

p14 基因启动子甲基化在上皮性卵巢癌临床检测中的意义

丁红岩¹ 高金瑜^{1#} 张燕² 李长华¹ 孙广琴¹

(1 南京医科大学附属淮安一院 江苏淮安 223300; 2 山东大学附属省立医院中心实验室 济南 250021)

摘要:目的:探究 p14 基因启动子异常甲基化检测在上皮性卵巢癌发生发展中的临床意义。方法:选取 2007 年 9 月~2009 年 6 月我院收治的 45 例上皮性卵巢癌患者、30 例卵巢良性肿瘤患者及 20 例卵巢组织正常者作为研究对象,通过甲基化特异性聚合酶链式反应法检测所有研究对象的 p14 基因启动子区甲基化情况,采用荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测组织标本 p14mRNA 表达,采用免疫组织化学法检测 p14 蛋白表达,并比较各组患者之间的差异。结果:正常卵巢组织、良性肿瘤组织和上皮性卵巢癌组织未检测到 p14 基因启动子区甲基化。p14mRNA 在正常卵巢组织中的水平为(0.57±0.41),在卵巢癌组织的水平为(0.83±0.07),在良性肿瘤组织中的水平为(0.62±0.39),p14mRNA 在卵巢癌组织中的水平与正常组织和良性肿瘤组织中的比较,差异有统计学意义, $P<0.05$;p14mRNA 在正常组织和良性肿瘤组织中的水平比较,差异无统计学意义, $P>0.05$;p14 表达在上皮性卵巢癌、良性卵巢肿瘤和正常卵巢组织中的阳性率分别为 37.8%、73.3%和 85.0%,三组中 p14 表达的阳性率比较,差异有统计学意义, $P<0.05$ 。结论:p14 低表达可能与卵巢癌的发生、发展有关,但蛋白的异常表达与甲基化无关。

关键词:上皮性卵巢癌;p14 基因;DNA 甲基化;临床检测

Significance of Promoter Hypermethylation of p14 Gene in the Clinical Detection of Epithelial Ovarian Cancer

DING Hong-yan¹, GAO Jin-yu^{1#}, ZHANG Yan², LI Chang-hua¹, SUN Guang-qin¹

(1Huaian Affiliated Hospital of Nanjing Medical University,Jiangsu,huaian 223300; 2Shandong Province-owned Hospital,Jinan 250021)

Abstract: Objective: To study the significance of promoter hypermethylation of p14 gene in the clinical detection of the course of epithelial ovarian cancer. Methods: From September 2007 to June 2009, selected 45 cases of epithelial ovarian cancer patients, 30 patients with ovarian benign tumor and 20 patients with normal ovarian in our hospital as the research objects. The p14 Gene promoter region methylation of all the research objects was detected by methylation specific polymerase chain reaction method; the expression of p14mRNA was detected by fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR); and the expression of p14 protein was detected by immunohistochemistry, compared the differences between the three groups. Results: No hypermethylation was detected in p14 Gene promoter region about the epithelial ovarian cancer primary tissues, ovarian benign tumor and normal ovarian tissues. The amount of p14 mRNA in normal ovarian tissues was (0.57±0.41); in ovarian cancer tissues, it was (0.83±0.07); in ovarian benign tumor tissues, it was (0.62±0.39); the differences of p14mRNA between ovarian cancer tissues and normal tissues and benign tumor tissues were statistically significant, $P<0.05$; the difference of p14mRNA between normal tissues and benign tumor tissues was not statistically significant, $P>0.05$. The positive rate of p14 expression in epithelial ovarian cancer, ovarian benign tumor and normal ovarian tissues were 37.8%, 73.3% and 85%; compared the positive rate of p14 expression in the three groups, the differences were statistically significant, $P<0.05$. Conclusion: The lower expression of p14 Gene may be associated with the occurrence and development of ovarian cancer, but the abnormal protein expression may be not related to the hypermethylation.

Key words: Epithelial Ovarian Cancer; p14 Gene; DNA Hypemethylation; Clinical Detection

中图分类号:R737.31

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2017.12.001

卵巢癌是严重威胁女性健康的恶性肿瘤之一,其死亡率居妇科恶性肿瘤第 1 位。抑癌基因的失活是卵巢癌发生及发展的关键因素,其主要表现有基因突变、缺失以及启动子区域(CPG 岛)的过甲基化。p14 是细胞周期调控因子,通过 MDM2-p53 通路履行调控细胞进程的职责。上皮性卵巢癌中的表达异常是否由 p14 基因启动子的甲基化所致,尚未见报道。本文旨在探讨 p14 基因启动子甲基化在上皮性卵巢癌中的存在情况,同时检测 p14 基因的突变情况,观察其与 p14 甲基化的关系。现报告如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2007 年 9 月~2009 年 6 月我院收治的 45 例上皮性卵巢癌患者、30 例卵巢良性

肿瘤患者及 20 例卵巢组织正常者作为研究对象,所有患者的病理诊断及组织分级明确,术前均未进行任何化疗或放疗等治疗。上皮性卵巢癌患者中,根据细胞分化程度有 14 例高分化癌,18 例中分化癌,13 例低分化癌;平均年龄(45.5±6.2)岁;25 例浆液性囊腺癌,13 例黏液性囊腺癌,6 例子宫内膜样癌,1 例透明细胞癌。卵巢良性肿瘤患者中,有 17 例浆液性囊腺瘤,13 例黏液性囊腺瘤;平均年龄(44.9±5.1)岁。卵巢组织正常患者均为宫颈良性病变者,患者平均年龄(46.7±5.2)岁。三组患者的一般资料相比较,差异无统计学意义, $P>0.05$,具有可比性。所有手术标本的采集均已得到患者的同意并签署知情同意书,标本切除后立即-80℃保存备用。

通讯作者:高金瑜,E-mail:gaojinyu422@126.com

1.2 甲基化特异性 PCR 检测

1.2.1 组织 DNA 提取 组织 DNA 的提取采用酚 - 氯仿 - 异戊醇法, 之后通过紫外分光光度法进行组织 DNA 浓度及纯度的检测。

1.2.2 DNA 修饰及纯化 取 2 μg DNA、3 mol/L NaOH 5 μl 加入到 50 μl 疗效反应体系中, 充分混匀后于 75 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 随后加入 4.8 mol/L 亚硫酸氢钠(购自 Sigma 公司)320 μl 和 20 mmol/L 的氢醌 12.6 μl , 充分混匀后再加入 10 μl 矿物油, 于 55 $^{\circ}\text{C}$ 中水浴过夜。另外, 将 1 ml DNA 纯化树脂 (购自 Promega 公司) 加入到每个 DNA 样本中, 通过纯化柱, 再加入 80% 异丙醇溶解树脂 2 ml、NaOH 脱硫 3 mol/L 5 μl 、醋酸钠 5 mol/L 5 μl , 用 100% 冰乙醇进行 DNA 沉淀, 75% 乙醇吹洗, 离心, 弃上清液, 随后溶于 30 μl TE 缓冲液中进行备用。

1.2.3 甲基化特异 PCR 反应 反应体系共 25 μl , 主要有 DNA 2 μl 、10 $\times$ PCR buffer 2.5 μl 、引物 0.5 μl 、dNT 2 μl 、Taq 酶 0.2 μl 、双蒸水补足至 25 μl 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。注意非甲基化反应退火温度为 54 $^{\circ}\text{C}$ 。以甲基转移酶 SssI 处理和未处理的正常人外周血细胞 DNA 为阳性和阴性对照, 空白对照采用双蒸水。甲基化引物序列: 上游引物 F5'-GGT ATA TTT TCG AGG GGT ACG-3', R5'-TTC CCG ACC CGC ACT CCG C-3', 预期产物为 90 bp; 非甲基化引物序列如下: F5'-TGT GAG GGT ATA TTT TTG AGG GGT AT-3', R5'-CTT CTC TCT CCA CTT CCC AAC CCA-3', 预期产物为 109 bp, 由上海生工合成。

1.2.4 电泳 取 5 μl PCR 产物, 采用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 实验重复 3 次。

1.3 荧光定量 PCR (FQ-PCR) 检测组织标本 p14mRNA 表达 采用 SYBR Green 荧光染料进行 FQ-PCR: (1) 按 Trizol 试剂说明提取组织总 RNA; (2) 引物序列: p14mRNA: F5'-GAG ACA GAA TGG AGG TGC TGC-3', R5'-GTA AGA TGA TTG GAA TTA TCT TCT-3', 预期产物为 170 bp; GAPDHmRNA: F5'-AAC GGA TTT GGT CGT ATT GGG-3', R5'-TTG ATT TTG GAG GGA TCT CGC-3', 预期产物 233 bp, 由上海生工合成; 逆转录第一链 cDNA 合成: 取总 RNA 10 μl , Oligo (dT) 5 pmols, 65 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 之后插入冰中, 加入 5 $\times$ Buffer 4 μl , 10 mmolPL dNTPs 2 μl , MMLV 逆转录酶 100 U, RNase 抑制剂 20 U, 加 DEPC 水至 20 μl , 42 $^{\circ}\text{C}$ 1 h;

FQ-PCR 反应体系为 25 μl , 其中包含 0.7 μl SYBR Green 染料, Mg^{2+} 浓度为 3.5 mol/L, 扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 50 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 每样本 4 个复孔, 在 CFD-3220 DNA Engine Option 自动荧光 PCR 仪上进行反应。

1.4 p14 基因蛋白表达的检测 p14 即用型多克隆抗体(购自福州迈新生物技术开发公司)、第一抗体兔抗人 p14 多克隆抗体、第二抗体超敏链酶卵白素 - 过氧化酶 (S-P) 试剂盒和 DAB 显色试剂盒均为即用型。提取卵巢癌组织、良性肿瘤组织和正常卵巢组织的蛋白。采用免疫组织化学法检测 p14 蛋白的表达, 具体方法为: 将切片脱蜡至水, 于 3% 过氧化氢甲醇液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 以阻断内源性过氧化物活性。以 1:10 稀释的抗原修复液高温修复, 加一抗室温下孵育 60 min, 加生物素标记的二抗室温孵育 20 min, 加 S-P 溶液 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。DAB 显色, 显微镜下观察 3~10 min, 苏木素复染, 脱水透明, 中性树胶封片。

1.5 结果判定标准 在 400 倍显微镜下观察患者标本中 p14 蛋白表达的情况, 其中阳性表达细胞的细胞核和(或)胞浆为棕黄色颗粒。观察时, 每张切片均选定 10 个观察视野, 每个视野以 100 个细胞计数。阴性: 细胞数 < 5%, 以“-”表示; 弱阳性: 细胞数为 5%~25%, 以“+”表示; 中等强度: 阳性细胞数为 25%~50%, 以“++”表示; 强阳性: 细胞数 > 50%, 以“+++”表示。

1.6 统计学分析 数据处理采用 SPSS11.0 统计学软件, 甲基化频率等计数资料采用 χ^2 检验及 Fisher 检验, 各组患者蛋白相对含量等计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组患者 p14 基因甲基化情况分析 所有患者中均未发现 p14 的高甲基化。见图 1。

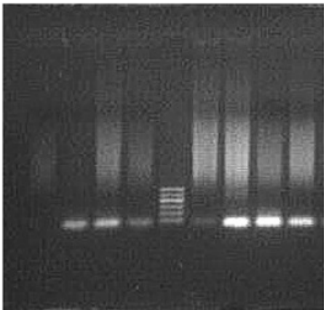


图 1 p14 基因甲基化情况

注: 从上到下依次为 600、500、400、300、200 和 100, 左边为甲基化的引物, 右边为未甲基化的引物, 均无产物扩出。

2.2 p14mRNA 表达水平 p14mRNA 在正常卵巢组织中的水平为 (0.57± 0.41), 在卵巢癌组织的水平为 (0.83± 0.07), 在良性肿瘤组织中的水平为 (0.62± 0.39)。p14mRNA 在卵巢癌组织中的水平与正常组织和良性肿瘤组织中的相比较, 差异有统计学意义, $P<0.05$; p14mRNA 在正常组织和良性肿瘤组织中的水平相比较, 差异无统计学意义, $P>0.05$ 。

2.3 p14 蛋白的表达变化 p14 蛋白表达在上皮性卵巢癌、良性卵巢肿瘤和正常卵巢组织中的阳性率分别为 37.8%、73.3%和 85.0%, 三组中 p14 蛋白表达的阳性率比较, 差异有统计学意义, $P<0.05$ 。p14 蛋白在 13 例 G3 病例中只有 3 例阳性, 阳性率为 23.1%; 18 例 G2 病例中 6 例阳性, 阳性率为 33.3%; 14 例 G1 病例中 8 例阳性, 阳性率为 57.1%。卵巢癌 I~II 期 p14 蛋白阳性表达率为 40.0%、III 期 p14 蛋白阳性表达率为 37.5%和 IV 期 p14 蛋白阳性表达率为 33.3%, 各组间差异无统计学意义, $P>0.05$ 。见表 1。

表 1 卵巢肿瘤中 p14 蛋白表达情况分析						
指标	分类	n	-	+	++	+++ 阳性率(%)
组织学类型	正常组织	20	3	9	6	2 85.0
	良性组织	30	8	13	6	3 73.3
	浆液性腺癌	25	15	8	2	0 40.0
	黏液性腺癌	13	8	4	1	0 38.5
	内膜样癌	6	4	1	1	0 33.3
	透明细胞癌	1	1	0	0	0 0.0
分化程度	G1	14	6	7	1	0 57.1
	G2	18	12	4	2	0 33.3
	G3	13	10	2	1	0 23.1
临床分期	I~II 期	20	12	6	2	0 40.0
	III 期	16	10	5	1	0 37.5
	IV 期	9	6	2	1	0 33.3

3 讨论

在正常细胞中, p14 基因参与细胞周期和细胞增殖的调控, 其产物 p14 蛋白可与 MDM2-P53 结合产生 P53-MDM2-ARF 三聚体复合物, 阻断 MDM2 诱导的 p53 蛋白降解, 将 p53 蛋白的半衰期延长至 15~75 min, 使 p53 发挥门卫作用, 调控细胞周期, 诱导周期停滞, 促进细胞凋亡, 抑制肿瘤的发生。甲基化是抑癌基因失活的机制之一, 主要是胞嘧啶 - 磷酸 - 鸟嘌呤 (Cytosine-phosphate-Guanosine, CpG) 二核苷酸发生甲基化, 甲基化后抑癌基因不表达, 这可能是肿瘤发生的关键机制之一, 在某些情况下可能是唯一机制^[1]。p14 基因表达异常包含遗传学层面 (基因突变和缺失) 和表观遗传学层面 (DNA 甲基化) 的。p14 异常表达可表现为高度甲基化, 这可能是 p14-p53 作用途径的主要调节机制之一, 影响着癌症的发展。据文献显示, 在肺癌、膀胱癌、肝癌、鼻咽癌及肠癌患者中 p14 基因出现高甲基化。Xiaofang

L 等研究发现胆管癌中 p14 的甲基化率为 24.0%, 而正常组织中未发现甲基化, 且甲基化程度与胆管癌的病理生物学行为及患者预后有关^[2]。Lassacher A 等研究发现 Merkel 细胞癌中 p14 的甲基化率为 42.0%, 未发现 p14 基因的突变, 认为 p14 的甲基化与皮肤 Merkel 细胞癌的发生有关^[3]。有关子宫内膜癌的研究显示, p14 表达异常促进了子宫内膜癌的发展^[4-5]。卵巢癌的发生与甲基化密切相关, 研究发现 RASSF1A^[6]、OPCML^[7]、BRCA1^[8]、WWOX^[9] 和 ING4^[10] 在卵巢癌均出现高甲基化。但 Teodoridis JM 检测了 106 例 III/IV 期上皮性卵巢癌中 24 个基因的 CpG 岛甲基化情况, 其结果显示 OPCML、DCRI、RASSG1A、HICI、BRCAI 和 MINT25 的甲基化率分别是 33.3%、30.7%、36.4%、17.3%、12.3%和 12.0%, 其余的基因未检测到甲基化 (APAF-1、DAPK、FANCF、FAS、p14、p21、p73、SOCS-3 和 SURVIVIN) 或是低甲基化 (OPCML、DCR1、RASSF1A、MINT25、HIC1 和 SFRP1)^[11]。

本研究显示, 在正常卵巢组织和卵巢良性肿瘤中未发现 p14 的高甲基化, 上皮性卵巢癌中也未发现 p14 甲基化。采用荧光定量 PCR (FQ-PCR) 检测组织标本中的 p14mRNA 表达水平, 结果显示卵巢癌标本中 p14mRNA 表达水平明显高于卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织, 差异有统计学意义, $P<0.05$ 。免疫组化显示上皮性卵巢癌中 p14 蛋白表达明显低于良性卵巢肿瘤和正常卵巢组织中的表达, 三组之间比较, 差异有统计学意义, $P<0.05$ 。分化程度随组织异型性和 p14 蛋白缺失率增高而增高, 但各组之间相比较, 差异无统计学意义, $P>0.05$ 。III 期和 IV 期卵巢癌中 p14 蛋白表达缺失率较 I~II 期低, 但差异无统计学意义, $P>0.05$ 。提示 p14 基因异常表达与卵巢癌的发生、发展有一定关系, 但表达异常可能不是甲基化所致, p14 基因甲基化失活在散发性卵巢癌中并不常见。与汤绍辉等研究的大肠癌中 p14 基因表达异常是 p14 基因甲基化所致不同^[12], 这可能与缺少同类研究以及我们的研究在病例种类的构成、标本量等方面的局限有关, 也可能与实验方法的不同有关; 再者可能是甲基化发生率与卵巢上皮性肿瘤的组织学类型及卵巢癌分期密切相关, 这样可以解释各研究者所报道的同一种基因在卵巢癌中的甲基化率不同, 先前报道的卵巢癌中高甲基化多是在生殖细胞癌和透明细胞癌中^[13], 而本研究无卵巢生殖细胞癌病例, 透明细胞癌仅 1 例。本实验的结论有待进一步的研究和扩大标本量得以证实。

参考文献

[1]Mé tivier R,Gallais R,Tiffoche C,et al.Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter[J].Nature,2008,452(7183):45-50

[2]Xiaofang L,Kun T,Shaoping Y,et al.Correlation between promoter methylation of p14^{ARF}, TMS1/ASC, and DAPK, and p53 mutation with prognosis in cholangiocarcinoma [J].World Journal of Surgical Oncology,2012,10:5

[3]Lassacher A,Heitzer E,Kerl H,et al.p14^{ARF} 和 p53 hypermethylation is common but INK4a-ARF locus or p53 mutations are rare in Merkel cell carcinoma[J].J Invest Dermatol,2008,128(7):1788-1796

[4]何培芝,刘少扬,江大琼.p14^{ARF}、p73 和 p53 在宫颈癌中的表达及其临床意义[J].中国临床医学,2004,11(5):820-822

[5]冯艳玲,刘富元,高克菲,等.p14^{ARF} 和 p53 在子宫内膜癌组织中的表达及其临床意义[J].肿瘤防治杂志,2005,12(21):1646-1650

[6]Fu L,Zhang S.RASSF1A promotes apoptosis and suppresses the proliferation of ovarian cancer cells[J].Int J Med,2014,33(5):1153-1160

[7]Zhou F,Tao G,Chen X,et al.Methylation of OPCML promoter in ovarian cancer tissues predicts poor patient survival[J].Clin Chem Lab Med,2014,52(5):735-742

[8]Stefansson OA,Jonasson JG,Olafsdottir K,et al.CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as co-occurring events in bassa/triple-negative breast cancer[J].Epigenetics,2011,6(5):638-649

[9]Yan H,Sun J.Methylation status of WWOX gene promoter CpG islands in epithelial ovarian cancer and its clinical significance[J].Biomed Rep,2013,1(3):375-378

[10]柳英兰,王英炜,吴迪,等.卵巢上皮癌中 ING4 基因启动子的甲基化状态及其临床意义[J].现代生物医学进展,2014,14(4):688-693

[11]Teodoridis JM,Hall J,Marsh S,et al.CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer[J].Cancer Res,2005,65(19):8961-8967

[12]汤绍辉,杨东华,黄卫,等.大肠癌组织 p14^{ARF} 与 P53 基因变异研究[J].中国病理生理杂志,2006,22(6):1191-1195

[13]Dhillon VS,Shahid M,Husain SA.CpG methylation of the FHIT, FANCF, cyclin-D2, BRCA2 and RUNX3 genes in Granulosa cell tumors(GCTs) of ovarian origin[J].Mol Cancer,2004,3(1):1-8

(收稿日期: 2017-08-27)

补阳还五汤结合头针对脑梗死后运动性失语的影响

陈清祥 刘洋洋 杨进贵 王国良
(福建省三明市中西医结合医院康复中心 三明 365001)

摘要:目的:比较补阳还五汤结合头针治疗和康复训练对脑梗死后运动性失语的疗效差异,探究补阳还五汤结合头针对脑梗死后运动性失语的影响。方法:将 60 例脑梗死后运动性失语患者按随机数字表法分为针药组和基础组,每组 30 例。针药组用补阳还五汤和针刺语言一区治疗,同时进行基础康复训练;基础组仅进行基础康复训练。治疗前后分别根据西方失语症成套测验(WAB)、功能性语言沟通能力检查法(CFCP)评估患者情况,并进行经颅超声多普勒(TCD)动脉血流动力学检查。结果:治疗后,患者的 WAB 和 CFCP 评分上升、责任血管血流增快明显。结论:补阳还五汤结合头针能改善脑梗死后运动性失语患者的语言功能。

关键词:运动性失语;脑梗死;补阳还五汤;头针

Effect of Buyanghuanwu Decoction Combined with Scalp Acupuncture on Motor Aphasia after Cerebral Infarction
CHEN Qing-xiang, LIU Yang-yang, YANG Jin-gui, WANG Guo-liang
(The Rehabilitation Center of the Sanming Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Fujian365001)

Abstract: Objective: To compare the differences of the the rapeutic effect of Buyanghuanwu decoction combined with scalp acupuncture and rehabilitation training on motor aphasia after cerebral infarction, and to explore the effect of Buyanghuanwu decoction combined with scalp acupuncture on patients with motor aphasia after cerebral infarction. Methods: 60 Patients with motor aphasia after cerebral infarction were divided into the acupuncture group and the basic group according to random number table method, 30 cases in each group. The acupuncture group was treated with Buyanghuanwu decoction and acupuncture language, and the basic rehabilitation training was carried out. The basic group only had basic rehabilitation training. According to western aphasia battery (WAB) and the chinese functional communication profile (CFCP) to evaluate the clinical situation before and after treatment, and transcranial Doppler ultrasonography (TCD) arterial hemodynamics was performed. Results: After treatment, the patients' WAB and CFCP scores increased, and the blood flow of the offending vessels increased obviously. Conclusion: Buyanghuanwu decoction combined with scalp acupuncture can improve the language function of motor aphasia patients after cerebral infarction.

Key words: Motor aphasia; Cerebral infarction; Buyanghuanwu decoction; Scalp acupuncture

中图分类号: R274.9 文献标识码: B doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2017.12.002

运动性失语亦称 Broca 失语,是脑卒中后失语的常见类型^[1],严重影响患者的日常生活、职业康复和社会回归,同时将延长康复进程。目前失语症的专业康复主要集中在高等级的医院或者有康复专科

的医院进行,其干预手段丰富,但也造成了过重的家庭负担,研究表明仅有不到 20%的患者能够坚持进行言语康复治疗^[2]。中医作为传统疗法,具有简便廉价的特点,头皮针治疗被证明对脑卒中后失语具有