

腺瘤样结肠息肉易感基因(APC)及结直肠癌 缺失基因(DCC)基因甲基化在肺癌早期诊断的意义^{*}

马丽颜,梁 静,周建龙 (广州军区广州总医院,广州 510010)

摘要:目的 探讨腺瘤样结肠息肉易感基因(APC)及结直肠癌缺失基因(DCC)基因甲基化在肺癌早期诊断的意义。方法 对245例肺癌患者、150例非恶性肺病患者和40例健康志愿者抽取晨起空腹外周血,应用甲基化特异性PCR法检测APC和DCC启动子区甲基化状态。并对其与临床病理特征等进行相关性分析。结果 ①肺癌组患者外周血中APC及DCC启动子甲基化阳性率分别为26.53%(65/245)和36.33%(89/245);非肺癌组患者外周血中APC及DCC启动子甲基化阳性率分别为2.67%(4/150)和8.00%(12/150);健康志愿者外周血中APC及DCC启动子甲基化阳性率为0;肺癌组与非肺癌组、健康志愿者组相比,APC和DCC基因甲基化检测结果比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。②APC及DCC基因甲基化联合检测,诊断肺癌灵敏度为52.65%,特异度为89.33%,联合检测与单独APC检测相比,敏感度与特异度差异均有统计学意义($P<0.01$);联合检测与单独DCC检测相比,敏感度有统计学差异($P<0.01$),但是特异度差异不明显($P>0.05$);③甲基化检测结果与患者性别、年龄、病理类型、病理分化程度、临床TNM分期等没有相关性($P>0.05$)。结论 APC和DCC基因甲基化与非小细胞肺癌的发生发展密切相关,可以作为肺癌早期诊断标志物之一。

关键词:肺癌;腺瘤样结肠息肉易感基因;结直肠癌缺失基因;甲基化

中图分类号:R735.35;R730.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)01-017-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.005

Evaluation of the Combination of APC and DCC Gene Methylation in the Early Diagnosis of Lung Cancer

MA Li-yan, LIANG Jing, ZHOU Jian-long

(General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

Abstract: **Objective** To investigate the significance of both the adenomatous polyposis coli (APC) and deleted in colorectal carcinoma (DCC) gene methylation in the early diagnosis of lung cancer. **Methods** 245 patients with lung cancer and 150 patients with non-malignant lung disease patients and 40 healthy volunteers were drawn for the experiment. A methylation specific PCR (MSP) was used to detect the methylation status of APC and DCC in the peripheral blood. **Results** The positive rates of APC and DCC genes promoter methylation Peripheral blood of patients with lung cancer were 26.53% (65/245) and 36.33% (89/245), respectively. The positive rates of APC and DCC genes promoter methylation Peripheral blood of patients with benign lung diseases were 2.67% (4/150), 8.00% (12/150), respectively. The positive rates of APC and DCC genes promoter methylation Peripheral blood of healthy volunteers were 0. There was a significant difference between patients with the lung cancer, those with the benign lung diseases and Healthy volunteers ($P<0.01$). The sensitivity and specificity of lung cancer was respectively 52.65% and 89.33% by the combination of APC and DCC genes methylation. Comparing with the separate APC detection, sensitivity and specificity statistical differences were significant in joint measurement ($P<0.01$). Comparing with the separate DCC detection, sensitivity statistical differences were significant, but specificity statistical differences was not obvious ($P>0.05$). There was no correlation between methylation test results and patient gender, age, pathological type, pathological grade, TNM stage and so on ($P>0.05$). **Conclusion** APC and DCC gene methylation were closely related to the development of non-small cell lung cancer. They can be used as an early diagnostic marker of lung cancer.

Keywords: lung cancer; APC gene; DCC gene; methylation

肺癌是目前男性癌症中发病率最高的癌症,且致死率也有逐年上升趋势。目前肺癌的治愈率,只有约15%有机会手术治疗,大多数患者发现时已失去手术机会,主要的原因就是早期的诊断非常

难^[1]。早期肺癌治疗后长期生存率很低,I期5年生存率为57%~67%,II期5年生存率为38%~55%。如果能提高早期诊断,则可以改善治疗效率。近年来,肿瘤的分子诊断有明显进展,不仅提

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81401752)。

作者简介:马丽颜(1985—),女,本科学历,硕士在读,技师,主要从事肿瘤的诊断研究,Tel:13570308378。

通讯作者:周建龙,男,主要从事肿瘤的诊断和治疗,Tel:13189090119。

高了早期诊断率,而且对肿瘤的个体治疗提高了治疗依据和监测手段。尤其是循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ct DNA)的发现,它与肿瘤的发生、发展密切相关,而且易于获得,从而为肿瘤的无创诊断和监测提供了新的手段。肿瘤的表现遗传学如 DNA 甲基化的相关研究很多,目前已发现 DNA 甲基化在基因表达及细胞增殖等起了重要的作用,并参与肿瘤发生、发展、转移等。DNA 启动子 CpG 岛的甲基化是抑癌基因通过甲基化失活的重要方式。目前研究发现单个基因甲基化的阳性率不高,无法达到肺癌早期筛查的标准。大多数研究倾向于联合检测多个基因甲基化来提高诊断效率,但是各个研究的结果差异较大,尚需要大样本的研究或是特定人群样本去做进一步亚群分析。本研究首次在较大样本中,拟通过甲基化特异性 PCR 方法,监测肺癌患者及健康患者外周血中的特定基因甲基化水平,来探讨结直肠癌缺失基因(deleted in colorectal carcinoma, DCC)和腺瘤样结肠息肉易感基因(adenomatous polyposis coli, APC)基因甲基化对早期肺癌的识别的意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象 肺癌组入选患者为 2014 年 1 月~2015 年 1 月在本院住院,经病理组织学或细胞学确诊为肺癌。总共入选对象 245 例,其中男性 203 例,女性 42 例,年龄 38~83 岁。根据 WHO 肺癌病理组织学类型分,其中鳞癌 100 例,腺癌 108 例,小细胞肺癌 30 例,其他未分型 7 例。按照病理学分化程度分,其中中分化及高分化 67 例,低分化及未分化 178 例。按国际抗癌联盟肺癌的 TNM 分期标准分(2009 年修订),其中 I 期及 II 期 84 例,III 期及 IV 期 161 例。所有患者亦无其他恶性肿瘤的病史。非恶性肺病组入选患者,为同期我院呼吸科及胸外科住院患者 150 例,其中男性 119 例,女性 31 例,年龄 18~86 岁。该组患者均无恶性肿瘤病史。健康对照组的入选患者为 40 例健康志愿者,其中男性 30 例,女性 10 例,年龄 51~65 岁。

所有入选受试者于放化疗治疗前,抽取 2 ml 清晨空腹外周静脉血,给予 EDTA 抗凝,3 600 r/min 离心 15 min 分离血浆,再以 3 600 r/min 离心 15 min,二次离心后弃血细胞成分,用 1.5 ml EP 管分装放于-20℃保存备用。

1.2 试剂和仪器 DNA MiniKit 试剂盒(德国 Qiagen 公司),甲基化特异性 PCR 引物(中国上海生工公司),RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司),EZ DNA Methylation-Gold Kit 试剂盒(美国 ZYMO RESEARCH 公司)。

1.3 方法 血浆 DNA 的提取及甲基化修饰用 DNA MiniKit 提取血浆的 DNA。取 1 ml 待测血浆,严格按试剂说明书进行提取,最终用 50 μl AE 缓冲液洗脱 DNA,放入-20℃冰箱待测。采用亚硫酸氢钠法进行甲基化修饰。操作过程严格按照 EZ DNA Methylation-Gold Kit 说明书进行,对提取的血浆 DNA 进行亚硫酸氢钠修饰后,DNA 序列中未甲基化胞嘧啶(C)转换成了尿嘧啶(U)。放入-20℃冰箱待测。

甲基化特异性 PCR 检测 APC 基因和 DCC 基因采用 Methprimer 软件来设计甲基化特异性 PCR 的引物序列,由上海生工生物工程股份有限公司合成。在重亚硫酸盐测序条件下,针对 APC 基因和 DCC 基因,分别设计甲基化引物(M)和非甲基化引物(U)。APC 引物序列,上游:ATT-GCGGAGTGCG,下游:TCGACGAAGTCCCGACGAA,产物 98bp;APC 非甲基化引物序列上游:GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT3,下游:CCAATCAACAACTCCCAACAA,产物 108bp;DCC 引物序列,上游:CGTTGTTCGCGATT TTTGGTTTC;下游:ACCGATTACTTAAAA ATACGCG,产物 137bp;DCC 非甲基化引物序列,上游:GTTGTTGTTGTTTGTGATTTTTGGTT TT,下游:CCACTTACCAATTACTTAAAAAT-ACACA,产物 145bp。PCR 反应体系共 20 μl,其中 DreamTaq Green PCR Master Mix (2×) 10 μl,修饰 DNA 模板 4 μl,上游引物 0.5 μl,下游引物 0.5 μl,去离子水 5 μl。混匀反应体系后置于 PCR 仪中扩增。反应条件:94℃变性 45 s,60℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,共 36 个循环。琼脂糖凝胶电泳将配置好的 2 g/dl 琼脂糖凝胶置于电泳槽,凝固后拔除梳子后加样。待电泳条带清晰化,停止电泳并置于凝胶成像系统拍照。

甲基化阳性定义:甲基化引物经扩增后可出现阳性条带;非甲基化阳性定义:非甲基化引物经扩增后可出现阳性条带。

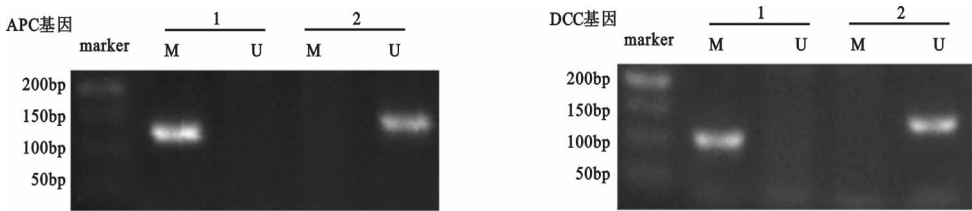
1.4 统计学分析 采用 SPSS16.0 软件统计学处理数据。灵敏度(%)=真阳性/(真阳性+假阴性)×100%;特异度(%)=真阴性/(真阴性+假阳性)×100%;计数资料卡方检验或 Fisher 精确检验法,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者外周血 APC 及 DCC 甲基化检测结果 见图 1,表 1。肺癌组患者外周血中 APC 及 DCC 启动子甲基化阳性率分别为 26.53%(65/245),36.33%(89/245);非肺癌组患者外周血中 APC 及 DCC 启动子甲基化阳性率分别为 2.67%(4/150),

8.00%(12/150);健康志愿者外周血中 APC 及 DCC 启动子甲基化阳性率为 0。肺癌组与非肺癌组 APC 和 DCC 基因甲基化检测结果比较,差异均

有统计学意义($P<0.01$),肺癌组与健康对照组结果比较差异有统计学意义($P<0.01$)。



Marker:分子标准参照物;M:甲基化;U:未甲基化

图1 外周血 APC,DCC 甲基化电泳图

表 1 各组患者甲基化检测结果比较					
临床分组	n	APC		DCC	
		甲基化	未甲基化	甲基化	未甲基化
肺癌组	245	65	180	89	156
非肺癌组	150	4	146 [*]	12	138 [#]
健康对照组	40	0	40 ^{**}	0	40 ^{##}

注:与肺癌组相比,* $\chi^2=36.751\ 3,P=0.000\ 0$;** $\chi^2=13.747\ 7,P=0.000\ 2$;# $\chi^2=39.225\ 9,P=0.000\ 0$;## $\chi^2=21.128\ 7,P=0.000\ 0$ 。

2.2 患者外周血 APC 及 DCC 甲基化的诊断效力
见表 2。与 APC 基因相比,DCC 基因的灵敏度高,而特异度低,阳性预测值低,而阴性预测值高。APC 基因与 DCC 基因联合检测,敏感度进一步提高至 52.65%,而特异度稍下降(89.33%)。联合检测 APC+DCC 与单独检测 APC 相比,敏感度与特异度,差异均有统计学显著意义($P<0.01$)。联合检测 APC+DCC 与单独检测 DCC 相比,敏感度

差异有统计学意义($P<0.01$),特异度有所下降,但是差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 外周血 APC 及 DCC 甲基化诊断效力(%)		
检测基因	灵敏度	特异度
APC	26.53(65/245) [*]	97.33(146/150) [#]
DCC	36.33(89/245) ^{**}	92.00(138/150) ^{##}
APC+DCC	52.65(129/245)	89.33(134/150)

注:与 APC+DCC 组相比:* $\chi^2=34.951\ 2,P=0.000\ 0$;** $\chi^2=13.221\ 8,P=0.000\ 3$;# $\chi^2=6.272\ 9,P=0.012$;## $\chi^2=0.630\ 3,P=0.427\ 3$ 。

2.3 肺癌组患者甲基化检测结果与临床病理特征关系
见表 3。两组基因甲基化检测结果与临床数据相关性分析,甲基化检测结果与患者性别、年龄、病理类型、病理分化程度、临床 TNM 分期等没有相关性($P>0.05$)。

表 3 肺癌组患者甲基化检测结果与临床病理特征关系								
临床病理特征		n	APC		χ^2/P	DCC		χ^2/P
			甲基化	未甲基化		甲基化	未甲基化	
性别	男性	203	54	149	0.003 0/	74	129	0.008 2/
	女性	42	11	31	0.956 3	15	27	0.927
年龄(岁)	<60	35	9	26	0.014 0/	13	22	1.307 0/
	≥60	210	56	154	0.905 9	76	197	0.252 9
组织学	鳞癌	100	26	74		36	36	
	腺癌	108	29	79		40	40	
	小细胞癌	30	8	22	0.035 4/	11	19	0.211 7/
	其他	7	2	5	0.998 2	2	5	0.975 7
分化程度	低分化及未分化	178	47	131	0.005 3/	65	113	0.010 2/
	中分化及高分化	67	18	49	0.941 9	24	43	0.919 6
TNM 分期	I+II	84	22	62	0.007 6/	31	53	0.018 5/
	III+IV	161	43	118	0.930 6	58	103	0.891 9

3 讨论 肺癌是我国及全球男性发病率居首位的恶性肿瘤,大多数肺癌发现时已进入晚期,错过手

术治疗机会。如何早期发现诊断肺癌是治疗肺癌的关键。正常健康人外周血中有少量游离 DNA

可供检测,而肿瘤患者的循环血 DNA 较正常人群明显增多,为提供无创诊断肺癌提供了可能,而肺癌患者循环血 DNA 与肺癌组织细胞的分子学特征一致,为外周血诊断肿瘤分子学分析奠定了理论基础。近年来许多研究^[2]先通过基因芯片高通量筛选靶向甲基化基因,再利用常规甲基 PCR 进行检测验证,以找到合适的靶向甲基化基因。

APC 基因位于染色体 5q21,约 8 535 bp,是 Wnt 信号传导通路中重要抑癌基因之一^[3]。APC 基因启动子区高甲基化使之失活或低表达,从而使 Wnt 信号传导通路障碍从而引发肿瘤通路启动,导致肠癌、肺癌等多种常见肿瘤的发生^[4]。既往研究发现各种癌症患者外周血 DNA 甲基化检测灵敏度基本小于 50%^[5]。本研究结果显示 APC 基因甲基化检测灵敏度 26.53% 和特异度为 97.33%,与既往研究结果基本一致。

DCC 基因人类染色体 18q21,是结直肠肿瘤发生中的一种抑癌基因,其启动子甲基化或基因缺失直接导致 DCC 基因表达下降。既往研究发现 DCC 基因甲基化检测率的灵敏度在 27.2%~35.5%,本研究肺癌患者外周血 DCC 基因甲基化检测灵敏度为 36.33%,特异度为 92.00%,与既往研究结果基本一致^[6]。本研究还发现,APC 及 DCC 基因甲基化程度,与患者性别、年龄、病理类型等临床结果无相关性。基因的甲基化与分期无关,说明该两个基因甲基化贯穿整个肿瘤进展过程,属于早期分子事件,可以作为早期肺癌诊断指标之一。

由于肿瘤的发生发展是多基因、多位点、多通道的特点,单一基因的甲基化不可能完全解释疾病机制,目前单基因甲基化检测灵敏度均小于 50%,提示必须多基因联合检测来提高诊断效率。本研究发现 APC 基因与 DCC 基因联合检测,敏感度进一步提高至 52%,而特异度稍下降到 89.33%,验证了联合基因检测提高诊断效率的说法。基因的甲基化与肿瘤的发生及发展关系密切,可作为肺癌早期诊断的标志物之一,APC 及 DCC 联合检测,可明确提高诊断效率,作为肺癌早期诊断的辅助手段之一。

基因的甲基化在肺癌的预后评估和治疗方法上也提供了新的方向。非小细胞肺癌患者 DNA 甲基状况不但与肺癌生存期有明显相关性^[7],而且发现基因高甲基化状态可使患者术后肿瘤复发率提高^[8]。最近研究证实 DNA 甲基转移酶(5 氮杂胞苷)治疗进展期肺癌临床试验显示,药物耐受性良好,其中使部分患者受益,甚至可以达到完全缓

解^[9,10]。但是在治疗及监测方面还没有稳定可靠的靶向基因供临床选择,下一步相关基因的甲基化等表观遗传学改变研究,可为肺癌的治疗、监测等提供新的方向。

参考文献:

- [1] Matsuda A, Katanoda K. Five-year relative survival rate of lung cancer in the USA, Europe and Japan[J]. Japan J Clin Oncol, 2013, 43(12):1287-1288.
- [2] Kwon YJ, Lee SJ, Koh JS, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation and the gene expression change in lung cancer[J]. Journal of Thoracic Oncology, 2012, 7(1):20-33.
- [3] 高丽, 潘世扬, 陈丹, 等. 熔解曲线法用于肺癌 APC 基因甲基化模式的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(1):19-23.
Gao L, Pan SY, Chen D, et al. Investigation of methylation patterns of APC gene in lung cancer with a novel fluorescence melting curve analysis assay[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(1):19-23.
- [4] Zysman M, Saka A, Millar A, et al. Methylation of adenomatous polyposis coli in endometrial cancer occurs more frequently in tumors with microsatellite instability phenotype[J]. Cancer Res, 2002, 62(13):3663-3666.
- [5] 宋超, 张云, 金永堂, 等. 非小细胞肺癌患者血浆 DAPK 基因甲基化检测及其临床意义[J]. 肿瘤防治研究, 2013, 40(8):772-775.
Song C, Zhang Y, Jin YT, et al. Detection and clinical significance of DAPK gene methylation in plasma of not-small cell lung cancer patients[J]. Cancer Research on Prevention and Treatment's, 2013, 40(8):772-775.
- [6] Ostrow KL, Hoque MO, Loyo M, et al. Molecular analysis of plasma DNA for the early detection of lung cancer by quantitative methylation-specific PCR[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(13):3463-3472.
- [7] Miao Y, Wang L, Zhang X, et al. Promoter methylation-mediated silencing of β -catenin enhances invasiveness of non-small cell lung cancer and predicts adverse prognosis[J]. PLoS One, 2014, 9(11):e112258.
- [8] Wu F, Lu M, Qu L, et al. DNA methylation of hMLH1 correlates with the clinical response to cisplatin after a surgical resection in non-small cell lung cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5):5457-5463.
- [9] 王虹, 李丽丽, 张吉才, 等. 5-氮杂-2'脱氧胞苷对肺癌 A549/DDP 细胞 hMLH1, MGMT 基因甲基化及其表达的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(3):83-86.
Wang H, Li LL, Zhang JC, et al. Effects of 5-Aza-Cde on DNA methylation and expression of hMLH1 and MGMT gene in lung cancer cell line A549/DDP[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(3):83-86.
- [10] Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, et al. Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer[J]. Cancer Discovery, 2011, 1(7):598-607.