维普资讯 http://www.cqvip.com

综 述 文章编号:0253-3626(2007)04-0442-03

P16 基因甲基化与早期肺癌诊断

张 诚 综述,吴庆琛,李 强 审校

(重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R734.204 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-17

肺癌是近年来发病率最高的恶性肿瘤,全世界每年肺癌新增病例约 120 万[1]。在我国肺癌是发病率最高的癌症,目前我国人群肺癌死亡率正以每年 4.5%的速度递增,其中农村上升速度达 10%。据世界银行估计,到 2030 年我国将有 170 万中年人死于肺癌。由于大多数肺癌临床发现已到中晚期,其中 50%的病人已失去了手术的机会[2]。因此,肺癌的早期发现,早期诊断,早期治疗显得尤为重要。但传统肺癌的确诊方法主要是影像学和痰液脱落细胞学检查,而作为早期发现和早期诊断作用非常有限,并不能帮助降低肺癌的死亡率。随着分子生物学技术的迅速发展,细胞增殖周期及其调控机制的研究也有了很大的进步。对肺癌特异性的分子标记物检查研究,使得肺癌的早期诊断有可能变为现实。近期研究表明,在肺癌患者中基因发生甲基化现象非常普遍,P16 基因就是易于发生甲基化的一个基因。P16 基因甲基化发生在肺癌形成的早期阶段[3-5],并且 P16 基因甲基化在肺癌和正常肺组织中有明显差异[6-8]。

1 P16 基因基本结构和功能

1.1 p16 基因基本结构

p16 基因是 1993 年由美国冷泉港实验室研究发现的新的抑癌基因,该基因在多种癌细胞中有缺陷,与癌的发生关系密切,因此又称为多种肿瘤抑制物 I (multiple tumor suppressor 1,MTS1)基因[9]。P16 基因是肺癌中最易发生甲基化的抑癌基因。P16 基因位于人类 9 号染色体短臂的 9p21 区,全长 8.5kb,由 2 个内含子和间隔的 3 个外显子构成,外显子 1(E1)包括 E1α(126bp)和 E1β(180bp);外显子 2(E2),307bp;外显子 3(E3),11bp[10]。p16 基因的启动子长约 75bp,位于转录启始位点上游 500 处;另外,启动子和 E1,E2 区含有多个可甲基化的 5′-CpG 岛。E1α 的 mRNA 可直接翻译成有活性的 p16;E1β 的 mRNA 在活体细胞中不能翻译。E1β 含有与 E1α 相同的外显子 2 和外显子 3,但外显子 1 不相同。E1β 外显子 1 位于 E1α 外显子 1 上游的 20kb,其结构特征如下[11]:①E1β 外显子 1 片段长为 269kb,具有高度的保守性。②1β 外显子 1 上游有一个 GT 富集区,为 GT 盒启动子单元。③在第 75 核苷酸 AUG 处有共同的 KOZAK 序列。④E1β 外显子 1 下游有一个长的微卫星(CA)n 重复序列。氨基酸序列分析表明成熟的 p16 分子量为 15.84ku 单链多肽,含有一个由 148 个氨基酸组成的开放阅读框架,具有 4 个 ankyrin 序列组成(回钩状重叠的空间构型的蛋白结构),这一构型为维持其活性所必须,参与蛋白与蛋白之间的作用[12]。

1.2 P16 基因的功能[13-16]

真核细胞的分裂通过 G1-S 转换开始 DNA 合成,通过 G2-M 转换开始有丝分裂。CDK4 在这些转换过程中起重要作用,可能通过调节诸种重要底物(如 Rb)的磷酸化促使 G1-S 和 G2-M 转换,导致细胞增殖。p16 蛋白作用于细胞周期的 G1-S 期的转移过程,其通过与 cyclinD(细胞周期素 D)竞争结合 CDK4,特异性抑制 CDK4 的活性,使之不能解除 Rb 基因对转录因子(TF)的抑制,从而阻止细胞从 G1 期进入 S 期,抑制细胞增殖,阻止细胞生长。Jin 等将野生型 p16 基因通过腺病毒载体导入无 p16 产物表达的肺癌细胞中,发现肿瘤细胞被阻滞在 G1 期,无法进入 S 期,肿瘤细胞在体内、外的生长受到抑制。他们也研究将 p16 基因导入无 p16 表达的肺癌细胞中,在离体或活体中不仅能阻止肿瘤细胞在 S 期,而且还能抑制肿瘤增殖。但当 cyclinD 同 CDK4 结合时,刺激细胞生长分裂。正常情况下二者保持平衡,使细胞的增长,分化协调进行。当 p16 由于其基因突变不能正常表达时,cyclinD 与 CDK4 的结合占优势,过度刺激细胞分裂从而使细胞失去控制,向癌变发展。此外,研究证实,p16 基因功能产物发挥的细胞生长抑制功能与其作为一种 CDK4 抑制及与野生型 Rb(pRb)之间的相互调节作用密切相关。

2 p16 基因甲基化与肺癌

2.1 p16 基因甲基化在不同类型肺癌中的表达异常

目前,有关 p16 基因异常与肺癌之间的关系主要集中在对各型肺癌之间及癌组织与正常组织之间。p16 基因甲基化在肺癌组织中的发生率为 24.5%~80%,而在非恶性病变组织中几乎没有发生。Kim 等[17]研究发现 p16 甲基化在鳞癌中的发生率(41%)比腺癌(22%)高;在 I 期腺癌中,p16 基因甲基

作者介绍:张 诚(1974-),男,硕士,
主要研究方向:肺癌分子生物学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

化是较其他因素(如 K-ras 突变)具有显著预测术后生存率的一个指标(P=0.03),在对 58 例 I 期肺癌五年生存追踪中,p16 基因甲基化和较差的预后有显著相关(P=0.04)。Yanagwa 等[18]对 NSCLC(非小细胞肺癌)癌组织和非肿瘤肺组织的多种肿瘤相关基因的启动子进行了研究,发现 p16 启动子甲基化在 NSCLC 癌组织中发生率为 31%,而非肿瘤组织中为 0,并且 p16 基因甲基化在鳞癌中的发生率较腺癌中常见(P<0.05).彭猛青[19]等检测 50 例肺癌组织和 54 例正常肺组织中 pl6 基因第 1 外显子 5′端启动子区域 CpG 岛甲基化及第 2 外显子缺失情况,其结果显示 pl6 基因在非小细胞肺癌组织中甲基化率为 32.0(16/50),缺失率为 28.0(14/50);54 例正常肺组织甲基化率为 3.7(2/54),缺失率为 0,二组比较,甲基化率(Fisher's exact=0.0001)及缺失率(Fisher's exact=0.0001)均有显著性差异。Belinsky 等[20]研究发现,在肺鳞癌的发生发展中,从细胞的过度增生、鳞状化生到原位癌的不同阶段抑癌基因 p16 甲基化的发生率分别达 17%、14%和 50%,p16 基因甲基化在肿瘤组织和癌前病灶均有发生,提示检测 p16 基因甲基化对肺癌早期诊断有较大意义。

2.2 p16 基因甲基化在肺癌脱落细胞中的表达异常

肺癌脱落细胞 p16 基因甲基化的检出率 21%~94%,在肺癌组织阳性患者中的检出率达 60%。肺癌脱落细胞主要来自痰液,且标本易获得。张文等[21]应用甲基化特异性 PCR(methylation-specific PCR,MSP)对 50 例周围型肺结节患者及 20 例正常人痰脱落细胞 p16 基因甲基化改变进行检查,其结果周围型肺癌痰脱细胞 p16MSP 阳性率(61.4%)明显高于良性周围型肺结节(16.7%)及正常人(15.0%),良性周围型肺结节 p16MSP 阳性率与正常人无显著差异(χ^2=0.136,P>0.05)。Palmisano 等[22]用 MSP 法对 21 例磷癌研究发现,10 例确诊为磷癌,其中 8 例肺癌组织和痰液均有 p16 基因甲基化,2 例无改变;另 11 例在临床诊断肺癌前 5~35 个月随访过程中,患者的痰脱落细胞中就可检测出 p16 基因异常甲基化;100%的肺鳞癌患者痰液可在临床诊断前 3 年内检测出 p16 基因的甲基化。Ahrendt 等[23]在研究肺癌脱落细胞的分子标记物时发现 NSCLCp16 基因甲基化发生率为 38%。Belinsky 等[24]运用敏感的 PCR 检测痰液发现 p16 基因甲基化在肺癌高危的吸烟者人群中发生率为 19%,且在肺癌人群发生率为 43%;并且他们的研究发现,p16 基因的 CpG 岛甲基化和早期 NSCLC 密切相关。因此,肺癌脱落细胞中 p16 基因甲基化状态的改变可作为临床最具前景的肺癌早期诊断的指标。

2.3 p16 基因甲基化在肺癌患者血液中的表达异常

对肺癌患者血液中 p16 基因甲基化研究较少,有研究结果示其发生率为 13%~77.8%。林勋等[25]应用甲基化特异性 PCR 检测 65 例 NSCLC 患者血清 p16 基因启动子区域甲基化情况,p16 基因甲基化检测率为 43.1%(28/65),而正常对照和良性肺部疾病组未检测出。姚群峰等[26]运用巢式甲基化特异性 PCR 方法,检测 53 例 NSCLC 患者血清 p16 基因甲基化和 CYFRA21-1 的情况,38 例 p16 基因出现异常甲基化,CYFRA21-1 阳性 34 例,这两项指标单独检测 NSCLC 的敏感性分别为 71.70%和 64.20%,特异性分别为 77.80%和 88.90%,而联合法检测敏感性为 89.80%。18 例肺部良性病变患者中未检测到 p16 基因的异常甲基化,具有较高的特异性。Liu 等[27]研究发现,p16 基因甲基化血液中发生率为 75.7%,肿瘤组织中为 80.2%,痰液中为 74.7%。他们最近研究提示凡在肺癌组织中 p16 基因甲基化阳性的病例,其血液和(或)痰液标本也阳性;而在肿瘤组织中 p16 基因甲基化阴性的病例,其血液和(或)痰液标本也阴性。将血液和痰液标本与痰细胞学检查相结合来判断,则 92.2%肿瘤中可发现他们的异常改变。

2.4 p16 基因甲基化的诊断方法

随着人们对 p16 基因甲基化在肺癌早期诊断中的作用不断深入的认识,其检测基因甲基化方法也得到不断改进。①目前甲基化特异性 PCR(Methylation Specific PCR,MSP)[28]及其改进方法[29-31],是检测 p16 基因甲基化的经典方法.该方法进行 PCR 扩增后,再利用琼脂糖凝胶电泳进行检测,但由于琼脂糖凝胶电泳检测的灵敏度有限,对于一些血浆中脱落肿瘤细胞少的患者,检测结果容易造成假阴性。其中巢式 MSP(Nested Methylation Specific PCR,nMSP)进一步提高了方法的特异性和灵敏度。MSP 法的原理是首先用亚硫酸氢钠修饰处理基因组 DNA,所有未发生甲基化的胞嘧啶都被转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则不变。然后设计针对甲基化和非甲基化序列的引物并进行聚合酶链反应(P-CR)扩增,最后通过凝胶电泳分析,确定与引物互补的 DNA 序列的甲基化状态。MSP 法灵敏度较高,应用范围广,特别是巢式 MSP(nMSP)法进一步提高了方法的特异性和灵敏度,更适于检测血清/血浆等标本中肿瘤细胞释放的微量 DNA 的异常甲基化。②微流控芯片[32]是目前分析化学研究的热点之一,利用该方法检测肺癌患者肿瘤及血浆中的 p16 基因异常甲基化的方法不但比传统的方法大大提高了灵敏度,并同时具有较高的特异性。其体积小、成本低、分析过程自动化、分析速度快、所需样品和试剂少等特点。③错配杂交化学发光[33]是检测 p16 基因启动子区过甲基化的定量分析方法。方法用亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA,所有未甲基化的胞嘧啶都被转变为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则不发生变化。设计合成 1 对不含 CpG 位点的引物,同时扩增甲基化或非甲基化目的 DNA 片段,用 2 条分别与甲基化及非甲基化 CpG 位点互补的寡核苷酸探针与扩增产物进行杂交及化学发光检测,通过探针杂交信号强度比确定样品 DNA 中甲基化的 p16 基因的比例。

2.5 结束语

目前大量实验证实,p16 基因的甲基化发生在肺癌形成的早期阶段。随着对 p16 基因甲基化深入认识,其在肺癌的早期发现,早期诊断,疗效观察及预后判断提供了非常有价值的信息。随着基因工程技术的飞速发展,使由于基因异常而导致的疾病的早期诊断及基因治疗成为可能。在临床上通

维普资讯 http://www.cqvip.com

过检测 p16 基因的失活，可提高诊断率，获得肿瘤恶性程度的信息，对估计预后有重要意义。但仍有许多问题尚需解决。如：p16 基因甲基化检测技术不成熟；p16 基因甲基化发生具体机制不清楚，它在肿瘤的发生、发展中起了什么作用？ 如何应用 p16 基因甲基化作为肿瘤患者的早期发现、早期诊断、早期治疗及预后判断的常规指标？ p16 基因甲基化如何协同其它肿瘤抑制基因；肿瘤细胞株与实体肿瘤之间基因异常的差异等问题仍有待进一步阐明。这些问题的圆满解决势必强有力地推动肺癌分子诊断有一个质的飞跃。

参 考 文 献

[1] Lung cancer and smoking-UK.Cancer Stats.Cancer Research UK, April 2004.

[2] Tyezynski JE, Bray F, Parkin DM.Lung Cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection[J].Lancet (Oncology), 2003;4(1):45-55.

[3] Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, et al.Aberrant methylation of p16(INK4a)is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis [J].Proc Natl Acad Sci usa, 1998;95(20):11891-11896.

[4] Niklinska W, Chyczeuski L, ET AL.Detecion of p16 abnormality in early stage non-small cell lung cancer[J].Folia Histoche mCy-tobiol, 2001;39 supp12:30-32.

[5] SuCQ, Shan xn, Correlation of inactivation of CDKN2/p16 gne by methylation dna lung cancers[J].Chin J Med Genet, 2000;17(1):36-38.

[6] Kasshiwabara K, Qyama T, Sano T, et al.Correlation between methylation status of the p16/CDKN2 gne and the expression of p16 and Rb proteins in primary non-small cell lung cancers[J].Int J cancer, 1998;79(3):215-220.

[7] Kurakawa E, Shimamoto T, Utsumi K, et al.Hypermethylation of p16(INK4b) genes in non-small cell cancer[J].Int J Oncol, 2001;19(2):277-281.

[8] Wu J, Liang B, He JL, ET AL.Study on detection of aberrant promoter hyper methylation of p16 and DAP kinase in serum DNA from patients with non-small cell lung cancer [J].Chin J Lung Cancer, 2002;5(3):188-190.

[9] Serrano M, Hannon GJ, Beach D.A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4[J]. Nature, 1993;366(6456):704-707.

[10] 付 国.P16 和 P15 基因缺失与白血病 [J]. 国外医学肿瘤学分册, 1997;24(1):52.

[11] Ssrrano M, Hanoon GJ, Beach D, et al.A new regulator motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4 [J].Nartur, 1993;366(6456):704-707.

[12] Nobori T, Miurak K, Wu DJ, et a1.Deletion of the cyclin dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancer [J]. Nature, 1994;368:753-756.

[13] Marx J.New tumor suppressor may rival p53[J].Science, 1994;264:344.

[14] Jin X, Ngugen D, Zhang WW, et al.Cell cycle arrest and inhibition of tumor cell proliferation by the p16INK4 gene mediated by an adenovirus vector[J].Cancer Res, 1995;55(15):3250-3253.

[15] David GW, Duan W, Emil A, et al.Homozygous deletions of the multiple tumor suppressor gene 1 in the progression of human astrocytomas[J]. Cancer Res, 1995;55(1):20-23.

[16] Lukas J, Aagaard L, Strauss M, et al.Oncogenic aberrations of p16INK4/CDKN2 and cyclinD1 cooperate to deregulate G1 control [J].Cancer Res, 1996;55:1355-1357.

[17] Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, et al.p16INK4a ang Histology-specific Methylation of CpG Islands by exposure to Tobacco Smoke in Non-small Cell Lung Cancer [J]. Cancer Res 2001;61(8):3419-3424.

[18] Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, ET AL.Promoter hypermet hylation of tumor suppressor and tumor related genes in non-small cell lung[J].cancer, 2003;94(7):589-592.

[19] 彭猛青，王 绪，刘德林，等.非小细胞肺癌 p16 基因甲基化及缺失的研究[J].中国肺癌杂志, 2002;5(4):250-253.

[20] Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, et al.Aberrant met hylation of p16 (IN K4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. Proc Natl Acad Sci USA, 1998;95(20):11891-11896.

[21] 张 文，孙玉鹗.检测痰脱细胞 p16 基因甲基化对周围型肺的诊断价值[J].中国肺癌杂志, 2004;7(1):46-49.

[22] Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, et al.Predicting Lung Cancer by Detecting Aberrant Promoter Methylation in Sputum [J].Cancer Res, 2000;60(21):5954-5958.

[23] Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, et al.Molecular Detection of tumor Cells in Bronchoalveolar Lavage Fluid From Patients With Early Stage Lung Cancer[J].J Nat Cancer Inst, 1999;91(4):332-339.

[24] Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, et al.Aberrant met hylation of p16 (IN K4a)is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis[J].Proc Natl Acad Sci USA, 1998;95(20):11891-11896.

[25] 林 勋，陈龙邦，唐永明，等.非小细胞肺癌患者血清 p16 基因启动子甲基化分析[J].医学研究生学报, 2005;18(4):352-354.

[26] 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].微循环学杂志, 2006;16(1):29-31.

[27] Liu Y, An Q, Li L, et al.Hypermethylation of p16INK4a in Chinese lung cancer patients:biological and clinical implication [J]. Carinogenesis, 2003;24(12): 1897-1901.

[28] Herman J G, Graft J R, Myohanen S, et a1.Methylation-specific PCR:a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J].Proc Natl Acad Sci USA, 1996;93:9821.

[29] Lo Y M, Wong I H, Zhang J et a1.Quantitative analysis of aberrant p1 6 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction [J].Cancer Res, 1999;59 (16):3899-3903.

(下转第 448 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

[9] Tamura M,Gu J,Tran H,et al. PTEN gene and inregrin sugnaling in cancer[J].J Natl Cancer lust,1999;91(21):1820-1828.

[10] Dickerson EB,Thomas R,Fosmire SP,et al.Mutations of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 in canine hemangiosarcoma[J].VetPathol,2005;42(5):618-632.

[11] Huang J,Kontos CD.PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects [J].J Biol Chem,2002;277(13):10760-10766.

[12] 尹卫宁,崔 洁,刘隆熙,等.PTEN 在脑胶质瘤表达的定性研究[J].青海医药卫生,2005;37(4):243-245.

[13] Depowski PL,Rosenthal SI,Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer[J].Mod Pathol,2001;14(7):672-676.

[14] 孔德玲,王桂芳.抑癌基因 PTEN 在宫颈癌中的表达及意义[J].现代中西医结合杂志,2005;14(17):2240-2241.

[15] 谢思明,沈丽佳,殷 操,等.PTEN 和 PHIT 在口腔鳞癌中的表达及意义[J].暨南大学学报,2005;26(2):237-241.

[16] 王 鲲,黄克强.口腔鳞癌抑癌基因 PTEN 蛋白的表达[J].武警医学,2005;16(10):736-738.

[17] 张茹慧,李春艳,余立江,等.抑癌基因 PTEN 在腮腺肿瘤中的突变与缺失[J].口腔医学研究,2005;21(1):41-44.

[18] Lee JI,Soria JC,Hassan KA,et al.Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer[J].Arch Otolaryngol Head Neck Surg JT-Archives of otolaryngology-head & neck surgery,2001;127(12):1441-1445.

[19] 吴先光,姚卓华,吴南娇.抑癌基因 PTEN 在鼻内翻性乳头状瘤中的表达及意义[J]. 现代医院,2005;5(8):13-14.

[20] 吴先光,何淑华,沈志忠.喉癌组织中抑癌基因 PTEN 的表达及意义[J].中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2005;13(4):186-188.

[21] Tian SZ,Jiang XQ,Chi HC,et al.Expression of p73 and PTEN in laryngeal squamous cell carcinoma and their clinical significance [J].Ai Zheng,2004;23(1):90-94.

[22] Xu X,Yang H,Huo X.Expression and significance of PTEN in nasopharyngeal carcinoma[J].Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi,2004;18(11):658-659.

[23] Detection of new PTEN/MMAC1 mutations in head and neck squamous cell carcinomas with loss of chromosome[J].10Cancer Genet Cytogenet,2002;132(1):20-24.

[24] Maria LS,Ramon P.PTEN:From pathology to biology[J].J Trende in Cell,2003;13:478-483.

(上接第 441 页)

[11] Arimoto-Ishida E,Ohmichi M,Mabuchi S,et al. Inhibition of phosphorylation of a forkhead transcription factor sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin [J]. Endocrinology,2004;145(4):2014-2022.

[12] Furukawa-Hibi Y,Kobayashi Y,Chen C,et al.FOXO transcription factors in cell-cycle regulation and the response to oxidative stress[J]. Antioxid Redox Signal,2005;7(5-6):752-760.

[13] Zhou Y,Kato H,Asanoma K,et al. Identification of FOXC1 as a TGF-beta1 responsive gene and its involvement in negative regulation of cell growth[J].Genomics,2002;80(5):465-472.

(上接第 444 页)

[30] Palmisano W A,Divine K K,Saccomanno G et a1.Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum [J]. Cancer Res,2000;60(21):5954-5958.

[31] An Q,Liu Y,Gao Y,et a1.Detection of p16 hypermethylation in circulating plasma DNA of non-small cell lung cancer patients [J].Cancer Lett,2002;188(1-2):109-114.

[32] Kersting M,Friedl C,Kraus A,et a1.Diferential frequencies of p16INK4a promoter hyper methylation,p53 mutation,and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers[J].Clinical Oncology J,2000;18(18):3221-3229.

[33] 姚群峰,宁 勇,张利平,等. 错配杂交化学发光法定量检测 p16 基因过甲基化[J]. 中华检验医学杂志,2005;28(10):1057-1059.