

TFAP2E 基因CpG 岛甲基化状态与食管癌患者化疗疗效的关系研究

卞保祥, 洪义东, 胡楠, 宋子琰, 吴风雷* (连云港市第一人民医院, 江苏 连云港 221002)

摘要: 目的 探讨 TFAP2E 基因 CpG 岛甲基化状态与食管癌患者诊断及基于氟尿嘧啶类药物化疗疗效之间的关系。方法 搜集 101 例病理学明确诊断的食管癌组织及 50 例癌旁正常组织, 通过荧光定量甲基化特异性 PCR 检测组织甲基化率。对其中 75 例晚期(IV 期)患者接受基于氟尿嘧啶药物为基础化疗的疗效进行评价, 并分析 TFAP2E 基因 CpG 岛甲基化状态和临床病理资料及化疗疗效间的关系。结果 肿瘤组织中 TFAP2E 甲基化的发生率高于正常组织($P<0.05$)。TFAP2E 甲基化率和肿瘤分化程度和淋巴结转移有关。TFAP2E 甲基化状态和化疗疗效有关, Logistic 回归分析表明低甲基化 TFAP2E 患者化疗效果明显优于高甲基化患者($OR=2.89$, 95% CI: 1.57~5.37; $P<0.05$)。结论 TFAP2E 基因 CpG 岛甲基化和接受基于氟尿嘧啶化疗食管癌患者疗效相关, 可能成为预测化疗效果的有效生物标志。

关键词: 食管癌; 甲基化; TFAP2E; 化疗疗效

中图分类号: R969.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2017)12-1756-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.12.025

引用本文: 卞保祥, 洪义东, 胡楠, 等. TFAP2E 基因 CpG 岛甲基化状态与食管癌患者化疗疗效的关系研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(12): 1756-1758.

Relationship Between the CpG Island Methylation of TFAP2E and Chemotherapy in Patients with Esophageal Cancer

BIAN Baoxiang, HONG Yidong, HU Nan, SONG Ziyang, WU Fenglei* (First People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 221002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the relationship between the CpG island methylation of TFAP2E and the diagnosis of patients with esophageal cancer based on fluorouracil chemotherapy. **METHODS** The 101 cases of esophageal carcinoma tissues and 50 normal tissues were collected. The methylation rate was detected by fluorescence quantitative methylation specific PCR. The efficacy of fluorouracil-based chemotherapy was evaluated in 55 patients with advanced stage (IV). And to analyze the relationship between the methylation status of TFAP2E gene CpG island and clinicopathological data and chemotherapy efficacy. **RESULTS** The TFAP2E methylation occurred at a significantly higher incidence rate in tumor tissues compared to adjacent nontumor tissues($P<0.05$). Hypermethylation of TFAP2E occurred more frequently in tumors with lower differentiation grades and lymph node metastasis ($P<0.05$). The chemotherapy effect of hypermethylated TFAP2E patients was significantly lower than that of hypomethylated patients ($OR=2.89$, 95% CI: 1.57-5.37; $P<0.05$). **CONCLUSION** The CpG island methylation of TFAP2E is associated with fluorouracil based chemotherapy in patients with esophageal cancer and may be an effective biomarker for predicting chemotherapy.

KEY WORDS: esophageal cancer; methylation; TFAP2E; chemotherapy response

食管癌目前仍旧是世界上最难治愈的肿瘤之一^[1]。近年来,随着多学科治疗手段的进展,疗效在一定程度上有所提高,但预后仍不乐观。其根本原因是手术复杂,容易淋巴转移,以及治疗手段不足^[2]。5-氟尿嘧啶(5-FU)和顺铂目前仍是该疾病最基本的化疗用药。然而,癌症起始和进展的分子生物学研究还不能很明确地解释化疗药物的耐药性机制,已有研究报道了表观遗传改变是食管癌的病因之一^[3]。表观遗传改变包括 DNA 甲基化和组蛋白修饰,影响着转录基因调控^[4]。但这些

分子改变在预测化疗药物方面的研究很少报道。转录因子 AP-2 家族共 5 个成员(TFAP2A, TFAP2B, TFAP2C, TFAP2D 和 TFAP2E),在肿瘤的发生发展过程中起着重要的作用。位于 1p34 染色体上的 TFAP2E 具有 2 个胞嘧啶-磷酸鸟嘌呤(CpG)岛,可通过 CpG 高甲基化来调节基因的表达。已有研究表明,TFAP2E 的甲基化状态和接受氟尿嘧啶类药物的结肠癌和胃癌患者的疗效有关^[5],但国内外尚没有食道癌的相关研究。本研究分析接受氟尿嘧啶类药物的食管癌患者的疗效和

作者简介: 卞保祥,男,硕士,副主任医师 Tel: 18961326161
医师 Tel: 18961328007 E-mail: wufenglei1981@163.com

E-mail: bianbx@126.com *通信作者: 吴风雷,男,博士,副主任

TFAP2E 甲基化状态的关系。

1 资料和方法

1.1 患者

收集 2013 年 1 月—2016 年 12 月 101 位经组织学确诊为食管癌和 50 例癌旁正常组织标本。所有患者均通过医院伦理委员会同意参加该研究。在 101 位食管癌患者中有 50 例患者确诊时候已发生远处转移(IV 期)。接受了以氟尿嘧啶类药物为基础的联合化疗(5-FU+奥沙利铂, 5-FU+顺铂, 希罗达+奥沙利铂)。按 RECIST 标准进行疗效评价。

1.2 方法

1.2.1 组织 DNA 提取 组织 DNA 的提取参照 QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen)试剂盒说明书进行[8]。

1.2.2 荧光定量甲基化特异性 PCR(Methylight)检测检测组织甲基化率 Methylight 方法是一种甲基化定量检测方法,将提取的组织 DNA 和甲基化酶(M.Sss I)修饰后 DNA 的样本按照说明书(Qiagen)进行实时荧光定量 PCR(Q-PCR)检测:通过 Taqman 探针法进行 PCR 反应检测 TFAP2E 甲基化水平,参照文献[9]进行,检测 TFAP2E 甲基化的引物及探针: Forward 5'-TTTAGAAGCGGTTTTCGTATC-3', reverse 5'-CCGAACGCTTACC TACAATC-3', probe 5'-TTGCGGTGGGCGTTTTCGGGT-3', 内参 Beta-actin(ACTB)的引物及探针 Forward 5'-TGTTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT-3', reverse 5'-AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA-3', probe 5'-ACCACCACCAACACACAATAACAAACACA-3'。具体反应条件如下。反应条件: 95 °C, 10 min, 冰浴, 以 95 °C, 15 s, 60 °C, 60 s, 72 °C, 10 s 的顺序循环 30 个周期,最后延伸 72 °C 延伸 10 min。

1.2.3 甲基化率的计算 Q-PCR 检测基因表达以 ACTB 为内参照, TFAP2E 甲基化率(percentage of methylated reference, PMR)=($2^{-\Delta\Delta Ct}$) $\times$ 100%, $\Delta\Delta Ct$ =(样品的目的基因的 ct 的平均-样本的内参基因的 ct 的平均)-(甲基化酶修饰后的目的基因的 ct 的平均-内参基因的 ct 的平均)。2^{- $\Delta\Delta Ct$} 值越大,甲基化率越高。取 3 次的独立实验结果的均值和标准差($\bar{x} \pm s$)。

1.3 统计方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,采用受试者工作特征曲线(Receiver-operating-

characteristic, ROC)区分 TFAP2E 高甲基化和低甲基化的截断值。组间率比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 认为有统计学意义。多因素 Logistic 回归分析,计算 OR 值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者临床病理资料

患者平均年龄(56.6 $\pm$ 3.5)岁。男性 78 例,女性 23 例。鳞癌 88 例,腺癌 13 例,高分化 37 例,中分化 40 例,低分化 24 例,有淋巴结转移 69 例,无淋巴结转移 31 例。

2.2 肿瘤和正常组织的甲基化状态

食管癌组织 TFAP2E 基因发生甲基化概率为 96.08%(97/101),正常组织为 66%(33/50),与正常组织相比,差异具有统计学意义($\chi^2=31.17$, $P<0.001$)。

2.3 定义 TFAP2E 甲基化和低甲基化 PMR 截断值的确定

为更好统计并明确 TFAP2E 甲基化作用,通过 ROC 曲线分析确定最佳的截止值以区分 TFAP2E 高甲基化和低甲基化。尤登指数结果提示>34.5%的 PMR 为高甲基化,<34.5%为低甲基化。其曲线下面积(AUC): 0.851(95% 可信区间, 0.776~0.925),见图 1。

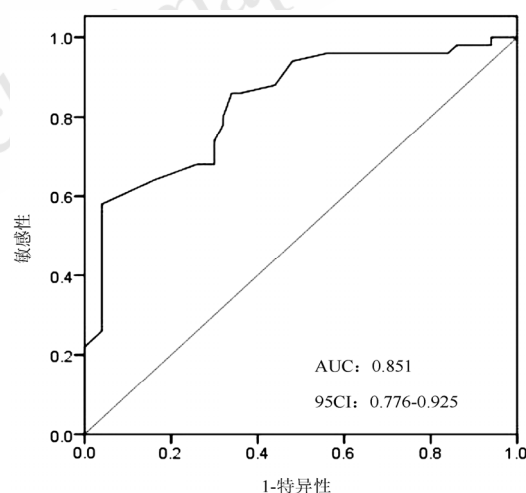


图 1 ROC 曲线分析,尤登指数提示截断值为 34.5%

Fig. 1 ROC curve analysis, the cut-off value prompted from Yuden index is 34.5%

2.4 TFAP2E 甲基化状态和临床病理资料之间的关系

这 2 个位点的基因型和性别、年龄、病理学类型无关联性,和肿瘤分化程度及淋巴结转移有关($P<0.05$),见表 1。

表 1 TFAP2E 甲基化状态和临床病理资料之间的关系
Tab. 1 The relationship between TFAP2E methylation and clinicopathological

组别	例数	TFAP2E 甲基化状态		P
		高甲基化	低甲基化	
年龄(岁)	≤60	49	36	0.964
	>60	52	38	
性别	男	78	55	0.382
	女	23	14	
组织类型	鳞癌	88	63	0.861
	腺癌	13	9	
分化程度	高	23	11	0.026
	中	37	22	
淋巴结转移	低	40	37	0.02
	无	32	19	
	有	69	57	

2.5 TFAP2E 甲基化状态和化疗疗效之间的关系
在所有接受以氟尿嘧啶类药物为基础化疗食管癌患者中,按照 RECIST 标准,17 例(34%)化疗有效,33 例(66%)化疗无效。在 75 例接受化疗的食管癌患者中,40 例为 TFAP2E 高甲基化,11 例(27.5%)化疗有效,35 例为 TFAP2E 低甲基化,20 例(57.1%)有效。TFAP2E 高甲基化患者化疗有效率明显低于低甲基化患者($P<0.05$)。多元 logistic 回归分析校正了年龄、性别、组织学类型、疾病分期和化疗方案以后,TFAP2E 高甲基化患者化疗有效率低于低甲基化患者($OR=2.89$, 95% CI: 1.57~5.37; $P<0.05$)。

表 2 化疗敏感性和 TFAP2E 甲基化状态之间的关系
Tab. 2 The relationship between chemosensitivity and TFAP2E methylation

TFAP2E 甲基化状态	化疗有效		化疗无效		P	OR	95%CI
	N	%	N	%			
低甲基化	20	57.1	15	42.9	0.041	2.89	1.57~5.37
高甲基化	11	27.5	29	72.5			

3 讨论

DNA 表观遗传改变尤其是 CpG 岛的甲基化在肿瘤的发生发展中起着重要的作用^[6]。转录因子 AP-2 家族和肿瘤的发生密切相关,其中 TFAP2D 和 TFAP2E 在前列腺癌和结肠癌中呈高甲基化状态。TFAP2E 在食管癌中的甲基化状态暂无研究报道。
本研究发现食管癌组织中 TFAP2E 甲基化率明显高于癌旁正常组织,提示 TFAP2E 基因甲基化可能是食管癌发生的危险因素。临床病理资料的关系分析发现在肿瘤低分化和淋巴结有转移的患者 TFAP2E 的甲基化水平明显增高,提示高甲基化水平 TFAP2E 可能和食管癌的恶性程度有关。但是这一研究结果和其他研究不一致,有研究报道 TFAP2E 在结直肠癌中的高甲基化状态是肿瘤

低度恶性的标志,和肿瘤组织高分化,临床分期偏早密切相关^[7]。研究结果的不一致可能与肿瘤的异质性有关,也可能是在不同肿瘤中 TFAP2E 甲基化状态扮演的角色不一样。需要将来进一步扩大样本量来证实。
本实验进一步研究了 TFAP2E 的甲基化状态和化疗疗效之间的关系。新英格兰杂志 2012 年的最新研究显示^[13], AP-2 转录因子家族之一 TFAP2E 基因启动子区呈现高甲基状态时,肿瘤患者会对 5-FU 耐药。另有研究表明,在消化道肿瘤(结直肠癌、胃癌)里 TFAP2E 高甲基化会导致氟尿嘧啶类药物耐药^[5,7]。本研究的结果提示,在所有接受氟尿嘧啶类药物的晚期食管癌患者,TFAP2E 高甲基化患者的化疗有效率 27.5%,明显低于 TFAP2E 低甲基化患者,多元 Logistic 回归分析在校正了年龄、性别、组织学类型,肿瘤分化程度和淋巴结转移等因素后,TFAP2E 高甲基化患者化疗有效率明显低于 TFAP2E 低甲基化患者($OR=2.89$, 95% CI: 1.57~5.37; $P<0.05$)。这一发现可能为食道癌患者个体化化疗方案的选择提供新的生物标记物。但是本研究也存在一定的局限性,比如说样本量不多,可能在统计方面带来一定偏倚。因此在将来的研究中将进一步收集病例,增加统计数量,进一步分析 TFAP2E 甲基化水平和临床病理资料和化疗疗效之间的关系。

REFERENCES

- [1] RUSTGI A K, EL-SERAG H B. Esophageal carcinoma [J]. N Engl J Med, 2014, 371(26): 2499-2509
- [2] PENNATHUR A, GIBSON M K, JOBE B A, et al. Oesophageal carcinoma [J]. The Lancet, 2013, 381(9864): 400-412.
- [3] O'CALLAGHAN C, FANNING L J, BARRY O P. Hypermethylation of MAPK13 promoter in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with loss of p38δ MAPK expression [J]. Cancers, 2015, 7(4): 2124-2133.
- [4] 张铁雯, 方罗, 郑小卫, 等. 细胞色素 P450 酶的表现遗传学调控及研究进展 [J]. 中国临床药理学, 2017, 34(2): 293-297
- [5] EBERT M P A, TÄNZER M, BALLUFF B, et al. TFAP2E-DKK4 and chemoresistance in colorectal cancer [J]. N Engl J Med, 2012, 366(1): 44-53.
- [6] SUN J, DU N, LI J, et al. Transcription factor AP2ε: A potential predictor of chemoresistance in patients with gastric cancer [J]. Technol Cancer Res Treat, 2016, 15(2): 285-295.
- [7] MCMAHON K W, KARUNASENA E, AHUJA N. The roles of DNA methylation in the stages of cancer [J]. Cancer J, 2017, 23(5): 257-261.
- [8] ZHANG Z M, WANG Y, HUANG R, et al. TFAP2E hypermethylation was associated with survival advantage in patients with colorectal cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2014, 140(12): 2119-2127.

收稿日期: 2017-06-26
(本文责编: 曹粤锋)