

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.23.012

## 非小细胞肺癌 BALF 中 RAR- $\beta$ 基因甲基化与 p53 突变检测及相关性研究\*

李琪,肖贵华,程长浩,常芬

(武汉科技大学附属普仁医院呼吸内科,武汉 430081)

**[摘要]** **目的** 探讨非小细胞肺癌患者支气管肺泡灌洗液(BALF)中 RAR- $\beta$  基因甲基化与 p53 基因突变检测的临床意义及二者的相关性。**方法** 收集非小细胞肺癌患者(肺癌组)85 例及良性疾病患者(良性疾病组)70 例的 BALF 标本,采用甲基化特异性 PCR(MSP)方法检测 BALF 中的 RAR- $\beta$  基因甲基化,PCR 结合 DNA 测序法检测 p53 基因突变。**结果** 肺癌组 BALF 中 RAR- $\beta$  基因甲基化率及 p53 基因突变率分别为 49.4%、36.5%,均显著高于良性疾病组( $P < 0.01$ );(I+II)期 RAR- $\beta$  基因甲基化率(32.5%)高于同期 p53 基因突变率(12.5%)( $P < 0.05$ );(III+IV)期 RAR- $\beta$  基因甲基化率及 p53 基因突变率均显著高于(I+II)期( $P < 0.01$ );发生 RAR- $\beta$  基因甲基化的肺癌患者 p53 基因突变率更高( $P < 0.01$ );发生 p53 基因突变的肺癌患者 RAR- $\beta$  基因甲基化率更高( $P < 0.01$ )。**结论** 检测非小细胞肺癌患者 BALF 中 RAR- $\beta$  基因甲基化与 p53 基因突变有助于肺癌的诊断。

**[关键词]** 癌,非小细胞肺;支气管肺泡灌洗液;甲基化;RAR- $\beta$  基因;p53 基因

**[中图分类号]** R734.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)23-3206-04

### Correlation between RAR- $\beta$ gene methylation and p53 gene mutation in bronchoalveolar lavage fluid in non-small-cell lung cancer\*

Li Qi, Xiao Guihua, Cheng Changhao, Chang Fen

(Department of Pulmonology, Affiliated Puren Hospital of Wuhan

University of Science and Technology, Wuhan 430081, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the clinical significance and correlation between RAR- $\beta$  gene methylation and p53 gene mutation in bronchoalveolar lavage fluid(BALF) in non-small-cell lung cancer. **Methods** BALF samples from 85 lung cancer patients(lung cancer group) and 70 cases(benign lung diseases group) with benign lung diseases were collected. RAR- $\beta$  gene methylation in BALF samples was detected by methylation-specific PCR (MSP), and p53 gene mutation was detected by PCR and DNA sequencing method. **Results** The rate of RAR- $\beta$  methylation and p53 mutation in BALF in lung cancer were 49.4% and 36.5%, respectively. Both were higher than in benign lung diseases group( $P < 0.01$ ). RAR- $\beta$  methylation rate(32.5%) of patients with TNM stages(I+II)(32.5%) was higher than the p53 mutation rate(12.5%) over the same stages( $P < 0.05$ ). RAR- $\beta$  methylation rate and p53 mutation rate of patients with stages(III+IV) were higher than those with stages(I+II)( $P < 0.01$ ). p53 mutation rate in lung cancer patients with RAR- $\beta$  methylation was higher than those with unmethylated( $P < 0.01$ ). RAR- $\beta$  methylation rate of lung cancer patients with p53 mutation was higher than those without p53 mutation( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Detection of RAR- $\beta$  methylation and p53 mutation in BALF contribute to the diagnosis of lung cancer.

**[Key words]** cancer, non-small cell lung; bronchoalveolar lavage fluid; methylation; RAR- $\beta$  gene; p53 gene

目前,支气管肺泡灌洗技术已普及,其对于肺癌的诊断价值国内、外已有不少文献报道<sup>[1-2]</sup>。检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中的特异性肿瘤标志物可能有助于部分不宜行肺活检患者的早期诊断<sup>[3]</sup>。RAR- $\beta$  基因即视黄酸受体  $\beta$  基因,在其启动子和第 1 个编码区域有 1 个典型的 CpG 岛,在肺癌患者正常组织中 CpG 岛是非甲基化的。当发生 CpG 岛高甲基化时,引起 RAR- $\beta$  基因表达缺陷,此时细胞生长抑制作用消失,从而参与了恶性肿瘤的形成<sup>[4-5]</sup>。野生型 p53 基因为最常见的肺癌抑癌基因之一,p53 基因突变参与了肺癌的发生、发展。本研究尝试采用甲基化特异性 PCR(MSP)方法检测 BALF 中的 RAR- $\beta$  基因甲基化,PCR 结合 DNA 直接测序法检

测 p53 基因突变,探讨联合检测 BALF 中 RAR- $\beta$  基因甲基化和 p53 基因突变的临床意义,以及二者在肺癌发生、发展中的关系。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集本院呼吸科及胸外科 2013 年 3 月 1 日至 2014 年 3 月 31 日住院肺癌患者 85 例(肺癌组),良性疾病患者 70 例(良性疾病组),经开胸手术、经皮穿刺肺活检等方式取得病理结果而明确诊断为非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)。其中男 60 例,女 25 例,年龄 45~82 岁,中位年龄 69 岁。按照国际抗癌联盟 2002 年制定的 TNM 分期标准分期,(I+II)期 40 例,(III+IV)期 45 例。良性疾病组为

\* 基金项目:湖北省教育厅基金项目(Q20131106)。 作者简介:李琪(1978-),主治医师,硕士,主要从事肺癌基础与临床研究。

△ 通讯作者,E-mail:optimum1212@163.com。

表 1 PCR 所需引物

引物	序列	长度(bp)	退火温度(°C)
RAR-β 基因甲基化	F 5'-TCG AGA ACG CGA GCG ATT CG-3'	146	56
	R 5'-GAC CAA TCC AAC CGA AAC GA-3'		
RAR-β 基因非甲基化	F 5'-TTG AGA ATG TGA GTG ATT TGA-3'	146	56
	R 5'-CTT CCT GCA TGC TCC AGG A-3'		
p53-exon 5	F 5'-TGT TCA CTT GTG CCC TGA CT-3'	268	61
	R 5'-CAG CCC TGT CGT CTC TCC AG-3'		
p53-exon 6	F 5'-TGG TTG CCC AGG GTC CCC AG-3'	201	62
	R 5'-TTA ACC CCT CCT CCC AGA GA-3'		
p53-exon 7	F 5'-AAG GCG CAC TGG CCT CAT CT-3'	181	57
	R 5'-CAG TGT GCA GGG TGG CAA GT-3'		
p53-exon 8	F 5'-GCT TCT CTT TTC CTA TCC TGA-3'	185	58
	R 5'-CGC TTC TTG TCC TGC TTG C-3'		

本院呼吸科同期住院患者 70 例,其中男 50 例,女 20 例,年龄 39~81 岁,中位年龄 67 岁,包括肺结核 21 例、肺炎 40 例及支气管扩张 9 例。两组年龄、性别等一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 DNA 抽提试剂盒、PCR 扩增试剂盒及亚硫酸氢钠修饰甲基化检测试剂盒均购自上海生工生物工程公司,β-actin(内参)引物、RAR-β 基因甲基化引物、非甲基化引物和 p53 基因第 5、6、7、8 号外显子的引物均由上海生工生物工程公司合成,引物设计序列及参数见表 1。

1.2.2 检测方法

1.2.2.1 标本收集与处理 每例患者行常规支气管镜检查后,确定病灶部位,将支气管镜镜头置于病灶所在叶或段支气管开口处,从工作孔注入 37 °C 生理盐水 100 mL,分 5 次灌注,负压吸引回收 BALF 约 60 mL,经双层纱布过滤后,以 2 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,留取沉淀细胞,-70 °C 冰箱内保存待检。

1.2.2.2 DNA 提取 在酚-氯仿-异戊醇方法基础上利用 DNA 抽提试剂盒对上述沉淀细胞标本内 DNA 进行抽提。紫外分光光度计检测 DNA 量和纯度,琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。

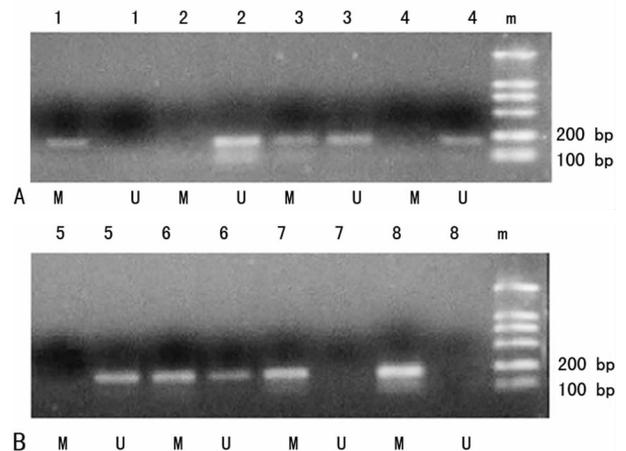
1.2.2.3 MSP 方法检测 RAR-β 基因甲基化 抽提合格的 DNA 按亚硫酸氢钠修饰甲基化检测试剂盒步骤修饰和纯化 DNA 后进行 PCR 扩增。采用 RAR-β 基因甲基化引物及非甲基化引物对同一样本 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积 25 μL,包括 10×PCR Buffer 2.5 μL、dNTP 2.5 μL、MgCl<sub>2</sub> 溶液 1.5 μL、各引物 F 和 R 各 0.5 μL、TaqDNA 聚合酶 0.25 μL、血 DNA(模板)2.5 μL、DDH<sub>2</sub>O 14.75 μL。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s(40 次循环),退火 30 s(温度见表 1,40 次循环),72 °C 延伸 30 s(40 次循环),72 °C 延伸 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳(溴化乙锭染色)检测 PCR 产物条带,根据扩增出的产物条带判断 DNA 是否甲基化,用甲基化引物扩增出条带者为甲基化的标本,仅非甲基化引物扩增出条带者为非甲基化的标本。

1.2.2.4 PCR 结合 DNA 直接测序法检测 p53 基因突变 对提取的 DNA 中的 p53 基因第 5~8 外显子进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积 50 μL,包括 10×PCR Buffer 5 μL、dNTP 5 μL、MgCl<sub>2</sub> 溶液 3 μL、p53-exon 引物 F 和 R 各 0.5 μL、Taq DNA 聚合酶 0.5 μL、血 DNA(模板)2 μL、DDH<sub>2</sub>O 33.5 μL。PCR 反应条件:95 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 30 s(40 次循环),退火 30 s(温度见表 1,40 次循环),72 °C 延伸 30 s(40 次循环),72 °C 延伸 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳(溴化乙锭染色)检测 PCR 扩增效果。将电泳条带清晰的 p53 外显子扩增产物交由上海生工公司纯化回收后进行正反链双向测序。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计数资料用例数和率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 确切概率法,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌组 RAR-β 基因甲基化 肺癌组 BALF 中的 RAR-β 基因电泳图见图 1。



A:1 号及 3 号标本检测出 RAR-β 基因甲基化,2 号及 4 号标本检测出 RAR-β 未发生甲基化;B:6、7、8 号标本检测出 RAR-β 基因甲基化,5 号标本检测出 RAR-β 未发生甲基化。M:甲基化泳道;U:非甲基化泳道;m:DNA 相对分子质量参照物。

图 1 肺癌组 BALF 中 RAR-β 基因电泳图

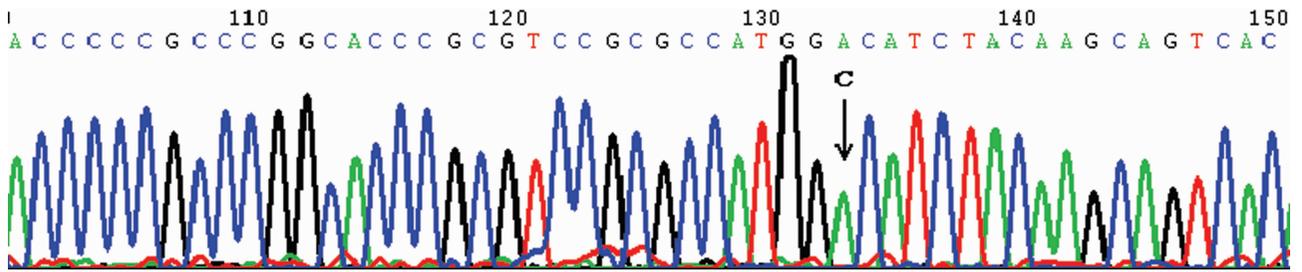


图2 肺癌组 BALF 中 p53-exon5 GCC 突变 GAC

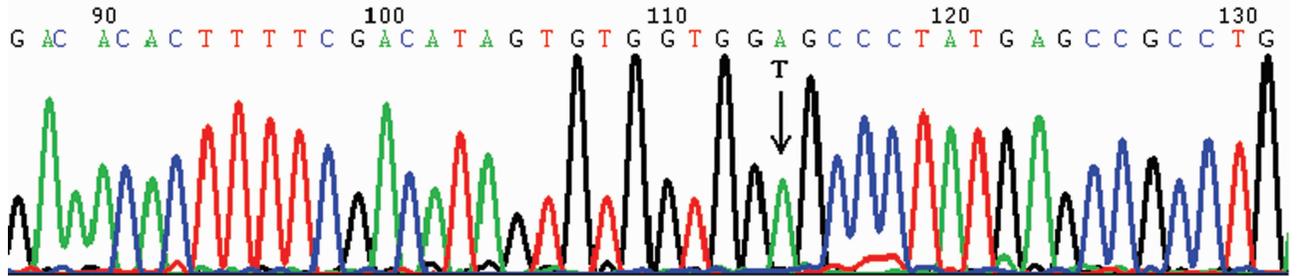


图3 肺癌组 BALF 中 p53-exon6 GTG 突变 GAG

**2.2 p53 基因突变结果** 肺癌组 BALF 中 p53-exon5 GCC 突变为 GAC(对应第 161 号密码子),以及 GTG 突变为 GAG(对应第 218 号密码子),具体见图 2、3。

**2.3 两组 RAR-β 基因甲基化率及 p53 基因突变率的比较** 两组 BALF 中 RAR-β 基因甲基化率比较差异有统计学意义(49.4% vs. 7.1%,  $\chi^2 = 32.462, P < 0.01$ ); 两组 BALF 中 p53 基因突变率比较差异有统计学意义(36.5% vs. 2.9%,  $\chi^2 = 25.882, P < 0.01$ ), 肺癌组 RAR-β 基因甲基化率及 p53 基因突变率均显著高于良性疾病组。

**2.4 肺癌患者 RAR-β 基因甲基化率、p53 基因突变率与临床分期的关系** (I + II) 期患者 RAR-β 基因甲基化率与(III + IV) 期患者比较, 甲基化率较低(32.5% vs. 64.4%,  $\chi^2 = 8.645, P < 0.01$ ); (I + II) 期患者 p53 基因突变率与(III + IV) 期患者比较, 突变率较低(12.5% vs. 57.8%,  $\chi^2 = 18.737, P < 0.01$ )。 (I + II) 期患者 RAR-β 基因甲基化阳性率(32.5%) 高于同期 p53 基因突变阳性率(12.5%), 差异有统计学意义( $\chi^2 = 4.588, P < 0.05$ )。

**2.5 肺癌患者 RAR-β 基因甲基化与 p53 基因突变的关系** RAR-β 基因甲基化的肺癌患者有 54.8% 发生了 p53 基因突变, RAR-β 基因非甲基化的肺癌患者有 18.6% 发生了 p53 基因突变, 两者比较发生甲基化的肺癌患者 p53 基因突变率更高( $\chi^2 = 11.989, P < 0.01$ )。 p53 基因突变肺癌患者有 74.2% 发生 RAR-β 甲基化, p53 基因未突变肺癌患者有 35.2% 发生 RAR-β 基因甲基化, 两者比较发生 p53 基因突变的肺癌患者 RAR-β 基因甲基化率更高( $\chi^2 = 11.998, P < 0.01$ )。

### 3 讨论

肺癌的发生、发展是一个多基因参与、多阶段发生、长时间形成的病理过程。临床上对于一些因各种原因难以行肺组织活检的患者采用支气管肺泡灌洗技术, 对其 BALF 标本进行脱落细胞及相关基因检测是肺癌早期诊断的一种方法。检测 BALF 中脱落癌细胞有一定诊断价值, 但由于脱落癌细胞在 BALF 中容易裂解、凋亡, 实际阳性率不高, 因此 PCR 方法直

接检测 BALF 沉淀细胞中相关癌基因或抑癌基因有助于提高检测阳性率<sup>[6]</sup>。

RAR-β 基因的表达产物即视黄酸受体, 而视黄酸是通过与视黄酸受体结合调节靶基因转录, 从而发挥抗癌效应, 该机制已在大量研究中得到证实<sup>[7]</sup>。国外研究也表明, RAR-β 基因启动子 CpG 岛高甲基化是其表达沉默的重要原因, 有可能成为一个新的肿瘤标志物<sup>[8]</sup>。国外研究表明, 肿瘤抑制基因启动子甲基化可发生于肺癌形成的早期<sup>[9]</sup>, 而 BALF 中的 RAR-β 基因甲基化有可能成为肺癌早期诊断的指标<sup>[10]</sup>。

本研究结果显示肺癌组 RAR-β 基因甲基化率及 p53 基因突变率显著高于良性疾病组, 这与国内研究的部分结果一致<sup>[11]</sup>, 表明 BALF 中 RAR-β 基因甲基化及 p53 基因突变检测对肺癌具有一定的诊断及鉴别诊断价值。检测结果还显示: (III + IV) 期 RAR-β 基因甲基化率及 p53 基因突变率显著高于 (I + II) 期, TNM 分期越晚, 检测阳性率越高, 表明 RAR-β 基因甲基化及 p53 基因突变与临床分期有关, RAR-β 基因甲基化及 p53 基因突变事件参与了肺癌的发生、发展、转移过程。另外, (I + II) 期患者 RAR-β 基因甲基化阳性率高于同期 p53 基因突变阳性率( $P < 0.05$ ), 表明 RAR-β 基因甲基化检测较 p53 基因突变可能有更高的早期诊断价值。本研究还发现 RAR-β 基因甲基化因素与 p53 基因突变密切相关, 两者在肺癌发生、发展中可能有协同效应<sup>[12]</sup>。

综上所述, BALF 中 RAR-β 基因甲基化与 p53 基因突变可作为肿瘤标志物用于肺癌的诊断, RAR-β 基因甲基化检测可能有更高的早期诊断价值, 二者可能有协同效应, 共同促进了肺癌的发生、发展。

### 参考文献

- [1] Zhou JH, Liu GN, Huang SM, et al. Comparative study of protein markers in serum and bronchoalveolar lavage fluid from patients with lung cancer by surface-enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry[J].

- Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2011, 34(4): 274-277.
- [2] Ciebiada M, Górski P, Antczak A. Eicosanoids in exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage fluid of patients with primary lung cancer[J]. *Dis Markers*, 2012, 32(5): 329-335.
- [3] Naumnik W, Naumnik B, Niewiarowska K, et al. Angiogenic axis angiopoietin-1 and angiopoietin-2/Tie-2 in non-small cell lung cancer: a bronchoalveolar lavage and serum study[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 788(8): 341-348.
- [4] Moison C, Senamaud-Beaufort C, Fourrière L, et al. DNA methylation associated with polycomb repression in retinoic acid receptor  $\beta$  silencing[J]. *FASEB J*, 2013, 27(4): 1468-1478.
- [5] Brabender J, Metzger R, Salonga D, et al. Comprehensive expression analysis of retinoic acid receptors and retinoid X receptors in non-small cell lung cancer: implications for tumor development and prognosis [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(3): 525-530.
- [6] Kido T, Yatera K, Noguchi S, et al. Detection of MALT1 gene rearrangements in BAL fluid cells for the diagnosis of pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma[J]. *Chest*, 2012, 141(1): 176-182.
- [7] Ines FM, Valeria GG, Lis SM, et al. Retinoic acid reduces migration of human breast cancer cells: role of retinoic acid receptor beta[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(6): 1113-1123.
- [8] Bhagat R, Kumar SS, Vaderhobli S, et al. Epigenetic alteration of p16 and retinoic acid receptor beta genes in the development of epithelial ovarian carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(9): 9069-9078.
- [9] Haroun RA, Zakhary NI, Mohamed MR, et al. Assessment of the prognostic value of methylation status and expression levels of FHIT, GSTP1 and p16 in non-small cell lung cancer in Egyptian patients[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(10): 4281-4287.
- [10] Kim H, Kwon YM, Kim JS, et al. Tumor-specific methylation in bronchial lavage for the early detection of non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(12): 2363-2370.
- [11] Zhao X, Wang N, Zhang M, et al. Detection of methylation of the RAR- $\beta$  gene in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Lett*, 2012, 3(3): 654-658.
- [12] Tan C, Jin YT, Xu HY, et al. Correlation between RAR-beta gene promoter methylation and P53 gene mutations in non-small cell lung cancer[J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2012, 29(2): 131-136.

(收稿日期: 2015-02-26 修回日期: 2015-07-15)

(上接第 3205 页)

## 参考文献

- [1] 殷培, 李冀军, 宋岩, 等. 高通量血液透析对维持性血液透析患者血清叶酸、维生素 B12 水平的影响[J]. *中国血液净化*, 2011, 10(11): 610-612.
- [2] 李蒙. 罗格列酮对原发性高血压伴胰岛素抵抗患者的降压作用[J]. *中国医药指南*, 2014, 11(11): 153-154.
- [3] Burkett E, Keijzers G, Lind J. The relationship between blood glucose level and QTc duration in the critically ill [J]. *Crit Care Resusc*, 2009, 11(1): 8-13.
- [4] Orford N. Intensive insulin therapy in septic shock[J]. *Crit Care Resusc*, 2010, 8(3): 230-234.
- [5] Richard S, Hotchkiss MD, Irene E, et al. The pathophysiology and treatment of sepsis[J]. 2013, 34(8): 135-138.
- [6] 王秀英, 宋青, 周飞虎, 等. 血浆置换在热射病合并多器官功能障碍综合征患者中的应用[J]. *中国急救医学*, 2007, 27(1): 83-85.
- [7] Ghasemi R, Dargahi L, Haeri A, et al. Brain insulin dysregulation: implication for neurological and neuropsychiatric disorders[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47(3): 1045-1065.
- [8] Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity[J]. *Shock*, 2001, 16(2): 83-96.
- [9] Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A $\beta$  oligomers[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(4): 1339-1353.
- [10] 刘晓斌, 王凉, 刘斌, 等. 高通量血液透析对糖尿病肾病维持性血液透析患者胰岛素抵抗的影响[J]. *中国血液净化*, 2011, 10(1): 22-24.
- [11] 赵新菊, 王琰, 甘良英, 等. 北京市新增维持性血液透析患者的人口统计学及病因构成的变迁[J]. *中国血液净化*, 2014, 13(3): 185-189.
- [12] Schroyen MA, Dekkers OM, Grootendorst DC, et al. Survival in dialysis patients is not different between patients with diabetes as primary renal disease and patients with diabetes as a comorbid condition[J]. *BMC Nephrol*, 2011, 69(12): 66-69.
- [13] House AA, Anand I, Bellomo R, et al. Definition and classification of cardio-renal syndromes: workgroup statements from the 7th ADQI Consensus Conference [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(5): 1416-1420.
- [14] Eshaghian S, Horwich TB, Fonarow GC. Relation of loop diuretic dose to mortality in advanced heart failure[J]. *Am J Cardiol*, 2006, 97(12): 1759-1764.

(收稿日期: 2015-02-24 修回日期: 2015-07-16)