

· 论 著 ·

p16INK4A 表达水平差异与子宫内膜病变发生及发展的关系*

李 敏, 张覓宇, 刘 建

(重庆医科大学附属第二医院妇产科 400010)

摘要:目的 研究抑癌基因 p16INK4A 在不同程度子宫内膜病变中的表达水平变化, 分析这种差异表达与甲基化及病变程度的关系。方法 逆转录-聚合酶链法(RT-PCR)检测正常子宫内膜组织、子宫内膜复杂性增生、子宫内膜不典型增生、子宫内膜癌中 p16INK4A 基因的表达水平, 每组均检测 30 例标本。蛋白免疫印迹法分析各组 p16INK4A 蛋白水平的表达。甲基化特异性的 PCR 技术(MSP)对 p16INK4A DNA 进行甲基化分析。结果 随着子宫内膜病变程度的加重, p16INK4A 的表达量逐渐降低, 子宫内膜癌与其他病变比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 不典型增生与其他病变比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); 子宫内膜复杂性增生与正常子宫内膜比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。蛋白的表达检测也得到相同的结果。MSP 进一步分析各组织中 p16INK4A 的甲基化状态, 发现在子宫内膜癌组织中有 19 例存在不同程度的 p16INK4A 的甲基化, 子宫内膜不典型增生组织中有 11 例甲基化, 子宫内膜复杂性增生组织中有 1 例甲基化, 这些甲基化的组织同时伴有 p16INK4A 蛋白的表达异常。甲基化与子宫内膜癌手术-病理分期有关($P < 0.05$)。正常子宫内膜组织中未发现 p16INK4A 甲基化。结论 p16INK4A 作为一种抑癌基因, 它的表达缺失或下降在子宫内膜病变的发生及发展过程中起重要作用, 表达越低, 内膜的病变程度越重, 基因甲基化可能是导致这种异常表达的主要原因。

关键词: 子宫内膜肿瘤; p16INK4A; 甲基化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.18.005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)18-2071-03

Disfigurement of p16INK4A gene expression in the development of endometrial diseases*

Li Min, Zhang Chanyu, Liu Jian

(Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To evaluate the different expression of p16INK4A gene in endometrial diseases and analyze the relation between this alteration and the promoter methylation of p16INK4A DNA. **Methods** Choose the tissues including normal endometrium, complex hyperplasia, atypical hyperplasia, endometrial carcinoma, every group including 30 specimens. The level of p16INK4A mRNA was detected with reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). Protein was tested by Western Blot. Methylation specific PCR(MSP) was used to check whether it was methylated in the promoter of p16INK4A exon. **Results** The expression of p16INK4A mRNA decreased step by step accompanied with the diseases development. In endometrial carcinoma, the expression of p16INK4A mRNA decreased significantly or absolutely defaulted when compared with the other tissues($P < 0.05$). Atypical hyperplasia tissues also significant when compared with the other two groups($P < 0.05$). 19 endometrial carcinoma specimens were found methylated in their first exon and the rate was 63.33%, What's more, methylation was related with the surgical-pathological stage of the patients. **Conclusion** That disfigurement of p16INK4A gene expression plays an important role in the development of endometrial carcinoma, and this alteration is partially caused by methylation of p16INK4A first exon.

Key words: endometrial neoplasms; p16INK4A; methylation

子宫内膜病变是女性生殖器中常见的病变之一, 尤其是子宫内膜癌的发病率在世界范围内逐渐增高并有年轻化的趋势^[1]。p16INK4A 基因能直接作用于细胞周期, 抑制细胞分裂, 它的表达缺陷导致细胞增殖失控, 肿瘤形成, 且随着病变程度的加重, p16INK4A 的表达也有可能发生进一步的变化^[2]。p16INK4A 表达在子宫内膜癌中的研究已经较多, 但在子宫内膜病变循序渐近发展过程中的趋势目前尚未见报道。本文检测了不同程度子宫内膜病变组织中的 p16INK4A 的表达水平, 同时还分析了甲基化与基因表达水平变化的关系, 旨在揭示 p16INK4A 基因表达水平变化在子宫内膜病变发生、发展过程中的作用及其发生机制。

1 材料与方法

1.1 材料及来源 收集重庆医科大学附属第二医院妇产科 2008 年 10 月至 2011 年 10 月的手术标本、诊断性刮宫标本及患者的临床病理资料, 包括正常子宫内膜组织、子宫内膜复杂性增生、子宫内膜不典型增生、子宫内膜癌各 30 例组织标本。子宫内膜癌患者的手术-病理分期以手术后标本病理检查结果结合国际妇产科联盟(FIGO)2000 年提出的标准进行分期。RNA 提取试剂 Trizol 为美国 GIBCO 公司产品; 逆转录 AMV 酶、聚合酶链反应 Taq 酶为日本 Takara 公司产品; 亚硫酸氢钠甲基化修饰试剂盒为 Chemicon 公司产品, 兔抗人 p16INK4A 蛋白抗体、 β -actin 抗体为美国 Santa Cruz 公司产品, 辣根酶标

* 基金项目: 重庆市卫生局基金资助项目(2009-2-162)。 作者简介: 李敏(1978~), 主治医师, 主要从事临床妇科肿瘤的研究。

记的羊抗兔抗体来自 Pierce 公司。p16INK4A 基因的逆转录-聚合酶链法(RT-PCR)及甲基化检测引物序列由上海博亚生物技术有限公司合成,序列设计参考文献[3]。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 技术检测各组织中 p16INK4A mRNA 表达

采用 Trizol 一步法试剂分别提取各组织标本中的 RNA,用紫外线分光光度仪检测其 RNA 的浓度、纯度符合要求后,先进行逆转录,再应用 RT-PCR 技术扩增 p16INK4A mRNA 部分片段。其引物序列为:上游 5'-AGC CTT CGG CTG ACT GGC TGG-3',下游 5'-CTG CCC ATC ATC ATG ACC TGG A-3',扩增产物长度为 139 bp;内参照 β-肌动蛋白(β-actin)序列为:上游 5'-AAG AGA GGC ATC CTC ACC CT-3',下游 5'-GGA AGG AAG GCT GGA AG-3',扩增产物长度 619 bp。循环条件为:94 ℃ 4 min 45 s,然后 94 ℃ 45 s,60 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,循环 28 次,最后 72 ℃ 延伸 5 min。取反应产物 1.5%琼脂糖凝胶电泳,照相并用 Gelworks 1D interdiatate 软件分析,以 p16INK4A 条带与同管 β-actin 条带的吸光度值的比值表示 p16INK4A mRNA 的相对表达水平。

1.2.2 蛋白免疫印迹法检测 p16INK4A 蛋白的表达水平

取 100 mg 组织,机械分散后,三去污裂解液提取蛋白后,用 Bradford 法测定总蛋白含量,将所有蛋白样品调至等浓度。采用 15%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,直至溴酚蓝条带距胶下缘约 1 cm 时结束电泳,切下目的蛋白所在部分,电转 2 h,洗膜后进行一抗孵育,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 进行二抗孵育,最后电化学发光显色,照相,对结果进行灰度扫描分析,半定量分析结果。

1.2.3 甲基化特异性聚合酶链反应检测各组织的 DNA 甲基化状态

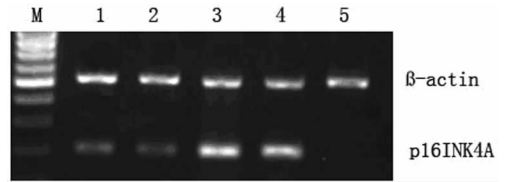
用 DNA 提取试剂盒提取各组 DNA,分别取 1 μg DNA 用亚硫酸氢钠修饰试剂盒进行修饰,按照说明书进行操作。p16INK4A 基因的 DNA 甲基化引物,上游 5'-TTT TTG CGT TTG TTG GAG AAT CGG GTT TTC-3',下游 5'-ATA CAC CGC AAA CCG CCG ACG AAC AAA ACG-3',扩增长度为 151 bp;非甲基化引物,上游 5'-TTT TTG TGT TTG TTG GAG AAT TGG GTT TTT-3',下游 5'-ATA CAC CAC AAA CCA CCA ACA AAC AAA ACA-3',扩增长度也为 151 bp。反应条件均为:94 ℃ 4 min 45 s,然后 94 ℃ 45 s,62 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,循环 35 次,最后 72 ℃ 延伸 5 min。产物 1.5%琼脂糖凝胶电泳,照相。根据扩增产物判断 DNA 是否甲基化,只有甲基化引物扩增出产物者为完全甲基化,甲基化引物和非甲基化引物均扩增出产物者为部分甲基化,只有非甲基化引物扩增出产物者为非甲基化。以上实验均重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行分析,mRNA 表达、蛋白表达采用 t 检验,甲基化结果采用 χ² 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

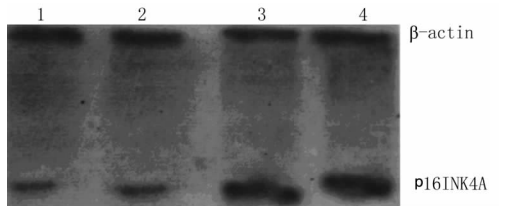
2.1 p16INK4A mRNA 和蛋白在不同程度子宫内膜病变中表达的结果 p16INK4A mRNA 和蛋白在各组组织中表达情况不同,但二者的表达趋势呈相同变化。与正常组织比较,子宫内膜复杂性增生组织中仅 3 例表达下降,而子宫内膜不典型增生中有 4 例表达缺失,10 例表达下降,在子宫内膜癌中有 8 例表达完全缺失,15 例表达下降。随着病变程度的加重,

p16INK4A mRNA 和蛋白表达均呈下降趋势,正常子宫内膜、子宫内膜复杂性增生、子宫内膜不典型增生、子宫内膜癌的 p16INK4A mRNA 表达分别为(1.31±0.04)、(1.26±0.05)、(0.64±0.04)、(0.29±0.06),p16INK4A 蛋白表达分别为(1.28±0.03)、(1.40±0.05)、(0.59±0.04)、(0.31±0.05),子宫内膜癌与其他病变比较,差异有统计学意义(P<0.05);不典型增生与正常子宫内膜组织和复杂性增生比较差异也有统计学意义(P<0.05);子宫内膜复杂性增生与正常子宫内膜比较差异无统计学意义(表 1,图 1、2)。



M:Marker;1:子宫内膜癌;2:子宫内膜不典型增生;3:子宫内膜复杂性增生;4:正常内膜;5:p16INK4A 缺失表达子宫内膜癌组织。

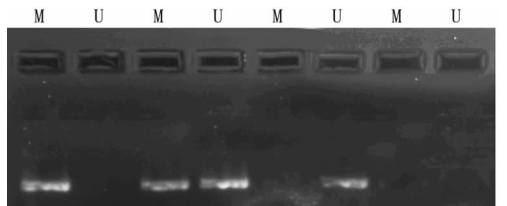
图 1 RT-PCR 检测 p16INK4A 基因表达状况



1:子宫内膜癌;2:子宫内膜不典型增生;3:子宫内膜复杂性增生;4:正常内膜。

图 2 Western blot 检测 p16INK4A 蛋白表达状况

2.2 p16INK4A 甲基化状态分析 30 例子宫内膜癌组织中发现 19 例 p16INK4A 甲基化,甲基化率为 63.33%,所有甲基化的组织中 p16INK4A 的表达水平均明显下降。82.61%(19/23)子宫内膜癌组织中的表达缺陷是由甲基化导致的,6 例 p16INK4A 表达缺失的子宫内膜癌组织中发现 p16INK4A DNA 呈完全甲基化状态,其 p16INK4A mRNA 和蛋白表达缺失;13 例为部分甲基化,其 p16INK4A mRNA 和蛋白表达水平下降;2 例 p16INK4A mRNA 表达缺失和下降的子宫内膜癌组织中未发现甲基化,可能与 p16INK4A 突变缺失有关。不典型增生组织中 8 例部分甲基化,3 例完全甲基化,复杂性增生组织中 1 例部分甲基化,正常子宫内膜组织中未发现甲基化(图 3,表 1)。



M:甲基化;U:非甲基化。

图 3 p16INK4A 基因甲基化状态

2.3 p16INK4A 甲基化与子宫内膜癌手术-病理分期的关系

分析甲基化出现与子宫内膜癌手术-病理分期的关系,在 30 例子宫内膜癌组织中,有 8 例为 I a 期(无甲基化),3 例为 I b 期(2 例甲基化),10 例为 I c 期(8 例甲基化),5 例为 II a 期(全

部甲基化),4 例为 II b 期(全部甲基化)。以 I c 为分界,发现甲基化更易于出现在子宫内膜癌的 I c 期及以后的患者,19 例发现 p16INK4A 甲基化的患者中有 17 例为 I c 期及以后的患者($P < 0.05$),见表 2。

表 1 p16INK4A DNA 甲基化状况与基因表达水平的关系(n)

组别	DNA 检测				RNA 检测			
	缺失或突变	甲基化		缺失	下降	正常	RNA 相对表达值($\bar{x} \pm s$)	
无		部分完全						
正常内膜	0	30	0	0	0	30	1.31±0.04	
复杂性增生	0	29	1	0	3	27	1.26±0.05	
不典型增生	0	19	8	3	4	10	16	0.64±0.04
子宫内膜癌	2	9	13	6	8	15	7	0.29±0.06

表 2 甲基化与病变程度的关系(n)

组别	I a	I b	I c	II a	II b	合计
甲基化	0	2	8	5	4	19
非甲基化	8	1	2	0	0	11
合计	8	3	10	5	4	30

3 讨 论

p16INK4A 基因是人们发现的一种直接作用于细胞周期,抑制细胞分裂的抑癌基因,它表达减少甚至消失使细胞大量由 G₁ 期进入 S 期开始增殖,在无限制的增殖过程中发生表型变化导致肿瘤形成^[4],与妇科肿瘤的发生、发展及预后密切相关^[5]。本研究发现,在子宫内膜癌及子宫内膜不典型增生中 p16INK4A 的表达水平明显下降,且随着子宫内膜病变程度的加重,p16INK4A 的表达水平下降更加明显,这也和 Di Domenico 等^[6]的研究结果一致。

基因启动子区域的 CpG 岛高度甲基化是多种肿瘤细胞中常见的变异^[7],p16INK4A 基因转录起始位点有丰富的 CpG 岛,基因启动子区 CpG 岛过甲基化可通过抑制其转录,使该基因失活,目前认为它是一种新的基因调控机制^[8]。Guidat 等^[9]检测 p16INK4A 启动子甲基化率在子宫内膜癌为 75%,在子宫内膜不典型增生中为 50%,而在正常子宫内膜中却没有检测。本研究进一步了解甲基化与 p16INK4A 表达缺陷之间的关系,发现子宫内膜癌组织中 82.61%的 p16INK4A 表达水平下降是由甲基化导致的,甲基化率为 63.33%,甲基化程度不一可能导致基因表达程度也不一,所以,部分甲基化者有少量基因 mRNA 表达,而完全甲基化者基因表达完全缺失。另外,本研究还发现 2 例子宫内膜癌患者的组织中基因表达缺陷与甲基化无关,其甲基化特异性的 PCR 检测结果中无论甲基化扩增,还是非甲基化扩增,均未有扩增产物出现,说明导致他们

的 p16INK4A DNA 发生改变的原因并不是甲基化,而可能另有机存在,如:杂合缺失、纯合缺失、突变等。

本文的结果还提示甲基化更易于出现在子宫内膜癌手术病理分期 I c 期及以后的患者,分析其原因,可能子宫内膜病变趋向晚期发展,其 p16INK4A 甲基化发生率越高,恶性循环促进子宫内膜细胞增殖更快,病变发展得更快,也就是说,有甲基化的子宫内膜病变患者往往更易于发展到晚期,其预后较差,这和作者既往在宫颈癌中的研究结果是一致的。

参考文献:

- [1] Federação Brasileira das Associações de Ginecologia,Obstetricia e Sociedade Brasileira de Cancerologia. Endometrial carcinoma: treatment[J]. Rev Assoc Med Bras,2012,58(3):281-286.
- [2] Meng CF,Su B,Li W. DNA demethylation is superior to histone acetylation for reactivating cancer-associated genes in ovarian cancer cells[J]. Mol Med Rep,2011,4(6):1273-1278.
- [3] Bird AP. DNA methylation de novo[J]. Science,1999,286(5448):2287-2288.
- [4] Babaian AI,Kariakin OB,Teplov AA,et al. Some molecular-genetic markers, defining the pathogenesis of superficial and invasive bladder cancer[J]. Mol Biol,2011,45(6):1012-1016.
- [5] Lee JJ,Ko E,Cho J,et al. Methylation and immunoppression of p16(INK4a) tumor suppressor gene in primary breast cancer tissue and their quantitative p16(INK4a) hypermethylation in plasma by real-time PCR[J]. Korean J Pathol,2012,46(6):554-561.
- [6] Di Domenico M,Santoro A,Ricciardi C,et al. Epigenetic fingerprint in endometrial carcinogenesis: the hypothesis of a uterine field cancerization [J]. Cancer Biol Ther,2011,12(5):447-457.
- [7] Fukushige S,Horii A. DNA methylation in cancer;a gene silencing mechanism and the clinical potential of its biomarkers[J]. Tohoku J Exp Med,2013,229(3):173-185.
- [8] Zhang QY,Yi DQ,Zhou L,et al. Status and significance of CpG island methylator phenotype in endometrial cancer [J]. Gynecol Obstet Invest,2011,72(3):183-191.
- [9] Guidat M,Sanguedolce F,Bufo P,et al. Aberrant DNA hypermethylation of Hmlh-1 and CDKN2A/p16 genes in benign,pre-malignant and malignant endometrial lesions [J]. Eur J Gynaecol Oncol,2009,30(3):267-270.

(收稿日期:2012-12-28 修回日期:2013-02-22)

欢迎投稿

欢迎订阅