

APC、P16 基因甲基化与肝细胞癌关系的 Meta 分析

邹 莉(湖北省谷城县人民医院 441700)

【摘要】 目的 应用 Meta 分析的方法评价 APC 基因和 P16 基因甲基化与肝细胞癌(HCC)的关系。**方法** 检索 1978~2011 年在 Medline、Pubmed 等数据库及 1994~2011 年在中国知网和万方数据库收录的所有有关 P16、APC 基因甲基化与 HCC 病例对照研究文献,按纳入与排除标准筛选文献,并用 RevMan 5.0 软件进行统计分析。**结果** 纳入国内外标准的 16 篇数据合并结果显示,APC 基因甲基化病例组 488 例,对照组 HCC 患者肿瘤组织 434 例,其中 HCC 癌旁组织 390 例,非肿瘤肝病组织 21 例,健康人组织 23 例;HCC 组与癌旁组织组合并的有效率的比值比(OR)=5.91,95%CI 为 4.20%~8.31%;HCC 肿瘤组与正常组织组 OR=35.19,95%CI:6.00%~206.33%。P16 甲基化病例组 HCC 患者肿瘤组织 400 例,对照组共 437 例,其中 HCC 癌旁组织 398 例,非肿瘤肝病组织 21 例,健康人组织 18 例。HCC 组与癌旁组织组的 OR=5.69,95%CI:3.96%~8.19%,HCC 肿瘤组与正常组织组 OR=12.18,95%CI:2.56%~58.03%。**结论** APC、P16 基因的高甲基化导致了该基因的失活,与 HCC 的发生和发展有密切关系。

【关键词】 肝细胞癌; APC 基因; P16 基因; 甲基化; Meta 分析

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.21.020 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)21-2698-02

Meta analysis of the relations of APC、P16 gene methylation with HCC ZOU Li (People's Hospital of Gucheng country, Xiangyang, Hubei 417000, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the relationship of APC and P16 methylation with hepatocellular carcinoma (HCC) by meta analysis. **Methods** Articles related to the APC, P16 methylation in HCC published from 1978 to December 2011 in the databanks including MEDLINE and PUNMED and published from 1994 to December 2011 in databanks including CNKI, Wanfang database were collected, and data was analyzed by RevMan 5.0 software. **Results**

Sixteen studies met our inclusion criteria, 488 HCC cases and 434 controls about APC methylation were brought into the study. Statistically significant odds ratios (ORs) of APC hypermethylation were obtained from tumor tissues and non-tumorous liver tissues of HCC patients (OR 5.91, 95% CI: 4.20% - 8.31%), tumor tissues of HCC patients and liver tissues of healthy person (OR 35.19, 95% CI: 6.00% - 206.33%). 400 HCC cases and 437 controls about P16 methylation were brought into the study. Statistically significant odds ratios (ORs) of P16 hypermethylation were obtained from tumor tissues and non-tumorous liver tissues of HCC patients (OR 5.69, 95% CI: 3.96% - 8.19%), tumor tissues of HCC patients and healthy liver tissues of healthy person (OR 12.18, 95% CI: 2.56% - 58.03%). **Conclusion** Hypermethylation of APC and P16 caused gene inactivation, and may contribute to the development of HCC.

【Key words】 HCC; P16; APC; methylation; meta-analysis

肝细胞癌是目前肝癌中最常见的恶性肿瘤之一,且发病率和病死率还在迅速增长。近年的研究表明,表观遗传学在肝癌的形成过程中具有重要的作用。与人类疾病有关的表观遗传学过程主要有:DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑、基因组印记等。近年有关 DNA 甲基化与肝癌关系的研究很多^[1-13],本研究采用 Meta 分析综合评价了 APC、P16 基因甲基化与肝细胞癌(HCC)关系的文献,以期对临床提供指导依据。

1 资料与方法

1.1 文献检索 以“DNA methylation and hepatocellular carcinoma”为检索词,检索 1978 年 1 月至 2011 年 12 月在 Medline、Pubmed 等数据库发表的文献,检索语种为英语。以“DNA 甲基化与肝细胞癌”为检索词,检索 1994 年 1 月至 2011 年 12 月在 CNKI 和万方数据库、1999 年 1 月至 2011 年 12 月的优秀硕士论文、博士论文等文献,检索语种为汉语。为避免漏查,对检索到的相关文献中的参考文献进行补充检索。

1.2 文献纳入标准 (1)研究主题:APC、P16 基因甲基化与 HCC 的关系;(2)研究对象:研究对象为人群,研究设计为病例对照研究,病例组均由细胞学或病理学确诊为 HCC 患者,对照组为经病理证实为良性肝疾病的患者或健康人;(3)研究方法相似,DNA 甲基化检测采用甲基化特异 PCR 方法;(4)能获得全文且综合的统计指标:有效率的比值比(OR)。

得全文且综合的统计指标:有效率的比值比(OR)。

1.3 文献排除标准 对文献进行质量评价,对不符合纳入标准的一律排除,剔除标准:(1)重复发表的论文;(2)动物实验研究、综述及讲座;(3)数据不全,不能提取统计学内容的研究。

1.4 资料提取 提取文献中的基本数据,包括作者、发表时间、原始的样本量和阳性结果。按照 Meta 分析的要求整理数据,建立数据库,并核校数据。

1.5 统计学方法 采用 RevMan 5.0 软件对资料进行统计分析,计算合并 OR 及 95%CI。对 OR 值进行异质性检验。

2 结 果

2.1 经过文献检索,符合纳入标准的共有 16 篇^[1-13],有关 APC 的论文提取出 6 篇,P16 的提取出 8 篇,2 篇论文有重复者。有关 APC 的论文中病例组 HCC 患者肿瘤组织 488 例,对照组共 434 例,其中 HCC 癌旁组织 390 例,非肿瘤肝病组织 21 例,健康人组织 23 例;有关 P16 的论文中病例组 HCC 患者肿瘤组织 400 例,对照组共 437 例,其中 HCC 癌旁组织 398 例,非肿瘤肝病组织 21 例,健康人组织 18 例。

2.2 APC 基因甲基化与 HCC 关系的资料以及 Meta 分析结果

2.2.1 APC 基因在 HCC 肿瘤组织和 HCC 癌旁组织中的甲

基化 8 个研究^[1-6]实验组与对照组对 APC 基因甲基化与 HCC 的关系进行了比较, HCC 肿瘤组织 488 例, HCC 非肿瘤组织 390 例, 其中 300 例 (61.5%) 肿瘤组织和 98 例 (25.1%) 非肿瘤组织发生了甲基。Meta 分析显示, HCC 肿瘤组与非肿瘤组 APC 基因甲基化异质性检验结果表明有异质性 ($P < 0.01, I^2 = 71\%$, 见表 1), 则采用随机效应模型分析, 得到合并的 $OR = 5.91, 95\%CI: 4.20\% \sim 8.31\%$, 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2.2 APC 在 HCC 肿瘤组织和健康人组织中的甲基化 3 个研究^[5-6]实验组与对照组对 APC 基因甲基化与 HCC 的关系进行了比较, HCC 肿瘤组织 137 例, 健康人组织 23 例, 其中 101 例 (73.7%) 肿瘤组织和 0 例 (0%) 正常组织发生了甲基化。Meta 分析显示, HCC 肿瘤组与正常组织组 $OR = 35.19, 95\%CI: 6.00\% \sim 206.33\%$, 异质性检验结果显示没有异质性 ($P > 0.05, I^2 = 0\%$), 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 P16 基因甲基化与 HCC 关系的资料以及 Meta 分析结果

表 1 纳入的文献及数据

项目	作者	发表时间	HCC 组/对照组	n	国家	平均年龄(岁)	性别(男/女)	
APC	邱东民	2011	肿瘤/非肿瘤/健康人	47/47/8	中国	27~78	36/11	
	娄诚	2008	肿瘤/非肿瘤/肝硬化/肝炎/健康人	60/60/16/5/5	中国	22~75	不详	
	袁卫平	2010	肿瘤/非肿瘤	61/61	中国	23~69	51/10	
	吴龙	2008	肿瘤/非肿瘤/健康人	30/30/10	中国	50	24/6	
	张慧景	2010	肿瘤/非肿瘤	97/26	中国	55.69±10.21	81/16	
	Eric J	2010	肿瘤/非肿瘤	43/45	中国	66.20±8.10	37/12	
	S Nomoto	2007	肿瘤/非肿瘤	108/102	中国	52.80±7.56	85/23	
	Ji-Bin Liu	2011	肿瘤/非肿瘤	42/19	中国	不详	不详	
	P16	邱东民	2011	肿瘤/非肿瘤/健康人	47/47/8	中国	27~78	36/11
		陈祥锦	2005	肿瘤/非肿瘤	25/25	中国	46	20/5
杨卫富		2006	肿瘤/非肿瘤	25/25	中国	不详	不详	
娄诚		2008	肿瘤/非肿瘤/肝硬化/肝炎/健康人	60/60/16/5/5	中国	22~75	不详	
张艳玲		2002	肿瘤/非肿瘤	33/33	中国	46.5	21/12	
刘建余		2002	肿瘤/非肿瘤/健康人	20/20/2	中国	36~69	16/4	
刘平果		2006	肿瘤/非肿瘤	35/35	中国	49	31/4	
刘文姬		2006	肿瘤/非肿瘤	50/48	中国	28~76	48/4	
YangQin		2004	肿瘤/非肿瘤/健康人	20/20/3	中国	不详	不详	
Lan-LShen		2002	肿瘤/非肿瘤	85/85	中国/英国/美国	不详	不详	

2.3.1 P16 基因在 HCC 肿瘤组织和 HCC 癌旁组织中的甲基化 10 个研究^[5-13]实验组与对照组对 P16 基因甲基化与 HCC 的关系进行了比较, HCC 肿瘤组织 400 例, 癌旁组织 398 例, 其中 180 例 (45.0%) 肿瘤组织和 54 例 (13.6%) 非肿瘤组织发生了甲基化。Meta 分析显示, HCC 肿瘤组与癌旁组织组 $OR = 5.69, 95\%CI: 3.96\% \sim 8.19\%$, 异质性检验结果显示没有异质性 ($P = 0.05, I^2 = 47\%$), 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3.2 P16 在 HCC 肿瘤组织和健康人组织中的甲基化 4 个研究^[5-7,13]实验组与对照组对 P16 基因甲基化与 HCC 的关系进行了比较, HCC 肿瘤组织 147 例, 健康人组织 18 例, 其中 80 例 (54.4%) 肿瘤组织和 0 例 (0.0%) 健康人组织发生了甲基化。Meta 分析显示, HCC 肿瘤组与健康人组织组 $OR = 12.18, 95\%CI: 2.56\% \sim 58.03\%$, 异质性检验结果显示没有异质性 ($P = 0.05, I^2 = 0\%$), 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 发表性偏倚评估 显示本研究受发表性偏倚影像程度较小, 结论较可靠。

2.5 敏感性分析 分别在上述 2 项观测指标的 Meta 分析中逐一剔除单个独立研究时, 剔除前后结果差异无统计学意义。

3 讨论

本研究评价结果显示, 以筛选出的 15 篇论文为依据, 荟萃分析直观地评价了 APC、P16 基因高甲基化与 HCC 的关系。对 APC 基因甲基化与 HCC 关系的研究分析, HCC 组与癌旁组织组合并的 OR 值为 5.91, $95\%CI$ 为 4.20%~8.31%, $P < 0.01$, 可以认为病例组与癌旁组的 APC 基因甲基化例数不同, 病例组/对照组 $95\%CI > 0\%$ 。同时 HCC 肿瘤组与正常组织组 $OR = 35.19, 95\%CI: 6.00\% \sim 206.33\%$, 异质性检验结果显示没

有异质性 ($P > 0.05, I^2 = 0\%$), 表明 HCC 肿瘤组织与正常组织的 APC 基因甲基化差异具有统计学意义, 说明无论是对于癌旁组织组, 还是正常组织组, HCC 组 APC 基因甲基化均大于对照组, 进一步证实了 APC 基因甲基化与 HCC 间的密切关系。有关 P16 基因甲基化与 HCC 关系分析, HCC 组与癌旁组织组的 OR 值为 5.69, $95\%CI$ 为 3.96%~8.19%, 可以认为病例组与癌旁组的 APC 基因甲基化例数不同, 病例组/对照组 $95\%CI > 0\%$ 。同时 HCC 肿瘤组与正常组织组 OR 为 12.18, $95\%CI: 2.56\% \sim 58.03\%$, 异质性检验结果显示没有异质性 ($P > 0.05, I^2 = 0\%$), 证实 P16 基因甲基化与 HCC 间存在密切关系。

由于 Meta 分析属于观察性研究, 在设计、资料收集、统计分析过程中必然存在着偏倚, 本文只纳入了中英文文献, 且最终纳入的文献均来自于中国、英国及美国。未检测到其他国家类似的研究, 是本研究的局限性; HCC 的发生是一个多基因、多阶段的复杂过程, 2 项肿瘤标志物仅能提供有限的信息, 联合多项指标可以弥补数个标志物信息不足。APC、P16 基因高甲基化对照组中有 7 篇文章涉及了肝硬化患者和健康人, 但是由于数据不足, 对于对照组中的肝硬化患者和实验组 HCC 患者没有作出区分和比较, 容易发生选择性偏倚或部分核实偏倚。

HCC 的 APC、P16 基因甲基化可能与多种因素有关。袁卫平等^[4]研究发现 P16 基因高甲基化与肝细胞癌 TNM 分期及分化程度密切相关, 肿瘤组织分化程度差, 分期晚的 HCC 患者出现 P16 基因甲基化的频率更高。但由于入选研究资料并未全都进行病理分型、临床分型及生活习惯史等相关资料, 因此未能够进一步分析 APC、P16 基因甲基化与 HCC 关系的研究, 这也可以作为以后的研究方向进一步深入研究。

总之, APC、P16 基因甲基化与 HCC 有(下转第 2702 页)

自动血细胞分析仪的精密度、线性范围、携带污染率、可比性等项目的性能检测发现,本机自动冲洗系统良好,携带污染率均小于 1.00%符合 ICSH 所公布的标准要求;各指标批内精密度和总重复性满足 1/4 CLIA'88 标准要求,批间精密度均满足 1/3 CLIA'88 标准要求;与 Sysmex XE-2100 以及奥菲 Mytic 22 全自动血细胞分析仪测定结果比对分析,相关性较好, $r \geq 0.975$,同时对结果进行配对 t 检验,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),由此证明以上指标的检测结果可信性度高。

WBC 五分类结果与显微镜目测法进行统计分析,中性粒细胞和嗜酸性粒细胞相关系数最好,淋巴细胞和单核细胞次之,嗜碱性粒细胞较差,进行样本均数检验,嗜碱性粒细胞差异有统计学意义,其余项目差异无统计学意义。嗜碱性粒细胞差异有统计学意义,分析其原因可能与血液中嗜碱性粒细胞比例特别低有关。需要指出的是目前的血液细胞分析仪无论是采用电阻法或激光技术还是其他技术检测细胞形态和分类,均不能完全代替显微镜目测观察的结果^[7]。因此,现阶段所有仪器对 WBC 分类结果仍然是“筛选”^[8]。特别是白血病细胞、单核细胞、非典型淋巴细胞,只有根据细胞体积,染色后细胞质颜色、胞浆情况、胞核结构、染色质特点等进行综合分析,才能得出准确的结果^[9]。

Mindray BC-5200 全自动血细胞分析仪对 WBC、RBC 及 PLT 的指标总数可信度较高,一般不需手工复检,在白细胞分类方面是否需要手工复检,必须根据国际临床标准化委员会提出的 41 条血片复检要求进行^[10]。综上所述,各项评价试验均达到国际临床标准化委员会制定的评价标准要求,能满足临床诊断预后及治疗的需要。

参考文献

[1] Guideline for the evaluation of blood cell analyzers inclu-

(上接第 2699 页)

密切的关系,对 HCC 有临床指导意义,随着甲基化技术的进步,检测水平的不断提高,试验设计的不断完善,Meta 分析将对其作出更准确的评价,以指导其临床应用。

参考文献

[1] Eric J, Masato T, Hideki F, et al. Comparative analysis of pr-omoter methymethylation and gene expression end-points between tumorous and non-tumorous tissues from HCV-positive patients with hepatocellular carcinoma[J]. Mutat Res, 2010, 692(1/2): 26-33.

[2] Liu JB, Zhang YX, Zhou SH, et al. CpG island methylator phenotype in plasma is associated with hepatocellular carcinoma prognosis [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(42): 4718-4724.

[3] Nomoto S, Kinoshita T, Kato K, et al. Hypermethylation of multiple genes as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma [J]. Br J Cancer, 2007, 97: 1260-1265.

[4] 袁卫平, 吴飞翔, 黄山, 等. 肝细胞癌中 APC 基因启动子甲基化及蛋白表达的研究[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(9): 1795-1797.

[5] 邱东民, 余坚, 黄朝晖. MSRE-qPCR 技术分析多基区 DNA 甲基化对肝细胞癌的诊断价值[J]. 中国癌症杂志, 2011, 21(8): 616-620.

[6] 娄诚, 杨斌, 高英堂, 等. 肝细胞癌多基因甲基化异常及其

ding those used for differential leukocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. International Council for Standardization in Hematology; prepared by the IC-SH Expert Panel on Cytometry [J]. Clin Lab Haematol, 1994, 16(2): 157-174.

[2] 丛玉隆. 血液学体液学检验与临床解释[M]. 北京: 人民军医出版社, 2004: 294-298.

[3] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 133.

[4] 卢兴勇, 丛玉隆. 应重视和提升传统血液形态学检验水平[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(5): 481.

[5] 顾光煜. 临床化学自动分析的携带污染与解除[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(6): 401-403.

[6] 邓芳, 张丽平. Sysmex XT-2000 血细胞分析仪的应用评价[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(20): 1739-1740.

[7] 顾可梁. 使用血液细胞分析仪有关问题解答[J]. 临床检验杂志, 2000, 18(1): 58-59.

[8] 丛玉隆, 李艳. 加强形态学临床检验专家座谈会纪要[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(2): 147-148.

[9] 朱忠勇. 临床血液学实验室诊断进展[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(12): 16-17.

[10] 陈宏础, 王祖琴, 张莉萍, 等. Sysmex XE-2100 全自动血细胞分析仪显微镜复检规则的建立及评价[J]. 重庆医学, 2009, 38(19): 2418-2420.

(收稿日期: 2012-06-29)

临床意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2008, 30(11): 831-836.

[7] Qin Y, Liu JY, Li B, et al. Association of low p16INK4a and p15INK4b mRNAs expression with their CpG islands methylation with human hepatocellular carcinoma genesis [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(9): 1276-1280.

[8] Shen LL, Ahuja N, Shen Y, et al. DNA Methylation and Environmental exposures in Human Hepatocellular Carcinoma [J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94: 755-761.

[9] 陈祥锦, 张惠灏, 郑炜, 等. 肝细胞癌 P16 基因甲基化及其对 mRNA 表达的影响[J]. 中国癌症杂志, 2005, 15(6): 569-571.

[10] 杨卫富, 李德春, 朱兴国. 肝细胞癌病人血清中 GSTP1、p16 基因启动子甲基化的检测[J]. 中华肝胆外科杂志, 2006, 12(10): 712-713.

[11] 张艳玲, 肖文华, 张艳梅, 等. 肝细胞癌中 P16 基因及其甲基化的检测与意义[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(10): 1182-1184.

[12] 刘建余, 覃扬, 李波, 等. 人原发性肝癌中 P16 基因表达及 CpG 岛甲基化状态的研究[J]. 华西医科大学学报, 2002, 33(4): 540-543.

[13] 刘平果, 王效民, 李永国, 等. 原发性肝细胞癌病人血浆 P16 甲基化的意义[J]. 中华肝胆外科杂志, 2006, 12(6): 384-386.

(收稿日期: 2012-06-11)