

◇ 经验与体会 ◇

## 脑胶质瘤组织与外周血中 p16 甲基化检测及临床意义

邓鹏程<sup>1</sup>, 徐培坤<sup>1</sup>, 朱立新<sup>2</sup>, 王 斌<sup>1</sup>, 杨成子<sup>1</sup>

**摘要** 选择 48 例脑胶质瘤患者血浆及癌组织作为实验组, 10 例脑外伤患者坏死脑组织、血浆及 10 例健康者血浆作为对照组。应用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)和亚硫酸氢盐处理后测序(BSP)法检测 p16 基因甲基化, 显示实验组外周血浆、肿瘤组织中 p16 基因甲基化率分别为 37.5% (18/48)、43.8% (21/48), 对照组均未发现甲基化现象。实验组基因甲基化与临床资料差异无统计学意义。

**关键词** 胶质瘤; 甲基化; p16; 血浆; 癌组织

**中图分类号** R 739.41

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2015)02-0253-03

p16 基因位于 9p21, 包括 3 个外显子和 2 个内含子, 是常见的抑癌基因, 能够调节细胞的异常增殖<sup>[1]</sup>。p16 基因处于甲基化状态则无法发挥其正常功能。该实验通过对 48 例胶质瘤患者的血浆标本和癌组织标本 p16 基因甲基化的检测, 分析 p16 基因甲基化状态与胶质瘤的联系及临床意义。

### 1 材料与方 法

**1.1 病例资料** 收集 2013 年 3 月~2014 年 7 月于安徽医科大学第一附属医院神经外科手术中 48 例脑胶质瘤患者的癌组织及对应血浆标本作为实验组, 其中男 27 例, 女 21 例; 年龄 7~74 岁, 中位年龄 43.5 岁。癌组织标本均经我院病理科确诊: 星形细胞瘤 16 例, 少枝胶质细胞瘤 9 例, 髓母细胞瘤 5 例, 中枢神经细胞瘤 1 例, 胶质母细胞瘤 14 例, 室管膜瘤 3 例。其中 I~II 级 26 例, III~IV 级 22 例。脑胶质瘤患者术前均未进行放、化疗等前期治疗, 可排除前期治疗干扰实验结果。另取 10 例因脑外伤手术患者的坏死脑组织及对应血浆标本和 10 例健康者血浆标本作为对照组, 其中男 13 例, 女 7 例, 年龄 20~67 岁, 中位年龄为 45 岁。脑组织及血

浆标本提取后快速转放入 -80 °C 冰箱中冷冻备用。

### 1.2 方 法

**1.2.1 标本 DNA 提取和 DNA 浓度、纯度测定** ① 取癌组织标本 10 mg 移至加入冰水浴预冷的研钵中, 快速充分研磨成匀浆; 血浆标本取样 200 μl; ② 使用 AxyPrep 基因组 DNA 试剂盒, 根据说明书按步骤提取标本 DNA 并检测提取的 DNA 浓度和纯度; ③ 将提取癌组织及对应血浆标本的 DNA 标号后移至 -20 °C 冰箱保存。

**1.2.2 基因组样本的亚硫酸氢钠处理** ① 准备 DNA 样品, 总体积为 20 μl, 总量约 500 ng (以 200~500 ng 最佳); ② 采用 MethylCode™ Bisulfite Conversion Kit 试剂盒, 按使用说明进行亚硫酸盐修饰; ③ 将修饰后的 DNA 转入 1.5 ml 的离心管中进行下一步实验操作。

**1.2.3 修饰后 DNA 样本 PCR 扩增** p16 基因甲基化和非甲基化引物由上海 Invitrogen 公司设计 (甲基化的引物 F: 5'-TCGTCGTTGTGGTTTTTCGTG-3', R: 5'-AAACCTCCACCGACGATTATCT-3'; 非甲基化的引物 F: 5'-GGGGTGTGTTGTTGTTGTGTTG-3', R: 5'-ATCTCCTCCTCCTCCTAACCTA-3')。PCR 反应体系为 25 μl (Buffer 2.5 μl + Mg 1 μl + F1/R1 1 μl + 10 mmol/L dNTP 0.5 μl + Bisulfite) 处理的 DNA 1.0 μl + DNA 聚合酶 0.2 μl + ddH<sub>2</sub>O 19 μl。PCR 循环参数: 95 °C 预变性 300 s, 95 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 35 周期, 72 °C 延伸 300 s 后终止扩增。PCR 扩增的目的产物经纯化后进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.4 PCR 产物 TA 克隆测序** 步骤一: 提取标本 DNA, 亚硫酸氢钠处理, PCR 步骤如前。其中引物由上海 Invitrogen 公司设计合成 (p16 基因引物 F: 5'-TTGTYGAGTTYGGTTTTGG-3', R: 5'-CCTCAATTCCCACRATTAATA-3'); 步骤二: 连接, 配制体积为 5 μl 的反应液 (PCR 产物 2 μl + pMD18-T Vector 0.5 μl + Solution I 2.5 μl), 将配制的溶液混匀, 放置 16 °C 中连接 30 min 以上; 步骤三: 转化, 取出 1 管冻存的 DH5α (200 μl / 管) 感受态细胞, 冰块中溶解; 取 5 μl 连接产物加入菌液中, 轻柔摇匀, 冰水浴

2014-09-28 接收

基金项目: 安徽省科技攻关项目 (编号: 1301042208)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院<sup>1</sup> 神经外科,<sup>2</sup> 中心实验室, 合肥 230022

作者简介: 邓鹏程, 男, 硕士研究生;

徐培坤, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xpkayfy@163.com

30 min 42 °C 热激 90 s,再冰浴 2 min; 加至 500 μl 无抗性 LB 培养基并在摇床中 37 °C 200 r/ min 培养 45 min; 超净台中取 200 μl 预转化的菌液涂抹至含 100 μg/ml 氨苄的平板上; 将平板放于 37 °C 恒温培养箱中倒置培养过夜,直至克隆完成; 步骤四: 从平板上挑取多个克隆产物测序(测序工作由上海英骏生物技术公司完成)。依照测序结果,可以判断目的产物中是否发生甲基化现象。若未发生甲基化现象,基因序列中胞嘧啶经亚硫酸氢盐修饰等实验处理后会变成胸腺嘧啶; 若发生甲基化现象,基因序列中胞嘧啶则保持不变。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 13.0 软件分析,数据采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

**2.1 癌组织及相应血标本的甲基化** 实验组中癌组织及血浆标本检测 p16 基因甲基化的概率分别为 43.8% (21/48)、37.5% (18/48), 对照组均未检测出 p16 基因的甲基化。见图 1、2。

**2.2 p16 基因甲基化与临床参数相关性** 脑胶质瘤患者癌组织及对应血浆标本中 p16 基因甲基化的发生率与患者的性别、年龄、肿瘤类型、病理分级之间相关性的统计学分析表明 p16 基因甲基化现象与临床资料相关性差异无统计学意义。见表 1。

## 3 讨论

随着肿瘤表观遗传学的研究进展,抑癌基因的甲基化是肿瘤发生发展中一个重要的分子事件。王喆等<sup>[2]</sup>发现胶质瘤中发生 p16 甲基化率为 42.5%

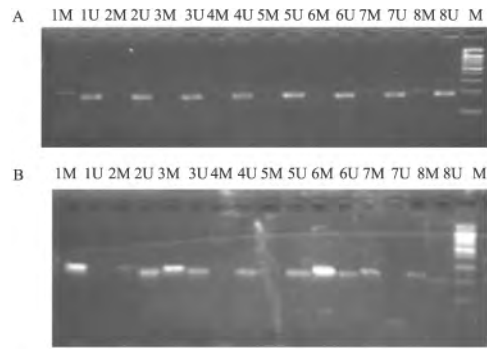


图 1 PCR 扩增产物电泳图检测

A: 血浆标本 p16 基因甲基化检测电泳图; B: 对应患者的癌组织 p16 甲基化检测电泳图; M: Marker; 1~8M: 标本 1~8 使用甲基化引物 PCR 扩增; 1~8U: 标本 1~8 使用非甲基化引物 PCR 扩增

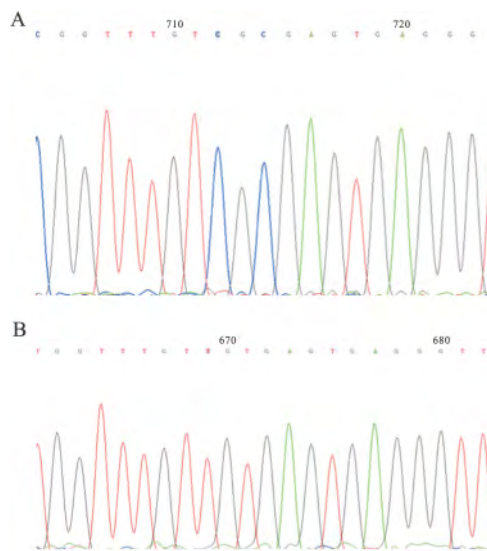


图 2 PCR 产物 TA 克隆测序图

A: PCR 产物发生甲基化现象(胞嘧啶未发生改变); B: PCR 产物未发生甲基化现象(胞嘧啶转变成胸腺嘧啶)

表 1 p16 基因甲基化与临床病理特征关系(n)

项目	例数 (n)	癌组织			血浆			
		甲基化数(n)	$\chi^2$ 值	P 值	甲基化率(%)	甲基化数(n)	$\chi^2$ 值	P 值
性别			0.485	0.486		0.457	0.499	
男	27	13			48.1	9		33.3
女	21	8			38.1	9		42.9
年龄(岁)			0.167	0.683		0.285	0.594	
<45	29	12			41.4	10		34.5
≥45	19	9			47.4	8		42.1
肿瘤类型			1.005	0.961		1.539	0.857	
星形细胞瘤	16	8			50.0	6		37.5
少枝胶质细胞瘤	9	3			33.3	3		33.3
髓母细胞瘤	5	2			40.0	3		60.0
胶质母细胞瘤	14	6			42.9	5		35.7
其他	4	2			50.0	1		25.0
病理分级			0.480	0.827		0.201	0.654	
低级别( I ~ II)	26	11			42.3	9		34.6
高级别( III ~ IV)	22	10			45.5	9		40.9

(17/40) 表明 p16 基因甲基化的发生率随脑胶质瘤恶性程度增加而升高; 本实验中脑胶质瘤组织的 p16 基因甲基化率为 43.8% (21/48), 与研究<sup>[2]</sup> 结果一致。由此推断 p16 基因可能是脑胶质瘤发生发展中一个重要事件, 但本实验并未表明 p16 基因甲基化与病理分级间差异有统计学意义。本实验中存在病理诊断为 II ~ III 级的标本, 按高级别处理, 可能是影响实验结果的一个原因。拟下一步扩大样本继续研究, 并以跨高、低级别的肿瘤作为实验对象。

国外学者<sup>[3-4]</sup> 发现血浆/血清中有大量游离的 DNA 存在, 而肿瘤患者中更甚, 结果证实了血液检测可能成为诊断肿瘤的有力辅助。另外, 血标本具有采集方便、微创、价格便宜、适合大片人群普筛等优点, 因此, 研究血液标本的 DNA 甲基化是有意义的。研究<sup>[5]</sup> 显示胶质瘤患者的血清中发生 p16 基因甲基化率为 75% (9/12), 并推断血清检测有成为胶质瘤分子检测的潜能。本实验表明血浆标本中 p16 甲基化率为 37.5% (18/48), 对照组中并未发现 p16 基因的甲基化, 两者差异有统计学意义。由此可以推断出以血浆标本为检测物也同时发现脑胶质与 p16 基因甲基化存在一定的联系, 为脑胶质瘤的无创性检查诊断开拓了新思路。

研究<sup>[6]</sup> 表明血浆与癌组织标本中 p16 基因甲基化检测结果差异无统计学意义, 两标本检测的结果的确具有关联。张振兴等<sup>[7]</sup> 也得出类似的结论。本研究显示血浆标本与癌组织的 p16 基因甲基化率差异无统计学意义, 由此推断脑胶质瘤中 p16 基因甲基化检测, 血浆标本与癌组织有着密切的联系, 两者呈平行相关, 但两者并非一一对应的关系。分析原因一: 可能与血浆中 DNA 检测甲基化的灵敏度较低于癌组织或是血浆中肿瘤 DNA 含量少有关。

图 1 电泳图显示癌组织的电泳条带比血浆标本中的条带亮可以反映这点。本实验采用的两种方法检测 DNA 甲基化, 提高实验结果准确性, 但无法排除血浆中其他非肿瘤 DNA 的干扰。原因二: 具体肿瘤类型可能存在差异性, 具有的不同的分子生物学特征也可能导致这样实验结果, 可扩大样本, 针对具体肿瘤类型进一步深入研究。

综上所述, 脑胶质瘤患者血浆中检测 p16 基因甲基化与癌组织具有平行相关性, 血浆检测具有成为胶质瘤早期诊断指标之一的潜力, 但血浆检测仍有灵敏度较低、部分结果与癌组织检测不一致等缺陷。

### 参考文献

- [1] Holdt L M, Teupser D. Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(2): 196-206.
- [2] 王 喆, 曹培成, 张振兴, 等. p16 基因 CpG 岛甲基化与胶质瘤生物学特性的系 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2007, 6(4): 311-4.
- [3] Leon S A, Shapiro B, Sklaroff D M, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy [J]. *Cancer Res*, 1977, 37(3): 646-50.
- [4] Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients [J]. *Oncology*, 1989, 46(5): 318-22.
- [5] Wakabayashi T, Natsume A, Hatano H, et al. p16 promoter methylation in the serum as a basis for the molecular diagnosis of gliomas [J]. *Neurosurgery*, 2009, 64(3): 455-61.
- [6] 朱沛传, 陈江瑛, 张素平. p16 基因启动子在脑胶质瘤患者中的异常甲基化及意义 [J]. *现代医院*, 2011, 11(9): 9-12.
- [7] 张振兴, 管立学, 王成东, 等. 瘤组织和血浆中 p16 基因 CpG 岛甲基化与脑肿瘤生物学行为的关系 [J]. *潍坊医学院学报*, 2006, 28(3): 184-7.

## p16 methylation in plasma and tumor tissue of patients with human brain glioma

Deng Pengcheng<sup>1</sup>, Xu Peikun<sup>1</sup>, Zhu Lixin<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Neurosurgery, <sup>2</sup>Central Lab, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract** The plasma and cancer tissue of the 48 patients for glioma were selected as the experimental group. The necrotic brain tissue and plasma of the 10 patients with traumatic brain injuries were selected as the control group, and the plasma of the 10 healthy people was also selected as the control group. The p16 gene methylation was examined in samples by methylation specific polymerase chain reaction (MSP) method and bisulfite sequencing after processing (BSP) method. The result shows that the rate of p16 gene methylation in tumor tissues was 43.8% (21/48) and in gliomas, plasma was 37.5% (18/48). The methylation phenomenon was not found in the control group. The study found that the p16 gene methylation was no significant correlation with clinical data.

**Key words** glioma; methylation; p16; plasma; tumor tissue