

【临床研究】

作者简介:盖守娟(1969-),女,辽宁凌源人,学士,主任医师,研究方向:消化系统疾病。

those of patients with high expression of CDKN2A mRNA ($P < 0.05$). **Conclusion** CDKN2A gene expression is down-regulated in PC tissues, and the expression of CDKN2A gene is related to the tumor size, tissue differentiation, clinical stage and survival status of patients.

Key words: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; pancreatic cancer; clinicopathological features

胰腺癌(pancreatic cancer, PC)是消化道常见恶性肿瘤之一,恶性程度高,预后较差,在癌症相关的死亡中居第3位^[1]。近年来,PC发病率呈现上升趋势,PC早期症状不典型,许多患者确诊时已处于局部进展或远端转移阶段,错过了最佳手术时机,导致5 a生存率低于9%^[2]。因此,早期诊断、及早治疗是改善PC患者预后的关键。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子2A(cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A)基因是PC中最常见的体细胞突变基因之一,其突变可能会增加罹患PC的风险,且CDKN2A基因启动子区过度甲基化在PC的发生、发展中起着至关重要的作用^[3-4]。CDKN2A基因的缺失可通过负反馈导致细胞周期蛋白依赖激酶4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)、细胞周期蛋白依赖激酶6(cyclin-dependent kinase 6, CDK6)活性增加,从而促进细胞周期进程^[5-6]。本研究通过观察CDKN2A基因表达与胰腺癌临床病理特征的关系,探讨CDKN2A在PC发生、发展中可能发挥的作用。

1 资料与方法

1.1 组织标本来源 选择2016年1月至2018年6月朝阳市第二医院保存的88例PC患者的PC组织标本,其中男52例,女36例;年龄43~73(60.20 ± 9.28)岁,体质指数 $18.9 \sim 26.3$ (22.78 ± 3.01) $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 。病例纳入标准:(1)经病理学检查确诊为PC;(2)术前未行放射治疗、化学治疗等抗肿瘤治疗;(3)临床病理资料完整。排除标准:(1)合并其他恶性肿瘤;(2)有免疫系统疾病、血液系统疾病、全身感染性疾病、肝肾功能障碍等其他基础疾病;(3)失访者。同时选择相应正常胰腺组织标本30例作为对照,其中男20例,女10例;年龄45~69(58.22 ± 8.78)岁,体质指数 $20.5 \sim 26.7$ (23.04 ± 2.96) $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 。2组患者的性别、年龄、体质指数比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究通过医院医学伦理委员会批准。

1.2 反转录定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)法检测PC组织和正常胰腺组织中CDKN2A mRNA的表达 PC组织和正常胰腺组

织各取100 mg分别置入EP管内,加入TRIzol进行组织溶解,然后加入0.3 mL氯仿,室温下震荡30 s,放置30 min,取上清液移入另一EP管,加入等体积的异丙酮溶液,室温放置30 min, $1\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取沉淀物为RNA,加入体积分数75%乙醇1 mL,溶解后 $1\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液,加入20 μL 无核酸酶水。采用SuperScript IV反转录试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司)进行cDNA合成,引物合成和设计由南京金斯瑞生物科技有限公司完成,以 β -actin为内参;CDKN2A mRNA上游引物序列为5'-CTTTGAGGTGCGTGTTT-3',下游引物序列为5'-CAGTGCTCGCTTAGTGTC-3'; β -actin上游引物序列为5'-GGATCCTGCGATGTGCA-3',下游引物序列为5'-GGTCAAAGTCCAGGCT-3'。将RNA模板、引物、dNTP、DTT、RT缓冲液混合,组成20 μL 体积的反转录体系,根据说明行PCR检测。采取 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算CDKN2A mRNA的相对表达量。实验设3组复孔,取均值。

1.3 统计学处理 应用SPSS 22.0软件进行数据统计与分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用独立样本 t 检验;计数资料以例数和百分率表示,采用 χ^2 检验;采用Kaplan-Meier法分析患者生存率,CDKN2A mRNA高表达与低表达患者生存率比较采用log-rank检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PC组织和正常胰腺组织中CDKN2A mRNA相对表达量比较 PC组织和正常胰腺组织中CDKN2A mRNA相对表达量分别为 1.43 ± 0.56 、 2.03 ± 0.87 ,PC组织中CDKN2A mRNA相对表达量显著低于正常胰腺组织,差异有统计学意义($t = 3.531, P < 0.05$)。

2.2 CDKN2A基因表达与PC临床病理特征的关系 结果见表1。以正常胰腺组织中CDKN2A mRNA相对表达量均值2.03为界值,PC组织中CDKN2A基因高表达者36例,低表达者52例。CDKN2A基因高表达与低表达患者的性别、年龄、肿

瘤部位比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);CDKN2A 基因高表达与低表达患者的肿瘤直径、组织分化程度和肿瘤临床分期比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表1 CDKN2A 基因表达与 PC 患者临床病理特征的关系
Tab.1 Relationship between the expression of CDKN2A gene and clinicopathological features of PC patients

临床病理特征	n	CDKN2A 基因高表达 (n=36)/例(%)	CDKN2A 基因低表达 (n=52)/例(%)	χ^2	P
性别					
男	52	20(38.5)	32(61.5)	0.315	0.575
女	36	16(44.4)	20(55.6)		
年龄					
<60岁	50	21(42.0)	29(58.0)	0.057	0.811
≥60岁	38	15(39.5)	23(60.5)		
肿瘤直径					
>2 cm	47	10(21.3)	37(78.7)	16.084	0.001
≤2 cm	41	26(63.4)	15(36.6)		
肿瘤部位					
头部	51	22(43.1)	29(56.9)	0.249	0.618
体尾部	37	14(37.8)	23(62.2)		
组织分化程度					
高分化	32	18(56.3)	14(43.7)	4.896	0.027
中、低分化	56	18(32.1)	38(67.9)		
临床分期					
I、II	68	32(47.1)	36(52.9)	4.681	0.030
III	20	4(20.0)	16(80.0)		

2.3 CDKN2A mRNA 表达与 PC 患者生存率的关系 结果见图 1 和图 2。CDKN2A mRNA 高表达和低表达患者 2 a 总生存率分别为 66.67% (24/36)、34.62% (18/52),CDKN2A mRNA 低表达患者 2 a 总生存率显著低于高表达患者,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.516, P < 0.05$);CDKN2A mRNA 高表达和低表达患者 2 a 疾病无进展生存率分别为 58.33% (21/36)、23.08% (12/52),CDKN2A mRNA 低表达患者 2 a 疾病无进展生存率显著低于高表达患者,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 10.370, P < 0.05$)。

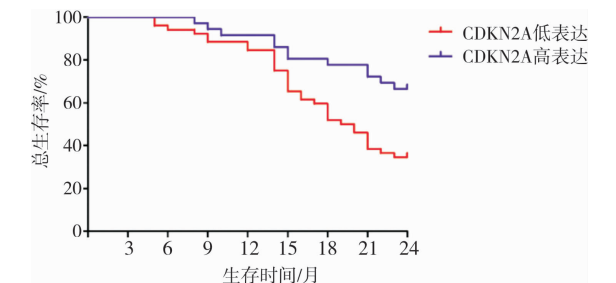


图1 CDKN2A 基因表达与 PC 患者 2 a 总生存率的关系
Fig.1 Relationship between CDKN2A gene expression and 2-year overall survival rate of PC patients

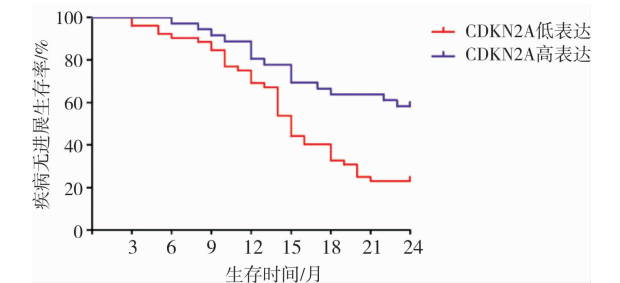


图2 CDKN2A 基因表达与 PC 患者 2 a 疾病无进展生存率的关系
Fig.2 Relationship between CDKN2A gene expression and 2-year progression-free survival rate in PC patients

3 讨论

PC 的发病机制尚不完全明确,其发生与遗传因素、饮食因素或者基础性胆道系统疾病等有关^[7]。有研究显示,长期高蛋白、高脂肪饮食的 PC 患者的预后更差,其带瘤生存率降低,中位生存时间明显缩短^[8-9]。基因水平改变及癌细胞周期调控基因异常可能在 PC 发生、发展中发挥作用。CDKN2A 基因定位于 9 号染色体 21 区,编码 1 个由 148 个氨基酸组成的蛋白^[10]。有研究显示,CDKN2A 基因编码的蛋白可与 CDK4、CDK6 结合而抑制细胞周期蛋白与 CDK4 结合形成具有激酶活性的复合物,阻断该复合物对成视网膜母细胞瘤蛋白的磷酸化,将细胞阻滞于 G1 期,从而抑制细胞增殖^[11]。研究显示,CDKN2A 基因是一种肿瘤抑制基因,其纯合性缺失与杂合性缺失是黑色素瘤发生的重要机制之一^[12]。CDKN2A 基因编码细胞周期抑制剂蛋白 p16 和 p14,在 90% ~ 98% 的胰腺导管腺癌细胞中由于基因突变或启动子过度甲基化导致 CDKN2A 基因丢失^[13-14]。本研究结果显示,PC 组织中 CDKN2A mRNA 相对表达量显著低于正常胰腺组织,且肿瘤直径越大、组织分化程度越低、肿瘤临床分期越高的患者 CDKN2A 基因表达越低,提示 CDKN2A 基因低表达可能与 PC 的发生与发展有关,CDKN2A 基因可抑制胰腺导管上皮细胞增殖,减弱肿瘤细胞的浸润能力,但其具体机制仍不明确。

PC 发病隐匿,早期症状不典型,多数患者确诊时已属于晚期,预后差,生存期短,5 a 生存率低^[15]。本研究结果显示,CDKN2A 基因高表达和低表达患者 2 a 总生存率分别为 66.67% (24/36)、34.62% (18/52),2 a 疾病无进展生存率分别为 58.33% (21/36)、23.08% (12/52),CDKN2A 基因低表达患

者 2 a 总生存率和 2 a 疾病无进展生存率显著低于高表达患者,提示 CDKN2A 基因表达与 PC 患者的预后有关。

综上所述,PC 组织中 CDKN2A 基因表达下调,且 CDKN2A 基因表达与肿瘤大小、组织分化程度、肿瘤临床分期及患者生存状况有一定关系,CDKN2A 基因检测可为 PC 患者的病情及预后评估提供参考。

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1):7-34.

[2] LU C, XU C F, WAN X Y, et al. Screening for pancreatic cancer in familial high-risk individuals: a systematic review [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(28):8678-8686.

[3] ZHEN D B, RABE K G, GALLINGER S, et al. BRCA1, BRCA2, PALB2, and CDKN2A mutations in familial pancreatic cancer: a PACGENE study [J]. *Genet Med*, 2015, 17(7):569-577.

[4] MCWILLIAMS R R, WIEBEN E D, CHAFFEE K G, et al. CDKN2A germline rare coding variants and risk of pancreatic cancer in minority populations [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2018, 27(11):1364-1370.

[5] CAMPA D, PASTORE M, GENTILUOMO M, et al. Functional single nucleotide polymorphisms within the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/2B region affect pancreatic cancer risk [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(35):57011-57020.

[6] LEOF E R, ZHU X, RABE K G, et al. Pancreatic cancer and melanoma related perceptions and behaviors following disclosure of CDKN2A variant status as a research result [J]. *Genet Med*, 2019, 21(11):2468-2477.

[7] 熊慧敏, 许小凡, 段丽芳, 等. 白细胞介素-6 在胰腺炎症和肿瘤中的作用机制研究进展 [J]. *新乡医学院学报*, 2019, 36(12):1191-1196.

[8] GRANT R C, SELANDER I, CONNOR A A, et al. Prevalence of germline mutations in cancer predisposition genes in patients with pancreatic cancer [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(3):556-564.

[9] HUANG J Y, BUTLER L M, WANG R, et al. Dietary intake of one-carbon metabolism-related nutrients and pancreatic cancer risk: the Singapore Chinese health study [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2016, 25(2):417-424.

[10] SASAKI S, KITAGAWA Y, SEKIDO Y, et al. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions in human cancers [J]. *Oncogene*, 2003, 22(24):3792-3798.

[11] GUL A, LEYLAND-JONES B, DEY N, et al. A combination of the PI3K pathway inhibitor plus cell cycle pathway inhibitor to combat endocrine resistance in hormone receptor-positive breast cancer: a genomic algorithm-based treatment approach [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(12):2359-2376.

[12] 刘梦桐, 柳剑英, 苏静. CDKN2A 基因在黑色素瘤中的研究现状 [J]. *中华病理学杂志*, 2019, 48(11):909-912.

[13] PADHI S S, ROY S, KAR M, et al. Role of CDKN2A/p16 expression in the prognostication of oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2017, 73:27-35.

[14] HATZISTERGOS K E, WILLIAMS A R, DYKXHOORN D, et al. Tumor suppressors RB1 and CDKN2a cooperatively regulate cell-cycle progression and differentiation during cardiomyocyte development and repair [J]. *Circ Res*, 2019, 124(8):1184-1197.

[15] 方乐平, 徐晓燕, 姬玉, 等. 胰腺癌术后影响患者预后的相关因素分析 [J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(8):606-611.

(本文编辑:徐自超)

(上接第 572 页)

[7] MUTAI H, WASANO K, MOMOZAWA Y, et al. Variants encoding a restricted carboxy-terminal domain of SLC12A2 cause hereditary hearing loss in humans [J]. *PLoS Genet*, 2020, 16(4):e1008643.

[8] FUKUNAGA I, SHIGA T, CHEN C, et al. Generation of the induced pluripotent stem cell (hiPSC) line (JUFMD0i004-A) from a patient with hearing loss carrying GJB2 (p. V37I) mutation [J]. *Stem Cell Res*, 2019, 43(12):101674.

[9] 刘清明, 田野, 於娟娟, 等. 新生儿耳聋基因筛查阳性患儿随访研究 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 54(12):881-887.

[10] AL-SHEIKH U, KANG L J. Molecular crux of hair cell mechano-transduction machinery [J]. *Neuron*, 2020, 107(3):404-406.

[11] 马宁, 王艳, 彭薇, 等. 2 545 例新生儿遗传性耳聋基因突变筛查 [J]. *中国康复理论与实践*, 2019, 25(4):78-81.

[12] 张拔山, 李婵, 朱梓年, 等. 东莞地区 16 182 名个体 18 个耳聋易感基因 100 个变异位点的测序筛查 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2020, 37(4):373-377.

[13] SCARLINO S, DOMI T, POZZI L, et al. Burden of rare variants in ALS and axonal hereditary neuropathy genes influence survival in ALS: insights from a next generation sequencing study of an

italian ALS cohort [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9):3346.

[14] 张致恺, 张燕梅, 宗亚静, 等. 耳聋相关基因诊断与遗传咨询的临床实践 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 33(1):58-62.

[15] SHIMODAIRA H. Interpreting variants of uncertain significance in hereditary cancer genes in cancer genome era [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(6):vi4.

[16] 邱里, 彭欣辉, 刘贵清, 等. 4 500 例新生儿耳聋基因突变分析 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2019, 27(3):328-330.

[17] 刘丽琴, 马彦萍, 张恩东. 重症监护病房新生儿听力联合耳聋基因筛查结果分析 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2019, 17(4):388-391.

[18] 刘清明, 田野, 於娟娟, 等. 新生儿听力与耳聋基因联合筛查随访研究 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2019, 27(1):20-24.

[19] 刘清明, 田野, 於娟娟, 等. 新生儿耳聋基因筛查纯合突变婴幼儿的听力评估及随访研究 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 33(11):86-89.

[20] 杨延龙, 谢明水. 基因芯片联合二代测序技术在产前耳聋基因筛查中的应用价值 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2019, 12(4):409-411.

(本文编辑:徐自超)