

p16 基因启动子甲基化与乳腺癌临床病理特征的关系*

张一兵¹, 卢鹤翔², 张欣然³, 秦丽娟¹, 董桂兰⁴, 孙娜¹, 张田¹

1. 华北理工大学基础医学院 生理系 (唐山 063001); 2. 华北理工大学基础医学院 形态实验室 (唐山 063001);
3. 华北理工大学临床医学五年制 2011 级 (唐山 063001); 4. 河北省唐山市人民医院 (唐山 063001)

【摘要】 目的 探讨 p16 基因在乳腺癌组织中的表达及其启动子区域甲基化情况, 并分析 p16 基因启动子甲基化与临床病理特征的关系。**方法** 采用免疫组织化学 SP 方法和甲基化 PCR(MSP)方法检测 47 例乳腺癌和 20 例乳腺增生组织 p16 蛋白表达及其启动子甲基化情况。**结果** 乳腺癌组织 p16 蛋白阳性表达率低于乳腺增生组织(48.9% vs. 70.0%), 启动子甲基化率高于乳腺增生组织(38.3% vs. 20.0%), 但差异均无统计学意义($P>0.05$); p16 基因表达下降与其高甲基化呈负相关($r=-0.33, P=0.02$); p16 基因启动子甲基化与年龄、肿瘤直径、临床分期、雌激素受体(ER)以及孕激素受体(PR)无关($P>0.05$), 而与组织分级、淋巴结转移有关($P<0.05$)。**结论** p16 基因启动子甲基化诱导 p16 蛋白低表达在乳腺癌早期发生过程中作用有限, 但在乳腺癌发展过程中发挥作用。

【关键词】 乳腺癌 p16 启动子甲基化 预后

The Methylation of p16 Gene Promoter in Carcinogenesis and Development of Breast Cancer ZHANG Yi-bing¹, LU He-xiang², ZHANG Xin-ran³, QIN Li-juan¹, DONG Gui-lan⁴, SUN Na¹, ZHANG Tian¹. 1. Department of Physiology, Basic Medical College, North China University of Science and Technology, Tangshan 063001, China; 2. Morphology Laboratory, Basic Medical College, North China University of Science and Technology, Tangshan 063001, China; 3. Five-year Clinical Medical, 2011 Grade, North China University of Science and Technology, Tangshan 063001, China; 4. The People Hospital of Tangshan City, Tangshan 063001, China

【Abstract】 Objective To investigate the protein expression of the p16 gene and the methylation of its promoter in breast cancer, and to analyze the correlation between the p16 DNA methylation and the clinicopathological features. **Methods** Immuno-histochemistry technique (SP method) and methylation-specific-PCR (MSP) were used to detect p16 protein expression and the methylation of the p16 promoter in 47 breast cancer samples as well as in 20 hyperplasia samples of mammary glands. **Results** The p16 protein expression in breast cancer samples significantly lower when compared with those of hyperplasia samples (48.9% vs. 70.0%) and p16 methylation was more frequent in breast-tumor tissues when compared with those of hyperplasia samples (38.3% vs. 20.0%), but the statistical significance wasn't found ($P>0.05$). Down-regulation of p16 protein was negatively correlation with p16 gene hypermethylation ($r=-0.33, P=0.02$). Meanwhile, p16 methylation in breast cancer tissues correlated with histological type, lymph node metastasis, but not correlated with the age, tumor diameter, TNM stage, expression of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) gene status. **Conclusion** The downregulation of p16 protein induced by promoter methylation of p16 gene may not contribute to early carcinogenesis, but may contribute to progression of breast cancer.

【Key words】 Breast cancer p16 Promoter methylation Prognosis

乳腺癌发生发展过程中涉及到多个基因的异常表达, 表观遗传机制在基因异常表达中发挥重要作用。DNA 甲基化是表观遗传学的主要内容, 可阻遏抑癌基因转录, 表达缺失^[1]。p16 基因编码蛋白是细胞周期负向调控因子, 有抑制细胞恶性增殖转化作用。关于 p16 基因表达与乳腺癌关系有较多报道, 但所得结论不尽一致, 研究^[2]显示 p16 基因甲基化和表达缺失与乳腺癌预后有关, 但也有学者^[3]

认为 p16 蛋白表达与临床病理参数无关, 不能作为预后的指标。本研究中我们检测乳腺癌组织及乳腺增生组织中 p16 基因启动子区域甲基化状态与 p16 蛋白表达, 并分析 p16 基因启动子区域甲基化状态与乳腺癌临床病理特征的关系, 进一步明确 p16 在乳腺癌发生发展过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 组织标本来源

收集 2004~2006 年河北省唐山市人民医院外

* 河北联合大学培育基金(No. LDPYS-07)资助

科手术切除、病理确诊的乳腺癌患者肿瘤蜡块组织标本 47 例。患者均为女性,年龄 37~81 岁,病理诊断全部为浸润性导管癌,术前未接受化学治疗和放射治疗,患者病理分期、组织学类型判定依据 2004 年 NCCN 指南标准。另取 20 例正常人群乳腺增生组织作为阴性对照。

1.2 主要试剂和仪器

p16 抗体、过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)试剂盒、甲基联苯胺(DAB)试剂购自北京中杉金桥生物制品有限公司。石蜡组织 DNA 提取试剂盒 (Analyticjena) 购自上海生工生物工程公司, DNA 甲基化修饰试剂盒 (Epigentek) 购自北京康颂博生物技术公司, DNA 甲基化 PCR 试剂盒 (Epigentek) 购自上海杰美生物技术公司。Mastercycler pros PCR 扩增仪(德国 Eppendorf), 微量核酸蛋白检测仪(美国 ND2000), 凝胶成像系统(美国 Geldoc XR), 全自动显微镜扫描系统(奥林巴斯 BX63, 日本)。

1.3 甲基化 PCR 法检测乳腺癌组织和乳腺增生组织中 p16 基因启动子甲基化状态

石蜡组织以 5 μm 厚度连续切片,取 3~5 片,按试剂盒说明书提取各标本基因组 DNA,检测 DNA 水平和纯度。提取的 DNA 亚硫酸氢钠修饰后,未甲基化的胞嘧啶(C)变为尿嘧啶(U),而已甲基化的胞嘧啶(C^{m})则不会改变。修饰后的 DNA 进行甲基化 PCR,甲基化特异性引物: Sense, 5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3', Anti-sense, 5'-GACCCCGAACC GCGACCGTAA-3', 退火温度为 65 $^{\circ}\text{C}$, 扩增片段长度为 150 bp; 非甲基化特异性引物: Sense, 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3', Antisense, 5'-CAACCCCAACCACAACCATAA-3', 退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$, 扩增片段长度为 151 bp。加入反应体系后,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 相应退火温度 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 35 个循环, 最后延伸 5 min。PCR 产物经过 20 g/L 琼脂糖电泳、gelgreen 染色后,在凝胶成像系统下观察成像记录结果,如出现 150 bp 产物则为 p16 基因启动子甲基化,如出现 151 bp 产物,则认为 p16 基因启动子非甲基化。

1.4 免疫组织化学 SP 法检测乳腺癌组织和乳腺增生组织中 p16 蛋白表达

两组患者每例取常规组织病理切片 1 张,厚度 4 μm ,组织切片脱蜡至水,高压抗原修复,3%双氧水孵育 10 min 阻断内源过氧化物酶,血清封闭,滴加 1:200 兔抗人 p16 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS 冲洗 3 次,每

次 2 min, 滴加二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 滴加辣根酶标记链霉卵白素, 显色, 复染, 脱水, 透明, 封片。以 PBS 代替一抗作为空白对照。结果判定: 以细胞核、细胞浆出现棕黄色颗粒为阳性染色。以阳性细胞占肿瘤细胞总数的比例和染色强度作为判断依据, 于高倍镜下随机取 10 个不同视野, 各计数 100 个细胞观察: 无色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; 按阳性细胞所占的百分比评分: 阴性为 0 分, 阳性细胞比例 $<25\%$ 为 1 分, 阳性细胞比例 $25\% \sim 50\%$ 为 2 分, 阳性细胞比例 $>50\% \sim 75\%$ 为 3 分, 阳性细胞比例 $>75\%$ 为 4 分; 两项分值的乘积 >3 判定为阳性^[4]。

1.5 统计学方法

各组数据之间采用 χ^2 检验统计分析, 相关分析采用 pearson 相关。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织和乳腺增生组织中 p16 基因启动子甲基化的阳性率

47 例乳腺癌组织中有 18 例 (38.3%) 发生 p16 基因甲基化, 20 例乳腺增生组织中有 4 例 (20.0%) 发生 p16 基因甲基化, 差异没有统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。

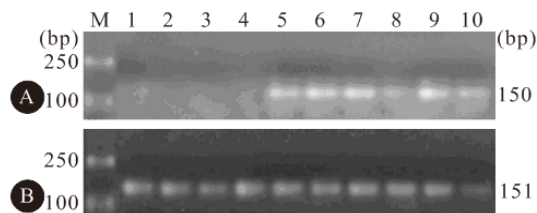


图 1 p16 基因启动子在乳腺癌和乳腺增生组织中甲基化状态电泳图

Fig 1 Electropherogram of p16 gene methylation status in breast cancer and hyperplasia samples

A: Methylation; B: Unmethylation; M: DNA marker; 1-3: Hyperplasia; 4-7: Low malignancy; 8-10: High malignancy

2.2 乳腺癌组织和乳腺增生组织 p16 蛋白的表达

p16 蛋白阳性表现为细胞核、细胞浆阳性染色, 染色不均匀。47 例乳腺癌组织中有 23 例 p16 蛋白阳性表达 (48.9%), 20 例乳腺增生组织中有 14 例 p16 蛋白阳性表达 (70.0%), 乳腺癌组织 p16 蛋白阳性表达率低于乳腺增生组织, 但差异没有统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2。

2.3 不同临床病理特征乳腺癌患者 p16 基因启动子甲基化的阳性率

47 例乳腺癌组织中 p16 基因启动子甲基化与

年龄、肿瘤大小、临床分期、雌激素受体(ER)以及孕激素受体(PR)无关($P>0.05$),而与组织分级、淋巴结转移有关($P<0.05$)。见表 1。

2.4 乳腺癌组织中 p16 基因甲基化与 p16 蛋白表达的相关性

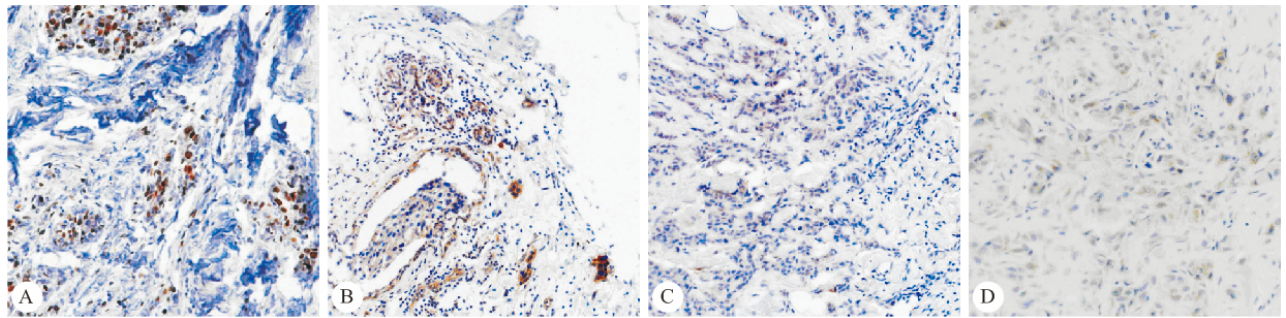


图 2 免疫组织化学法检测 p16 蛋白在乳腺癌和乳腺增生组织中的表达。SP ×200

Fig 2 p16 protein expression in in breast cancer and hyperplasia samples stained by immunohistochemical method. SP ×200

A: Breast hyperplasia; B: Breast cancer grade 1; C: Breast cancer grade 2; D: Breast cancer grade 3

表 1 p16 基因启动子甲基化与乳腺癌患者临床病理特征的关系

Table 1 The relationship between p16 promoter methylation and clinicopathological features

Variable	n	p16 methylation status		χ^2	P
		M	U		
Age (yr.)				0.89	0.340
≤50	25	8	17		
>50	22	10	12		
Tumor diameter (cm)				1.36	0.510
≤2	19	6	13		
>2-5	23	9	14		
>5	5	3	2		
TNM stage				2.29	0.310
I	5	2	3		
II	27	8	19		
III	15	8	7		
Histological type				10.65	0.004
G1	8	1	1		
G2	29	11	14		
G3	10	6	5		
Lymph node metastasis				8.62	0.030
Yes	20	13	7		
No	27	5	22		
ER				0.98	0.320
+	29	9	20		
—	18	9	9		
PR				0.07	0.780
+	26	10	16		
—	21	8	13		

ER: Estrogen receptor; PR: Progesterone receptor; M: Methylation; U: Unmethylation

表 2 p16 基因甲基化与 p16 蛋白表达的相关性

Table 2 The correlation between p16 gene methylation and protein expression

Variable	n	P16 expression		χ^2	P	r
		+	—			
p16 methylation	18	5	13	5.23	0.02	−0.33
p16 unmethylation	29	18	11			

18 例 p16 基因甲基化的乳腺癌组织中有 5 例 p16 蛋白阳性表达,29 例 p16 基因非甲基化的乳腺癌组织中有 18 例 p16 蛋白阳性表达,p16 基因启动子甲基化与 p16 蛋白表达有关($r = -0.33, P < 0.05$),见表 2。

3 讨论

DNA 甲基化作为肿瘤发病的重要机制,越来越受到人们重视。肿瘤组织 DNA 甲基化异常表现为癌基因的去甲基化和抑癌基因的超甲基化。p16 是一个抑癌基因,其编码蛋白属于细胞周期素依赖激酶抑制因子,与细胞周期素 D(cyclinD)竞争与细胞周期依赖蛋白激酶 4(CDK4)的结合。p16 蛋白与 CDK4 结合后抑制其对 Rb 蛋白的磷酸化,使 Rb 蛋白保持脱磷酸化状态,细胞周期停滞在 G₁ 期,抑制细胞的增生和恶性转化。p16 蛋白表达缺失时,cyclinD 则与 CDK4 优势结合,可导致细胞失控性增殖,容易发生恶性变。有研究证明 DNA 甲基化是 p16 基因失活的主要机制^[5],其启动子区域的超甲基化与胃癌、结肠癌等多种肿瘤的发生和发展密切相关^[6,7]。

本研究中,我们检测了 47 例乳腺癌组织和 20 例乳腺增生组织 p16 基因启动子甲基化状态和蛋白的表达,结果显示乳腺癌组织中 p16 基因甲基化率 38.3%(18/47),乳腺增生组织 p16 基因甲基化率 20.0%(4/20);乳腺癌组织 p16 蛋白阳性表达率 48.9%(23/47),乳腺增生组织 p16 蛋白阳性表达率 70.0%(14/20),虽然乳腺癌组织 p16 基因甲基化率高于乳腺增生组织,蛋白阳性表达率低于乳腺增生组织,但差异都没有统计学意义,提示 p16 基因甲基化可能在乳腺癌发生早期阶段作用不大,赵英芳等^[8]也报道了类似的结果。Holst 等^[9]还发现在正常乳腺上皮细胞中存在 p16 基因甲基化现象,认

为是乳腺上皮细胞的正常分子事件。但有学者报道 *p16* 基因启动子甲基化参与了乳腺癌的发生和发展并与预后不良有关^[10]。不同研究得到的结果不一致可能与纳入研究的样本量、研究方法以及种族的不同有关。

本研究中我们还分析了乳腺癌组织中 *p16* 基因启动子甲基化与临床病理特征之间的关系,结果显示 *p16* 基因甲基化率与患者年龄、肿瘤直径、临床分期无关,但随着肿瘤组织分级增加和淋巴结转移的出现,*p16* 基因甲基化率呈现逐渐增加的趋势,差异有统计学意义,与 Vallian 等^[11]研究结果较一致。结果还显示 *p16* 基因甲基化与 *p16* 蛋白表达呈现负相关,提示乳腺癌组织中 *p16* 基因超甲基化可能是导致 *p16* 蛋白表达缺失的主要原因,并参与了肿瘤的进展。

乳腺癌是一种雌激素依赖性肿瘤,肿瘤组织中 ER、PR 的表达对乳腺癌预后的评估和内分泌治疗效果的评估有重要意义。ER、PR 阳性表达者对内分泌治疗效果敏感,而且预后也好于阴性表达者。关于 ER 和 *p16* 异常表达的关系,本研究显示 ER 表达阳性者 *p16* 甲基化率 31%(9/29),而 ER 表达阴性者 *p16* 甲基化率 50%(9/18),但差异没有统计学意义,可能与我们纳入研究的样本数量少有关。有文献^[12]报道乳腺癌组织中 *p16* 基因甲基化与 ER 表达负相关,并与乳腺癌的分化差、恶性高有关,*p16* 基因甲基化可作为乳腺癌预后评估的一个重要指标。但 Raish 等^[13]报道 *p16* 甲基化与 ER 和 PR 表达状态没有相关性。关于 ER 与 *p16* 相互关系的分子机制,有研究^[14]显示 ER 阳性表达而 Rb 阴性表达的乳腺癌细胞对三苯氧胺治疗不敏感,而 ER 和 Rb 均正常表达的乳腺癌细胞对三苯氧胺治疗敏感,提示 Rb 表达状态可能与内分泌治疗敏感性有关,为此,我们推测 *p16* 异常表达可能通过影响 Rb 表达状态进而影响内分泌治疗的敏感性。这有待进一步研究。

参 考 文 献

- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 2003; 349 (21):2042-2054.
- Jing F, Jun L, Yong Z, *et al.* Multigene methylation in serum of sporadic Chinese female breast cancer patients as prognostic biomarker. *Oncology*, 2008; 75(1-2): 60-66.
- Geradts J, Wilson PA. High frequency of aberrant *p16* (*INK4A*) expression in human breast cancer. *Am J Pathol*, 1996; 149(1): 15-20.
- 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判定标准. *中国癌症杂志*, 1996; 6(4): 229-231.
- Dominguez G, Silva J, Garcia JM, *et al.* Prevalence of aberrant methylation of *p14ARF* over *p16INK4a* in some human primary tumors. *Mutat Res*, 2003; 530(1-2): 9-17.
- Hu SL, Kong XY, Cheng ZD, *et al.* Promoter methylation of *p16*, *Runx3*, *DAPK* and *CHFR* genes is frequent in gastric carcinoma. *Tunori*, 2010; 96(5): 726-733.
- Pehlivan S, Artac M, Sever T, *et al.* Gene methylation of *SFRP2*, *p16*, *DAPK1*, *HIC1* and *MGMT* and *KRAS* mutation in sporadic colorectal cancer. *Cancer Genet*, 2010; 201 (2): 128-132.
- 赵英芳, 沈淑萍, 蒋剑英等. 乳腺癌中 *p16INK4a* 和视网膜母细胞瘤基因甲基化状况及其表达. *中华病理学杂志*, 2010; 39 (6): 377-381.
- Holst CR, Nuovo GJ, Esteller M, *et al.* Methylation of *p16* (*INK4a*) promoters occurs *in vivo* in histologically normal human mammary epithelia. *Cancer Res*, 2003; 63 (7): 1596-1601.
- Wang L, Tang L, Xie R, *et al.* *p16* promoter hypermethylation is associated with increased breast cancer risk. *Mol Med Rep*, 2012; 6(4): 904-908.
- Vallian S, Sedaghat M, Nassiri I, *et al.* Methylation status of *p16INK4A* tumor suppressor gene in Iranian patients with sporadic breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009; 135(8): 991-996.
- Tao MH, Shields PG, Nie J, *et al.* DNA hypermethylation and clinicopathological features in breast cancer: the Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) Study. *Breast Cancer Res Treat*, 2009; 114(3): 559-568.
- Raish M, Dhillon VS, Ahmad A, *et al.* Promoter hypermethylation in tumor suppressing genes *p16* and *FHIT* and their relations estrogen receptor status in breast cancer patients from Northern India. *Transl Oncol*, 2009; 2 (4): 264-70.
- Lehn S, Fernf M, Jirstfrim K, *et al.* A non-functional retinoblastoma tumor suppressor (RB) pathway in premenopausal breast cancer is associated with resistance to tamoxifen. *Cell Cycle*, 2011; 10(6): 956-962.

(2014-05-21 收稿, 2015-03-23 修回)

编辑 汤 洁