

血浆相关基因甲基化在食管癌复发中的临床价值*

朱卫华, 刘继斌 (南通市肿瘤医院, 江苏南通 226361)

摘要:目的 评估血浆相关基因甲基化在食管癌复发中的临床价值。方法 收集 81 例食管癌(ESCC)患者及 60 例健康体检者血浆。采用甲基化特异性 PCR 技术分析了 81 例食管癌患者及 60 例健康体检者血浆中四个基因 SFRP-1, WIF-1, DKK-3 和 RUNX3 启动子区域的甲基化。结果 这四种基因在食管癌血浆甲基化频率均超过 25%, 其中: SFRP-1 为 29.6%, WIF-1 35.8%, DKK-3 37.4%, RUNX-3 35.8%; 健康体检者血浆中均未检测到相关基因的甲基化。食管癌患者血浆中 SFRP-1($\chi^2=14.16, P<0.01$), DKK-3($\chi^2=6.21, P<0.05$)和 RUNX3($\chi^2=11.75, P<0.01$)基因甲基化明显与食管癌的复发有关, 未发现 WIF-1 基因甲基化与食管癌复发有关($\chi^2=3.39, P>0.05$)。结论 食管癌血浆相关基因甲基化可能与食管癌复发相关。

关键词:食管癌; 甲基化; 复发

中图分类号: R735.1; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)04-093-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.04.025

Clinical Significance of Promoter Hypermethylation of Esophageal Squamous Cell Carcinoma(ESCC) in Plasma

ZHU Wei-hua, LIU Ji-bin (Nantong Tumor Hospital, Jiangsu Nantong 226361, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the clinical significance of promoter hypermethylation of esophageal squamous cell carcinoma(ESCC) in plasma. **Methods** Promoter hypermethylation status of 81 ESCC patients and 60 healthy persons were analyzed using a methylation marker panel in plasma with methylation-specific polymerase chain reaction and the association between promoter hypermethylation and the two-year recurrence of ESCC. Examined genes included SFRP-1, WIF-1, DKK-3 and RUNX3. **Results** The frequencies of high-level methylation in ESCC plasma were at least 25% for the four genes: SFRP-1 29.6%, WIF-1 35.8%, DKK-3 37.4% and RUNX-3 35.8%. Hypermethylation status was not detected in plasma of healthy persons. Hypermethylation of SFRP-1 ($\chi^2=14.16, P<0.01$), DKK-3 ($\chi^2=6.21, P<0.05$) and RUNX-3 ($\chi^2=11.75, P<0.01$) was significantly associated with an increased risk of ESCC recurrence. **Conclusion** The status of promoter hypermethylation of examined genes in plasma may be associated with recurrence of ESCC.

Keywords: esophageal squamous cell carcinoma; methylation; recurrence

食管癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一^[1], 我国是发病率和死亡率最高的国家^[2]之一。虽然诊疗水平在不断提高, 但食管癌的预后仍非常差, 复发率极高, 生存率约在 5%~20% 之间^[3]。研究发现启动子区域的 CpG 岛甲基化导致抑癌基因转录沉默^[4], 这种变化可能有助于预测肿瘤的预后^[5,6]。在本研究中我们探讨了血浆中 SFRP-1, WIF-1, DKK-3 和 RUNX3 基因启动子区域甲基化变化在食管癌复发中的临床价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2008 年 6 月~12 月期间南通市肿瘤医院经病理明确诊断食管鳞癌患者 81 例, 平均年龄为 63 岁(46~80 岁), 其中男性 61 例, 女性 20 例。65 例(80.2%)患者接受了放疗或化疗, 31 例(38.3%)患者采血后进行了手术治疗。81 例患者中, 有 21 例(26%)出现复发。健康体检者 60 例作为对照组, 男性 28 例, 女性 32 例, 两组

人员均晨起空腹抽取外周静脉血(抗凝)。血清标本, 3 000×g 离心 5~10 min, 取上层血浆, -80℃ 低温冰箱冻存或立即提取 DNA。所有患者都进行了 24 个月的随访。本研究获得本院伦理委员会的批准, 所有患者均签署了书面知情同意书。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 主要试剂: PCR 产物纯化试剂盒(购自上海生工); MSP mix(购自上海生工), 离心柱型临床血液基因组 DNA 提取试剂盒(购自上海闪晶生物公司); 琼脂糖(购自 Amresco 公司); EZ DNA Methylation-Gold Kit™ (购自美国 ZYMO RESEARCH 公司)。

1.2.2 主要仪器: Biometra PCR 扩增仪; ECPS 3000/150 电泳仪; BECKMAN Allegra™ RA 64R 高速低温离心机; 美国 BIO-RAD 公司凝胶图像分析仪; 博日 MiniRun 凝胶电泳仪。

1.3 方法

* 作者简介: 朱卫华(1977—), 男, 学士, 主管技师, 主要从事肿瘤临床检验及科研工作, Tel: 0513-86712063, E-mail: 1585543600@qq.com。
通讯作者: 刘继斌, Tel: 0513-86712016, E-mail: tians2008@163.com。

1.3.1 血浆 DNA 提取:按上海闪晶生物公司临床标本基因组 DNA 抽提试剂盒说明书严格操作提取血浆 DNA,4℃保存备用。

1.3.2 引物设计与合成:根据 GenBank 和相关文献设计相关引物由上海生工公司设计合成,引物序列见表 1。

表 1 四种基因甲基化引物

Gene	Primer sequence(5'-3')
WIF-1	U F GGGTGTATTATTGGGTGTATTGT
	R AAAAAAATAACACAAACAAATACAAAC
M F	CGTTTTATTGGGCGTATCGT
	R ACTAACGCGAACGAAATACGA
RUNX3	U F TTATGAGGGGTGGTTGTATGTGGG
	R AAAACAACCAACACAAACACCTCC
M F	TTACGAGGGGCGGTCTACGCGGG
	R AAAACGACGACGCGAACGCCTCC
SFRP-1	U F GAGTTAGTGTGTGTGTTTGTGTTTGT
	R CCCAACATTACCAACTCCACAACCA
M F	GTGTCGCGGTTCGTCGTTTCGC
	R AACGTTACCCGACTCCGCGACCG
DKK-3	U F TTAGGGGTGGGTGGTGGGGT
	R CTACATCTCCACTCTACACCA
M F	GGGGCGGGCGGGGGC
	R ACATCTCCGCTCTACGCCG

注:M. 甲基化;U. 未甲基化;F. 前导链;R. 后续链。

1.3.3 DNA 甲基化处理:DNA 甲基化处理采用美国 ZYMO RESEARCH 公司的 EZ DNA Methylation-Gold Kit™ 试剂盒,严格按照说明操作。

1.4 统计学分析 采用 SPSS12.0 软件进行资料的统计分析,计数资料采用 χ^2 检验,多因素 Cox 回归计算风险比例(hazard ratios, HR)及其 95%可信区间(confidence intervals, CI),检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 食管癌患者临床病理特征与复发的关系 见表 2。年龄、性别、吸烟、饮酒和有无进行手术以及放疗或化疗与食管癌复发无相关性,差异无统计学意义($P > 0.05$),但临床分期与食管癌复发关系密切,特别是晚期食管癌复发的危险因素($P < 0.001$)。

2.2 食管癌相关基因的甲基化以及与复发的关系 见表 3。甲基化特异性 PCR 技术分析了 81 例食管癌患者及 60 例健康体检者血浆中四个基因 SFRP-1, WIF-1, DKK-3 和 RUNX3 启动子区域的甲基化。健康体检者血浆中均未检测到相关基因的甲基化。结果显示:这四种基因在食管癌血浆甲

基化频率均超过 25%,其中:SFRP-1 为 29.6%, WIF-1 35.8%, DKK-3 37.4%, RUNX-3 35.8%;发现 SFRP-1($\chi^2 = 14.16, P < 0.01$), DKK-3($\chi^2 = 6.21, P < 0.05$)和 RUNX3($\chi^2 = 11.75, P < 0.01$)基因甲基化明显与食管癌复发有关。未发现 WIF-1 基因甲基化与食管癌的复发有关($\chi^2 = 3.39, P > 0.05$)。

表 2 食管癌患者临床病理特征

项目	变量	复发		χ^2	P
		无	有		
年龄(岁)	<63	31	10	0.10	>0.05
	≥63	29	11		
性别	女	16	4	0.49	>0.05
	男	44	17		
吸烟	无	31	9	0.48	>0.05
	有	29	12		
饮酒	无	26	8	0.18	>0.05
	有	34	13		
手术	无	38	12	0.25	>0.05
	有	22	9		
放化疗	No	11	5	0.05	>0.05
	Yes	49	16		
分期	I	25	3	17.04	<0.05
	II	22	3		
	III	13	15		

表 3 基因甲基化与食管癌复发的关系表

基因	n	复发		χ^2	P
		无	有		
SFRP-1	阴性	57	49	14.16	<0.01
	阳性	24	11		
WIF-1	阴性	52	42	3.39	>0.05
	阳性	29	18		
DKK-3	阴性	51	44	6.21	<0.005
	阳性	30	16		
RUNX-3	阴性	52	45	11.75	<0.01
	阳性	29	15		

3 讨论 食管癌是我国常见的恶性肿瘤之一。食管癌早期症状并不十分明显,内镜检查和指示性活检由于创伤性,给就检者带来了难以忍受的痛苦而影响其临床应用。

恶性肿瘤的发生、发展是一个多因素、多阶段、多基因的复杂过程,在此过程中涉及多种基因功能的异常变化,这些基因功能异常原因很多,例如基因突变、基因拷贝数变化等改变,还涉及到基因表观遗传学改变。DNA 甲基化是最 (下转 97 页)

- tients of Guangdong province[J]. Chin J Clin Lab Sci, 2011, 29(7): 526-528.
- [3] 邓健康, 郭晓兰. 川东北地区性病门诊男性患者 HPV 感染情况分析[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(5): 143-146.
- Deng JK, Guo XL. Analysis of human papillomavirus infection in male patients in northeast of Sichuan[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(5): 143-146.
- (上接 94 页)重要的表观遗传修饰形式之一。DNA 甲基化造成抑癌基因转录沉默^[4]。这种变化经常发生在肿瘤的发生和发展过程。基因的异常甲基化可作为肝癌发生风险的筛选指标, 基因的甲基化与预后明显相关^[7]。
- 研究表明, 血清/血浆中的各种基因的甲基化可能是对人类肿瘤一个非常特异的生物标志物^[8]。研究显示 NKD2 在体内外通过抑制 Wnt 信号通路而抑制了食管癌的进展^[9]。有研究认为异常的 DNA 甲基化改变可能作为诊断、预后和化疗敏感的标志物^[10]。而在本研究中, 我们发现, 血浆中 SFRP-1, DKK-3 和 RUNX-3 基因启动子甲基化与食管癌复发有关, 但相关基因的甲基化并不是都可以作为评估食管癌预后的指标。同时发现 SFRP-1 基因甲基化的患者比未发生甲基化的食管癌复发的危险增加了 10.8 倍, 同样 DKK-3 基因甲基化复发的危险增加了 6.07 倍, RUNX-3 基因甲基化复发的危险增加了 7.81 倍。WIF-1 基因甲基化没有明显的增加食管癌复发的风险 ($P=0.107$)。该研究提示食管癌血浆中 SFRP-1, DKK-3 和 RUNX-3 基因甲基化可以独立预测食管癌复发的风险。本研究发现血浆中 SFRP-1, DKK-3 和 RUNX-3 基因启动子甲基化状态不仅可以单独预测食管癌复发的风险, 若联合检测也许可以共同预测食管癌复发风险, 增加了预测食管癌复发风险的可靠性; 相关验证将在今后研究中加以证实。本研究由于样本量较少, 相关结论还需要在今后大样本研究中加以证实。另外本研究仅仅研究了食管鳞癌病例, 虽然腺癌病例较少, 但此相关结论是否也适用于腺癌有待进一步研究。本研究随访时间短, 相关结论还需要在今后长期随访中继续验证。总归, 相关结论仅仅是一种现象的总结, 相关科学结论有待在今后的深入研究中验证和总结。
- 参考文献:
- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [4] Zhang XM, Guo MZ. The value of epigenetic markers in esophageal cancer[J]. Front Med China, 2010, 4(4): 378-384.
- [5] Hamilton JP, Sato F, Jin Z, et al. Reprimo methylation is a potential biomarker of Barrett's-Associated esophageal neoplastic progression[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(22): 6637-6642.
- [6] Hamilton JP, Sato F, Greenwald BD, et al. Promoter methylation and response to chemotherapy and radiation in esophageal cancer[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006, 4(6): 701-708.
- [7] 陆海一, 林 兰, 刘继斌. 拮抗 Wnt 信号通路的 CPG 岛甲基化表型在肝癌预后中的临床价值[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(6): 22-25.
- Lu HY, Lin L, Liu JB. Clinical significance of CpG island methylator phenotype(CIMP) in plasma associated with prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(6): 22-25.
- [8] Salazar F, Molina MA, Sanchez-Ronco M, et al. First-line therapy and methylation status of CHFR in serum influence outcome to chemotherapy versus EGFR tyrosine kinase inhibitors as second-line therapy in stage IV non-small-cell lung cancer patients[J]. Lung Cancer, 2011, 72(1): 84-91.
- [9] Cao B, Yang W, Jin Y, et al. Silencing NKD2 by promoter region hypermethylation promotes esophageal cancer progression by activating Wt signaling[J]. Journal of Thoracic Oncology, 2016 [Epub ahead of print].
- [10] Ma K, Cao B, Guo M. The detective, prognostic, and predictive value of DNA methylation in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Epigenetics, 2016, 8(1): 1-9.
- 收稿日期: 2016-04-17 修回日期: 2016-05-28
- 收稿日期: 2016-04-05 修回日期: 2016-06-23