

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

李 琦¹, 胡昌华¹, 万光华¹, 张 婧^{2△} (1. 湖北省武汉市武汉科技大学附属汉阳医院妇产科 430050; 2. 湖北省襄阳市中心医院妇产科 441021)

【摘要】 目的 研究死亡相关蛋白激酶 1(DAPK1)基因启动子甲基化在宫颈癌中的临床意义。**方法** 应用甲基化特异性聚合酶链反应(PCR)检测宫颈癌组织和癌旁正常组织中 DAPK1 基因启动子甲基化,比较在二者间的差异及其与临床病理因素之间的关系。**结果** 宫颈癌组织中 DAPK1 基因启动子甲基化率为 62.5%,癌旁组织中甲基化率为 5.0%,宫颈癌组织中 DAPK1 基因启动子甲基化率显著高于宫颈癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。宫颈癌组织 DAPK1 基因启动子甲基化率在组织学分级、肿瘤最大径、淋巴结转移、器官转移、FIGO 分期中的差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** DAPK1 基因启动子在宫颈癌中呈高甲基化状态,可作为宫颈癌的病情和预后评估的生物学标志物。

【关键词】 宫颈癌; 死亡相关蛋白激酶 1; 甲基化; 临床意义

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.09.021 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)09-1101-02

Clinical significances of the DAPK1 gene promoter's methylation in cervical carcinoma LI Qi¹, HU Chang-hua¹, WAN Guang-hua¹, ZHANG Jing^{2△} (1. Department of Gynecology and Obstetrics, Hanyang Hospital, Wuhan, Hubei 430050, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Center Hospital of Xiangyang, Hubei 441021, China)

【Abstract】 Objective To study the clinical significances of death-associated protein kinase 1(DAPK1) gene promoter's methylation in cervical carcinoma. **Methods** Methylation specific PCR(MSP) were applied to detect DAPK1 gene promoter's methylation in cervical carcinoma and paracancerous normal tissues. The relationship between clinicopathological factors and DAPK1 gene promoter's methylation was analyzed. **Results** The methylation rate in cervical carcinoma was 62.5%, which was significantly higher than that in paracancerous normal tissues (5.0%). The differences of DAPK1 gene's methylation rates in histology staging, tumor diameters, lymph node metastasis, metastasis and FIGO staging were statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** DAPK1 gene promoter might be hypermethylated in cervical carcinoma and it could be served as a tumor biomarker in condition and prognosis evaluation.

【Key words】 cervical carcinoma; death-associated protein kinase 1; methylation; clinical significance

宫颈癌的发病机制主要与基因表达改变有关,表现遗传学在其发病机制中扮演重要角色,其中抑癌基因启动子甲基化引起的表观遗传学改变被认为是最重要的发病机制^[1-2]。死亡相关蛋白激酶 1(DAPK1)为钙调蛋白调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可正性调控细胞凋亡,与肿瘤的发生、发展和转移密切相关,在肿瘤中普遍存在高甲基化状态^[3-4]。本研究采用甲基化特异性聚合酶链反应(PCR)检测宫颈癌组织和癌旁组织 DAPK1 基因启动子甲基化状态,研究 DAPK1 基因在宫颈癌诊断、病情和预后评估中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象为 2010 年 1 月至 2012 年 1 月手术治疗的 80 例初治宫颈癌患者,均经症状体征、体格检查、影像学及病理组织学检查确诊。年龄 30~85 岁,平均(50.6±15.4)岁;病理组织类型包括鳞状细胞癌 60 例,腺癌 12 例,腺

鳞癌 8 例;根据 2009 年国际妇产科联盟(FIGO)宫颈癌分期,其中 I 期 20,II 期 35 例,III 17 例,IV 期 8 例。

1.2 方法 检测标本均取宫颈癌患者手术切除肿瘤组织和距肿瘤组织大于 5 cm 癌旁组织,标本取材后立即置于液氮中保存。DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。引物由大连宝生物工程有限公司合成。甲基化修饰试剂盒购于北京天漠公司。DAPK1 基因启动子甲基化 MSP 检测,按基因组 DNA 试剂盒说明书进行,提取宫颈癌组织和癌旁正常组织总 DNA。按甲基化试剂盒说明书采用重亚硫酸盐将提取的 DNA 未甲基化 C 转化为 U,转化后的样本进行 PCR 扩增。引物采用 Methyl Primer Express V1.0 设计,序列见表 1,PCR 反应体系为 25 μL,循环条件为:95℃预变性 10 min,95℃变性 1 min,65℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,共 35 个循环,最后一轮 72℃延伸 10 min。扩增后的产物经琼脂糖凝胶电泳后检测。

表 1 RASSF1A 基因 MSP 甲基化引物

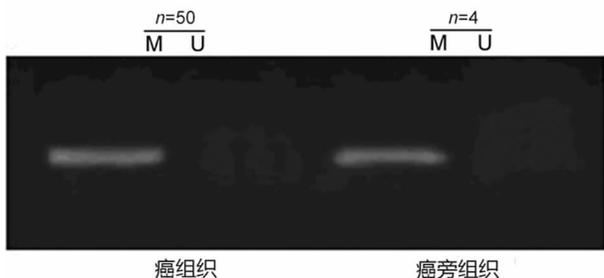
引物	甲基化引物(M)	非甲基化引物(U)
正向引物	5'-AAGGAGTCGAGAGGTTGTTTC-3'	5'-TAAGGAGTTGAGAGGTTGTTTT-3'
反向引物	5'-ACCCTACCGCTACGAATTACC-3'	5'- AACCTACCACTACAAATTACC-3'

△ 通讯作者, E-mail: mirror1219@shou.com。

1.3 统计学方法 采用 Sigmaplot 11.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。计数数据采用 χ^2 检验或 Fisher 精确计算 P 值。检验水准 $\alpha=0.05, P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 宫颈癌组织和癌旁组织检测结果 80 例患者中宫颈组织有 50 例 DAPK1 基因启动子呈甲基化状态, 甲基化率为 62.5%, 癌旁组织中有 4 例 DAPK1 基因启动子呈甲基化状态, 甲基化率为 5.0%, 宫颈癌组织中 DAPK1 基因启动子甲基化率显著高于宫颈癌癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 1。



注: M 为甲基化, U 为未甲基化。

图 1 RASSF1A 基因启动子甲基化 MSP 结果

2.2 DAPK1 基因启动子甲基化与临床病理因素的关系 见表 2。宫颈癌癌组织 DAPK1 基因启动子甲基化率在年龄和病理中差异无统计学意义 ($P>0.05$), 在组织学分级、肿瘤最大径、淋巴结转移、器官转移、FIGO 分期中差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 组织学分级高、肿瘤最大径大、有淋巴结转移及器官转移、FIGO 分期晚的癌组织 DAPK1 基因启动子甲基化率高于组织学分级低、肿瘤最大径小、无淋巴结转移及器官转移、FIGO 分期早的癌组织。

表 2 DAPK1 基因启动子甲基化与临床病理因素的关系

临床病理因素	n	甲基化		χ^2	P
		甲基化	未甲基化		
年龄	<50 岁	36	15	0.215	0.642
	≥50 岁	44	15		
组织类型	鳞状细胞癌	60	22	0.107	0.948
	腺癌	12	5		
	腺鳞癌	8	3		
组织学分级	I 级	40	20	6.388	0.041
	II 级	26	8		
	III 级	14	2		
肿瘤最大径	≤4 cm	60	28	7.111	0.008
	>4 cm	20	2		
淋巴结转移	有	32	6	6.722	0.010
	无	48	24		
器官转移	有	8	0	—	0.022
	无	72	30		
FIGO 分期	I 期	20	12	10.629	0.010
	II 期	35	14		
	III 期	17	4		
	IV 期	8	0		

注: — 表示无数据。

3 讨 论

基因甲基化是最重要的表观遗传学调控机制, 真核生物的 DNA 中高达 80% 的 CpG 位点发生甲基化改变, 这些甲基化主要分布在基因启动子区域的 CpG 岛, CpG 位点的甲基化可引起染色体及 DNA 空间构象发生改变, 主动或被动阻遏转录因子结合到转录起始点而调控基因表达^[5]。研究表明, 基因启动子甲基化与肿瘤的发病机制、病情及预后紧密相关, 可作为肿瘤的基因水平生物学标志物, 较传统的蛋白水平的肿瘤标志物具有更高的灵敏度及特异性^[6]。DAPK1 作为新发现的抑癌基因, 具有钙调蛋白调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的作用, 可正性调控细胞的凋亡, 在各种细胞凋亡系统中扮演重要角色, 被证实与肿瘤的发生、发展和转移紧密相关, 其启动子高甲基化改变在乳腺癌及消化系统均可检测到^[7-8], 在人乳头瘤病毒诱导发生的宫颈癌组织中其甲基化高达 56.3%^[9]。本研究中, 宫颈癌组织中 DAPK1 基因启动子甲基化率为 62.5%, 癌旁组织中甲基化率为 5.0%, 宫颈癌组织中 DAPK1 基因启动子甲基化率显著高于宫颈癌癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 由此证实 DAPK1 基因在宫颈癌中存在高甲基化状态。

研究表明, 抑癌基因的表观遗传学改变在肿瘤的诊断、病情评估和预后评估中扮演重要角色, 越来越多的基因被发现, 在肿瘤诊断中表现出极高的灵敏度及特异性。在本研究中, 组织学分级高、肿瘤最大径大、有淋巴结转移及器官转移、FIGO 分期晚的宫颈癌组 DAPK1 基因启动子甲基化率高于组织学分级低、肿瘤最大径小、无淋巴结转移及器官转移、FIGO 分期早的癌组织, 提示 DAPK1 基因启动子甲基化在宫颈癌病情及预后评估中具有重要作用。肿瘤的组织学分级及分期是公认的与肿瘤病情及预后相关的因素, 分化程度越低、分期越晚, 患者病情越重, 预后越差, 生存时间越短, 质量越差, 基于这个事实, 本文认为 DAPK1 基因启动子甲基化可以作为宫颈癌基因水平的生物学标志物, 可为宫颈癌的诊断、病情与预后评估提供证据, 尽管较目前的蛋白质生物学标志物的检测繁琐, 随着检测水平的提高, 会越来越体现出高灵敏度及特异性等优点。

参考文献

[1] Rizvi MM, Alam MS, Ali A, et al. Aberrant promoter methylation and inactivation of PTEN gene in cervical carcinoma from Indian population[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(8): 1255-1262.

[2] Zhao S, Sun G, Tony PW, et al. Expression and methylation status of the Syk gene in cervical carcinoma[J]. Arch Gynecol Obstet, 2011, 283(5): 1113-1119.

[3] Ahmad ST, Arjumand W, Seth A, et al. Methylation of the APAF-1 and DAPK-1 promoter region correlates with progression of renal cell carcinoma in North Indian population[J]. Tumour Biol, 2012, 33(2): 395-402.

[4] Hu SL, Kong XY, Cheng ZD, et al. Promoter methylation of p16, Runx3, DAPK and CHFR genes is frequent in gastric carcinoma[J]. Tumori, 2010, 96(5): 726-733.

[5] Ozdemir F, Altinisik J, Karateke A, et al. Methylation of tumor suppressor genes in ovarian Cancer[J]. Exp Ther Med, 2012, 4(6): 1092-1096.

[6] Ulirsch J, Fan C, Knafl G, et al. Vimentin DNA methylation predicts survival in breast Cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 137(2): 383-396. (下转第 1104 页)

平均血压降幅为 15.1%。

表 1 拉西地平 and 比索洛尔治疗前、后对血压、心率的影响

组别	收缩压(mm Hg)	舒张压(mmHg)	心率(次/分)
治疗前	163.3±18.7	108.2±7.6	74.3±8.3
治疗后	140.1±12.6*	91.2±5.4*	63.2±5.7*

注:与治疗前比较,*P<0.01。

表 2 拉西地平 and 比索洛尔治疗前、后对血糖、血脂、肝功能、肾功能的影响

组别	GLU(mmol/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	ALT(U/L)	Cr(μmol/L)
治疗前	4.80±1.06	4.46±0.71	1.73±0.14	2.42±1.16	32±11	70.56±15.22
治疗后	4.86±1.09	4.58±0.84	1.75±0.12	2.45±1.14	33±10	70.24±15.32

3 讨论

老年高血压发病率高,我国 60 岁及以上人群高血压的患病率为 49%,即 60 岁以上人群约有一半患高血压的可能^[2-3]。老年高血压在临床上有以下特点:(1)老年高血压多以收缩压增高为主,脉压增大,老年单纯收缩期高血压占高血压的 60%。随着年龄增长其发生率增加,同时脑卒中的发生率急剧升高。老年人各器官呈退行性变化,尤其心血管系统动脉硬化明显,心脏射血时主动脉不能完全膨胀,以及周围血管硬化等原因动脉内骤增的血容量得不到缓冲,导致收缩期血压增高,而舒张期相对降低,导致脉压差增大。(2)血压波动幅度加大,“晨峰”现象增多,高血压合并体位性低血压和餐后低血压增多。老年人的压力感受器调节血压的敏感性减退,导致血压波动增大,可明显增加发生心血管事件的危险。(3)血压昼夜节律异常发生增高,表现为夜间血压下降幅度小于 10%(非杓型)或超过 20%(超杓型),导致靶器官损害的危险性增加。(4)并发症增多:老年人由于生理机能减退,常有冠心病、糖尿病、高脂血症等。患高血压后易发生心、脑、肾的并发症,如心绞痛、心肌梗死、脑卒中、肾功能不全等^[4-5]。老年高血压患者的血管弹性减弱,血管壁的重构是导致动脉粥样硬化和血管狭窄的重要因素^[6]。故老年人用药应遵循从小剂量开始,逐渐增加剂量,缓慢降低血压,以避免低血压,脑及组织灌注不足,提倡联合用药,优先选择长效制剂,尽可能减少不良反应。应根据老年高血压合并其他疾病情况,采取个体化治疗并重视血压监测及血压达标。

拉西地平与比索洛尔联合应用,不同的降压机制针对不同的血压升高机制,协同作用,降压效果较好。拉西地平是一种新型的二氢吡啶类钙离子拮抗剂,其作用机制是选择性阻滞血管平滑肌细胞膜上的钙通道而减少钙离子内流,引起周围动脉扩张,减少外周阻力,其扩血管作用能减轻心脏的负荷而改善心功能,从而达到降压效果^[7]。拉西地平有高度脂溶性,它在脂质部分沉积并在清除阶段不断释放到结合部位,这一特点保证其降压作用强而持久。比索洛尔是β受体阻滞剂,能与去甲肾上腺素神经递质竞争β受体,使心率减慢,心肌收缩力减弱,

2.2 拉西地平和比索洛尔治疗前、后对血糖、血脂、肝功能、肾功能均无明显影响 见表 2。检查结果表明,两种药物联合应用对患者血糖、血脂、肝功能、肾功能均无明显影响。

2.3 不良反应 头痛 3 例,头晕 2 例,乏力 2 例,水肿 1 例。所有患者均未因上述不良反应而停药。

心输出量减少,心肌耗氧量下降,保护心脏并达到降压的作用^[8]。两种药物联合应用对血糖、血脂、肝功能、肾功能均无明显不良影响,其临床应用是安全的^[9]。两种药物均为长效降压药物,联合应用降压平稳有效、安全,不良反应少,服药简便,依从性好。

本文结果表明,拉西地平与比索洛尔联合应用治疗老年高血压是临床安全有效的理想组合。

参考文献

- [1] 中国高血压防止指南修订委员会. 中国高血压防止指南 2010[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19(8): 716.
- [2] 孙宁玲, 刘梅林, 郭翼珍, 等. 老年高血压危险程度更高[J]. 老年健康, 2010, 3(1): 56-58.
- [3] 高飞, 高焱莎. 我国高血压流行病学现状[J]. 中日友好医院学报, 2012, 26(5): 307-309.
- [4] 杜志刚. 高血压并发症及其预防和治疗研究[J]. 中国实用医药, 2011, 06(26): 93-94.
- [5] 江云东, 杨思进, 白雪. 拉西地平联用比索洛尔治疗原发性高血压临床研究[J]. 中国社区医师杂志, 2010, 25(): 108.
- [6] 李蕊, 张俊萍, 张慧. 拉西地平治疗老年高血压病的疗效观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(8): 1024.
- [7] 侯兴旺, 王蓉. 拉西地平治疗高血压 61 例的临床疗效观察[J]. 中国现代医生, 2008, 46(7): 103-104.
- [8] 苏勇, 薛楠. 拉西地平治疗原发性高血压临床观察[J]. 基层医学论坛, 2012, 16(5): 607.
- [9] 宦文辉, 胡兴文. 比索洛尔与拉西地平合用治疗原发性高血压 40 例的临床观察[J]. 川北医学院学报, 2010, 25(5): 418-420.

(收稿日期: 2012-12-14)

(上接第 1102 页)

- [7] Pehlivan S, Artac M, Sever T, et al. Gene methylation of SFRP2, P16, DAPK1, HIC1, and MGMT and KRAS mutations in sporadic colorectal Cancer[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 201(2): 128-132.
- [8] Qian J, Wang YL, Lin J, et al. Aberrant methylation of the death-associated protein kinase 1(DAPK1) CpG island in

chronic myeloid leukemia[J]. Eur J Haematol, 2009, 82(2): 119-123.

- [9] Henken FE, Wilting SM, Overmeer RM, et al. Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis[J]. Br J Cancer, 2007, 97(10): 1457-1464.

(收稿日期: 2012-12-18)