

宫颈脱落细胞 DKK-3 基因甲基化在宫颈癌中的意义

胡玲¹, 姜玲¹, 胡姣¹, 张婧^{2△} (1. 武汉市青山区第一医院妇产科 430080; 2. 湖北省襄阳市中心医院妇产科 441021)

【摘要】 目的 检测宫颈脱落细胞 Dickkopf 相关蛋白 3(DKK-3)基因启动子甲基化并研究其在宫颈癌中的临床意义。方法 选择宫颈癌患者(CER组)和健康女性(CON组)为研究对象,采用甲基化特异性 PCR(MSP)检测两组研究对象宫颈脱落细胞 DKK-3 基因启动子甲基化,比较 DKK-3 基因启动子甲基化率在不同临床病理因素中的差异。结果 CER组宫颈癌患者宫颈脱落细胞 DKK-3 基因启动子甲基化率明显高于 CON组健康女性(53.8% vs. 0.0%, $P < 0.01$)。CER组宫颈癌患者宫颈脱落细胞 DKK-3 基因启动子甲基化率在 HPV 感染、组织学分级、肿瘤最大径、淋巴结转移、远处转移和国际妇产科联盟(FIGO)分期中的差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),有 HPV 感染、组织学分级高、肿瘤最大径大于或等于 4 cm、有淋巴结转移、有远处转移和 FIGO 分期晚的宫颈癌患者 DKK-3 基因启动子甲基化率明显高于无 HPV 感染、组织学分级低、肿瘤最大径小于 4 cm、无淋巴结转移、无远处转移和 FIGO 分期早的患者。结论 宫颈癌患者宫颈脱落细胞 DKK-3 基因启动子甲基化与 HPV 感染、组织学分级、肿瘤最大径、淋巴结转移、远处转移和 FIGO 分期有关,可用于评估宫颈癌的病情严重程度和预后。

【关键词】 宫颈癌; DKK-3; 甲基化

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.01.045 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)01-0110-02

目前对宫颈癌的发病机制尚未完全明确,研究表明其与抑癌基因的甲基化沉默有关,这些基因的甲基化率与宫颈癌的病情严重程度和预后紧密相关^[1-2]。Dickkopf 相关蛋白 3(DKK-3)是新近发现的抑癌基因,其甲基化沉默时导致失去对细胞周期的调控而发生癌变,与肿瘤的发生、进展与转归紧密相关^[3]。研究表明,在宫颈癌组织中可检测到 DKK-3 高甲基化状态^[4]。本研究检测宫颈癌患者宫颈脱落细胞 DKK-3 基因启动子甲基化状态,研究宫颈脱落细胞 DKK-3 基因启动子甲基化在宫颈癌中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 1 月至 2014 年 1 月诊治的宫颈癌患者为研究对象(CER 组)。纳入标准:(1)初治患者,既往未行化疗及手术治疗;(2)经临床表现、体格检查、影像学及病理组织学检查确诊;(3)排除合并严重心肺及其他肿瘤患者。共纳入 65 例研究对象,平均年龄(47.3±6.5)岁;病理类型为鳞状细胞癌 48 例,腺癌 11 例,腺鳞癌 6 例;国际妇产科联盟(FIGO)(2009 年)宫颈癌分期包括 I 期 10 例,II 期 28 例,III 期 17 例,IV 期 10 例。另以同期 50 例健康女性为对照(CON 组),平均年龄(47.5±7.1)岁。CER 组和 CON 组研究对象年龄差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 材料与试剂 宫颈脱落细胞获取:将宫颈刷在子宫颈外口与颈管交界处刷转,收集子宫颈脱落细胞,然后将宫颈涂片取样器放入装有特殊溶液的试管中,轻轻摇动,使取样器上的细胞标本洗脱在溶液中。DNA 提取试剂购自宝生物工程公司;引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;甲基化检测购于北京天漠公司。

1.3 DKK-3 基因启动子甲基化检测 根据 DNA 提取试剂操作说明提取 CER 组和 CON 组宫颈脱落细胞总 DNA。采用 MSP 法检测 DKK-3 基因启动子甲基化,引物序列参考 Ding 等^[5]文献报道序列。PCR 反应体系为 25 μ L,循环条件:95 $^{\circ}$ C

预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,63 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后检测。

1.4 统计学处理 采用 SigmaPlot11.0 统计软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DKK-3 基因启动子甲基化 CER 组 65 例宫颈癌患者宫颈脱落细胞检测到 35 例呈甲基化状态,甲基化率为 53.8%,CON 组 50 例健康女性中均未检测到甲基化状态,甲基化率为 0.0%,CER 组宫颈癌患者宫颈脱落细胞 DKK-3 基因甲基化率明显高于 CON 组健康女性($\chi^2 = 36.200, P < 0.01$)。

2.2 DKK-3 基因启动子甲基化与临床病理因素的关系 CER 组宫颈癌患者的宫颈脱落细胞 DKK-3 基因启动子甲基化率在年龄和病理类型中的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),在 HPV 感染、组织学分级、肿瘤最大径、淋巴结转移、远处转移和 FIGO 分期中的差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),有 HPV 感染、组织学分级高、肿瘤最大径大于或等于 4 cm、有淋巴结转移、有远处转移、FIGO 分期晚的宫颈癌患者 DKK-3 基因启动子甲基化率明显高于无 HPV 感染、组织学分级低、肿瘤最大径小于 4 cm、无淋巴结转移、无远处转移和 FIGO 分期早的患者。结果见表 1。

表 1 CER 组宫颈脱落细胞 DKK-3 基因启动子甲基化与临床病理因素关系

| 临床病理因素 | n | 甲基化[n(%)] | | χ^2 | P |
|--------|-----------|-----------|----------|----------|-------------|
| | | 甲基化 | 未甲基化 | | |
| 年龄(岁) | <50 | 35 | 18(51.4) | 17(48.6) | 0.029 0.863 |
| | ≥ 50 | 30 | 17(56.7) | 13(43.3) | |

△ 通讯作者, E-mail: mirror1219@sohu.com。

续表 1 CER 组宫颈脱落细胞 DKK-3 基因启动子甲基化与临床病理因素关系

| 临床病理因素 | | n | 甲基化[n(%)] | | χ^2 | P |
|---------|-------|----|-----------|----------|----------|-------|
| | | | 甲基化 | 未甲基化 | | |
| HPV 感染 | 阳性 | 50 | 31(62.0) | 19(38.0) | 4.462 | 0.035 |
| | 阴性 | 15 | 4(26.7) | 11(73.3) | | |
| 病理类型 | 鳞状细胞癌 | 48 | 26(54.2) | 22(45.8) | 0.039 | 0.980 |
| | 腺癌 | 11 | 6(54.5) | 5(45.5) | | |
| | 腺鳞癌 | 6 | 3(50.0) | 3(50.0) | | |
| 组织学分级 | I | 30 | 10(33.3) | 20(66.7) | 9.684 | 0.008 |
| | II | 22 | 15(68.2) | 7(31.8) | | |
| | III | 13 | 10(76.9) | 3(23.1) | | |
| 肿瘤最大径 | <4 cm | 28 | 10(35.7) | 18(64.3) | 5.289 | 0.021 |
| | ≥4 cm | 37 | 25(67.6) | 12(32.4) | | |
| 淋巴结转移 | 有 | 28 | 20(71.4) | 8(28.6) | 4.939 | 0.026 |
| | 无 | 37 | 15(40.5) | 22(59.5) | | |
| 远处转移 | 有 | 10 | 9(90.0) | 1(10.0) | 6.812 | 0.009 |
| | 无 | 55 | 26(47.3) | 39(70.9) | | |
| FIGO 分期 | I 期 | 10 | 2(20.0) | 8(80.0) | 15.759 | 0.001 |
| | II 期 | 28 | 11(39.3) | 17(60.7) | | |
| | III 期 | 17 | 13(76.5) | 4(23.5) | | |
| | IV 期 | 10 | 9(90.0) | 1(10.0) | | |

3 讨 论

基因甲基化是表观遗传学中 与碱基突变无关的转录前基因调控机制,甲基化 CG 结合甲基结合蛋白或自身结构可阻遏转录因子形成转录复合物从而调控基因表达,而基因甲基化主要集中在含 CpG 岛的基因启动子区域^[6]。研究表明,抑癌基因启动子甲基化沉默导致其失去对正常细胞增殖的调控而发生癌变,与肿瘤的发病机制、转归及预后密切相关,越来越多的研究表明抑癌基因启动子甲基化可用于肿瘤的病情及预后评估^[7-8]。DKK-3 基因属于 DKK 家族,为 Wnt 信号传导通路的抑制因子,具有促进细胞凋亡和调控肿瘤血管产生的功能,在消化系统肿瘤和呼吸系统肿瘤等可检测到其处于甲基化状态,且其甲基化率可反映病情严重程度和预后^[9]。目前对宫颈癌的发病机制尚未完全明确,研究表明其与抑癌基因的甲基化失活有关,随着研究的不断深入,越来越多的基因被发现参与宫颈癌的发生、发展^[10]。研究表明,宫颈癌组织中可检测到 DKK-3 基因启动子甲基化状态,其甲基化率明显高于正常组织^[4],因宫颈脱落细胞筛查宫颈癌较宫颈切除组织病理学更方便、快捷,检测宫颈脱落细胞 DKK-3 基因甲基化状态对宫颈癌的筛查更有临床价值。本研究表明宫颈癌患者宫颈脱落细胞 DKK-3 基因启动子甲基化率明显高于健康女性,证实 DKK-3 基因甲基化在宫颈癌发病机制中的作用。

目前公认的宫颈癌病情及预后的决定因素为组织学分级、肿瘤大小、淋巴结转移、远处转移和 FIGO 分期,组织分化程度

低、肿瘤越大、有淋巴结转移、有远处转移和 FIGO 分期晚的患者其生存期越差,此外,研究表明宫颈癌患者的生存质量同样与这些因素密切相关。本研究发 现宫颈癌患者的宫颈脱落细胞 DKK-3 基因启动子甲基化率在 HPV 感染、组织学分级、肿瘤最大径、淋巴结转移、远处转移和 FIGO 分期中的差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),有 HPV 感染、组织学分级高、肿瘤最大径大于或等于 4 cm、有淋巴结转移、有远处转移、FIGO 分期晚的宫颈癌患者 DKK-3 基因启动子甲基化率明显高于无 HPV 感染、组织学分级低、肿瘤最大径小于 4 cm、无淋巴结转移、无远处转移和 FIGO 分期早的患者。这些证据表明,与宫颈癌术后切除病理组织一样,宫颈脱落细胞 DKK-3 基因启动子甲基化与宫颈癌的病情及预后紧密相关,可作为其病情及预后评估的标志物。宫颈脱落细胞筛查宫颈癌较传统的宫颈活检更具有临床价值,同时可在术前提供客观证据,这点是传统的病理组织学无法企及的。

参考文献

- [1] 李琦,胡昌华,张婧,等. 宫颈脱落细胞 RASSF1A 基因甲基化在宫颈癌中的临床意义[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(12):1518-1519.
- [2] 李琦,胡昌华,万光华,等. 死亡相关蛋白激酶 1 基因启动子甲基化在宫颈癌中的临床意义[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(9):1101-1102.
- [3] 肖述兵,彭碧华,万金龙,等. Dkk-3 在原发性肝细胞癌的表达及其临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(16):1952-1953.
- [4] 沈婷,雷晓真,刘凌芝,等. 宫颈癌 DKK-3 基因启动子甲基化检测及其临床意义[J]. 中国当代医药, 2013, 20(35):87-88.
- [5] Ding Z, Qian YB, Zhu LX, et al. Promoter methylation and mRNA expression of DKK-3 and WIF-1 in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(21):2595-2601.
- [6] 左强强,郑威楠,张金莉,等. IFITM1 基因启动子甲基化与新疆维吾尔族妇女子宫癌的相关性[J]. 基础医学与临床, 2014, 34(1):58-61.
- [7] 巫剑红,田玉翠,万治安,等. 宫颈癌性别决定基因 9 基因启动子区甲基化水平检测对宫颈癌的价值研究[J]. 中国全科医学, 2013, 16(6):618-620.
- [8] 王宏,潘世扬,庞智睿,等. 子宫颈癌和 CIN 患者血浆 APC 和 RASSF1A 基因启动子甲基化检测的意义[J]. 中华妇产科杂志, 2013, 48(12):929-934.
- [9] 柯杨. Dkk-3 基因启动子甲基化在非小细胞肺癌中的临床研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2012.
- [10] 马冬,蔚岩,王艳,等. IL-10 基因启动子区 CpG 岛甲基化与宫颈癌的相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(12):1956-1959.