

胰液中 p16 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化改变及其意义

刘 枫*,李兆中,许国铭,孙振兴,邹多武,满晓华,方 琳
(第二军医大学长海医院消化内科,上海 200433)

[摘要] 目的:探讨胰液中 p16 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化检测在胰腺癌诊断中的价值。方法:2005~2006 年 30 例来自长海医院消化内镜中心的胰腺疾病患者入选,采用内镜逆行胆胰管造影(ERCP)下放置鼻胰管收集胰液,沉渣涂片 H-E 染色进行细胞学检查,甲基化特异性 PCR(MSP)法检测胰液及组织中 p16 基因甲基化状态。结果:单纯胰液细胞学检查诊断胰腺癌的敏感性为 40%(8/20),特异性为 100%(10/10),阳性预测值为 100%(8/8),阴性预测值为 45.4%(10/22),诊断准确性 60.0%(18/30)。所有胰液标本均成功抽提出 DNA,30 例胰腺疾病患者胰液标本进行 p16 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化检测,其中 20 例胰腺癌患者胰液中 p16 基因甲基化率为 35%(7/20),慢性胰腺炎和胰腺囊腺瘤患者胰液中无 p16 基因甲基化。胰液中 p16 基因甲基化与常规细胞学联合诊断胰腺癌的敏感性为 55%(11/20),特异性为 100%(10/10),阳性预测值为 100%(11/11),阴性预测值为 52.6%(10/19),诊断准确性 70%(21/30)。结论:鼻胰管收集的胰液可用于分子生物学检测,检测胰液中 p16 基因甲基化改变与细胞学联合更有助于胰腺癌的诊断。

[关键词] 胰腺肿瘤;内镜逆行胆胰管造影;胰液;甲基化

[中图分类号] R 735.9 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2007)06-0629-04

Aberrant methylation of CpG island in 5' promoter region of p16 gene and its role in diagnosis of pancreatic cancer

LIU Feng*, LI Zhao-shen, XU Guo-ming, SUN Zhen-xing, ZOU Duo-wu, MAN Xiao-hua, FANG Lin (Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Objective: To investigate the aberrant methylation of CpG island in 5' promoter region of p16 gene in the pancreatic juice and its value in diagnosis of patients with pancreatic cancer. Methods: Pure pancreatic juice(PPJ) was collected from the pancreatic duct by a nasopancreatic tube put under endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP). Cytological examination was performed by H-E staining in pure pancreatic juice. Aberrant p16 methylation was detected using the methylation-specific PCR (MSP) in the PPJ. Results: The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy cytological examination in diagnosis of pancreatic cancer were 40%, 100%, 100%, 45.4% and 60.0%, respectively. The DNA sequences were successfully extracted from the PPJ of 30 patients with pancreatic diseases and were subjected to MSP. Seven(35%) of the 20 cases with pancreatic cancer showed aberrant methylation of p16 gene. No aberrant methylation was detected in the pancreatic juice samples of patients with chronic pancreatitis and mucinous cystadenocarcinoma of pancreas. When cytological examination combined with p16 methylation detection, the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy for diagnosis of pancreatic cancer were 55%, 100%, 100%, 52.6% and 70%, respectively. Conclusion: Pancreatic juice collected by nasopancreatic drainage during ERCP can be used for molecular analysis. Detection of aberrant methylation of p16 gene in pancreatic juice combined with cytological examination is a better method for diagnosis of pancreatic cancer.

[KEY WORDS] pancreatic neoplasms; endoscopic retrograde cholangiopancreatography; pancreatic juice; methylation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(6): 629-632]

在胰腺癌多步骤、多阶段发生过程中有多种癌基因和抑癌基因参与。p16 是其中一个重要的抑癌基因,参与细胞周期的调控,控制细胞的生长和分化。其失活的机制包括缺失、突变及 5' CpG 岛异常甲基化。目前已在多种肿瘤中发现 5' CpG 岛异常甲基化是其灭活的主要机制^[1]。我们前期研究^[1]发现 38.9% 的胰腺癌组织中存在 p16 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化改变。国外学者也报道^[2]在胰腺癌组织中 p16 基因异常甲基化达到 43%~52%,而在正常胰腺

组织及良性胰腺疾病中未发现 p16 基因甲基化。为此我们采用内镜逆行胆胰管造影(ERCP)下放置鼻胰管收集胰液,通过检测胰液中 p16 基因甲基化,探讨其对胰腺癌早期诊断及鉴别诊断的价值。

[基金项目] 上海市优秀青年医学人才培养计划。Supported by Outstanding Young Medical Talents Cultivation Program of Shanghai.

[作者简介] 刘 枫,博士,主治医师。

* Corresponding author. E-mail: drliuffeng@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 研究对象 所有胰液标本均取自长海医院消化内镜中心 2005 年 10 月至 2006 年 10 月施行 ER-CP 检查的胰腺疾病患者,共 30 例,20 例为胰腺癌,8 例慢性胰腺炎,2 例胰腺囊腺瘤,其中男 19 例,女 11 例,年龄 20~80 岁,平均 58.2 岁。20 例胰腺癌 15 例有病理诊断,5 例为临床诊断,2 例胰腺囊腺瘤为病理诊断,8 例慢性胰腺炎为临床诊断。胰腺癌临床入选标准为 ERCP 提示胰管中断、断端变钝、管壁僵硬不规则或双管征加如下任何一项:(1)B 超示胰腺有低密度区、胰管扩张以及胆总管扩张;(2)CT 示胰腺局部增大和占位性病变;(3)超声内镜提示胰腺区低密度占位性病变;(4)磁共振胰胆管造影(MRCP)示有胰管或胆总管的狭窄、扩张或有占位性病变。慢性胰腺炎入选标准为有临床症状如反复急性胰腺炎发作病史、反复脂肪泻、上腹痛病史等且符合下列条件之一者:(1)腹部 B 超示胰腺组织内有结石;(2)CT 示胰腺钙化或结石;(3)ER-CP 示胰管扭曲、扩张、囊性扩张、狭窄。

1.2 胰液标本的获得 按常规 ERCP 作术前准备,ERCP 显影后,留置鼻胰管负压分段吸取胰液,共收集 24 h 胰液,在收集瓶四周置放冰块,并分段统计胰液量。取 5 ml 收集的胰液,1 200×g 离心 5 min,沉渣涂片,95%乙醇固定 10~15 min,H-E 染色后镜检,由同一病理科医生阅片。余胰液-80℃保存以备分子生物学检测。

1.3 胰液 DNA 抽提 按 Müller 的方法抽提胰液 DNA,具体如下:取 1 ml 胰液加 1 ml TE 缓冲液(pH 7.5~8.0)/重蒸酚,4℃离心 1 200×g,5 min,水相用移液器移至新 Eppendorf 管中,再用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提 2 次,离心后上清用 0.1 ml 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2)和 2.5 ml 无水乙醇沉淀、干燥,TE(pH 8.0)溶解保存。

1.4 胰液中 p16 基因甲基化检测 采用甲基化特异性 PCR(MSP)法进行 p16 基因甲基化检测^[3]。

1.4.1 亚硫酸氢钠修饰 1 μg DNA 溶于 20 μl 水中,以新鲜配制的 0.2 mol/L NaOH 使 DNA 变性,再加入 12 μl 10 mmol/L 对苯二酚、208 μl 亚硫酸氢钠,50℃孵育 16 h。用 DNA 纯化试剂盒(上海博彩生物科技有限公司)将修饰后的 DNA 纯化,纯化后加 0.3 mol/L NaOH 终止反应。乙醇沉淀 DNA,重溶于 20 μl 双蒸水中,-20℃保存,2 周内检测。

1.4.2 甲基化 PCR 扩增 引物由 CpGWIZ™扩增试剂盒(Intergen Corp.)提供。共 3 对引物:W₁₋₂、

M₁₋₂及 U₁₋₂,分别可扩增未经亚硫酸氢钠修饰的 p16、甲基化的经亚硫酸氢钠修饰的 p16 及未甲基化的经亚硫酸氢钠修饰的 p16,产物大小分别为 142、145、154 bp。PCR 反应总体积 25 μl,其中含 10×PCR 缓冲液 2.5 μl,2.5 mmol/L dNTP 2.5 μl,W、M、U 引物各 1 μl,Taq DNA 聚合酶(Qiagen Corp.) 1 U,模板 DNA 100 ng。95℃热变性 5 min,迅速冷却至 80℃以下,加入 Taq DNA 聚合酶,然后在 DNA 扩增仪(Perkin Elmer 9600)上进行如下反应:95℃×45 s,60℃×45 s,72℃×60 s,35 个循环后 72℃延伸 5 min。取 8 μl 扩增产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳分析。检测时以结肠癌细胞株 SW66 为阳性对照。

1.5 组织标本中 p16 基因甲基化检测 组织中 DNA 抽提:采用小量组织基因组 DNA 抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司),按说明书操作。紫外分光光度计鉴定 DNA, $D_{260}/D_{280}>1.8$ 。胰腺癌组织中 p16 基因启动子区 5'CpG 岛甲基化检测方法同胰液。

1.6 统计学处理 敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值及诊断准确性根据以下公式计算:敏感性=真阳性数/(真阳性数+假阴性数),特异性=真阴性数/(真阴性数+假阳性数),阳性预测值=真阳性数/总阳性数,阴性预测值=真阴性数/总阴性数,诊断准确性=(真阳性数+真阴性数)/总例数。

2 结果

2.1 鼻胰管胰液收集 收集 24 h 胰液量,胰腺癌和慢性胰腺炎分别为(80±25) ml(50~135 ml)、(100±24) ml(75~150 ml),2 例胰腺囊腺瘤分别为 50 和 90 ml。

2.2 胰液标本细胞学检测 30 例胰液标本均进行了细胞学检测。20 例胰腺癌中 8 例(40%)细胞学检查找到恶性细胞(图 1A),2 例胰腺囊腺瘤细胞学检查未见异型细胞,8 例慢性胰腺炎中 3 例细胞学可见异型细胞,5 例为正常上皮细胞(图 1B)。细胞学检查诊断胰腺癌的敏感性为 40%(8/20),特异性为 100%(10/10),阳性预测值为 100%(8/8),阴性预测值为 45.4%(10/22),诊断准确性 60.0%(18/30)。

2.3 组织标本中 p16 基因启动子区 5'CpG 岛甲基化状态 15 例胰腺癌和 2 例胰腺囊腺瘤手术切除标本均成功抽提出 DNA 并进行了 p16 基因甲基化检测。2 例胰腺黏液性囊腺瘤未发现甲基化,15 例胰腺癌标本中 6 例甲基化(40%)。

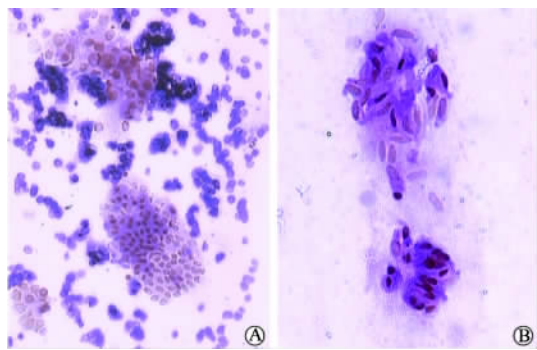


图 1 胰腺癌(A)及慢性胰腺炎(B)胰液脱落细胞
Fig 1 Exfoliated cells in PPJ of patients with pancreatic cancer (A) and chronic pancreatitis(B)
A: The cells at bottom were normal epithelia. The cells on the top were cancer cells; B: The normal cells' nuclei are small; their chromatin is soft

2.3 胰液 p16 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化状态 对30 例胰腺疾病患者胰液标本进行 p16 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化检测,可见大部分标本 W 引物扩增出 142 bp 条带,M 引物扩增出 145 bp 条带,同时 U 引物扩增出 154 bp 条带(图 2),其中 20 例胰腺癌患者胰液中 p16 基因甲基化率为 35%(7/20),慢性胰腺炎和胰腺胰腺瘤患者胰液中无 p16 基因甲基化($P<0.05$)。

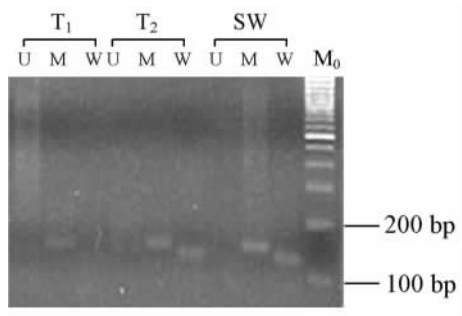


图 2 MSP 法检测胰液 p16 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化状态
Fig 2 Aberrant p16 methylation was detected by MSP in PPJ
U, M, W: Primer; T₁, T₂: PPJ in pancreatic cancer; SW: Positive control; M₀: 100 bp maker

7 例胰液 p16 基因甲基化的胰腺癌患者中 5 例进行了手术切除,其对应的 5 例组织标本均检测到 p16 基因甲基化,13 例胰液未检测到 p16 基因甲基化的胰腺癌患者中 10 例进行了手术切除,其对应的组织标本均未发现 p16 基因甲基化。2 例胰腺黏液性囊腺瘤患者胰液和组织标本中均未发现甲基化。在胰液甲基化阳性的 7 例胰腺癌患者中 4 例细胞学检查找到恶性细胞,3 例胰液甲基化阳性而细胞学

检查阴性,4 例胰液细胞学阳性而甲基化阴性。将胰液中 p16 基因甲基化与常规细胞学联合诊断胰腺癌的敏感性为 55%(11/20),特异性为 100%(10/10),阳性预测值为 100%(11/11),阴性预测值为 52.6%(10/19),诊断准确性 70%(21/30)。

3 讨 论

胰腺癌的诊断一直是困扰临床医生的一个难题。近年来随着分子生物学技术的发展,各国学者均在寻找一种与胰腺癌密切相关的分子标志物用于其早期诊断。胰液是由胰腺直接分泌的体液,检测胰液中的脱落细胞和肿瘤标志物对诊断胰腺癌更具有特异性^[4]。过去单纯通过检测胰液脱落细胞诊断胰腺癌特异性高(100%)但敏感性偏低(30%),造成细胞学检查敏感性不高的主要原因是取材错误(sampling error),约占导致假阴性原因的 67%,其次是读片错误(interpretive),约为 17%^[5]。因此目前情况下如单纯依靠胰液细胞学来诊断胰腺癌还存在不足。检测胰液中肿瘤相关基因诊断胰腺癌成为研究的热点。其中研究最多的是 K-ras 基因突变,高达 90%以上的胰腺癌中存在着 K-ras 基因突变。一些研究也显示在胰腺癌患者胰液、血液或者粪便中可以检查到高频率 K-ras 基因突变,为胰腺癌的早期诊断带来了希望^[6]。但是随着研究的深入,逐渐发现在许多良性胰腺疾病患者胰液中也存在 K-ras 基因突变,这就大大限制了其在胰腺癌诊断中的应用^[7]。

p16/INK4a 基因位于人 9 号染色体 p21 区,其编码的 p16 蛋白是细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (CDK4)的抑制剂,在细胞周期调节中发挥重要作用。p16/INK4a 的失活存在于大多数肿瘤中,可导致细胞周期调节失控,细胞过度增生,向恶性转化。p16 基因中的失活模式包括基因突变、纯合性缺失及高甲基化。在胰腺癌中 p16 基因高甲基化是其主要失活模式,印度的 Attri 等^[2]报道胰腺癌组织 p16 基因甲基化率高达 52%,我们前期的研究^[1]结果显示 38.9%的胰腺癌 p16 基因发生了甲基化,而正常胰腺组织、慢性胰腺炎和胰腺良性肿瘤均未发现 p16 基因甲基化。因此可以推测 p16 基因甲基化检测可能作为胰腺癌的诊断标志物。本研究对鼻胰管收集的纯胰液检测其 p16 基因甲基化状态,结果显示 20 例胰腺癌患者胰液中 p16 基因甲基化率为 35%(7/20),慢性胰腺炎和胰腺胰腺瘤患者胰液中无 p16 基因甲基化。我们的结果与 Klump 等的相似,Klump 等^[8]发现在 49%的胰腺癌患者胰液中可

以检测到 p16 基因甲基化,因此检测胰液中 p16 基因甲基化可以作为胰腺癌与慢性胰腺炎鉴别的分子标志。Gerdes 等^[9]还研究发现 50% 的胰腺导管内瘤(pancreatic intraduct neoplasia, PanIN)有 p16 基因的甲基化,而 PanIN 是明确的胰腺癌癌前病变,推测 p16 基因甲基化是胰腺癌进展过程中的早期分子事件,因此胰液中 p16 基因甲基化可能作为胰腺癌早期诊断的分子标志。我们还发现 3 例胰液甲基化阳性而细胞学检查阴性,说明尽管胰液中不能发现癌细胞,但还是可以检测到癌细胞的基因变化。4 例胰液细胞学阳性而甲基化阴性的原因可能是这部分患者胰腺癌本身不存在 p16 基因的甲基化。将胰液中 p16 基因甲基化与常规细胞学联合诊断胰腺癌的敏感性和准确性均高于单纯细胞学检查。

本组 5 例胰腺癌组织标本中检测到 p16 基因甲基化,其对应的胰液标本中亦检测到 p16 基因甲基化,10 例胰腺癌组织标本中未检测到 p16 基因甲基化,其对应的胰液标本也未发现 p16 基因甲基化。因此胰液标本中 p16 基因甲基化能够反映组织中 p16 基因甲基化的状态。

胰液收集方法的不同也会影响甲基化检测的结果。Matsubayashi 等^[10]报道在正常人十二指肠液中可以检测到多个基因甲基化改变(包括 p16 基因),这些基因改变可能与年龄相关,因此要分析胰液中基因甲基化变化必须得到没有十二指肠液污染的纯胰液。本组 30 例行 ERCP 患者采用鼻胰管引流获取胰液。鼻胰管引流是经十二指肠镜将导管插入胰管内的合适位置,通过导管将胰液引流至体外的一种方法。该方法可获得足够纯胰液,且术中操作时间短,无严重并发症发生。此外本研究直接从胰液中抽提 DNA,而未像大多数研究者那样采用胰液中脱落细胞作为 DNA 来源,因为以往研究胰液中基因突变的实验发现胰液脱落细胞中 K-ras 基因突变率低于胰液上清^[7]。

本研究中采用的甲基化检测方法为 MSP 法,简便易行,灵敏度高,且对 DNA 的质和量要求也低,可用于临床少量标本的检测。最近 Lo 等^[11]在荧光 PCR 和 MSP 技术基础上,建立了一种叫实时 MSP 的新技术并成功地用于 p16 基因异常甲基化的定量分析,使之兼备 MSP 的特异性和灵敏性以及实时 PCR 的快速、高通量和抗污染特性。国外已有学者报道^[12]采用实时 MSP 法检测胰液中多个肿瘤抑制基因的甲基化状态作为胰腺癌的诊断方法,敏感性和特异性分别达到 82% 和 100%。我们下一步也准

备建立实时 MSP 的检测方法。

总之,对于早期胰腺癌的诊断目前还没有有效的筛查方法,也缺乏可靠的诊断试验,本研究首次从中国人胰液中检测到 p16 基因甲基化改变,为胰腺癌早期诊断和鉴别诊断提供了一个新的分子标志物,其与胰液细胞学检查联合诊断胰腺癌有一定的价值,但本研究病例数还有限,其确切的临床意义还需要大规模的临床实验来验证。

[参考文献]

- [1] 刘枫,李兆申,许国铭,等. 特异性 PCR 法检测胰腺癌 p16 基因甲基化改变[J]. 胰腺病学, 2002, 2: 82-84.
- [2] Attri J, Srinivasan R, Majumdar S, et al. Alterations of tumor suppressor gene p16INK4a in pancreatic ductal carcinoma[J]. BMC Gastroenterology, 2005, 5: 1471-1481.
- [3] Herman J G, Graff J R, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR; a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 9821-982.
- [4] Fujita N, Noda Y, Kobayashi G, et al. Endoscopic approach to early diagnosis of pancreatic cancer[J]. Pancreas, 2004, 28: 279-281.
- [5] Logrono R, Kurtycz D F, Molina C P, et al. Analysis of false-negative diagnoses on endoscopic brush cytology of biliary and pancreatic duct strictures: the experience at 2 university hospitals[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124: 387-392.
- [6] 周国雄,李兆申,许国铭,等. 胰液 K-ras12 密码子点突变检测对胰腺癌诊断的临床价值[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23: 477-478.
- [7] Ha A, Watanabe H, Yamaguchi Y, et al. Usefulness of supernatant of pancreatic juice for genetic analysis of K-ras in diagnosis of pancreatic carcinoma[J]. Pancreas, 2001, 23: 356-363.
- [8] Klump B, Hsieh C J, Nehls O, et al. Methylation status of p14ARF and p16INK4a as detected in pancreatic secretions[J]. Br J Cancer, 2003, 88: 217-222.
- [9] Gerdes B, Ramaswamy A, Kersting M, et al. P16^{INK4a} alterations on chronic pancreatitis-indicator for high-risk lesions for pancreatic cancer[J]. Surgery, 2001, 129: 490-497.
- [10] Matsubayashi H, Sato N, Brune K, et al. Age- and disease-related methylation of multiple genes in nonneoplastic duodenum and in duodenal juice[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(2 Pt 1): 573-583.
- [11] Lo Y M, Wong I H, Zhang J, et al. Quantitative analysis of aberrant p16 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction[J]. Cancer Res, 1999, 59: 3899-3903.
- [12] Matsubayashi H, Canto M, Sato N, et al. DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease[J]. Cancer Res, 2006, 66: 1208-1217.

[收稿日期] 2007-04-16

[修回日期] 2007-05-14

[本文编辑] 孙岩