-1359.
- [10] Sanchez-Cespedes M, Reed AL, Buta M, et al. Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 1999, 18(43):5843-5849.
- [11] Deng D, Liu Z, Du Y. Epigenetic alterations as cancer diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers [J]. *Adv Genet*, 2010, 71:125-176.

(收稿日期 2013-12-11)

279.

- [12] Steg A, Wang W, Blanquicett C, et al. Multiple gene expression analyses in paraffin-embedded tissues by TaqMan low-density array: Application to hedgehog and Wnt pathway analysis in ovarian endometrioid adenocarcinoma[J]. *J Mol Diagn*, 2006, 8(1):76-83.
- [13] Aprelikova O, Palla J, Hibler B, et al. Silencing of miR-148a in cancer-associated fibroblasts results in WNT10B-mediated stimulation of tumor cell motility [J]. *Oncogene*, 2013, 32(27):3246-3253.

(收稿日期 2013-11-14)