

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.21.006

文章编号: 1005-8982(2019)21-0033-04

肺癌食管癌缺失基因1及其甲基化在 鼻内翻性乳头状瘤中的表达研究*

蒋伟蓉¹, 唐金勇², 李云秋³, 钟宇³

(1. 湖南岳阳职业技术学院, 湖南 岳阳 414000; 2. 郴州市第一人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖南 郴州 423000; 3. 湖南师范大学附属第一医院耳鼻喉科, 湖南 长沙 410005)

摘要: 目的 探讨肺癌食管癌缺失基因1 (*DLEC1*) 表达及其甲基化在鼻内翻性乳头状瘤 (NIP) 中表达的临床意义及与 Ki-67 表达的关系。**方法** 收集 30 例 NIP 组织作为 NIP 组, 20 例鼻黏膜组织作为对照组, 采用甲基化特异性聚合酶链反应 (MSP) 检测 *DLEC1* 基因启动子区域甲基化情况, 免疫组织化学法检测 *DLEC1* 和 Ki-67 的表达。**结果** 30 例 NIP 组织中 *DLEC1* 基因启动子甲基化比例为 43.3%, 高于正常组织 (2.0%) ($P < 0.05$); NIP 组 *DLEC1* 失表达率为 76.7%, 高于对照组 45.0% ($P < 0.05$); NIP 组 Ki-67 阳性表达率为 60.0%, 高于对照组 10.0% 阳性表达率 ($P < 0.05$); NIP 组织中 *DLEC1* 的表达与 Ki-67 的表达呈负相关 ($P < 0.05$)。**结论** *DLEC1* 基因启动子甲基化在 NIP 患者中表达较高, *DLEC1* 在 NIP 中表达下调且与 Ki-67 呈负相关, *DLEC1* 表达缺失可能与 NIP 的发病相关。

关键词: 鼻内翻性乳头状瘤; 肺癌食管癌缺失基因 1; Ki-67; 甲基化; 免疫组织化学

中图分类号: R739.62

文献标识码: A

Research of expression of *DLEC1* and its methylation in patients with nasal inverted papilloma*

Wei-rong Jiang¹, Jin-yong Tang², Yun-qiu Li³, Yu Zhong³

(1. Yueyang Vocational Technical College of Hunan Province, Yueyang, Hunan 414000, China; 2. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, The First People's Hospital of Chenzhou City, Chenzhou, Hunan 423000, China; 3. Department of otolaryngology, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical value of *DLEC1* gene expression and its methylation in nasal inverted papilloma (NIP) and its relationship with Ki-67 expression. **Methods** Thirty NSCLC tissues were collected as NIP group and 20 nasal mucosa tissues as control group. Methylation specific polymerase chain reaction (MSP) was used to detect the methylation of the *DLEC1* gene promoter region. The expression of *DLEC1* and Ki-67 was detected by immunohistochemistry. **Results** The methylation ratio of *DLEC1* gene promoter in NIP tissues was 43.3%, which was higher than that in normal tissue (2.0%) ($P < 0.05$). The negative rate of *DLEC1* in the NIP group (76.7%) was higher than that in the control group (45.0%) ($P < 0.05$), and the positive rate of Ki-67 in the NIP group (60.0%) was significantly higher than that in the control group (10.0%) ($P < 0.05$); the correlation between the expression of *DLEC1* and Ki-67 in NIP tissue was negatively correlated ($P < 0.05$). **Conclusions** Methylation of *DLEC1* gene promoter is highly expressed in NIP patients, and the express of *DLEC1* is downregulated in NIP and negatively correlated with Ki-67.

Keywords: nasal inverted papilloma; *DLEC1*; Ki-67 Antigen; methylation; immunohistochemistry

收稿日期: 2019-04-03

* 基金项目: 湖南省科技厅一般项目 (No: 2013FJ6034)

[通信作者] 钟宇, E-mail: 41914816@qq.com

鼻内翻性乳头状瘤 (nasal inverted papilloma, NIP) 是一种耳鼻喉科临床中常见的良性肿瘤, 具有局部发病、侵袭性强、易复发且易恶性变的特点^[1]。5% 的 NIP 与鼻窦癌有关, 因此探讨 NIP 的发病机制有助于其早期诊断及治疗。肺癌食管癌缺失基因 1 (deleted in lung and esophagi cancer 1, *DLEC1*) 是一个新的候选肿瘤抑制基因, 研究发现 *DLEC1* 基因是一个良好的预后指标^[2]。而增殖细胞核抗原 Ki-67 是一种与细胞有丝分裂密切相关的抗原, 能敏感而特异且较全面可靠地反映人体细胞增殖活性^[3]。本研究通过检测 NIP 组织中 *DLEC1* 表达及基因甲基化和 Ki-67 的表达, 探讨 *DLEC1* 与 NIP 发病及临床病理特征的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 1 月—2018 年 1 月湖南师范大学附属第一医院 (湖南省人民医院) 及郴州市第一人民医院经病理确诊为鼻内翻性乳头状瘤患者 30 例为 NIP 组。其中, 男性 14 例, 女性 16 例; 年龄 39 ~ 67 岁, 平均 51.8 岁。另选取同期鼻中隔偏曲矫正术患者 20 例为对照组, 取其正常中鼻甲黏膜组织。其中, 男性 12 例, 女性 8 例。所有组织标本常规石蜡包埋切片备用。

1.2 方法

1.2.1 试剂 石蜡包埋组织 DNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司, 引物、Taq 酶、Gold View II 型核酸染色剂等购自大连宝生物工程有限公司, EZ DNA Methylation-Gold 试剂盒购自北京天漠科技发展有限公司, 即用型 EnVision™ Supper/HRP 检测试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。

1.2.2 NIP 组织中 *DLEC1* 和 Ki-67 检测 采用即用型 EnVision™ Supper/HRP 检测试剂盒检测 *DLEC1* 和 Ki-67 表达, 操作步骤按试剂盒说明书进行。*DLEC1* 在细胞核和 / 或细胞浆呈棕黄色为表达阳性, Ki-67 在细胞核呈棕黄色为表达阳性, 于高倍显微镜下 ($\times 400$) 取 5 个视野, 依据染色细胞数及强弱分类及表达的细

胞平均数所占百分比判定: $< 5\%$ 为阴性, $\geq 5\%$ 为阳性。

1.2.3 *DEL1* 甲基化检测 采用 DNA 提取试剂盒提取石蜡包埋组织中 DNA, 采用 EZ DNA Methylation-Gold 试剂盒, 将组织 DNA 取 $1 \mu\text{g}$ 进行修饰; 以上游 2 000 bp 作为该基因启动子区域设计引物, 甲基化 (M) 引物序列, 正向: 5'-GATTATAGCGATGACGGGATTC-3', 反向: 5'-ACCCGACTAATAACGAAATTAACG-3'; 未甲基化 (U) 引物序列, 正向: 5'-TGATTATACTGATGATGGGATTTGA-3', 反向: 5'-CCCAACTAATAACAAATTAACACC-3'; 扩增产物大小 193 bp。PCR 反应体系 $25 \mu\text{l}$, 反应条件根据文献修改^[4]。甲基化: 95°C 预变性 10 min, 40 个循环 (94°C 变性 30 s, 58°C 退火 45 s, 72°C 延伸 30 s), 最后 72°C 延伸 5 min, 4°C ; 非甲基化: 95°C 预变性 10 min, 40 个循环 (94°C 变性 30 s, 55°C 退火 45 s, 72°C 延伸 30 s), 最后 72°C 延伸 5 min, 4°C 。取扩增产物琼脂糖凝胶电泳判断结果。为保证检测可靠性, 采用反复多次检测 *DLEC1* 均为甲基化阳性的肺腺癌 A549 细胞 DNA 为甲基化阳性对照, 外周血单个核细胞 DNA 标本为非甲基化阳性对照。产物电泳只出现非甲基化条带, 结果统计为非甲基化; 出现甲基化条带, 则无论是否出现非甲基化条带, 均统计为甲基化。

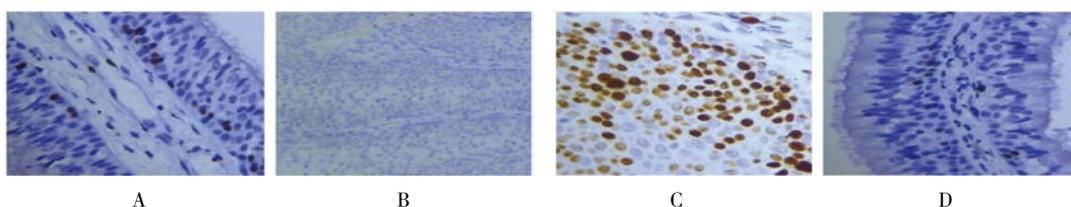
1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计数资料采用例 (%) 表示, 比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 *DLEC1* 和 Ki-67 的表达情况

NIP 组 *DLEC1* 失表达 23 例 (76.7%), 对照组 *DLEC1* 失表达 9 例 (45.0%), 两组比较差异有统计学意义 ($\chi^2=5.223$, $P=0.022$); NIP 组 Ki-67 阳性 18 例 (60.0%), 对照组 Ki-67 阳性 2 例 (10.0%), 两组比较差异有统计学意义 ($\chi^2=12.500$, $P=0.000$)。见图 1。



A: NIP 组 *DLEC1* 失表达; B: 对照组 *DLEC1* 阳性表达; C: NIP 组 Ki-67 阳性表达; D: 对照组 Ki-67 阴性表达。

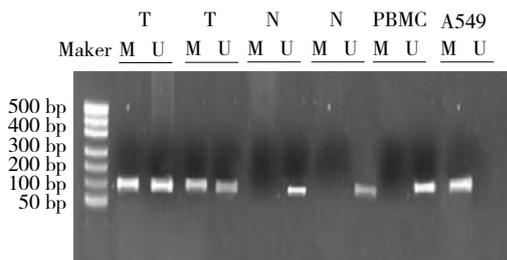
图 1 两组 *DLEC1* 和 Ki-67 的表达情况 ($\times 400$)

2.2 两组 *DLEC1* 启动子甲基化水平

NIP 组 *DLEC1* 启动子区 CpG 岛甲基化阳性检出率为 43.3% (13 例), 对照组有 10.0% (2 例) *DLEC1* 启动子区呈甲基化状态, 两组比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=6.349, P=0.012$)。见图 2。

2.3 NIP 组 *DLEC1* 与 Ki-67 表达的关系

NIP 组 *DLEC1* 与 Ki-67 的表达有关 ($\chi^2=5.660, P=0.017$)。见表 1。



T: NIP 组织; N: 正常鼻黏膜组织; PBMC: 外周血单个核细胞, 非甲基化阳性对照; A549: 肺腺癌上皮细胞, 甲基化阳性对照; M: 甲基化; U: 非甲基化。

图 2 两组 *DLEC1* 基因启动子甲基化水平

表 1 NIP 组 *DLEC1* 与 Ki-67 表达的相关性

Ki-67	<i>DLEC1</i>		合计
	+	-	
高表达	1	17	18
低表达	6	6	12
合计	7	23	30

3 讨论

NIP 在 1854 年被首次报道^[5], 是一种鼻腔和鼻窦的良性肿瘤, 它有 3 个主要特点^[6-7]: 局部相对高侵袭性、高复发率及可能在发病初或复发时发现与恶性肿瘤相关。目前, 肿瘤的性质及是否为鳞癌的癌前病变及发病机制仍不明确, 这些特点使得其在临床治疗较为困难, 因此对 NIP 发病机制的研究具有重要的临床意义。

有研究^[8-10]认为, 其发病可能与 HPV 感染有关, HPV 感染易引起组织细胞增殖, Ki-67 为增殖性核抗原标志物, 在除 G₀ 期细胞, Ki-67 在所有 G₁、S、G₂ 和 M 期细胞中均有表达, 且在许多恶性肿瘤中的表达与肿瘤活跃、病理分期及早期复发有关。本研究中发现 NIP 组 Ki-67 表达高于对照组, 与其他研究结果类似, 说明在 NIP 中存在组织增生。

许多标志物^[11-12]如桥粒芯蛋白 3 和表皮生长因子受体等与 NIP 有关, 但 NIP 恶性转化的确切机制尚不清楚, 有研究者^[13]曾对口腔鳞癌及癌前病变黏膜白斑中 *DLEC1* 的表达及机制进行研究, 发现 *DLEC1* 在口腔鳞癌中表达受抑制, 且其抑制程度与肿瘤浸润深度相关。*DLEC1* 表达从正常组织到黏膜白斑到鳞癌依次减弱。*DLEC1*^[14]定位于 3p22 ~ p21.3, 因已证实其在肝癌、鼻咽癌、肺癌、胃癌、口腔鳞癌和肾细胞癌组织中表达下调, 因而被鉴定为候选抑癌基因^[15-18]。该基因包含 37 个外显子, 是一种相对较新的基因, 其 3p 位点是几个抑癌基因的著名位点。

DLEC1 通过表观遗传改变而受抑制, 其表达方式与表观遗传相关, 受启动子 CpG 高甲基化组蛋白有或无去乙酰化而被调控^[19]。有研究在胃癌和结肠癌细胞系中再引入 *DLEC1* 可抑制肿瘤细胞克隆。而在多个肿瘤中发现 *DLEC1* 活性被抑制, 可能是通过影响 *DLEC1* 启动子甲基化而实现^[20]。其他研究^[21]发现, 在肝细胞癌中 *DLEC1* 可诱导细胞周期 G₁ 期阻滞, 本研究发现 NIP 组 *DLEC1* 失表达高于对照组, NIP 组 *DLEC1* 与 Ki-67 表达有关, NIP 组 *DLEC1* 启动子区 CpG 岛甲基化阳性检出率高于对照组, 提示在 NIP 中 *DLEC1* 基因受抑制, 其发病可能与其有关。

综上所述, *DLEC1* 表达缺失可能与 NIP 的发病相关, 通过 *DLEC1* 启动子区 CpG 岛甲基化造成基因在 NIP 中失表达, 并与 Ki-67 协同, 引起 NIP 组织异常增殖而发病。*DLEC1* 可能成为治疗 NIP 并防止其复发的新的治疗靶点。

参考文献:

- [1] 黄选兆, 汪吉宝, 孔维佳, 等. 实用耳鼻咽喉头颈外科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 26-237.
- [2] KWONG J, LEE J Y, WONG K K, et al. Candidate tumor-suppressor gene *DLEC1* is frequently downregulated by promoter hypermethylation and histone hypo-acetylation in human epithelial ovarian cancer[J]. Neoplasia, 2006, 8(4): 268-278.
- [3] TSOU Y A, HUANG H J, WANG T C, et al. Evaluation of correlation of cell cycle proteins and Ki-67 interaction in paranasal sinus inverted papilloma prognosis and squamous cell carcinoma transformation[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 1-16.
- [4] 叶晓兵, 张有为, 陈龙邦. *DLEC1* 基因在结直肠癌中的甲基化水平及临床意义 [J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(8): 842-845.
- [5] WARD N. A mirror of the practice of medicine and surgery in the hospitals of London: London hospital[J]. Lancet, 1854, 2: 480-482.
- [6] 黎庆辉, 朱江. 鼻腔-鼻窦内翻性乳头状瘤复发与恶变的临床分析 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 28(11): 797-800.

- [7] KIM W S, HYUNDW KIM C H, et al. Treatment outcomes of sinonasal inverted papillomas according to surgical approaches[J]. *Acta Otolaryngol*, 2010, 130(4): 493-497.
- [8] LAWSON W, SCHLECHT N F, BRANDWEIGENSLER M. The role of the human papillomavirus in the pathogenesis of Schneiderian inverted papillomas: an analytic overview of the evidence[J]. *Head Neck Pathol*, 2008, 2(2): 49-59.
- [9] KIM S G, LEE O Y, CHIO J W, et al. Pattern of expression of cell cycle-related proteins in malignant transformation of sinonasal inverted papilloma[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2011, 25(2): 75-81.
- [10] 张峻崢, 杨一兵, 汤勇, 等. Msx2, topo II - α , HPV16 及 VEGF 在鼻内翻性乳头状瘤中的定量及意义 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 28(23): 1819-1823.
- [11] HUANG C C, LEE T J, CHANG P H, et al. Desmoglein 3 is overexpressed in inverted papilloma and squamous cell carcinoma of sinonasal cavity[J]. *Laryngoscope*, 2010, 120(1): 26-29.
- [12] CHAO J C, FANG S Y. Expression of epidermal growth factor receptor in the inverted papilloma and squamous cell carcinoma of nasal cavity[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2008, 265(8): 917-922.
- [13] CHANG P H, HUANG C C, LEE T J, et al. Downregulation of DLEC1 in sinonasal inverted papilloma and squamous cell carcinoma[J]. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2012, 41(2): 94-101.
- [14] WANG K, LING T, WU H, et al. Screening of candidate tumor-suppressor genes in 3p21.3 and investigation of the methylation of gene promoters in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(3): 1175-1182.
- [15] CHAN W H, CHANG K P, YANG S W, et al. Transcriptional repression of DLEC1 associates with the depth of tumor invasion in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2010, 46(12): 874-879.
- [16] YING J, POON F F, YU J, et al. DLEC1 is a functional 3p22.3 tumour suppressor silenced by promoter CpG methylation in colon and gastric cancers[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(4): 663-669.
- [17] 刘艳华, 罗达亚, 艾有生, 等. 小细胞肺癌中 DLEC1 的表达缺失与临床病理因素的相关研究 [J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(16): 2898-2901.
- [18] ZHANG Q, YING J, LI J, et al. Aberrant promoter methylation of DLEC1, a critical 3p22 tumor suppressor for renal cell carcinoma, is associated with more advanced tumor stage[J]. *J Urol*, 2010, 184(2): 731-737.
- [19] SEVEN D, YAVUZ E, KILIC E, et al. DLEC1 is not silenced solely by promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Gene*, 2015, 563(1): 83-86.
- [20] WANG Z, LI L, SU X, et al. Epigenetic silencing of the 3p22 tumor suppressor DLEC1 by promoter CpG methylation in non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas[J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 209.
- [21] QIU G H, SALTO-TELLEZ M, ROSS J A, et al. The tumor suppressor gene DLEC1 is frequently silenced by DNA methylation in hepatocellular carcinoma and induces G1 arrest in cell cycle[J]. *J Hepatol*, 2008, 48(3): 433-441.

(王荣兵 编辑)