

银屑病患者外周血中 p16 基因甲基化的检测

张 杰(湖北省襄阳市襄州区人民医院皮肤科 441000)

【摘要】 目的 检测斑块型银屑病患者外周血单个核细胞(PBMCs)中 p16 基因启动子甲基化的状态,探讨 p16 基因甲基化的检测在斑块型银屑病发病中的作用和机制。**方法** 收集 2011 年 4 月至 2012 年 5 月该院门诊和住院 48 例斑块型银屑病患者(实验组)和 18 例健康者(对照组)的外周血单个核细胞(PBMCs),采用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)检测 PBMCs 中 p16 基因甲基化的状态,并分析 p16 基因甲基化与患者病程和银屑病皮损面积和严重程度指数(PASI)评分的关系。**结果** 斑块型银屑病患者 PBMCs 中 p16 基因甲基化状态(31.3%)明显高于对照组(5.6%),差异具有统计学意义($\chi^2=4.71, P<0.05$),且与 PASI 评分之间差异具有统计学意义($t=2.63, P<0.05$),而与患病病程之间差异无统计学意义($t=0.55, P>0.05$)。**结论** 斑块状银屑病患者 PBMCs 中 p16 基因呈高甲基化比例明显增高状态,可能参与斑块状银屑病的发病机制。

【关键词】 银屑病; p16 基因; 甲基化

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.22.033 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)22-3006-02

Detection of p16 gene methylation of peripheral blood in patients with plaque psoriasis ZHANG Jie (Department of Dermatology, Xiangzhou District People's Hospital, Xiangyang, Hubei 441000, China)

【Abstract】 Objective To detect the methylation of p16 gene promoter in peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) in patients with plaque psoriasis and to research its function and mechanism in the pathogenesis of plaque psoriasis. **Methods** From 2011.4 to 2012.5 collected and tested the PBMCs from 48 plaque psoriasis patients (experiment group) and 18 healthy controls (control group), and detected the methylation of p16 gene promoted in PBMCs with methylation specific PCR (MSP), and analyzed the relationship between p16 gene methylation and course of disease and PASI credits. **Results** The rates of p16 gene methylation (31.3%) in psoriatic patients was higher compared with the controls (5.6%) ($\chi^2=4.71, P<0.05$) and demonstrated significant difference and significantly coincident with PASI ($t=2.63, P<0.05$), but there was no significant difference compared with course of disease ($t=0.55, P>0.05$). **Conclusion** The rates of p16 gene methylation in PBMCs in plaque psoriasis patients was significantly higher than the controls, and it suggests that the hyper-methylation of p16 gene may play an important role in the pathogenesis of plaque psoriasis.

【Key words】 psoriasis; p16 gene; methylation

银屑病发病机制较为复杂,研究表明,某些基因启动子区域的异常甲基化可能参与了银屑病的发生以及发展过程。基因 p16 也称之为 CDKN2A,是一种重要的抑癌基因,也是细胞周期依赖性激酶抑制因子基因家族重要成员之一。作为一种细胞周期中的基本基因,p16 基因可以直接参与细胞周期的调控,负调节细胞增殖及分裂。该基因启动子区域异常甲基化常与肿瘤的发生和异常性免疫性疾病有关。为研究 p16 基因甲基化在斑块型银屑病发病中的作用和机制,本研究采用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)检测斑块状银屑病患者以及健康者外周血单个核细胞(PBMCs)中 p16 基因的甲基化状态,进而为了解银屑病的发病机制提供一定的实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 4 月至 2012 年 5 月本院皮肤科住院和门诊 48 例斑块状银屑病患者乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝外周血标本 5 mL(实验组),患者中男 30 例,女 18 例,平均(41.5±15.6)岁,病程 4~362 个月,平均(136.7±80.4)个月;所有患者根据银屑病皮损面积和严重程度指数(PASI)评分进行评估得分,PASI 评分为 6.5~37.9 分,平均得分(19.5±6.9)分;另收集健康体检人员 EDTA-K₂ 抗凝外周血标本 18 例(对照组),平均年龄(39.9±16.4)岁。实验组与对照组的年龄等一般资料比较差异无统计学意义($P>$

0.05),具有可比性。所有患者均经病理组织学和临床症状明确诊断,并且病例资料完整,并且采集标本前 1 个月未系统或局部使用糖皮质激素或其他免疫抑制剂。所有标本收集前均签署知情同意书。

1.2 主要试剂和仪器 淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品有限公司),DNA 抽提试剂盒(北京天根生物有限公司),PE7000(ABI 公司),甲基化试剂盒(北京天漠科技开发有限公司),G-BOX 紫外凝胶成像系统(Gene 公司),721 紫外分光光度计(北京六一仪器公司),聚合酶链反应(PCR)试剂盒与 DNA 分子量 marker(上海生物工程技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 PBMCs 的分离 采用密度梯度离心法获取 PBMCs,并在末次离心后,弃去上清液,用 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞。取 10 μ L 细胞混悬液与 990 μ L PBS 混匀,并将稀释后的细胞悬液与等体积的 0.2% 台盼蓝混染后冲池,计数 4 个大方格细胞总数,并根据下列公式计算出单个核细胞浓度。单个核细胞浓度(细胞数/1 mL 细胞悬液)=4 个大方格内细胞总数 $\times 10^6 \times 2/4$ 。并根据所得的细胞数量分装到 EP 管中,−80℃冰箱保存备用。

1.3.2 PBMCs 中 DNA 的提取及转化 DNA 的提取根据 DNA 抽提试剂盒说明书进行,提取后的基因组 DNA 用分光

光度计进行比色后,测定其浓度和纯度,-20℃保存备用。

1.3.3 PBMCs 中 DNA 的转化 DNA 的转化按照甲基化试剂盒步骤进行,经变性、碱基修饰、脱盐后回收再脱去磺化基团等步骤,转化后的 DNA -80℃低温保存或直接进行 PCR 扩增。

1.3.4 p16 基因扩增引物的设计与合成 p16 甲基化 M 和非甲基化 U 引物根据参考文献[1]设计并合成。p16-M: 5'-TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC-3'(forward), 5'-GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA-3'(reverse), 扩增产物片段长度为 150 bp; p16-U: 5'-TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT-3'(forward), 5'-CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A-3'(reverse), 扩增产物片段长度为 151 bp; 引物合成由北京赛百盛生物技术有限公司完成。

1.3.5 MSP 扩增 MSP 反应体系 25 mmol/L Mg²⁺ 2.0 μL、2 mmol/L dNTP 1.5 μL、5 U/μL Taq 0.5 μL、DNA Sample 5 μL、10×Buffer 2.5 μL、上下游引物各 1 μL、用无菌水补齐体积共 25 μL。PCR 扩增在 PE7000 PCR 仪上进行,扩增条件如下:95℃ 12 min,95℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 60 s,35 个循环;72℃ 10 min。

1.3.6 结果判断 取 8 μL PCR 扩增产物进行 20 g/L 琼脂糖、100 V 电压电泳,并在泳道的一侧加入 150 bp DNA marker,在指示剂位于加样空 2/3 处时切断电源,紫外线下观察 150 bp、151 bp 处出现特异性目的条带为阳性,并在紫外凝胶成像系统中照相分析结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计数资料用率(%)表示,采用χ²检验,计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

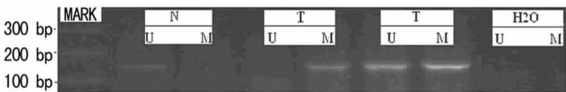
2.1 实验组和对照组中 p16 基因甲基化状态 实验组 48 例 PBMCs 中 p16 基因甲基化的检出率为 31.3%(15/48),对照组 18 例 PBMCs 中 p16 基因甲基化的检出率为 5.6%(1/18),差异有统计学意义(χ²=4.71,P<0.05)。

2.2 实验组中 p16 基因异常甲基化与 PASI 评分、病程的关系 根据实验组 PBMCs 中检测的 p16 基因甲基化阳性和阴性结果,将患者分为阳性组和阴性组,对 PASI 评分、病程进行分析,发现 p16 基因甲基化与 PASI 评分之间差异有统计学意义(P<0.05),而与患者的病程之间差异无统计学意义(P>0.05)。见表 1。

表 1 实验组 PMBCs 中 p16 甲基化与病程、PASI 评分的关系($\bar{x} \pm s$)

组别	n	病程(个月)	PASI 评分(分)
阳性	15	178.7±115.8	23.0±11.0
阴性	33	158.7±117.8	15.6±8.1
t	—	0.55	2.63
P	—	0.58	0.01

注:—表示无数据。



注:N 为对照组;T 为实验组;U 为非甲基化;M 为甲基化。

图 1 p16 基因异常甲基化电泳结果

2.3 实验组与对照组中 p16 基因启动子异常甲基化电泳结果 为判断扩增产物的特异性,将扩增产物经 20 g/L 的琼脂糖

凝胶电泳后,甲基化与非甲基化产物在 150、151 bp 处分别出现特异性目的条带,见图 1。

3 讨 论

有研究表明,在银屑病患者表皮角质形成细胞中 p16 蛋白的表达降低,并且在人卵巢颗粒细胞瘤中 p16 也呈明显表达降低,导致这种情况具体的原因尚不很明确^[2-3]。而 DNA 启动子异常高甲基化是导致基因表达降低的主要机制之一,并且在某些情况下是唯一的机制。研究表明,一些自身免疫性疾病中常常会发生 CD4⁺ 细胞中许多自身免疫相关基因的甲基化^[4-7],揭示 DNA 甲基化与自身免疫性疾病之间存在有某种关联;并且前期研究也发现在银屑病的皮损组织中也检测出了 p16 基因的高甲基化^[8],而在 PMBCs 中 p16 基因异常甲基化的研究较为少见。本文为从细胞的表现遗传学水平上了解银屑病的发病机制提供一定的理论基础。

有研究表明,PBMCs 在银屑病发病初期发挥着重要的作用。而 DNA 甲基化也是一种未涉及基因序列改变早期的化学修饰,本研究中实验组中 PBMCs 中 p16 基因异常甲基化要高于正常对照组,表明在斑块状银屑病患者 PBMCs 中确实存在有 p16 基因的异常高甲基化。这表明 PBMCs 中 p16 基因的异常甲基化可能在银屑病发病的早期发挥着极其重要的作用。可能正是由于 p16 基因的高甲基化,丧失了 G₁ 期的阻滞调控作用而导致了细胞过度增殖,而细胞的增殖活化,并向皮损部位趋化聚集又在银屑病皮损的炎症过程中起到重要作用。这也进一步说明了 p16 基因的高甲基化可能在银屑病所致皮损的发病机制中起到一定的作用。

本研究的对照组 PBMCs 中检测出了 1 例 p16 基因的高甲基化状态,表明该基因的异常甲基化不是斑块状银屑病所特有的。在实验组中甲基化阳性的 PASI 评分要高于甲基化阴性,提示了疾病的严重程度可能与 p16 基因的异常甲基化没有直接的相关性,导致的基因异常甲基化的原因还需要做进一步的研究。但就目前的研究表明,无论是斑块型银屑病的皮损组织还是 PMBCs 中均可以检测出较高的 p16 基因的异常甲基化状态,说明 p16 基因的异常甲基化可能参与了疾病的发生。

参考文献

[1] 李海平,张吉才,范金波,等.乙型病毒性肝炎和肝硬化患者外周血血 p16 启动子异常甲基化分析[J].中华检验医学杂志,2008,31(2):182-183.

[2] 陆前进,卢放根,颜兰香,等.银屑病患者皮损中 CDK4 和 p16 蛋白的表达[J].中华皮肤科杂志,1998,31(2):104-105.

[3] 梁晓艳,姚汉武,宋志宇,等.p16 和 cyclin D2 在卵巢颗粒细胞瘤中的表达及临床意义[J].检验医学与临床,2010,7(7):607-610.

[4] Lu Q,Kaplan M,Ray D,et al. Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum,2002,46(5):1282-1291.

[5] OelkeK, Lu Q, Richardson D, et al. Overexpression of CD70 and overstimulation of IgG synthesis by luPus T cells and T cells treated with DNA methylation inhibitors [J]. Arthritis Rheum,2004,50(6):1850-1860.

[6] Kaplan M,Lu Q,Wu A,et al. Demethylation of promoter regulatory elements contributes to perform overexpression in CD4⁺ lupus T cells[J]. J Immunol,(下转第 3010 页)

高,为89.39%,抗-HIV 检测试剂特异性较差。从 2011 年 6 月开始检验科所用的北京万泰 HIV 检测试剂孵育时间延长后,抗-HIV 检测试剂的特异性明显提高,假阳性率降低为 2011 年 60.61%、2012 年 50.00%。HIV 检测试剂假阳性率的降低减少了血站正常血液的报废,减少了市 CDC 确认实验的工作量,减少了业务科同志对无偿献血者所做的解释工作,节约成本。

检测灰区不合格率为 0.16%,是排第 6 位的原因。关于 ELISA 检测灰区的设置多篇报道对此进行了讨论,报道中一致的看法是设置 ELISA 检测灰区是必要的,只是对于检测灰区的设置范围看法有所不同^[16-19]。本站检验科从 2011 年 11 月开始设置灰区异常淘汰项目,因为所有检测值 S/CO≥1 的标本按照规定都要进行双孔复试,复试结果 S/CO≥1 的标本都判为阳性,所以检验科对于复试结果 S/CO≥1 的标本判为阳性,不作灰区判定。检验科对 0.8≥S/CO≤1 的标本进行了双孔复试,复试值国产试剂 S/CO≥0.5 判为灰区不合格,进口试剂 S/CO≥0.7 判为灰区不合格。这样设置的原因是因为索灵试剂和伯乐试剂显色剂本底较高,索灵试剂阴性标本 S/CO 值常处于 0.4~0.6,伯乐试剂阴性标本 S/CO 值常处于 0.2~0.4,而国产试剂显色剂本底较低,阴性标本 S/CO 值常处于 0.0~0.1。双孔复试后标本 S/CO 值国产试剂仍然大于 0.5、进口试剂仍然大于 0.7,可以排除检测过程中偶然因素“花板”造成的 S/CO 值假性升高,判为检测灰区不合格。2012 年检测灰区不合格共 238 例,异常率为 0.78%,高于 HBsAg 0.73%的不合格率,是 2012 年排第 3 位的不合格原因。本研究表明,检测灰区不合格标本构成中抗-HCV 103 例(43.28%)居首位,HBsAg 97 例(40.76%)次之,两者共占灰区标本的 84.04%。由于本站检验科尚未开展核酸检测,所以没有对以上灰区不合格标本进行核酸确认,无法确定这些标本中真阳性的比率。但笔者认为,对检测灰区标本进行双孔复试既可以防止弱阳性标本的漏检,又可以避免偶然因素“花板”造成 S/CO 值异常导致的血液报废。

综上所述,采血前开展 ALT 快速检测能有效降低检测不合格率;可考虑采血前金标法快速检测抗-TP 以降低梅毒阳性率;设置灰区即可以防止弱阳性标本的漏检,又可以避免偶然因素“花板”造成 S/CO 值异常导致的血液报废;抗-HIV 检测试剂特异性提高,节约了大量社会成本。

参考文献

[1] 毛瑞. 2005~2010 年拉萨地区无偿献血者血液检测结果分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(8): 975-976.
[2] 严凤好, 钟展华, 曾少丽. 惠州无偿献血者血液检测结果分析[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(1): 25-26.
[3] 刘志强. 2005~2010 年青海省海西州无偿献血者血液检测结果分析[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(1): 49-50.
[4] 黄斯瑜, 李尔凡. 2004~2010 年曾城市无偿献血者血液检测结果分析[J]. 国际医药卫生导报, 2012, 18(9): 1361-

1363.
[5] 蔡澍, 罗均, 周平, 等. 湛江市无偿献血者血液检测结果分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(13): 1600-1601.
[6] 余明超, 严莉, 蔡小月, 等. 2008~2011 年重庆市江津区无偿献血者血液检测结果分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(20): 2590-2593.
[7] 王会英, 李宏. 2007~2011 年安康地区无偿献血者血液检测结果分析[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(5): 141-142.
[8] 刘丽, 张霞, 于琦. 2007~2011 年青岛市无偿献血者血液检测结果分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(19): 2459-2460.
[9] 邱仓文, 姜莹, 袁婷, 等. 2008~2010 年南宁地区无偿献血者血液检测结果分析[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(12): 1075-1076.
[10] 周世乔, 杨春晖, 刘建, 等. 遵义市 2006~2010 年无偿献血者血液检测结果分析[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(11): 979-980.
[11] 马文华, 付辉. 2005~2011 年新疆昌吉地区无偿献血者血液检测结果分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(20): 2626-2627.
[12] 李莉, 惠永庆, 樊晶. 2006~2010 年天津市无偿献血者血液检测结果分析[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(1): 48-49.
[13] 张金桢, 李娟. 银川地区 2006~2010 年无偿献血者血液报废下降原因分析[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(11): 984-985.
[14] 舒堃, 刘香云. 2008~2011 年保定市无偿献血者血液检测结果分析[J]. 中国误诊学杂志, 2012, 12(15): 3885-3886.
[15] 陈辉. 2008~2010 年某地区无偿献血者血液检测结果分析及对策[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(21): 2542-2543.
[16] 刘胡敏, 陶传敏, 徐研, 等. HCV 检测技术现状及 ELISA 检测灰区设置的意义[J]. 中国误诊学杂志, 2012, 12(10): 2285-2286.
[17] 陈霞, 黄丽丽, 姜标. ELISA 法检测 HBsAg 灰区设置的探讨[J]. 临床输血与检验, 2011, 13(1): 63-66.
[18] 杨卫华, 王燕宁, 曹明玉, 等. ELISA 法用于患者输血前检测 TP 设置灰区的意义[J]. 西北国防医学杂志, 2010, 31(4): 292.
[19] 甘新宇, 杨洋, 于丽君, 等. ELISA 检测抗-HCV 抗体灰区设置的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(11): 1405-1406.

(收稿日期: 2013-04-20 修回日期: 2013-07-05)

(上接第 3007 页)

2004, 172(6): 3652-3661.
[7] Katsiari CG, Liossis SN, Dimopoulos AM, et al. CD40L overexpression on T cells and monocytes from patients with systemic lupus erythematosus is resistant to calci-

neurin inhibition[J]. Lupus, 2002, 11(6): 370-378.
[8] 张杰. 银屑病患者 CDKN2A 甲基化状态的研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2012, 26(2): 130-132.

(收稿日期: 2013-04-26 修回日期: 2013-06-12)