

非小细胞肺癌血清 8 个抑癌基因启动子 CpG 岛甲基化的联合检测及意义*

赵培革¹, 鲁德珩¹, 姬晓青¹, 赵琦², 刘伟³, 刘姝梅¹ (山东省聊城市人民医院: 1. 呼吸内科; 2. 消化内科; 3. 中心实验室 252000)

【摘要】 目的 探讨非小细胞肺癌患者血清中 8 个抑癌基因启动子 CpG 岛甲基化的联合检测在诊断非小细胞肺癌患者中的意义, 以期提高非小细胞肺癌早期无创检出率, 提升治愈率。方法 选取 62 例非小细胞肺癌患者设为肺癌组, 选取 30 例肺部良性疾病患者作为对照组, 选取 16 例健康者作为健康组, 取 3 个组研究对象的血清采取癌基因测序法检测 8 种基因启动子区域甲基化情况, 比较 3 个组研究对象的上述指标, 分析上述指标的变化和 3 个组研究对象不同临床状态的相关性。结果 肺组结肠腺瘤性息肉病基因 (APC)、钙粘蛋白 13 (CDH 13)、死亡相关蛋白激酶基因 (DAPK)、人类 O6-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶 (MGMT)、RAS 相关区域家族 F2 (RASSF2)、人类 Runt 相关转录因子 3 (RUNX3)、RAS 相关区域家族 1A (RASSF1A) 和 TMS1/ASC 基因甲基化检出率均明显高于对照组, 组间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 非小细胞肺癌患者血清中抑癌基因 8 个指标联合检测敏感性达到 93.54%, 特异性达到 90.3%, 敏感性明显高于所有单项检测和 4 个指标联合检测。结论 APC、CDH 13 等 8 个抑癌基因异常甲基化状态的联合检测可以明显提高非小细胞肺癌患者抑癌基因甲基化的检出率。该 8 个基因异常甲基化有望成为非小细胞肺癌辅助诊断和预后判断的分子标记, 并有可能成为非小细胞肺癌治疗的新靶点, 从而提高临床对非小细胞肺癌患者的诊治水平。

【关键词】 非小细胞肺癌; DNA 甲基化; 联合检测; 无创诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.10.010 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)10-1322-03

Clinical significance of combined detection of promoter CpG island methylation in eight tumor suppressor genes in serum of patients with non-small cell lung cancer* ZHAO Pei-ge¹, LU De-xuan¹, JI Xiao-qing¹, ZHAO Qi², LIU Wei³, LIU Shu-mei¹ (1. Department of Respiratory Medicine; 2. Department of Gastroenterology; 3. Central Laboratory, People's Hospital of Liaocheng City, Liaocheng, Shandong 252000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the clinical significance of combined detection of promoter CpG island methylation in eight tumor suppressor genes in serum of patients with non-small cell lung cancer cliserum of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** A total of 62 patients with NSCLC were enrolled as lung cancer group, 30 patients with benign lung disease were enrolled as control group, and 16 healthy subjects were enrolled as healthy group. Serum samples of all groups were collected and detected for promoter region methylation of eight genes by using cancer gene sequencing assay. Detection results were compared between the three groups, and association between changes of these indicators and clinical state of patients were analyzed. **Results** Detection rates of promoter region methylation of adenomatous polyposis colii (APC) gene, cadherin 13 (CDH 13) gene, death-associated protein kinase (DAPK) gene, human O6 methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene, Ras association domain family F2 (RASSF2) gene, runt-related transcription factor 3 (RUNX3) gene, Ras association domain family F1A (RASSF1A) gene and TMS1/ASC gene in NSCLC group were significantly higher than control group ($P < 0.05$). The sensitivity and specificity of combined detection of these eight indicators in NSCLC patients were 93.54% and 90.3%, and the sensitivity was significantly higher than individual test and combined detection of four indicators. **Conclusion** Combined detection of promoter region methylation of eight tumor suppressor genes, including APC, CDH 13 and so on, could improve the detection rate of tumor suppressor gene methylation in patients with NSCLC, indicating that hypermethylation of these eight genes could be useful for the diagnosis and prognosis of NSCLC, which could be new molecular markers for the therapy of NSCLC to improve the level of diagnosis and therapy of NSCLC.

【Key words】 non-small cell lung cancer; DNA methylation; combined detection; non-invasive diagnosis

* 基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金 (2008BS08046)。

作者简介: 赵培革, 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向为肺癌的基础与临床。

目前非小细胞肺癌的首要治疗方法仍然是手术治疗^[1-2]。手术治疗效果和患者的病情分期情况密切相关。提高非小细胞肺癌的早期诊断率是提高其治疗质量的关键环节。无创快速检测是任何肿瘤早期诊断的理想方向。本组资料在前期进行了大量的非小细胞肺癌患者和健康者血清中 8 个抑癌基因启动子 CpG 甲基化分析工作的基础上^[3-7],对 8 个基因[结肠腺瘤性息肉病基因(APC)、钙粘蛋白 13(CDH 13)、死亡相关蛋白激酶基因(DAPK)、人类 O6-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶(MGMT)、RAS 相关区域家族 F2(RASSF2)、人类 Runt 相关转录因子 3(RUNX3)、RAS 相关区域家族 1A (RASSF1A)和 TMS1/ASC]联合检测以早期诊断非小细胞肺癌进行了研究,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2008 年 12 月至 2009 年 10 月呼吸科收治的非小细胞肺癌患者 62 例设为肺癌组,选取同期在本院呼吸科进行治疗的肺部良性疾病患者 30 例,设为对照组,再选取同期来本院进行健康体检者 16 例设为健康组。肺癌组中,男 40 例,女 22 例;年龄(59.6±6.5)岁。所有患者均首次确诊为非小细胞肺癌,未进行任何放化疗。对照组中,男 18 例,女 12 例;年龄(58.1±6.9)岁。健康组中,男 10 例,女 6 例;年龄(57.3±6.8)岁。3 个组受试者的男、女性别比例及年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及预处理 所有入组受试者(非小细胞肺癌组患者于放化疗前)于凌晨采集 5 mL 空腹外周静脉血于抗凝

离心管中。密封后放置于冰箱中 4 ℃ 静置 2 h,取出放于离心机中,采用 3 000 r/min 的离心速度离心 10 min,倾取上层血清于一 80 ℃ 保存待后续进行标本预处理。取 2 mL 血清,采用德国 Qiagen 公司生产的 QIAamp Blood Mini Kit DNA 试剂盒进行上述标本的血清 DNA 提取。加入反应试剂→反复通过离心柱→用 50 μL 蒸馏水洗脱下 DNA→-80 ℃ 保存→亚硫酸氢钠修饰将 DNA 序列中未甲基化的胞嘧啶(C)转变为尿嘧啶(U)→DNA 纯化→脱磺基反应→聚合酶链反应(PCR)扩增^[8]。

1.2.2 PCR 序列分析 将 1.2.1 所得 PCR 产物采用德国 Qiagen 公司生产的 QIAquick PCR 产物纯化试剂进行纯化封装,委托上海生工公司对其进行序列分析。

1.3 观察指标 分别计算 3 个组受试者 8 个基因甲基化的单项阳性检出率、非小细胞肺癌患者 8 个指标进行组合(每 4 个指标为一种组合和 8 个指标连个)检测的阳性检出率及敏感性、特异性,并进行比较。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计数资料以率表示,采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 个组受试者血清 8 个基因甲基化阳性率比较:APC、CDH 13、DAPK、MGMT、RASSF2、RUNX3、RASSF1A、TMS1/ASC 基因甲基化检出率均明显高于对照组和健康组,组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 血清 8 个基因在各研究组中的甲基化阳性率比较[n(%)]

基因	肺癌组(n=62)	对照组(n=30)	健康组(n=16)	χ^2	P
APC 基因甲基化	32(51.61)	0(0.00)	0(0.00)	33.74	<0.01
CDH 13 基因甲基化	23(37.10)	0(0.00)	0(0.00)	14.84	<0.05
DAPK 基因甲基化	23(37.10)	0(0.00)	0(0.00)	14.84	<0.05
MGMT 基因甲基化	17(27.42)	0(0.00)	0(0.00)	14.97	<0.01
RASSF2 基因甲基化	24(38.71)	0(0.00)	0(0.00)	22.89	<0.01
RUNX3 甲基化检	25(40.32)	0(0.00)	0(0.00)	23.69	<0.01
RASSF1A 基因甲基化	28(45.16)	0(0.00)	0(0.00)	25.73	<0.01
TMS1/ASC 基因甲基化	14(22.59)	0(0.00)	0(0.00)	4.12	<0.05

2.2 非小细胞肺癌患者 8 个基因甲基化单项检测结果 非小细胞肺癌患者 8 个指标单项检测的敏感性和特异性见表 2。

表 2 非小细胞肺癌患者抑癌基因启动因子 CpG 岛甲基化单项检测结果

基因	阳性数	敏感性(%)	特异性(%)
APC 基因甲基化	32	51.61	33.33
CDH 13 基因甲基化	23	37.10	41.03
DAPK 基因甲基化	23	37.10	41.03
MGMT 基因甲基化	17	27.42	48.48
RASSF2 基因甲基化	24	38.71	40.00

续表 2 非小细胞肺癌患者抑癌基因启动因子 CpG 岛甲基化单项检测结果

基因	阳性数	敏感性(%)	特异性(%)
RUNX3 甲基化检	25	40.32	39.02
RASSF1A 基因甲基化	28	45.16	36.36
TMS1/ASC 基因甲基化	14	22.59	50.00

注:—表示无数据。

2.3 非小细胞肺癌患者 8 个基因甲基化联合检测结果分析 非小细胞肺癌患者 8 个指标联合检测敏感性达到 93.54%,特异性达到 90.3%,敏感性明显高于所有单项检测和 4 个指标联合检测。见表 3。

表 3 非小细胞肺癌患者抑癌基因启动因子 CpG 甲基化联合检测结果 (n=62)

检测指标联合方式	阳性例数(n)	敏感性(%)	特异性(%)
APC 基因、CDH 13 基因、DAPK 基因、MGMT 基因	33	53.23	98.3
RASSF2 基因、RUNX3 甲基、RASSF1A、TMS1/ASC 基因	41	66.13	96.4
CDH 13 基因、DAPK 基因、MGMT 基因、RASSF2 基因	39	62.90	95.3
APC 基因、RUNX3 甲基、RASSF1A、TMS1/ASC 基因	43	69.35	92.1
DAPK 基因、MGMT 基因、RASSF2 基因、RUNX3 甲基	51	82.26	93.2
APC 基因、CDH 13 基因、RASSF1A、TMS1/ASC 基因	48	77.42	92.1
APC 基因、CDH 13 基因、DAPK 基因、TMS1/ASC 基因	47	75.81	92.5
MGMT 基因、RASSF2 基因、RUNX3 甲基、RASSF1A	50	80.65	94.5
APC 基因、CDH 13 基因、DAPK 基因、MGMT 基因、RASSF2 基因、RUNX3 甲基、RASSF1A、TMS1/ASC 基因	58	93.54	90.3

3 讨 论

肿瘤作为目前世界公认的医学难题,治疗模式是以手术、放疗和化疗为主的综合治疗,在一定程度上延长了患者的生命,提高了患者的生活质量,但仍有许多不尽如人意之处。进展期肺癌手术后患者 5 年生存率不到 10%,肺癌总生存率在过去的 20 年中无明显提高,约 14%。而在过去的 30 年中,乳腺癌、结肠癌、前列腺癌等生存率大大提高,其中的重要原因是早期得到了确诊并及早采取了手术治疗。早期诊断研究中,无创、快速的检测方法一直是人们关注的重点领域。肿瘤的发生和遗传学改变之间存在直接的关系,这得到众多学者的肯定。遗传学改变中,基因甲基化作用和组蛋白乙酰化作用是最为显著的特征。随着近年来 PCR 技术的不断发展和日趋完善,其在遗传学检测中得到越来越广泛的应用。PCR 技术的发展使得 DNA 特异片段的甲基化检测的更为简便、快捷。肿瘤患者的肿瘤组织及血液标本中研究发现多个基因的高度甲基化,从而使 DNA 特异片段的甲基化检测极有可能成为临床最新的肿瘤早期诊断指标,对肿瘤的监测及预后也均有明显的意义。

目前肺癌的抑癌基因启动子甲基化是早期肺癌的独立危险因素。深入研究肺癌相关抑癌基因启动子甲基化将可能导致肺癌早期诊断的进展。

本组资料中,通过检测具有可比性的非小细胞肺癌患者、良性肺部病变患者和健康者的 8 个抑癌基因启动因子 CpG 岛甲基化阳性情况,发现非小细胞肺癌组患者的检出率均明显高于良性肺部病变患者和健康者,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。非小细胞肺癌患者 8 个指标联合检测敏感性达到 93.54%,特异性达到 90.3%,敏感性明显高于所有单项检测和 4 个指标联合检测。

综上所述,对外周血所提取得到的 DNA 进行相关基因甲基化状况进行检测,采用 8 个基因检测数据联合分析,对非小细胞肺癌的检测敏感性高、特异性高,且该方法可以做到基本无创,操作简便、快捷,可大批量用于非小细胞肺癌的早期

筛查。

参考文献

- [1] 王建平,鲁德环,杨燕,孟鲁斯特用于稳定期慢性阻塞性肺疾病患者疗效观察[J]. 山东医药,2007,47(5):41-42.
- [2] 鲁德环,姬晓青. 非小细胞肺癌中 survivin 及 bcl-xl 基因蛋白的表达及其相关性研究[J]. 中国实用内科杂志,2006,26(19):1523-1525.
- [3] 鲁德环,姬晓青. 非小细胞肺癌患者血清死亡相关蛋白激酶基因异常甲基化的检测及意义[J]. 山东医药,2010,50(9):69-70.
- [4] 鲁德环,姬晓青,徐国强,等. 非小细胞肺癌患者血清 Ras 相关区域家族 1A 基因异常甲基化检测及意义[J]. 国际呼吸杂志,2010,30(18):1093-1096.
- [5] 鲁德环,姬晓青,刘伟. 非小细胞肺癌患者血清 RUNX3 基因异常甲基化的检测及意义[J]. 肿瘤防治研究,2011,38(6):671-674.
- [6] 鲁德环,姬晓青,刘伟,等. 非小细胞肺癌患者血清 O6-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶基因异常甲基化检测及其临床意义[J]. 国际呼吸杂志,2009,29(20):1221-1224.
- [7] 鲁德环,王建平,姬晓青,等. NSCLC 患者血清 RASSF2 基因甲基化检测临床意义分析[J]. 中华肿瘤防治杂志,2012,19(19):1474-1476.
- [8] Zinn RL, Pruitt K, Eguchi S, et al. hTERT is expressed in Cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site[J]. Cancer Res, 2007, 67(1):194-201.

(收稿日期:2013-10-30 修回日期:2013-12-30)