



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.03.025
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.03.025
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(3):435-439.

· 简要论著 ·

p15、syk 基因启动子甲基化与直肠癌关系及预后的研究

彭星宇¹, 陈伟², 周凯³, 符建平¹, 傅平³, 杨修伟¹, 曾庆黎¹

(江西省人民医院 1. 普通外科 3. 干部外科, 江西 南昌 330006; 2. 中山大学附属第六医院 胃肠外科, 广东 广州 510655)

摘要

目的: 探讨直肠癌组织中 p15、syk 基因启动子甲基化状态与临床病理及预后之间的关系。

方法: 采用甲基化特异性聚合酶链式反应 (MSP) 联合检测直肠癌组织及相应癌旁正常组织中 p15 及 syk 基因启动子甲基化状态, 并分析两者间的关系、及其与临床病理资料之间和预后的关系。

结果: 在 55 例直肠癌组织中, p15、syk 基因启动子甲基化发生率分别为 56.4% (31/55)、36.4% (20/55), 对应癌旁正常组织中发生率分别为 16.4% (9/55)、0% (0/55), 两者间均有统计学差异 ($\chi^2=19.01$, $P<0.05$; $\chi^2=24.44$, $P<0.05$); 在癌组织中检测到 p15 启动子甲基化的 31 例中 10 例术后癌复发转移, 发生率为 32.2% (10/31), 在癌组织中检测到 syk 基因甲基化的 20 例中 7 例术后发生复发转移, 发生率为 35.0% (7/20)。p15 基因启动子甲基化状态与直肠癌分化程度有关 ($P<0.05$); syk 基因启动子甲基化状态与区域淋巴结转移及 TNM 分期有关 ($P<0.05$)。p15 基因启动子甲基化的 31 例中, syk 基因启动子甲基化 17 例, p15 与 syk 之间的甲基化状态有关 ($\chi^2=10.48$, $P<0.05$)。

结论: 直肠癌组织中 p15、syk 基因启动子高度甲基化, 且两者具有协同性; p15、syk 基因启动子高度甲基化与直肠癌的发生及术后复发转移密切相关, 联合检测两者表达及基因启动子甲基化状态或有助于直肠癌的早期诊断及预后评估。

关键词

直肠肿瘤 / 病理学; p15; syk; 甲基化

中图分类号: R735.7

直肠癌是世界范围内最常见的消化道肿瘤之一, 中国是直肠癌的高发区, 其病死率已跃居恶性肿瘤第2位^[1]。目前, 直肠癌的确切发病机制尚不十分清楚, 但随着分子生物学的发展, 其致癌模式已逐渐形成共识: 多个癌基因激活及抑癌基因的失活; 最近研究分析了基因启动子的 CpG 岛甲基化, 证实甲基化是抑癌基因失活的另一种机制, 且在某些情况下是抑癌基因失活的唯一机制^[2-3]。本研究采用甲基化特异性聚合酶链式反应 (MSP) 检测直肠癌中 p15、syk 基因启动子甲基化情况, 探讨其与直肠癌发生及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 标本与临床资料 收集江西省人民医院 2011 年 9 月—2012 年 12 月手术切除的 55 例直肠癌组织及匹配癌旁正常组织 (距肿瘤 5 cm 以上), 两者术后均经病理检查确认。其中男 31 例, 女 24 例, 男女比例为 1.29:1; 年龄 24~88 岁, 其中 <60 岁者 19 例, ≥60 岁者 36 例; 分化程度: 高分化 17 例, 中分化 26 例, 低分化 12 例; 组织分型: I 型 4 例 (鳞癌), II 型 45 例 (腺癌), III 型 6 例 (其它); 采用国际抗癌联盟 (UICC 2009) 病理 TNM 分期: I 期 19 例, II 期 23 例, III 期 8 例, IV 期 5 例。55 例患者术前均未接受放化疗及免疫治疗, 排除直肠癌以外其余恶性肿瘤; 其中 47 例为根治性手术 (切除范围包括所在肠袢及其系膜和区域淋巴结、已侵犯邻近器官的全部或部分), 8 例为姑息性手术 (仅切除癌肿及足够的两端肠段;

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260368); 江西省科学技术厅科技计划资助项目 (2010BSA14200)。

收稿日期: 2013-09-26; **修订日期:** 2014-10-09。

作者简介: 彭星宇, 江西省人民医院硕士研究生, 主要从事结肠直肠肿瘤方面的研究。

通信作者: 曾庆黎, Email: qlzkz@163.com

IV期5例不可根治,余3例为急诊或高龄梗阻患者,肿瘤已转移至系膜根部主要血管淋巴结且局部解剖层次不清,手术风险极大,故缩小手术范围);术后辅以FOLFOX6方案(奥沙利铂、5-FU、亚叶酸钙)化疗。所有标本取下后立即置于液氮中,后转移至-80℃冰箱保存。

1.1.2 主要试剂 基因组DNA提取试剂盒、DNA Marker及引物均购自大连Takara公司; wizard DNA纯化试剂盒购自Promega公司; Instant PCR Kit 2.0购自北京天恩泽基因科技有限公司。氢醌与亚硫酸氢钠购自Sigma公司。琼脂糖凝胶粉、溴化乙锭(EB)购自南昌赛尔科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 直肠癌组织及癌旁组织总DNA的提取和亚硫酸氢盐的修饰 取100 mg标本在未解冻的情况下尽量切碎,然后严格按照试剂盒操作说明提取基因组DNA,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,紫外分光光度计鉴定后暂存在-20℃冰箱中;参照以往操作流程进行基因组DNA亚硫酸氢盐修饰和纯化^[4]。

1.2.2 巢氏MSP法检测p15、syk甲基化情况
p15外侧引物:正义引物:5'-CGC GCA CCC TGC GGC C-3',反义引物:5'-CCG TGA GCG GGC CGG-3',反应体系为30 μL,包括修饰DNA 2 μL,PCR Magic Mix 2.0 15 μL,p15正反引物各1.0 μL,加水至30 μL。反应条件为:94℃预变性5 min,主循环94℃30 s,57℃30 s,72℃1 min,总共40个循环,末次循环72℃延伸10 min,产物保存于4℃冰箱内。

p15甲基化特异性引物:正义引物:5'-GCG TTC GTA TTT TGC GGT T-3',反义引物:5'-CAA TAA CCG AAC GAC CGA-3'。p15非甲基化特异性引物:正义引物:5'-TGT GAT GTG TTG GT T-3',反义引物:5'-CCA TAC AAT AAC CAA AC-3'。第2轮巢氏MSP分别使用甲基化和非甲基化引物进行扩增,除加入引物、第1轮PCR产物不同外,反应体系其他部分与第1轮相同。反应条件:甲基化引物退火温度为65℃,非甲基化引物退火温度为60℃,其余与第1轮相同。MSP扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,凝胶成像系统显像并拍照观察结果。

syk基因MSP的具体实验方法(包括反应体系、条件及所用引物)详见以往报道^[4]。

1.3 随访

术后患者门诊随访9~12个月,每3个月随访

1次,抽血查肿瘤全套(CEA、CA19-9、CA50等),并常规直肠指检。如有异常发现,则行全腹部CT或(和)电子结肠镜检查,明确肿瘤有无局部复发或远处种植转移。

1.4 统计学处理

所得数据应用SPSS 13.0统计软件进行处理分析。p15、syk基因的异常甲基化频率及其与直肠癌临床病理特征的分析数据比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNA提取质量

55例直肠癌标本基因组DNA提取液在1.5%琼脂糖凝胶(含EB 0.5 mg/mL)上电泳,凝胶成像系统观察,结果显像不同标本提取的DNA片段大小一致,为相同位置的单一条带(图1),提示提取的基因组DNA质量符合要求。用紫外分光光度计测试提取液260 nm与280 nm处吸光度,计算提取液 OD_{260}/OD_{280} 值,为1.7~1.9,符合试剂盒相关标准。

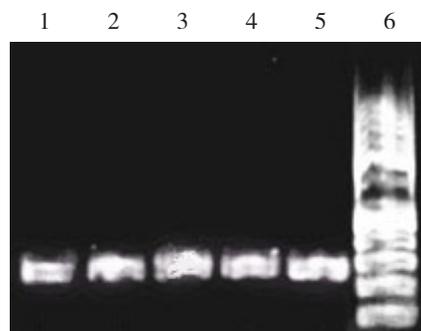


图1 DNA提取液电泳图 1-5:直肠癌组织标本,电泳显示提取的DNA片段大小一致,为相同位置的单一条带;6:分子量标记

2.2 p15、syk基因MSP扩增结果

应用MSP法分别对直肠癌组织及匹配癌周正常组织的基因组DNA进行p15、syk基因的甲基化和非甲基化检测,MSP扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳,凝胶成像系统观察结果(图2-3)。

2.3 p15、syk基因启动子甲基化及与直肠癌病理特征之间的关系

在55例直肠癌组织中,p15、syk基因启动子甲基化发生率分别为56.4%(31/55)、36.4%(20/55),对应癌旁正常组织中发生率分别为

16.4% (9/55)、0% (0/55), 两者间差异有统计学意义 ($\chi^2=19.01, P<0.05$; $\chi^2=24.44, P<0.05$)。结合随访调查, 在癌组织中检测到p15启动子甲基化的31例中10例术后癌复发转移(其中单纯性复发6例, 单纯性转移3例, 复发并转移1例), 发生率为32.2% (10/31); 而在癌组织中检测到syk基因甲基化的20例中7例术后发生复发转移(其中单纯性复发3例, 单纯性转移2例, 复发并转移2例), 发生率为35% (7/20)。p15基因启动子甲基化状态与直肠癌分化程度有关 ($P<0.05$), 与患者年龄、性别、组织分型、区域淋巴结转移及TNM分期无关 ($P>0.05$) (表1); syk基因启动子甲基化状态与区域淋巴结转移及TNM分期有关 ($P<0.05$), 与患者年龄、性别、分化程度、组织分型无关 ($P>0.05$) (表2)。在p15基因启动子甲基化的31例中, syk基因启动子甲基化17例; 在p15基因启动子非甲基化的24例中, syk基因启动子甲基化仅3例, p15与syk基因的甲基化状态具有相关性 ($\chi^2=10.48, P<0.05$)。

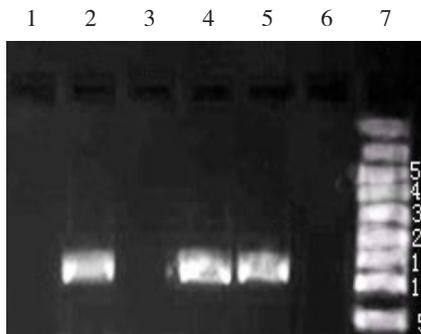


图2 p15 扩增产物电泳图 1, 3, 6: 水的阴性对照性对照; 4-5: 肿瘤组织甲基化扩增产物 148 bp; 2: 癌旁组织非甲基化扩增产物 154 bp; 7: 分子量标记

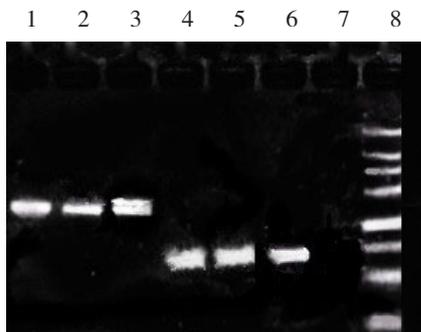


图3 syk 扩增产物电泳图 1-3: 肿瘤组织甲基化扩增产物 243 bp; 4-6: 癌旁组织非甲基化扩增产物 140 bp; 7: 水的阴性对照; 8: 分子量标记

表1 p15 基因启动子甲基化状态与直肠癌临床病理特征之间的关系 [n (%)]

变量	n	p15 甲基化状态		P
		M	U	
性别				
男	31	18 (32.7)	13 (23.6)	0.773
女	24	13 (23.6)	11 (20.0)	
年龄 (岁)				
< 60	19	10 (18.9)	9 (16.4)	0.685
≥ 60	36	21 (38.2)	15 (27.3)	
分化程度				
高	17	6 (10.9)	11 (20.0)	0.036
中	26	15 (27.3)	11 (20.0)	
低	12	10 (18.2)	2 (3.6)	
组织分型				
I	4	3 (5.5)	1 (1.8)	0.609
II	45	24 (43.6)	21 (38.2)	
III	6	4 (7.3)	2 (3.6)	
区域淋巴结转移				
有	12	7 (12.7)	5 (9.1)	0.876
无	43	24 (43.6)	19 (34.5)	
TNM 分期				
I	19	7 (12.7)	12 (21.8)	0.193
II	23	16 (29.1)	7 (12.7)	
III	8	5 (9.1)	3 (5.5)	
IV	5	3 (5.5)	2 (3.6)	

注: M 代表甲基化, U 代表非甲基化

表2 syk 基因启动子甲基化状态与直肠癌临床病理特征之间的关系 [n (%)]

变量	n	syk 甲基化状态		P
		M	U	
性别				
男	31	9 (16.4)	22 (40.0)	0.199
女	24	11 (20.0)	13 (23.4)	
年龄 (岁)				
< 60	19	10 (18.2)	9 (16.4)	0.068
≥ 60	36	10 (18.2)	26 (47.3)	
分化程度				
高	17	7 (12.7)	10 (18.2)	0.716
中	26	8 (14.5)	18 (32.7)	
低	12	5 (9.1)	7 (12.7)	
组织分型				
I	4	1 (1.8)	3 (5.5)	0.867
II	45	17 (30.9)	28 (50.9)	
III	6	2 (3.6)	4 (7.3)	
区域淋巴结转移				
有	12	9 (16.4)	3 (5.5)	0.002
无	43	11 (20.0)	32 (58.2)	
TNM 分期				
I	19	5 (9.1)	14 (25.5)	0.000
II	23	4 (7.3)	19 (34.5)	
III	8	6 (10.9)	2 (3.6)	
IV	5	5 (9.1)	0 (0.0)	

注: M 代表甲基化, U 代表非甲基化

3 讨论

p15基因最初是beach研究小组克隆的一个p16同类物,定位于9号染色短臂(9p21),含2个外显子(E_1 与 E_2)^[5],通过抑制细胞周期素依赖激酶4/6(CDK4/6)的活性,阻止细胞由G₁期进入S期,从而对细胞的异常增生和变异起负调控作用,限制肿瘤的发生及发展^[6]。p15基因启动子甲基化在白血病、膀胱移行上皮细胞癌及胶质母细胞瘤等^[7-9]多种肿瘤组织中均有报道。吕亚莉等^[10]运用MSP法分析了p15基因第一外显子转录起始位点前后的一段区域(包含启动子区CpG岛),检测并确定了p15基因甲基化状态。席亚鸣等^[11]采用相同方法研究显示结直肠癌患者术前血清及术中癌组织p15呈高甲基化状态,而癌旁组织明显低于癌组织;经手术治疗1周后,患者血清p15甲基化发生率明显低于术前。Xu等^[12]研究发现,p15的转录是由TGF- β 诱导的,68%的结直肠癌患者存在p15基因启动子区甲基化。杨彦林等^[13]采用免疫组化SP法研究发现p15在结肠癌组织中的表达明显低于正常组织,并且其表达与肿瘤的分化程度、Dukes分期及有无淋巴结转移密切相关。

syk基因被命名为脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase),定位于人类染色体9q22区,最初由Taniguchi等^[14]从猪脾cDNA中克隆出来,其作为一种非受体型酪氨酸激酶广泛表达于造血细胞、淋巴细胞及血管内皮细胞上。研究^[15-16]表明syk对T、B淋巴细胞的活性具有调节作用,前者表达缺失可能引起后者活化障碍,使机体对异化细胞的识别、杀灭能力降低,从而导致肿瘤的发生和转移。杨祖立等^[17]运用MSP及逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术分析表明syk基因过甲基化失表达参与了结直肠癌的发生,导致结直肠癌侵袭性增强,患者术后复发转移率增高;并通过荧光素酶载体构建进一步证实CpG岛甲基化直接抑制了syk启动子的活性,致使syk基因表达缺失,且蛋白印迹结果提示应用DNA甲基化转移酶I的抑制剂5-Aza-CdR可以使因甲基化syk失活的结直肠癌细胞重新表达syk^[18]。基因启动子区域的异常甲基化与syk基因表达沉默在肝细胞癌中亦有报道^[19]。问明等^[20]通过免疫组化SP法研究总结syk表达缺失的直肠癌细胞比syk阳性表达的直肠癌细胞具有更高的侵袭和转移能力。

本研究显示,55例直肠癌组织中p15为56.4%

(31/55),对应癌旁正常组织中发生率分别为16.4%(9/55)($\chi^2=19.01, P<0.05$),与席亚鸣等^[11]及Xu等^[12]研究数据差别不大,说明p15甲基化所致基因表达缺失可能与直肠癌发生有关;而p15基因启动子高甲基化低表达与直肠癌分化程度有关($P<0.05$),与患者年龄、性别、组织分型、区域淋巴结转移及TNM分期无明显相关($P>0.05$),这与梁晶等^[21]研究结果基本相符合,但与杨彦林等^[13]研究其表达与有无淋巴结转移密切相关未能一致,这可能和实验方法、样本资料或肿瘤部位的差别有关,尚需多中心研究证实。55例直肠癌组织中,syk基因启动子甲基化发生率为36.4%(20/55),对应癌旁正常组织中发生率分别0%(0/55),两者差异明显($\chi^2=24.44, P<0.05$);syk基因启动子高甲基化低表达与区域癌淋巴结转移及TNM分期有关($P<0.05$),但与患者年龄、性别、分化程度、组织分型无明显相关($P>0.05$),这与大量报道^[17,20,22-23]结论相一致,syk基因启动子甲基化导致直肠癌细胞的侵袭和转移能力增强,从而增加了直肠癌淋巴结转移的可能性,使肿瘤进展更快。在p15基因启动子甲基化的31例中,syk基因启动子甲基化17例,p15与syk基因的甲基化状态具有相关性($\chi^2=10.48, P<0.05$),说明两者启动子甲基化可能具有相互协同或(和)彼此影响的作用,共同促进直肠癌的发生与发展。

本研究受限于随访时间较短,仅检测术后早期是否有复发转移,未能涉及p15、syk基因启动子甲基化状态与患者长期生存率的关系;且实验病例不多,局限于随访条件,患者术后血清中p15、syk甲基化状态无法检测,因此,尚需长时间大样本量进一步调研。

综上所述,p15和syk可能相互协同,共同影响直肠癌的发生、发展及转移,联合检测两者表达及基因启动子甲基化状态或有助于直肠癌的早期诊断及预后评估。

参考文献

- [1] 刘启志,傅传刚. K-ras基因与结直肠癌靶向治疗的研究现状[J]. 结直肠肛门外科, 2012, 18(1):63-66.
- [2] Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age[J]. Nat Genet, 1999, 21(2):163-167.
- [3] Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis:

- epigenetics joins genetics[J]. Trends Genet, 2000, 16 (4):168-174.
- [4] 曾庆黎,周凯,陈伟,等. 结肠癌术后复发转移与抑癌基因启动子甲基化关系的研究[J]. 江西医药, 2010, 45(8):766-769.
- [5] 周涛,范洪涛,郭秀枝. p15基因甲基化与肿瘤的关系[J]. 武警医学院学报, 2005, 14(2):142-144.
- [6] 彭星宇,曾庆黎. 抑癌基因CpG岛甲基化与结直肠癌关系的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(10):1279-1282.
- [7] 林福安,叶宝国,沈建箴,等. 半巢式甲基化特异性PCR在急性淋巴细胞白血病患者p15基因甲基化检测中的应用[J]. 白血病·淋巴瘤, 2012, 21(4):208-212.
- [8] 管同郁,曹敬毅,梁杰,等. 膀胱移行上皮细胞癌p15基因启动子区甲基化检测及其临床意义[J]. 肿瘤基础与临床, 2009, 22(3):192-194.
- [9] Wemmert S, Bettscheider M, Alt S, et al. p15 promoter methylation-a novel prognostic marker in glioblastoma patients[J]. Int J Oncol, 2009, 34(6):1743-1748.
- [10] 吕亚莉,赵坡,李晓明,等. DNA硫化修饰聚合酶链反应检测石蜡包埋的结直肠癌p15基因甲基化改变[J]. 中华病理学杂志, 2003, 32(1):72-73.
- [11] 席亚鸣,谢庆芳,孙蓓. 抑癌基因甲基化检测结直肠癌患者的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(3):269-270.
- [12] Xu XL, bYu J, Zhang HY, et al. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis[J]. World Gastroenterol, 2004, 10(23):3441-3454.
- [13] 杨彦林,张占学,宋伟庆,等. 结肠癌组织中p15、MMP-2、MMP-9的表达及意义[J]. 山东医药, 2008, 48(3):5-6.
- [14] Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, et al. Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis[J]. J Biol Chem, 1991, 266(24):15790-15796.
- [15] Goodman PA, Wood CM, Vassilev A, et al. Spleen tyrosine kinase (Syk) deficiency in childhood pro-B cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Oncogene, 2001, 20(30):3969-3978.
- [16] Mahabeleshwar GH, Kundu GC. Syk, a protein-tyrosine kinase, suppresses the cell motility and nuclear factor kappa B-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator by inhibiting the phosphatidylinositol 3'-kinase activity in breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(8):6209-6221.
- [17] 杨祖立,王磊,康亮,等. 脾酪氨酸激酶基因甲基化与结直肠癌临床病理特征之间的关系[J]. 中华胃肠外科杂志, 2008, 11(5):458-461.
- [18] 杨祖立,康亮,黄美近,等. 结直肠癌细胞中脾酪氨酸激酶基因甲基化状态和表达的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(9):1720-1725.
- [19] Cheng Y, Zhang C, Zhao J, et al. Correlation of CpG island methylator phenotype with poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Exp Mol Pathol, 2010, 88(1):112-117.
- [20] 问明,马振峰,崔乃鹏,等. Syk在直肠癌中表达情况的研究[J]. 医学研究与教育, 2009, 26(4):14-16.
- [21] 梁晶,原晓勇. p15在大肠组织中的表达及其意义[J]. 基层医学论坛, 2013, 17(10):1225-1227.
- [22] 于庆功,常慧丽,李明强,等. Syk基因转染对人结肠癌细胞系影响的实验研究[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(11):1727-1729.
- [23] 董华承,范丽昕,朴正爱,等. PTEN、nm23-H1和syk在大肠癌中的表达及意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18(5):403-407.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 彭星宇,陈伟,周凯,等. p15、syk基因启动子甲基化与直肠癌关系及预后的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(3):435-439. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.03.025

Cite this article as: PENG XY, CHEN W, ZHOU K, et al. The study of the relationship between the promoter methylation of the p15, syk gene and the prognosis of rectal cancer patients[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(3):435-439. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.03.025