

子宫内膜癌患者 P16 基因甲基化和血清 CA125 检测的临床意义

皮精英¹ 陈超霞² 彭 强² 彭大川² 李宜静²

(1 周口市人民医院 河南 周口 466001 2 周口市豫生医院 河南 周口 466000)

摘要 目的 探讨子宫内膜癌患者 P16 基因甲基化和血清 CA125 检测的临床意义。方法 采用 DNA 甲基化特异性 PCR 分别对 46 例子宫内膜癌及 12 例正常内膜对照组织中抑癌基因 p16 甲基化进行检测;对所有病例术前均测定血清 CA125 水平。结果 子宫内膜癌组 p16 甲基化率 45.6%,而 12 例对照组织均未检测到甲基化;子宫内膜癌组血清 CA125 水平明显升高。结论 子宫内膜癌患者 p16 基因甲基化和血清 CA125 水平与发病关系密切,两者结合对早期诊断及预后判断具有一定的临床指导意义。

关键词 子宫内膜癌;基因;p16;基因表达;CA125

中图分类号 R737.33 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 18-3550-03

Clinical Significance of P16 Gene Methylation and Blood Serum CA125 Examination in Patients with Endometrium Cancer

PI Jing-ying¹, CHEN Chao-xia², PENG Qiang², PENG Da-chuan², LI Yi-jing²

(1 Zhoukou People's Hospital, 466001 zhoukou, henan Province, China;

2 Zhoukou Yusheng Hospital, 466001 zhoukou, henan Province, China)

ABSTRACT Objective: To investigate endometrial cancer P16 gene methylation and the clinical significance of serum CA125. **Methods:** The detection of 46 cases of endometrial cancer and 12 normal endometrial tissue in the tumor suppressor gene p16 DNA methylation using methylation-specific PCR; in all cases before surgery were serum CA125 level. **Results:** Endometrial cancer group 45.6% rate of p16 methylation, while 12 cases were not detected in control tissue methylation; serum CA125 levels were significantly increased in endometrial cancer group. **Conclusion:** The endometrium cancer patient p16 gene methylation and the blood serum CA125 level morbidity relations are close, Both union has certain clinical guiding sense to the early diagnosis and the prognosis judgment.

Key word: Endometrium cancer; Gene, p16; Gene expression; CA125

Chinese Library Classification(CLC): R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011) 18-3550-03

子宫内膜癌(carcinoma of the endometrium),又称为子宫体癌(carcinoma of the corpus uteri),是妇科常见的恶性肿瘤,发病率仅次于宫颈癌。作为一个与内分泌密切相关的恶性肿瘤,其发生、发展涉及多基因改变和多阶段累积的复杂的生物学过程。p16 基因被证明作为一个抑癌基因,能明显抑制肿瘤细胞的生长。p16 基因突变在人类恶性肿瘤中普遍存在,突变率 30%~80%不等。主要突变方式为缺失、点突变和甲基化,在三个外显子中以第二外显子发生突变的机率最高^[1]。本研究采用 DNA 甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 分别对 46 例子宫内膜癌及 12 例正常内膜对照组织中抑癌基因 p16 启动子区甲基化进行检测;对所有病例术前均测定血清 CA125 值,探讨两者与临床之间的关系,以期对子宫内膜癌的诊断及预后提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

46 例子宫内膜癌及 12 例正常内膜对照组织标本均来自周口市人民医院 2009 年 12 月至 2011 年 1 月间手术切除标本,新鲜组织标本冻存于 -80℃ 超低温冰箱。46 例子宫内膜癌患

者年龄 42~71 岁,平均年龄 51 岁。临床分期分为临床 I 期 21 例,II 期 14 例,III、IV 期 11 例,组织病理类型均为腺癌。选择 12 例 42~68 岁正常内膜组织作为对照。

1.2 主要试剂和仪器

组织 DNA 提取试剂盒 (Promega), MSP Kit 试剂盒 (TAKARA BIOTECHNOLOGY); PCR 仪 (ABI 公司, GeneAmp 9700), CA125 elisa kit (美国 R&D), 酶标仪 (芬兰雷勃 mk3)

1.3 子宫内膜组织 p16 甲基化的检测(MSP 法)

按照说明书提取并纯化 DNA, 提取后分别用琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 条带有无降解,并用紫外分光光度计检测纯度。参照文献设计合成 p16 甲基化引物序列,甲基化引物序列为 5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3' 和 5'-GACCCC-GAACCGCGACCGTAA-3'; 非甲基化引物序列为 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3' 和 5'-CAACCC-CAAACCACAACCATAA-3', 分别用于扩增 p16 基因启动子区 CpG 岛甲基化和非甲基化的等位基因,扩增产物长度分别为 150 bp 和 151bp^[1]。β-actin PCR 引物^[2]: 5'-CCAGCCATG-TACGTTGCTATCCAG-3', 5'-GGAACCGCTCATTGCCAATG-GTGA-3', 扩增片段为 378 bp 以上引物均由上海生工合成。

反应总体积 50μl, 反应体系为: 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.1mmol/L dNTP, 0.4μmol/L 上下引物, Taq DNA 酶 2 U, DNA 模板 5μl。循环参数: 94℃ 变性 5 min, 然后 94℃ 45 s, 60℃ 40 s,

作者简介 皮精英 (1962), 女, 学士, 长期从事中西医结合妇产科的临床和研究工作。E-mail: pijingying@yahoo.com.cn
(收稿日期 2011-05-21 接受日期 2011-06-18)

72℃60 s;循环 35 次,最后 72℃延伸 5 min。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外灯下观察结果并照相。

1.4 血清 CA125 的检测(elisa 法)

对 58 例患者术前均采用 ELISA 法检测血清 CA125 水平,严格按照说明书操作,测得 OD 值,根据标准品和对应 OD 值,做出标准曲线,计算样本血清 CA125 值。正常值为 <35 U/ml。

1.5 统计学方法

利用 SPSS 13.0 软件处理数据,计量资料用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,P<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 MSP 法对 p16 基因启动子区 CpG 岛甲基化的检测结果

提取基因组 DNA 经 2%琼脂糖电泳,结果表明完整性较好,且 A260/A280 比值均超过 1.8。 β -actin 为内参照,甲基化(M)和非甲基化(U)扩增产物分别为 150 bp 和 151bp,见图 1。46 例子宫内膜癌组织中 p16 基因甲基化 21 例(45.6%),而 12 例对照组织均未检测到甲基化,两组间甲基化率差异具有统计学意义(P<0.05)。

2.2 血清 CA125 检测的结果

子宫内膜癌组血清 CA125 为 4.45~176.5 U/ml,其中 15 例 >35 U/ml 为阳性,占 32.6% 而对照组血清 CA125 为 5.2~33.5 U/ml,均为阴性。子宫内膜癌组织中的 CA125 阳性率显著高于对照组,两组间差异有统计学意义(P<0.01),见表 1。

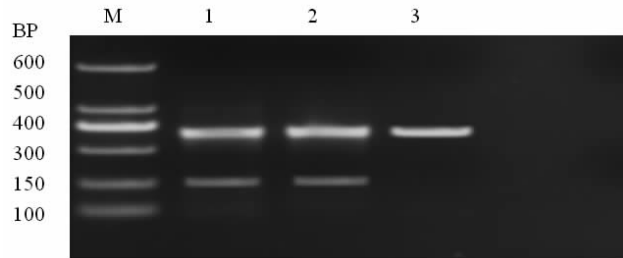


图 1 MSP 法对 p16 基因启动子区 CpG 岛甲基化结果(1,2 为子宫内膜癌组织,3 为正常对照组织)

Fig.1 MSP law to p16 gene start subsegment CpG island methylation result(1,2 organize for endometrium cancer, 3 for normal comparison organization)

表 1 各组血清 CA125 水平检测的结果

Tab.1 Each group of blood serum CA125 level examination result

Group	n	Blood serum CA125		
		Positive cases	Positive rates (%)	Measured value (U/ml)
Control group	46	15	32.6	102.45± 96.65*
Model group	12	0	0	19.85± 12.15

注 :与模型组相比,* p<0.01

Note: Compares with the model group, *p<0.01

3 讨论

p16 基因又叫 MTS (multiple tumor suppressor 1) 基因,是 1994 年美国冷泉实验室 Kamb 等发现的新抗癌基因,这是一种细胞周期中的基本基因,直接参与细胞周期的调控,负调节细胞增殖及分裂,是比 p53 更重要的一种新型抗癌基因^[3]。P16 基因以缺失,突变方式广泛参予肿瘤形成,检测 p16 基因有无改变对判断患者肿瘤的易感性以及预测肿瘤的预后,具有十分重要的临床意义^[4]。P16 基因是一种非常重要新的抗癌基因,一旦失活,则会引起细胞恶性增殖^[5],有人把它比作细胞周期中的刹车装置,一旦失灵则会导致细胞恶性增殖,导致恶性肿瘤发生。抑癌基因 p16 在子宫内膜癌中的高甲基化出现在肿瘤发生的早期阶段,与子宫内膜癌临床分期有关。本研究结果显示,p16 基因在子宫内膜癌及正常组织中甲基化率差异有统计学意义(P<0.05),在正常内膜组织中无甲基化出现。p16 基因甲基化在子宫内膜癌的诊断和判断预后具有重要的价值。

CA125 是一种膜抗原,组织分布广泛,存在于体腔上皮起源的各种组织及这些组织发生的肿瘤中^[6]。正常成年女性输卵管、子宫内膜及宫颈中含量甚微^[7]。子宫内膜癌患者血清 CA125 水平增高,可能与子宫内膜增生导致分泌 CA125 增加有关。在生理状态下,腹膜屏障只允许少量 CA125 抗原自腹膜

腔进入血循环,而子宫内膜癌患者病灶种植部位组织破坏,导致大量 CA125 进入血循环,故而使外周血 CA125 水平上升^[8]。本研究表明,CA125 与子宫内膜癌关系密切,CA125 在正常子宫内膜中未见阳性表达,而在子宫内膜癌中的表达明显升高,并且初步观察到 CA125 升高水平和临床分期、病理类型及病灶转移也有一定的关系。

总之,本研究表明,子宫内膜癌患者子宫内膜组织 P16 基因甲基化水平明显升高,血清 CA125 水平也比正常组水平明显升高,两者在子宫内膜癌的诊断中具有重要意义。本研究还观察到两者升高水平与肿瘤负荷及播散范围有关,以后还将进一步研究 P16 基因表达异常,血清 CA125 水平与子宫内膜癌的临床分期、病理分级、组织学分型等影响患者预后的因素之间的确切关系。

参考文献 (References)

[1] Igaki H, Saki H, Kishi T, et al. Highly frequent homozygous deletion of the p16 gene in esophageal cancer cell lines [J]. Bioche Biophys Res Commun,1994, 203(2):1090-1095

[2] Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, et al. Molecular structure of the human cytoplasmic β -actin gene: interspecies homology of sequences in the introns [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 82(18): 6133-6137

[3] Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus Jet al. A cell cycle regulator po-

- tentially involved in genesis of many tumour types [J]. Science, 1994; 264(1):436-437
- [4] 周莉, 黄萍, 朱安娜. 子宫内膜癌中 p16 甲基化、Her-2 表达及血清 CA125 水平与临床病理特征的关系[J]. 癌变. 畸变. 突变, 2009, 21(02):141-144
- Zhou Li, Huang Ping, Zhu An-na. Relations of p16 methylation, Her-2 expression and blood serum CA125 level and clinical pathology characteristic in endometrium cancer patient[J]. Cancer. Aberrations. Mutation, 2009, 21(02):141-144
- [5] 侯道荣, 马骏, 夏龙等. 脑胶质瘤组织中 p16 基因启动子区 CpG 岛甲基化检测及其临床意义研究[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(20):3890-3893
- Hou Dao-rong, Ma Jun, Xia Long, et al. Glioma in the p16 gene promoter CpG island methylation and its clinical significance [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(20):3890-3893
- [6] 郭梦凡, 王抒, 孟庆媛. CA125 在子宫内膜癌的表达及临床意义[J]. Heilongjiang Medicine and Pharmacy Feb, 2008, 31 (1):38
- Guo Meng-fan, Wang Shu, Meng Qing Yuan. CA125 at endometrium cancer's expression and clinical significance[J]. Feb, 2008, 31 (1):38
- [7] 马艳春, 闰运芹. 血清 CA125 测定对卵巢癌的临床应用价值[J]. 济宁医学院学报, 2004, 27 (3):50
- Ma Yan-chun, Run YUN xin. Blood serum CA125 determination to ovarian cancer's clinical practice value [J]. Jining Medical school journal. 2004, 27 (3):50
- [8] H. Kobayashi, H. Ooi, Y. Yamada, Serum. CA125 level before the development of ovarian cancer [J]. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2007, 99(2):95-99
-
- (上接第 3526 页)
- [10] 杨晓华, 周莉. 手术室护士血源性感染的危险与预防[J]. 护士进修杂志, 2005, 20(7):652
- Yang Xiao-hua, Zhou Li. Risk and prevention of haematogenous infection of nurses in operating rooms [J]. Journal of Nurses Training, 2005, 20(7):652
- [11] 岳永波. 浅谈手术室护士的自身防护[J]. 黑龙江医药科学, 2000, 23 (2):62
- Yue Yong-bo. Self-protection of nurses in operating rooms [J]. Heilongjiang Medicine and Pharmacy, 2000, 23 (2):62
- [12] 郭阳. 急诊手术感染原因及护理对策[J]. 当代医学, 2010(12):123
- Guo Yang. Infection causes and nursing countermeasures of emergency operation. Contemporary Medicine, 2010(12):123
- [13] 江利秋. 急诊手术分析与护理对策[J]. 护士进修杂志, 1999(8):50
- Jiang Li-qiu. Healthy Guiding of Malnutrition and Diet with Peritoneal Dialysis[J]. Journal of Nurses Training, 1999(8):50
- [14] 刘秀娥, 赵立敏, 仇艳苗, 等. 急诊手术中存在的不安全因素分析及护理措施[J]. 中国误诊学杂志, 2010(5):84-85
- Liu Xiu-e, Zhao Li-min, Chou Yan-miao, et al. Unsafe factor analysis and nursing countermeasures in emergency operation [J]. Chinese Journal of Misdiagnostics, 2010(5):84-85
- [15] 胡晓华, 王淑芳. 控制医院感染护理人员是关键[J]. 吉林医学信息, 2006(Z2):35-36
- Hu Xiao-hua, Wang Shu-fang. Nursing staff: the key point of controlling hospital infection[J]. Jilin Medical Information, 2006(Z2):35-36
- [16] 刘壁华. 介入室护士职业危害来源分析与防护对策[J]. 当代护士, 2007, 7:84-85
- Liu Bi-hua. Resource analysis and preventing countermeasures of nurses' professional harm in intervention rooms [J]. Today Nurse, 2007, 7:84-85
- [17] 郭享邑, 郑小燕. 浅谈急诊手术的护理安全问题及防范对策[J]. 中国医药指南, 2010(11):127-128
- Guo Xiang-yi, Zheng Xiao-yan. Nursing safety problems and protective countermeasures of emergency operation [J]. Guide of China Medicine, 2010(11):127-128
- [18] 刘丽丽, 韩菊花, 陈锦梅. 加强手术病人安全防护措施的探讨[J]. 农垦医学, 2005(3):84-86
- Liu Li-li, Han Ju-hua, Chen Jin-hai. Exploration of countermeasures of strengthening operation patients' safety protection [J]. Agricultural Reclamation Medicine, 2005(3):84-86
- [19] 李兰玲. 新时期手术室护理风险的应对措施探讨 [J]. 护理实践与研究, 2006(6):83-85
- Li Lan-ling. Discussion settlement measures of nursing risks on operation room in new period [J]. Attend to Practice and Research, 2006 (6):83-85
- [20] 郭德芳. 从 SARS 在医院的聚集流行看标准预防现状[J]. 中华医院感染学杂志, 2003, 11(4):301
- Guo De-fang. Standardized prevention status quo through SARS assessment and popularization in hospitals [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2003, 11(4):301