

DKK-3 基因甲基化在胃癌病情及预后评估中的价值

孔繁静(湖北省荆州市第二人民医院消化内科 434000)

【摘要】 目的 研究胃镜活检组织 Dickkopf 相关蛋白(DKK-3)基因甲基化在胃癌病情及预后评估中的价值。**方法** 采用甲基化特异性聚合酶链反应检测胃癌患者肿瘤组织、癌旁正常组织及健康人胃镜活检组织的 DKK-3 基因甲基化,比较不同临床病理因素中 DKK-3 基因甲基化的差异,分析 3 年生存率与 DKK-3 基因甲基化的关系。**结果** 观察组研究对象肿瘤组织 DKK-3 基因甲基化率显著高于癌旁正常组织和健康对照组研究对象正常组织,差异有统计学意义($P < 0.05$),DKK-3 基因甲基化率在癌旁正常组织和健康对照组研究对象正常组织差异无统计学意义($P > 0.05$)。观察组胃癌患者肿瘤组织中 DKK-3 基因甲基化率在性别、年龄、病变部位、肉眼形态、幽门螺杆菌感染和病理类型中差异无统计学意义($P > 0.05$),在分化程度、肿瘤直径、淋巴结转移、远处转移和 TNM 分期中差异有统计学意义($P < 0.05$)。DKK-3 基因甲基化胃癌患者 3 年生存率为 23.8%,未甲基化胃癌患者 3 年生存率为 52.6%,DKK-3 基因甲基化胃癌患者 3 年生存率显著高于未甲基化患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 胃癌患者胃镜活检组织 DKK-3 基因甲基化率越高则病情越重、预后越差,可作为胃癌病情及预后评估的标志物。

【关键词】 胃癌; 胃镜; Dickkopf 相关蛋白; 病情; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.09.029 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)09-1253-03

Value of DKK-3 gene methylation for evaluating disease condition and prognosis in gastric cancer KONG Fan-jing
(Department of Gastroenterology, Jingzhou Municipal Second People's Hospital, Jingzhou, Hubei 434000, China)

【Abstract】 Objective To study the value of Dickkopf-related protein-3(DKK-3) gene methylation by gastroscopy biopsy for evaluating the disease condition and prognosis in gastric cancer. **Methods** The methylation specific PCR was used to detect the DKK-3 gene methylation by gastroscopy biopsy in gastric cancer tissue, paracancerous normal tissue and healthy controls. The DKK-3 methylation rates were compared among different clinicopathological factors. **Results** The DKK-3 methylation rate in the tumor tissues of the observation group was significantly higher than that in the paracancerous normal tissues of the observation group and the healthy control group, the differences were statistically significant($P < 0.05$). The DKK-3 methylation rates had no statistical differences in the gender, age, lesion position, gross morphology, Hp infection and pathological type in the cancerous tissue of the observation group, but the differences in the differentiation degree, cancer diameter, lymph node metastasis, distant metastasis and TNM staging were statistically significant($P < 0.05$). The 3-year survival rate was 23.8% in the gastric cancer patients with DKK-3 methylation and 52.6% in the patients without DKK-3 methylation, which indicated that the 3-year survival rate in the patients with DKK-3 methylation was significantly lower than that without DKK-3 methylation, the difference was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** The higher the DKK-3 methylation rate by gastroscopy biopsy, the poor the prognosis, so DKK-3 methylation may serve as the marker for evaluating the disease condition and prognosis.

【Key words】 gastric cancer; gastroscopy; DKK-3; disease condition; prognosis

胃癌的发病机制与基因表达异常密切相关,其中甲基化导致抑癌基因表达沉默是目前研究的热点,有研究表明其可作为胃癌病情及预后评估的标志物^[1-2]。Dickkopf 相关蛋白 3(DKK-3)具有抑制细胞增殖的作用,在越来越多的肿瘤中可检测到其表观遗传学改变^[3]。本研究检测胃癌患者和健康人胃镜活检组织 DKK-3 基因甲基化,研究 DKK-3 基因甲基化在胃癌病情及预后评估中的价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 在研究选择 2009 年 1 月至 2011 年 6 月在本院胃镜检查的胃癌患者作为研究对象(观察组),入选标准:(1)

经症状体征、CT 增强、胃镜和(或)手术切除标本病理学检查确诊为胃癌;(2)首次诊治患者,排除既往行手术、放疗和化疗及合并其他肿瘤。观察组研究对象 80 例,男 46 例,女 34 例;平均年龄(53.5 ± 5.9)岁。另选择同期健康体检的 80 例健康人为对照(对照组),男 45 例,女 35 例;平均年龄(53.2 ± 5.4)岁。两组研究对象性别和年龄差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 DKK-3 基因甲基化检测 观察组胃癌患者取肿瘤组织和癌旁正常组织,对照组健康人取正常胃黏膜。采用甲基化特异性聚合酶链反应(PCR)检测观察组胃癌肿瘤组织和癌旁正

常组织、对照组健康人胃黏膜 DKK-3 基因甲基化,采用 Meth-yl Primer Express v1.0 设计引物,引物序列见表 1。PCR 循环条件为:95℃预变性 10 min,95℃变性 45 s,63℃退火 30 s,

72℃延伸 30 s,共 28 个循环,最后一轮 72℃延伸 8 min。最后 PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳显影。

表 1 MSP 检测 DKK-3 基因甲基化引物序列

引物	上游引物	下游引物
甲基化引物	5'-CGGGAGCGAGTAGATTTAGTTC-3'	5'-CCTTAACGTCGAATCCTACTCG-3'
未甲基化引物	5'-GGTGGGAGTGAGTAGATTTAGTTT-3'	5'-CCCCTTAACATCAAACTCCTACTCA-3'

1.3 统计学处理 采用 SigmaPlot12.0 进行统计学分析。观察组胃癌患者 DKK-3 基因甲基化在不同临床病理因素中的差异采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DKK-3 基因甲基化 观察组研究对象肿瘤组织中 DKK-3 基因甲基化 42 例,甲基化率为 52.5%,癌旁正常组织中 1 例 DKK-3 基因甲基化,甲基化率为 1.3%,对照组研究对象未检测到 DKK-3 基因甲基化,甲基化率为 0.0%,观察组研究对象肿瘤组织 DKK-3 基因甲基化率显著高于癌旁正常组织和对照组研究对象正常组织,差异有统计学意义 ($P<0.05$),DKK-3 基因甲基化率在癌旁正常组织和对照组研究对象正常组织差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 DKK-3 基因甲基化与临床病理因素的关系 见表 2。观察组胃癌患者肿瘤组织中 DKK-3 基因甲基化率在性别、年龄、病变部位、肉眼形态、Hp 感染和病理类型中差异无统计学意义 ($P>0.05$);在分化程度、肿瘤直径、淋巴结转移、远处转移和 TNM 分期中差异有统计学意义 ($P<0.05$)。肿瘤直径大、有淋巴结转移、有远处转移和 TNM 分期晚的患者 DKK-3 基因甲基化率显著高于肿瘤直径小、无淋巴结转移、无远处转移和 TNM 分期早的患者。

表 2 不同临床病理因素中 DKK-3 基因甲基化差异 (n)

临床病理因素	n	DKK-3 基因甲基化		χ^2	P
		甲基化	未甲基化		
性别	男	46	24	0.025	0.874
	女	34	18		
年龄(岁)	<50	32	15	0.353	0.552
	≥50	48	27		
病变部位	贲门	25	13	0.069	0.966
	胃体	20	11		
	胃窦	35	18		
肉眼形态	隆起型	39	20	0.092	0.955
	表浅型	18	10		
	凹陷型	23	12		
幽门螺杆菌感染	阳性	35	21	0.920	0.338
	阴性	45	21		
病理类型	腺癌	32	16	0.140	0.987
	黏液癌	22	12		

续表 2 不同临床病理因素中 DKK-3 基因甲基化差异 (n)

临床病理因素	n	DKK-3 基因甲基化		χ^2	P
		甲基化	未甲基化		
未分化癌	11	6	5	7.406	0.025
	其他	15	8		
分化程度	高	26	8	4.815	0.028
	中	34	22		
	低	20	12		
肿瘤直径(cm)	<5	31	11	4.277	0.039
	≥5	49	31		
淋巴结转移	无	20	6	16.233	<0.05
	有	60	36		
远处转移	无	68	30	24.312	<0.05
	有	12	12		
TNM 分期	I	15	2	24.312	<0.05
	II	26	10		
	III	27	18		
	IV	12	12		

2.3 DKK-3 基因甲基化与 3 年生存率的关系 对观察组胃癌患者随访 3 年,DKK-3 基因甲基化胃癌患者 3 年生存率为 23.8%,DKK-3 基因未甲基化胃癌患者 3 年生存率为 52.6%,DKK-3 基因甲基化胃癌患者 3 年生存率显著高于未甲基化患者,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

3 讨 论

DKK-3 基因属于 Dickkopf 家族成员,作为经典的 Wnt 信号传导通路拮抗因子,具有抑制细胞增殖的作用,在越来越多的肿瘤中发现其表观遗传学表达沉默与病情及预后密切相关^[4]。甲基化是表观遗传学最常见的转录前调控机制,甲基化 CG 自身或结合甲基结合蛋白后可阻遏转录因子结合至基因启动子,从而抑制基因表达,是继基因突变、单核苷酸多态性后的研究热点^[5]。杨子荣等^[6]采用组织芯片检测胃癌中 DKK-3 基因表达,发现其表达水平显著低于健康人。基于基因表达法则,推测 DKK-3 的表观遗传学表达沉默可能与胃癌的发病机制、病情及预后紧密相关。本研究中观察组研究对象肿瘤组织中 DKK-3 基因甲基化 42 例,甲基化率为 52.5%,癌旁正常组织中 1 例 DKK-3 基因甲基化,甲基化率为 1.3%,对照组研究对象未检测到 DKK-3 基因甲基化,甲基化率为 0.0%,观察组

研究对象肿瘤组织 DKK-3 基因甲基化率显著高于癌旁正常组织和对照组研究对象正常组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); DKK-3 基因甲基化率癌旁正常组织和对照组研究对象正常组织中差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这些证据证实 DKK-3 在胃癌中存在高甲基化表达沉默状态, 推测其可能在胃癌的病情及预后评估中具有重要临床价值。

传统的用于评估胃癌病情及预后的常见指标有肿瘤分化程度和 TNM 分期, 其中分化程度低表示肿瘤恶性程度高, TNM 分期越晚预示预后越差, 可客观准确地反映肿瘤的病情及预后^[7]。本研究中, 观察组胃癌患者肿瘤组织中 DKK-3 基因甲基化率在分化程度、肿瘤直径、淋巴结转移、远处转移和 TNM 分期中差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 肿瘤直径大、有淋巴结转移、有远处转移和 TNM 分期晚的患者 DKK-3 基因甲基化率显著高于肿瘤直径小、无淋巴结转移、无远处转移和 TNM 分期早的患者。这些证据表明 DKK-3 基因甲基化与胃癌患者的病情密切相关, 为临床胃癌病情评估提供客观科学的证据。进一步研究发现, DKK-3 基因甲基化胃癌患者 3 年生存率为 23.8%, DKK-3 基因未甲基化胃癌患者 3 年生存率为 52.6%, DKK-3 基因甲基化胃癌患者 3 年生存率显著高于未甲基化患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明 DKK-3 基因甲基化的胃癌患者预后差于未甲基化患者。

目前基因与胃癌病情及预后均为对手术切除的病理标本检测, 其最大不足为无法在术前提供客观证据, 因此能在术前评估病情及预后的分子标志物具有重要意义^[8]。胃镜活检组织与传统病理标本相比, 能在术前提供分子水平的证据, 加上其标本取得手段简单方便, 因此具有更广泛的临床价值。

(上接第 1252 页)

WBC、ALT 及 TBil 水平均显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时比较两组患者出现并发症结果表明, 观察组术后感染与并发症总发生率分别为 2.7% 和 16.2%, 显著低于对照组的 16.7% 和 36.1%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。本研究结果表明, 急诊内镜治疗在患者总治愈、病死率、并发症等方面均显著优于开腹手术治疗, 能够迅速稳定患者病情, 避免由于手术而带来的不必要风险。

本研究有以下几点体会: (1) 在治疗过程中, 由于老年患者结石数量往往较多, 体积较大, 同时老年患者耐受性差, 因此在治疗时第 1 次应当主要降低患者胆道压力, 然后再进行取石治疗^[6]。(2) 对于结石过大的患者, 若不能直接进行切开, 则可以使用乳头括约肌气囊扩张取石, 该方法既能对结石起到切割作用, 同时也能通畅胆汁^[7]。(3) 在手术中应当尽量完善操作过程, 缩短手术时间, 以减少并发症发生^[8]。

综上所述, 急诊内镜治疗作为一种对 AOSC 的治疗方法, 已经成功应用于临床, 对于老年 AOSC 患者而言, 急诊内镜治疗安全有效, 操作简单, 并发症少, 患者存活率与生活质量提高, 值得在床上进一步推广。

参考文献

[1] 胡骏, 刘永书, 方卫永, 等. 急性化脓性胆管炎的临床诊治

参考文献

[1] Chen R, Zhuge X, Huang Z, et al. Analysis of SEMA3B methylation and expression patterns in gastric cancer tissue and cell lines[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(3): 1211-1218.
 [2] Liu J, Zhu X, Xu X, et al. DNA promoter and histone H3 methylation downregulate NGX6 in gastric cancer cells [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(1): 817-821.
 [3] 陶累累. Wnt 信号通路拮抗因子 DKK-3 在肿瘤中的研究进展[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17(8): 752-755.
 [4] 李振华, 高小林, 于秀月, 等. 多基因甲基化检测在尿路上皮癌中作用的研究[J]. *中国医科大学学报*, 2013, 42(7): 648-652.
 [5] 陆海一, 林兰, 刘继斌. 拮抗 Wnt 信号通路的 CpG 岛甲基化表型在肝癌预后中的临床价值[J]. *现代检验医学杂志*, 2013, 28(6): 22-25.
 [6] 杨子荣, 董卫国, 樊利芳, 等. 组织芯片检测 Dickkopf-3 在胃癌中的表达及临床意义[J]. *中华消化杂志*, 2009, 29(8): 571-573.
 [7] 王来奎, 曾和平, 李桢. 老年及中青年患者胃癌临床表现及预后对比观察[J]. *山东医药*, 2013, 53(18): 43-45.
 [8] 叶琼, 涂焕平, 蒋义, 等. Endoglin 和脾酪氨酸激酶在胃癌组织中的表达及意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(2): 227-228.

(收稿日期: 2014-11-05 修回日期: 2015-01-15)

分析[J]. *中国现代普通外科进展*, 2011, 14(1): 12.

[2] 许梅. 急诊内镜手术治疗老年急性梗阻性化脓性胆管炎 65 例效果观察[J]. *齐鲁护理杂志*, 2011, 17(27): 22-23.
 [3] 陈方志, 吴志明, 詹雅珍, 等. 老年急性梗阻性化脓性胆管炎的急诊内镜治疗[J]. *浙江医学*, 2013, 35(11): 1038-1040.
 [4] 兰竹, 周永碧, 韦长征. 腹腔镜胆囊切除术作为急性胆囊炎治疗选择的评价[J]. *中华消化内镜杂志*, 1999, 16(5): 17-19.
 [5] 谭敏, 吴志棉, 连义彦, 等. 腹腔镜技术在脾脏切除术中的应用[J]. *中华外科杂志*, 2001, 39(8): 599-601.
 [6] 王同祥, 高才兵, 廖云娇. 急性梗阻性化脓性胆管炎的内镜治疗疗效分析[J]. *实用医技杂志*, 2012, 19(7): 753-755.
 [7] 杨颖. 急诊内镜介入与开腹手术治疗结石性急性梗阻性化脓性胆管炎的对比观察[J]. *中国现代药物应用*, 2014, 8(1): 45-46.
 [8] 高卫东, 徐关东, 陈巍峰, 等. 高龄患者急性化脓性胆管炎的急诊内镜治疗[J]. *中国临床医学*, 2011, 18(6): 809-811.

(收稿日期: 2014-11-18 修回日期: 2015-01-10)