

DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20160713.007

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20160713.1156.014.html>

NSCLC 患者血清 HDAC1 和 DNMT1 含量对临床病理分期、恶性分子表达的评估价值

闫伟¹, 汤小山¹, 王瑞东²

(1.解放军第 455 医院检验科, 上海 长宁 200052; 2.同济大学附属肺科医院检验科 上海 杨浦 200433)

[摘要] 目的: 研究非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者血清组蛋白去乙酰化酶 1(histone deacetylases 1, HDAC1)和 DNA 甲基化转移酶 1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)含量与肿瘤临床病理分期、恶性分子表达的相关性。方法: 选择 2012 年 4 月~2015 年 10 月在我院确诊为 NSCLC 的 89 例患者作为恶性组, 并收集血清样本、肺癌组织, 64 例肺部良性病变患者作为良性组并收集血清标本, 测定血清中 HDAC1、DNMT1 含量以及肺癌组织中 p53、p21、PTEN、c-myc、MKi-67 的表达量。结果: 恶性组血清中 DNMT1 和 HDAC1 的含量显著高于对照组($P < 0.05$), 且 TNM 分期越高、血清中 DNMT1 和 HDAC1 的含量越高, 而不同组织类型 NSCLC 患者血清中 DNMT1 和 HDAC1 的含量无显著性差异($P > 0.05$); 恶性组 TNM 分期越高, 肿瘤组织中 p21、p53、PTEN 的表达量越低, 且与血清 DNMT1、HDAC1 含量呈负相关, c-myc、MKi-67 的表达量越高且与血清 DNMT1、HDAC1 含量呈正相关。结论: NSCLC 血清中 DNMT1 和 HDAC1 的含量显著升高并且能够降低抑癌基因表达、促进原癌基因表达并参与肿瘤的发生发展。

[关键词] 非小细胞肺癌; DNA 甲基化转移酶 1; 组蛋白去乙酰化酶 1; 原癌基因; 抑癌基因

[中图分类号] R734.2 [文献标识码] B [文章编号] 1007-1237(2016)19-2251-04

Assessment value of serum HDAC1 and DNMT1 levels for clinical pathological staging and malignant molecule expression in patients with NSCLC

YAN Wei¹, TANG Xiao-shan¹, WANG Rui-dong²

(1. Laboratory Department, the 455th Hospital of PLA, Changning District, Shanghai 200052, China; 2. Laboratory Department, Shanghai Pulmonary Hospital Affiliated to Tongji University, Yangpu District, Shanghai 200433, China)

[Foundation Project]: It is supported by Shanghai Natural Science Fund (NO. 12ZR1401600).

[Author]: YAN Wei (1969-), Female, Associate chief physician, M.M., Tel: 13524678789, E-mail: y13524678789@163.com.

Received: 2016-06-29 Revised: 2016-07-13

JHMC, 2016; 22(19): 2251-2254

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective:** To study the correlation of serum HDAC1 and DNMT1 levels with the clinical pathological staging and malignant molecule expression in patients with NSCLC. **Methods:** A total of 89 patients diagnosed with NSCLC in our hospital from April 2012 to October 2015 were selected as malignant group, serum samples and lung tissues were collected from them, 64 patients with benign lung lesions were selected as benign group, serum specimens were collected from them, and then the HDAC1 and DNMT1 levels in serum as well as p53, p21, PTEN, c-myc and MKi-67 expression levels in lung tissue were determined. **Results:** DNMT1 and HDAC1 levels in serum of malignant group were significantly higher than those of control group, the higher the TNM staging, the higher the serum DNMT1 and HDAC1 levels, and serum DNMT1 and HDAC1 levels were not significantly different among patients with different tissue types of NSCLC; the higher the TNM stag-

[基金项目] 上海市自然科学基金(12ZR1401600)

[作者简介] 闫伟(1969-),女,山西沁县人,副主任医师,硕士,电话:13524678789,Email: y13524678789@163.com。

[收稿日期] 2016-06-29 [修回日期] 2016-07-13 网络出版时间:2016-7-13 11:56

ing of malignant group, the lower the p21, p53 and PTEN expression levels in tumor tissue and they were negatively correlated with DNMT1 and HDAC1 levels in serum, and the higher the c-myc and MKi-67 expression levels and they were positively correlated with DNMT1 and HDAC1 levels in serum. **Conclusions:** Serum DNMT1 and HDAC1 levels in patients with NSCLC significantly increase and can lower tumor-suppressor gene expression, promote proto-oncogene expression and participate in the occurrence and development of tumor.

[KEY WORDS] Non-small cell lung cancer; DNA methyltransferase 1; Histone deacetylases 1; Proto-oncogene; Tumor-suppressor gene

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是我国发病率最高的恶性肿瘤, 手术切除以及放化疗、靶向治疗是主要的治疗手段。目前, 关于 NSCLC 发生及发展的调控机制尚未明确。基因组 DNA 甲基化修饰、组蛋白乙酰化修饰是近年来新发现的表观遗传学调控机制, 能够调节多种原癌基因、抑癌基因的表达并参与恶性肿瘤的发生和发展^[1,2]。DNA 甲基化转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 是维持体内基因甲基化状态的重要催化酶, 而组蛋白去乙酰化酶 1 (histone deacetylases 1, HDAC1) 则是调控组蛋白乙酰化水平的重要催化酶。已有研究报道, 抑制肺癌 A549 细胞株中的甲基转移酶活性以及去乙酰化酶活性能够激活 p53、p21、PTEN 等抑癌基因的表达, 进而抑制肺癌细胞的生长^[3,4]。但是, 关于肺癌患者体内 HDAC1、DNMT1 含量与抑癌基因、原癌基因表达的关系尚不明确。本研究分析了 NSCLC 患者血清 HDAC1 和 DNMT1 含量与肿瘤临床病理分期、恶性分子表达的相关性。

1 材料与方法

1.1 临床标本

选择 2012 年 4 月~2015 年 10 月在我院确诊为 NSCLC 的 89 例患者, 收集肺癌组织及血清标本, 包括鳞癌 39 例、腺癌 27 例、其他 23 例, TNM I 期 12 例、II 期 36 例、III 期 28 例、IV 期 13 例。所有 NSCLC 患者经病理学确诊, 采集临床标本时均未接受放化疗、免疫治疗、靶向治疗。选择同期在我院就诊的 64 例肺良性病变患者, 包括肺部感染、支气管哮喘、支气管扩张, 治疗前收集血清标本。NSCLC 患者作为恶性组, 包括男性 52 例, 女性 37 例, 年龄 (57.2±8.5) 岁; 肺部良性病变患者作为良性组, 包括男性 39 例, 女性 25 例, 年龄 (55.8±7.9) 岁。两组一般资料比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 实验材料及仪器

酶联免疫吸附试剂盒为北京鼎国生物公司, RNA 抽提、cDNA 第一链合成以及荧光定量 PCR 扩增试剂盒均为北京

康为世纪公司; 低温离心机以及多功能酶标仪、洗板机为 Thermo 公司, 荧光定量 PCR 反应仪为 Bio-rad 公司。

1.3 血清 DNMT1、HDAC1 含量检测

取恶性组和良性组血清标本, 采用北京鼎国生物公司的人 DNMT1、HDAC1 酶联免疫吸附试剂盒进行实验, 所有操作按试剂盒说明书进行, 在酶标仪上读取特定波长处的吸光值后, 参照已知浓度的标准品吸光值计算待测血清样本中 DNMT1、HDAC1 的含量

1.4 肿瘤组织中恶性分子表达量检测

取恶性组肿瘤组织, 称量约 30 mg 并加入 PBS 缓冲液 300 μ L, 研磨后将研磨液在低温离心机中以 12 000 r/min 的速度离心 20 min, 弃去沉淀、保留上清并采用酶联免疫吸附试剂盒测定 p53、p21、PTEN、c-myc、MKi-67 的含量, 所有操作按试剂盒说明书进行。

1.5 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件录入和分析数据, 计量资料的两组间分析采用 t 检验, 3 组或 4 组分析采用方差分析, 两计量资料间的相关性采用 Pearson 检验, 按照 $P < 0.05$ 判断差异有统计学意义。

2 结果

2.1 良性组和恶性组患者血清 DNMT1、HDAC1 含量

恶性组血清中 DNMT1 和 HDAC1 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 良性组和恶性组患者血清中 DNMT1 和 HDAC1 的含量比较 (μ g/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	DNMT1	HDAC1
恶性组	89	59.25±8.25	468.76±71.35
良性组	64	16.59±2.26	242.54±34.61
t		26.942	14.251
P		<0.05	<0.05

2.2 恶性组不同 TNM 分期、组织类型患者的血清 DNMT1、HDAC1 含量

不同 TNM 分期 NSCLC 患者的血清 DNMT1、HDAC1 含量有显著性差异, TNM 分期越高、血清 DNMT1、HDAC1 含量越高, 两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。恶性组不同组织类型患者的血清 DNMT1、HDAC1 含量分析如下: 鳞癌、腺癌以及其他组织类型 NSCLC 患者的血清 DNMT1、HDAC1 含量无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 恶性组不同 TNM 分期、组织类型患者的血清 DNMT1、HDAC1 含量比较(μg/L, $\bar{x} \pm s$)

病理特征	例数	DNMT1	HDAC1
I 期	12	28.52±5.58	309.24±46.97
II 期	36	40.21±7.14 ^①	394.63±64.28 ^①
III 期	28	57.83±7.46 ^{①②}	472.32±77.56 ^{①②}
IV 期	13	75.44±9.31 ^{①②③}	602.35±89.14 ^{①②③}
鳞癌	39	61.29±9.94	472.39±75.96
腺癌	27	58.29±7.32	465.51±60.39
其他	23	57.93±6.87	468.62±69.14

注:与 TNM I 期比较,^① $P < 0.05$;与 TNM II 期比较,^② $P < 0.05$;与 TNM III 期比较,^③ $P < 0.05$ 。

表 3 恶性组不同 TNM 分期、组织类型患者肿瘤组织中恶性分子的表达量比较(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

病理特征	例数	p21	p53	PTEN	c-myc	MKi-67
I 期	12	10.93±1.85	7.49±0.92	4.18±0.55	4.92±0.82	25.69±4.92
II 期	36	8.22±0.91 ^①	5.52±0.91 ^①	3.04±0.46 ^①	6.41±0.59 ^①	42.67±6.47 ^①
III 期	28	6.74±0.88 ^{①②}	4.02±0.54 ^{①②}	2.32±0.33 ^{①②}	8.29±1.14 ^{①②}	53.12±7.38 ^{①②}
IV 期	13	4.52±0.75 ^{①②③}	2.93±0.42 ^{①②③}	1.78±0.21 ^{①②③}	12.68±1.59 ^{①②③}	72.98±9.51 ^{①②③}
鳞癌	39	6.95±0.88	5.18±0.74	2.78±0.36	8.94±1.32	57.96±7.18
腺癌	27	7.02±0.93	5.22±0.79	2.65±0.48	8.14±0.94	54.27±6.92
其他	23	6.59±0.79	5.02±0.85	2.81±0.40	8.42±1.59	53.12±7.40

注:与 TNM I 期比较,^① $P < 0.05$;与 TNM II 期比较,^② $P < 0.05$;与 TNM III 期比较,^③ $P < 0.05$ 。

2.4 NSCLC 患者血清 DNMT1、HDAC1 含量与恶性分子表达量的相关性

恶性组患者血清 DNMT1 含量与肿瘤组织中 p21、p53、PTEN、c-myc、MKi-67 表达量的分析如下:血清 DNMT1 含量与肿瘤组织中 p21、p53、PTEN 的表达量呈负相关,与 c-myc、MKi-67 的表达量呈正相关;恶性组患者血清 HDAC1 含量与肿瘤组织中 p21、p53、PTEN、c-myc、MKi-67 表达量的分析如下:血清 HDAC1 含量与肿瘤组织中 p21、p53、PTEN 的表达量呈负相关,与 c-myc、MKi-67 的表达量呈正相关。见表 4。

表 4 恶性组患者血清 DNMT1、HDAC1 含量与恶性分子表达量的相关性

	DNMT1			HDAC1		
	相关系数	统计量	P	相关系数	统计量	P
p21	-0.672	11.852	<0.05	-0.736	17.923	<0.05
P53	-0.615	15.836	<0.05	-0.625	12.684	<0.05
PTEN	-0.703	10.375	<0.05	-0.569	8.394	<0.05
c-myc	0.663	9.289	<0.05	0.721	11.039	<0.05
MKi-67	0.596	13.325	<0.05	0.579	15.572	<0.05

3 讨论

近年来,基因甲基化以及乙酰化程度异常与恶性肿瘤发生发展的关系受到了越来越多的重视,多项研究报道 DNMT1 以及 HDAC1 在多种恶性肿瘤组织以及血清中表达异常^[5-9]。DNMT1 的功能是对新合成的 DNA 单链进行甲基化修饰并将甲基化的遗传信息传递给分裂和增殖后的子代细胞,对于维持基因组 DNA 的甲基化水平具有重要意义。该催化酶能够以 S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体、将甲基转移到胞嘧啶核苷酸的胞嘧啶环并使之成为 5-

2.3 恶性组不同 TNM 分期、组织类型患者肿瘤组织中恶性分子的表达量

恶性组不同 TNM 分期患者肿瘤组织中恶性分子表达量的分析如下:不同 TNM 分期 NSCLC 患者肿瘤组织中恶性分子的表达量有显著性差异,TNM 分期越高,肿瘤组织中 p21、p53、PTEN 的表达量越低,c-myc、MKi-67 的表达量越高,两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。恶性组不同组织类型患者肿瘤组织中恶性分子表达量的分析如下:鳞癌、腺癌以及其他组织类型 NSCLC 患者肿瘤组织中 p21、p53、PTEN、c-myc、MKi-67 的表达量无显著性差异($P > 0.05$)。见表 3。

甲基胞嘧啶。HDAC1 能够与 DNA 紧密结合并使组蛋白发生去乙酰化,诱导染色质形成致密卷曲的阻抑结构。抑癌基因发生甲基化以及去乙酰化后会造造成转录过程受到抑制、表达减少,进而间接造成原癌基因激活、细胞恶性增殖^[10-12]。研究证实^[13],非小细胞肺癌组织中 DNMT1 以及 HDAC1 呈高表达的趋势,但未能阐明 DNMT1 以及 HDAC1 所修饰的靶基因。

在上述研究中,为了明确基因甲基化以及乙酰化水平与 NSCLC 发生、发展的关系,我们首先对 NSCLC 患者血清中 DNMT1 以及 HDAC1 含量的分析发现,恶性组血清中 DNMT1 和 HDAC1 的含量显著高于对照组。由此初步提示 DNMT1 和 HDAC1 表达异常与 NSCLC 的发生存在相关关系,上述两种催化酶表达异常可能通过影响基因甲基化及乙酰化的水平来造成原癌基因、抑癌基因表达失衡。进一步分析不同 TNM 分期以及组织类型 NSCLC 患者血清中 DNMT1 和 HDAC1 含量的差异可知:NSCLC 患者的 TNM 分期越高、血清中 DNMT1 和 HDAC1 的含量越高,而不同组织类型 NSCLC 患者血清中 DNMT1 和 HDAC1 的含量无显著性差异。这就说明 DNMT1 和 HDAC1 的过度表达与 NSCLC 的生长、浸润以及转移有关,但与肿瘤的组织类型无明显相关性。以上分析结果与文献的研究相一致^[13],均能够说明 DNMT1 和 HDAC1 的高表达参与 NSCLC 的发生以及发展。

目前,关于肺癌组织中受到甲基化以及去乙酰化调节的靶基因尚未完全阐明。细胞内甲基化以及去乙酰化水平提高的直接效应是抑制基因转录,而恶性肿瘤的发生与原癌基因表达增加、抑癌基因表达缺失有关。已有离体细胞研究证实,应用甲基化抑制剂以及去乙酰化抑制剂能够增加肺癌细胞内抑癌基因 p53、p21、PTEN 等的表达,而抑制原癌基因 c-myc、MKi-67 的表达^[3,4,14,15]。由此我们推测,肺癌患者体内高表达的 DNMT1 和 HDAC1 能够增加甲基化以及去乙酰化的水平,进而调节抑癌基因 p53、p21、PTEN 以及原癌基因 c-myc、MKi-67 的表达。抑癌基因 p53 和 p21 编码的蛋白能够抑制细胞周期蛋白 cyclin 所介导的细胞增殖^[16,17],而 PTEN 则能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路来负向调控细胞增殖^[18];原癌基因 c-myc 的表达产物是决定细胞从 G0/G1 期进入 S 期的关键分子,而 MKi-67 则是细胞增殖的标志物、其功能与细胞有丝分裂密切相关^[19,20]。我们对肺癌组织中抑癌基因及原癌基因表达量的分析证实:TNM 分期越高,肿瘤组织中 p21、p53、PTEN 的表达量越低且与血清 DNMT1、HDAC1 含量呈负相关,c-myc、MKi-67 的表达量越高且与血清 DNMT1、HDAC1 含量呈正相关。这就说明肺癌患者体内 DNMT1 和 HDAC1 的高表达能够降低肿瘤组织中抑癌基因 p21、p53、PTEN 的表达,而增加原癌基因 c-myc、MKi-67 的表达,进而促进肿瘤细胞增殖并参与肿瘤的发生、发展。

综上所述,NSCLC 患者血清中 DNMT1 和 HDAC1 的含量显著升高并且能够降低抑癌基因表达、促进原癌基因表达并参与肿瘤的发生、发展。

参考文献

- Urduingio RG, Torr  MI, Bay n GF, et al. Longitudinal study of DNA methylation during the first 5 years of life [J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1):160.
- Cortopassi WA, Kumar K, Duarte F, et al. Mechanisms of histone lysine-modifying enzymes: A computational perspective on the role of the protein environment [J]. *J Mol Graph Model*, 2016, 4(67): 69-84.
- Sacco JJ, Yau TY, Darling S, et al. The deubiquitylase Ataxin-3 restricts PTEN transcription in lung cancer cells [J]. *Oncogene*, 2014, 33(33): 4265-4272.
- 张博,刘文洲,孙宇,等. 甲基化抑制剂 5-Aza-CdR 对肺癌 A549 细胞株 DNMT1 及 c-myc、MKi-67、p53 基因表达的影响[J]. *广东医学*, 2016, 37(2):194-196.
- Shin E, Lee Y, Koo JS. Differential expression of the epigenetic methylation-related protein DNMT1 by breast cancer molecular subtype and stromal histology [J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 87.
- Zhang W, Chang Z, Shi KE, et al. The correlation between DNMT1 and ER α expression and the methylation status of ER α , and its clinical significance in breast cancer [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(3): 1995-2000.
- Ler SY, Leung CH, Khin LW, et al. HDAC1 and HDAC2 independently predict mortality in hepatocellular carcinoma by a competing risk regression model in a Southeast Asian population [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(5): 2238-2250.
- Citro S, Miccolo C, Meloni L, et al. PI3K/mTOR mediate mitogen-dependent HDAC1 phosphorylation in breast cancer: a novel regulation of estrogen receptor expression [J]. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7(2):132-142.
- 唐琼,赵辉,王妍,等. 基因检测在指导非小细胞肺癌化疗中的作用[J]. *中国全科医学*, 2016, 19(9):1024-1027.
- Ali Khan M, Kedhari Sundaram M, Hamza A, et al. Sulforaphane reverses the expression of various tumor suppressor genes by targeting DNMT3B and HDAC1 in human cervical cancer cells [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 412149.
- Zhang Q, Song Y, Chen W, et al. By recruiting HDAC1, MORC2 suppresses p21 Waf1/Cip1 in gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(18):16461-16470.
- Joensuu EI, Nieminen TT, Lotsari JE, et al. Methyltransferase expression and tumor suppressor gene methylation in sporadic and familial colorectal cancer [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2015, 54(12):776-787.
- 肖海励,王静,魏海霞. 血清 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 和 HDAC1 蛋白在肺癌患者中的表达及意义 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(20):5825-5826.
- Pan FP, Zhou HK, Bu HQ, et al. Emodin enhances the demethylation by 5-Aza-CdR of pancreatic cancer cell tumor-suppressor genes P16, RASSF1A and ppENK [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(4):1941-1949.
- Zhang X, Jiang SJ, Shang B, et al. Effects of histone deacetylase inhibitor trichostatin A combined with cisplatin on apoptosis of A549 cell line [J]. *Thorac Cancer*, 2015, 6(2):202-208.
- Zhang JX, Han YP, Bai C, et al. Notch1/3 and p53/p21 are a potential therapeutic target for APS-induced apoptosis in non-small cell lung carcinoma cell lines [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8): 12539-12547.
- Bizarro A, Ferreira IC, Sokovi  M, et al. Cordyceps militaris (L.) link fruiting body reduces the growth of a non-small cell lung cancer cell line by increasing cellular levels of p53 and p21 [J]. *Molecules*, 2015, 20(8): 13927-13940.
- Cedr s S, Ponce-Aix S, Pardo-Aranda N, et al. Analysis of expression of PTEN/PI3K pathway and programmed cell death ligand 1 (PD-L1) in malignant pleural mesothelioma (MPM) [J]. *Lung Cancer*, 2016, 96:1-6.
- Zhang E, Li W, Yin D, et al. c-Myc-regulated long non-coding RNA H19 indicates a poor prognosis and affects cell proliferation in non-small-cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3):4007-4015.
- Karaman A, Durur-Subasi I, Alper F, et al. Correlation of diffusion MRI with the Ki-67 index in non-small cell lung cancer [J]. *Radiol Oncol*, 2015, 49(3): 250-255.