

• 论 著 •

应用 BSP 克隆测序检测肝细胞癌组织中 Dynamin 3 基因启动子区域甲基化水平*

黄朱亮¹, 汪必成², 邱雪平¹, 黄一芳¹, 郑芳^{1△}

(武汉大学中南医院:1. 临床基因诊断中心/检验科 2; 病理科, 武汉 430071)

摘要:目的 检测原发性肝细胞癌组织 Dynamin 3(DNM3)基因启动子区域 36 个 CpG 的甲基化水平,分析其与肝细胞癌患者临床病理特征的关系,探讨 DN3 基因甲基化在肝癌形成过程中的作用。方法 提取 30 对患者肝细胞癌组织和癌旁组织 DNA,经亚硫酸氢盐处理后,进行巢式 PCR 并联合克隆测序检测 DN3 基因的甲基化水平。结果 肝细胞癌患者的甲基化事件发生率为 83.3%(25/30)。癌组织的 DN3 基因启动子区域平均甲基化率为 37.8%,癌旁组织为 12.0%,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。DNM3 基因甲基化诊断肝癌的受试者工作特征曲线(ROC)曲线下面积(AUC)为 0.831,对肝癌有较好的诊断价值。结论 DN3 作为肝细胞癌的一种抑癌基因,其启动子区域高度甲基化可能会促进肝细胞癌的形成。

关键词:肝细胞癌; 亚硫酸氢盐修饰后 PCR; 甲基化

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.17.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)17-2409-03

Analysis of the methylation status of Dynamin3 Gene Promoter by bisulfite genomic sequencing PCR combined with TA clone sequencing technology in hepatocellular carcinoma*
HUANG Zhuliang¹, WANG Bicheng², QIU Xueping¹, HUANG Yifang¹, ZHENG Fang^{1△}
(1. Clinical Genetic Diagnosis Centre/Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Pathology, Zhongnan hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: **Objective** To compare the methylation status of 36 CpG sites in dynamin 3(DNM3) promoter between hepatocellular carcinoma and paracancerous tissues, analyze the associations between clinicopathological characteristics and DN3 methylation, explore its role in HCC formation processes. **Methods** Genomic DNA of 30 pairs of liver cancer tissues and paracancerous tissues was extracted, then DN3 gene methylation levels was detected by nested PCR combined cloning sequencing after bisulfite treatment of genomic DNA. **Results** The methylation level of DN3 gene in hepatocellular carcinoma is high. The incidence of DN3 methylation in hepatocellular carcinoma was 83.3%(25/30). The average methylation rate of cancer tissues was 37.8%, and the average methylation rate of adjacent non-tumor tissues was 12.0%. There were significant statistical difference in DNA methylation between the tumor and non-tumor tissues($P<0.05$). The AUC of ROC for DN3 gene was 0.831, which showed great value for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. **Conclusion** DN3 as a tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma, the hypermethylation of its promoter might promote the formation of hepatocellular carcinoma.

Key words: hepatocellular carcinoma; bisulfite genomic sequencing PCR; methylation

肝细胞癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,肝细胞癌的病死率在恶性肿瘤中排第 3 位,每年大约有 600 万的新发病例^[1]。这些新发病例中中国大约占一半,肝细胞癌在肝癌中所占比例为 70%~85%^[2]。虽然对肝癌的诊断与治疗方法不断提高,但目前主要的治疗方法还是肝癌切除术,只有极少数早期发现的患者生存质量有较好的改善,大部分患者确诊时都已经到中晚期,其术后的预后情况并不理想。这不得不归因于肝癌缺乏有效的早期诊断方法,因此很有必要深入探讨肝细胞癌潜在的发病机制以及发现早期诊断的分子标记物。表观遗传学的修饰被认为在肿瘤形成过程中发挥至关重要的作用^[3]。DNA 甲基化被认为是主要的表观遗传学修饰方式,调节基因的表达,而且认为甲基化在肿瘤形成过程中是主要的分子机制之一^[4]。在肝细胞肝癌中,发现了各种各样的抑癌基因启动子区域异常的甲基化,这些抑癌基因的甲基化会下调基因的转录表达,促进肿瘤的形成^[5]。Dynamin 3(DNM3)蛋白是 Dynamin 家族中的一员,具有鸟苷酸三磷酸酶(GTPase)的活性,

主要参与细胞胞吞过程中的剪切^[6]。在肝细胞癌中,对 DN3 基因的相关研究报道很少。有研究表明 DN3 在肝癌形成过程中可能作为一种新发现的抑癌基因,在癌组织中该基因启动子区域出现异常的甲基化,并且表达水平出现下降^[7],但该结论还未在中国人群临床标本的研究中得到验证,因此很有必要探讨该基因在中国肝细胞癌患者癌组织中的甲基化水平。本研究采用亚硫酸氢盐修饰后 PCR(BSP)联合 TA 克隆测序检测肝细胞癌组织和癌旁组织的甲基化水平。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 30 对肝细胞癌与癌旁冰冻组织,来源于武汉大学中南医院和湖北省肿瘤医院行肝癌切除术的肝细胞癌患者。

1.2 仪器与试剂 Hema 9600 型 PCR 扩增仪(珠海黑马医学仪器有限公司);电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司;Hema UV-1 紫外透射分析仪(珠海黑马医学仪器有限公司);TGL-18R 低温离心机(常州市国立试验设备研究所);凝胶纯化试剂盒(美

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目(2012CB720600、2012CB720605)。

作者简介:黄朱亮,男,技师,主要从事临床生化与分子诊断学的研究。△ 通讯作者, E-mail: zhengfang@whu.edu.cn。

国 Qiagen 公司)。

1.3 肝细胞癌的诊断 (1)实验室检查:血清肿瘤标志物甲胎蛋白(AFP)和肝炎病毒的检测。(2)影像学检查:超声显像、CT、MRI 和数字减影血管造影(DSA)等。在对比增强的动态 CT 扫描或 MRI 检查时,肝细胞癌的典型影像特征:在动脉期呈显著强化,在静脉期增强不及周边肝组织,而在延迟期则造影剂持续消退,这是肝细胞癌高度特异的影像学表现。肝细胞癌的诊断需要检查平扫期、动脉期、静脉期、延迟期 4 个时期。(3)肝组织活检病理组织学检查。病理学检查是诊断原发性肝癌的金标准,肝细胞癌病理检查特点:癌细胞呈多边形以梁索状排列多见,细胞质嗜酸性,细胞核圆形,梁索间衬覆血窦。免疫组织化学:CD34 染色在肝细胞癌呈强阳性。该诊断标准参照美国肝病协会(AASLD)2010 年在线发布的《肝细胞癌临床指南更新版》。

1.4 方法

1.4.1 DNA 的提取与亚硫酸氢盐的修饰 基因组 DNA 的提取采用标准的蛋白酶 K 消化和酚/氯仿法^[8]。对提取的基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐修饰处理,基因组上未甲基化的 CpG 岛,C 碱基转变成 U。亚硫酸氢盐的处理步骤:(1)基因组 DNA 的碱变性;(2)硫化和脱氢;(3)纯化和脱硫;(4)沉淀和回收^[9]。

1.4.2 BSP 反应与 TA 克隆测序 经亚硫酸氢盐处理的基因 DNA 作为模板进行巢式 PCR 扩增。序列中未甲基化的 C 碱基变成 T 碱基,而甲基化的 C 碱基不变。用于 BSP 的引物序列为 DNM3 WF:5'-AGG GCG TGA TAG AGG AGA TT-3', DNM3 WR:5'-AAA ACC GAC GAC CAA CTA AT-3',产物为 557 bp;DNM3 NF:5'-GTG TTA GCG GCG ATA GTG-3', DNM3 NR:5'-ACT CAA CCA ACC AAA TCC-3',产物为 369 bp。PCR 反应条件:95 ℃ 10 min;95 ℃ 30 s,Tm(68、66、64、62、60、58) ℃30 s,72 ℃ 45 s,2 个循环;95 ℃ 30s,56 ℃ 30s,72 ℃ 45 s,25 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物采用凝胶纯化试剂盒进行纯化(美国 Qiagen 公司),纯化产物克隆到 pMD18-T 载体上(Takara 公司),挑取 10 个阳性单克隆菌群增菌,并且提取质粒送测序。

1.5 统计学处理 数据分析采用 SPSS20.0 统计学软件。肝细胞癌组织与癌旁组织的甲基化率比较采用两配对样本的 *t* 检验,肝细胞癌组织的甲基化事件发生率与患者临床资料的相关性分析采用 χ^2 检验中的 Fisher 确切概率法。不同组别的肝细胞癌组织甲基化率的比较也采用两样本 *t* 检验,双侧检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BSP 克隆测序结果 检测 30 对肝细胞癌组织和癌旁组织的 DNM3 基因启动子 36 个 CpG 岛甲基化水平。癌组织的启动子平均甲基化率为 37.8%,癌旁组织的平均甲基化率为 12.0%,两者甲基化水平比较差异有统计学意义(*P* < 0.05),癌组织的基因启动子 36 个 CpG 岛高度甲基化,见图 1。甲基化事件肝细胞癌的发生率为 83.3%(25/30)。

2.2 肝细胞癌组织的甲基化事件发生率与患者临床资料的相关性分析 临床资料包括患者年龄、性别、肝炎病毒感染情况、甲胎蛋白(AFP)水平、肿瘤大小、TNM 分期、BCLC 分期、细胞分化程度。其中只有患者年龄与 DNM3 基因启动子区域甲基化相关,年龄 < 60 岁甲基化事件发生率明显高于年龄 ≥ 60 岁患者(*P* < 0.05),其余临床资料跟甲基化在统计学上没有相关性,见表 1。将癌组织分别按照 AFP 水平、肿瘤大小、TNM 分

期、BCLC 分期、细胞分化程度进行分组比较各组甲基化率,未发现差异有统计学意义(*P* > 0.05)。见表 2。

表 1 肝细胞癌患者的甲基化事件发生情况与患者临床资料的相关性分析(<i>n</i>)				
临床资料	<i>n</i>	甲基化事件	无甲基化事件	<i>P</i>
性别				1.00
男	28	23	5	
女	2	2	0	
年龄				0.01
≥60 岁	4	1	3	
<60 岁	26	24	2	
肝炎病毒				1.00
阳性	29	24	5	
阴性	1	1	0	
AFP				1.00
≥400 ng/μL	12	10	2	
<400 ng/μL	18	15	3	
肿瘤直径				1.00
≥5 cm	21	17	4	
<5 cm	9	8	1	
TNM 分期				0.10
I + II	22	20	2	
III + IV	8	5	3	
BCLC 分期				1.00
A+B	16	13	3	
C+D	14	12	2	
细胞分化				1.00
I + II	24	20	4	
III + IV	6	5	1	

表 2 肝癌组织不同组别的甲基化率比较($\bar{x} \pm s$)			
分组	<i>n</i>	甲基化率(%)	<i>P</i>
AFP			0.26
≥400 ng/μL	12	43±27	
<400 ng/μL	18	34±19	
肿瘤直径			0.61
≥5 cm	21	36±25	
<5 cm	9	41±16	
TNM 分期			0.66
I + II	22	39±22	
III + IV	8	35±27	
BCLC 分期			0.08
A+B	16	31±24	
C+D	14	45±18	
细胞分化			0.18
I + II	24	39±22	
III + IV	6	23±20	

2.3 DNM3 基因启动子甲基化检测肝癌组织的准确性分析 制作了 DNM3 基因甲基化的受试者工作特征曲线(ROC)曲线,曲线下面积(AUC)为 0.831,对肝癌组织的检验有较好的诊断价值,最佳诊断分界点为甲基化率 24.6%,见图 2。

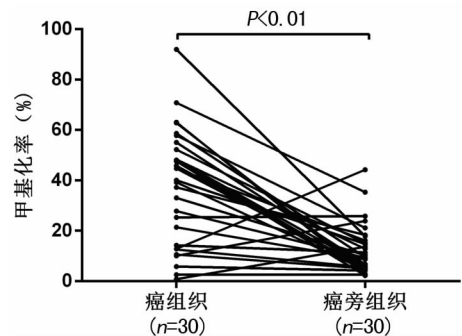


图 1 BSP 检测癌组织和癌旁组织的甲基化率

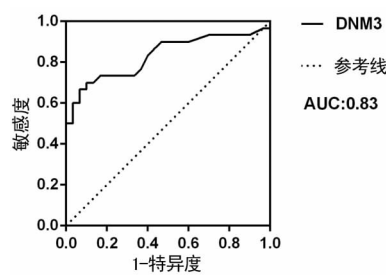


图 2 DNMT3 启动子甲基化率的 ROC 曲线

3 讨 论

肝细胞癌是一种有多种致病机制引起的复杂性疾病,其中表观遗传学机制逐渐受到重视^[10]。DNA 甲基化是目前表观遗传学研究的热门领域,肿瘤组织中的 DNA 异常的甲基化可以促进肿瘤的形成^[11]。本研究检测了 30 对肝细胞癌组织和癌旁组织的 DNMT3 基因启动子区域甲基化水平,发现该基因在癌组织中呈高度甲基化。这是第一次在中国人群中发现该基因在肝细胞癌组织中呈现高甲基化,甲基化事件发生率为 83.3%,癌组织中平均甲基化率为 37.8%。ROC AUC 为 0.83,说明 DNMT3 甲基化检测作为癌症的一个诊断指标有一定的应用价值,当然还需要更大的样本量进行验证。

DNMT3 蛋白是 Dynamin 蛋白家族中一员,主要参与细胞的内存过程。有研究报道 DNMT3 基因是一种新型的抑癌基因,在肝癌组织中该基因启动子高度甲基化,甲基化事件发生率为 87%,与本研究的结果相符^[7]。另有研究表明肝细胞癌中该基因表达量出现明显下降,而且下降程度与肿瘤细胞的血管浸润和肿瘤转移呈正相关,与患者的预后情况呈负相关,因此可以作为患者预后判断的指标^[12]。有研究发现 DNMT3 蛋白可能通过诱导 P53 蛋白的表达,抑制肝细胞的增生,使细胞增生阻滞于 G₀/G₁ 期,促进细胞的凋亡^[12],但具体通过什么信号通路或途径尚不明确。

目前,肝癌的早期发现存在难度,但是由于肝癌容易转移和复发,即使成功完成肝部分切除术和应用药物治疗,大多数患者预后情况并不理想,早发现、早治疗显得尤为重要^[13],目前缺乏好的分子标志物对肝癌进行早期诊断和预后评估^[14]。因此临床新的诊断标志物的筛查和发现,对肝癌潜在发病新机制、新的治疗靶点,新的预后指标的研究具有重要价值。有研究证明在人的血清中存在来自于肝癌细胞的甲基化 DNA^[15],血液中循环的肿瘤细胞的 DNA 甲基化水平可能是一个潜在的肿瘤标志物。对肝癌组织甲基化水平的研究可能会为肝细胞癌早期诊断寻找到一个突破口。

参考文献

- [1] Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature Cancer deaths[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(4):212-236.
- [2] Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, et al. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver Cancer worldwide[J]. J Hepatol, 2006, 45(4):529-538.
- [3] Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(22):4632-4642.
- [4] Esteller M. Epigenetics in cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 358(11):1148-1159.
- [5] Nishida N, Goel A. Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. Curr Genomics, 2011, 12(2):130-137.
- [6] Marsh M, McMahon HT. The structural era of endocytosis[J]. Science, 1999, 285(5425):215-220.
- [7] Inokawa Y, Nomoto S, Hishida M, et al. Dynamin 3: a new candidate tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma detected by triple combination array analysis[J]. Onco Targets Ther, 2013, 6(7):1417-1424.
- [8] Qiu X, Hu B, Huang Y, et al. Hypermethylation of ACP1, BMP4, and TSPYL5 in hepatocellular carcinoma and their potential clinical significance[J]. Dig Dis Sci, 2016, 61(1):149-157.
- [9] Herman JG, Graff JR, Myohonen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(18):9821-9826.
- [10] Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2008, 48(6):2047-2063.
- [11] Gao W, Kondo Y, Shen L, et al. Variable DNA methylation patterns associated with progression of disease in hepatocellular carcinomas[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(10):1901-1910.
- [12] Zhang Z, Chen C, Guo W, et al. DNMT3 attenuates hepatocellular carcinoma growth by activating P53[J]. Med Sci Monit, 2016, 22(1):197-205.
- [13] Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives[J]. Gut, 2014, 63(5):844-855.
- [14] Minguez B, Lachenmayer A. Diagnostic and prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma[J]. Dis Markers, 2011, 31(3):181-190.
- [15] Shen J, Wang S, Zhang YJ, et al. Genome-wide DNA methylation profiles in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2012, 55(6):1799-1808.