

## 胃癌相关甲基化分型与幽门螺杆菌感染的探讨\*

朱卫华, 刘继斌, 林 兰 (江苏省南通市肿瘤医院, 江苏南通 226361)

**摘要:**目的 探讨基因甲基化分型与幽门螺杆菌感染在胃癌预后中的临床价值。方法 使用甲基化特异性 PCR 技术分析 75 例胃癌病人血清中的 CpG 岛甲基化分型(CIMP), 同时分析了 40 例健康人血清作为对照。APC, WIF-1, RUNX-3, DLC-1, SFRP-1, DKK 和 E-cad 作为研究基因。幽门螺杆菌感染由血清抗幽门螺杆菌 G 抗体试验和快速脲酶试验确定。结果 7 个基因胃癌组织中甲基化的频率如下: APC 48%, WIF-1 57.33%, RUNX-3 56%, DLC-1 50.67%, SFRP-1 52%, DKK 54.67% 和 E-cad 48%; 血清中甲基化的频率如下: APC 30.67%, WIF-1 34.67%, RUNX-3 37.33%, DLC-1 29.33%, SFRP-1 33.33%, DKK 32% 和 E-cad 26.67%。CIMP+ (定义为  $\geq 3$  甲基化基因) 与 47 例(62.67%)胃癌组织标本和 44 例(58.67%)GC 血清样品相关联。CIMP+ 与非肿瘤黏膜组织和健康人的血清无关联。在 75 例胃癌中, 有 51 例(68%)为幽门螺杆菌阳性, 24 例(32%)为幽门螺杆菌阴性。在 51 例幽门螺杆菌感染胃癌组织中, 36 例为 CIMP+, 15 例为 CIMP-。相反, 在 24 例幽门螺杆菌阴性病例中, 11 例为 CIMP+, 13 例为 CIMP-。两组 CIMP 表达差异有统计学意义( $\chi^2=4.27$ ,  $P<0.05$ )。在 51 例幽门螺杆菌阳性胃癌血清样本中, 34 例为 CIMP+, 17 例为 CIMP-。24 例未感染血清样本中, 10 例 CIMP+, 14 例 CIMP-。两组间差异有统计学意义( $\chi^2=4.21$ ,  $P<0.05$ )。经过两年随访, 发现 HP+/CIMP+ 和 HP+/CIMP- 两组转移、复发率明显不同, HP+/CIMP+ 病人有转移、复发倾向( $P<0.05$ ); 生存率二者未见明显不同( $P>0.05$ )。结论 HP+/CIMP+ 的病人比 HP+/CIMP- 更易转移和复发。

**关键词:** 甲基化分型; 幽门螺杆菌; 血清; 预后; 胃癌

中图分类号: R735.2; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)06-055-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.06.015

## Relationship between the CpG Island Methylator Phenotype and *Helicobacter Pylori* Infection Associated with Gastric Cancer

ZHU Wei-hua, LIU Ji-bin, LIN Lan

(Nantong Tumor Hospital, Jiangsu Nantong 226361, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the association between the CpG island methylator phenotype (CIMP) and serum *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) levels for clinical prediction of gastric cancer (GC) progression. **Methods** Analyzed the serum CIMP status of 75 patients with GC using a methylation marker panel and a methylation-specific polymerase chain reaction. Serum samples from 40 healthy persons were examined at the same time. The genes examined were APC, WIF-1, RUNX-3, DLC-1, SFRP-1, DKK and E-cad respectively. *H. pylori* infection in serum was assayed with an anti-*H. pylori* immunoglobulin G antibody test and a rapid urease test. **Results** The frequencies of high-level methylation in GC tissues for the seven genes were: 48% for APC, 57.33% for WIF-1, 56% for RUNX-3, 50.67% for DLC-1, 52% for SFRP-1, 54.67% for DKK, and 48% for E-cad. The frequencies in GC serum were 30.67% for APC, 34.67% for WIF-1, 37.33% for RUNX-3, 29.33% for DLC-1, 33.33% for SFRP-1, 32% for DKK, and 26.67% for E-cad. CIMP+ (defined as  $\geq 3$  methylated genes) was associated with 47 (62.67%) GC tissue samples and 44 (58.67%) GC serum samples. CIMP+ was not associated with non-neoplastic mucosal tissues or the serum of healthy persons. Of the 75 GC cases, 51 (68%) were *H. pylori*+, and 24 (32%) were *H. pylori*-. Of the 51 *H. pylori*+ cases, 36 were CIMP+ and 15 were CIMP-. In contrast, for the 24 *H. pylori*- cases, 11 were CIMP+, and 13 were CIMP-. The difference was significant between the *H. pylori*+ and *H. pylori*- groups ( $\chi^2=4.27$ ,  $P<0.05$ ). Of the 51 *H. pylori*+ GC patients, 34 were CIMP+ and 17 were CIMP-, while among the 24 *H. pylori*- GC cases, 10 were CIMP+ and 14 were CIMP-. The difference was significant between the *H. pylori*+ and *H. pylori*- groups ( $\chi^2=4.21$ ,  $P<0.05$ ). A 2-year follow-up showed significant difference in the rates of metastasis and recurrence between *H. pylori*+/CIMP+ cases and the *H. pylori*+/CIMP- cases or CIMP- cases associated with *H. pylori* assayed in serum ( $P<0.05$ ). However, there were no significant differences in survival rates between the two groups. **Conclusion** *H. pylori*+/CIMP+ cases were associated with higher rates of metastasis and recurrence than *H. pylori*+/CIMP- cases. Serum may be useful for examining CIMP status.

**Keywords:** CpG island methylator phenotype; *Helicobacter pylori*; serum; prognosis; gastric cancer

\* 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: kindtiger74@163.com。

通讯作者: 林 兰, Tel: 0513-86712016, E-mail: kindrabbit75@163.com。

胃癌(GC)是人类常见的恶性肿瘤之一,是全球癌症相关死亡的第二大原因<sup>[1]</sup>。胃癌预后差仍然是一个重要的临床挑战,它对放疗和化疗相对耐药因而治疗选择有限<sup>[2]</sup>。DNA 甲基化(DNA methylation)是目前研究最为广泛、最重要的表观遗传修饰之一。肿瘤甲基化亚型,称为 CpG 岛甲基化表型(CIMP),是指出现多基因的甲基化,目前认为是肿瘤新的预后标志<sup>[3,4]</sup>。胃黏膜幽门螺杆菌感染(*H. pylori*, HP)是胃癌的高风险因素,一些研究表明,幽门螺杆菌感染与基因启动子甲基化有关,且与肿瘤的发生发展有关<sup>[5,6]</sup>。我们重点关注了幽门螺杆菌感染与 CpG 岛甲基化表型(CIMP)在胃癌中的关系,分析了 75 例胃癌患者血清中相关基因 CIMP 状态(APC, WIF-1, RUNX-3, DLC-1, SFRP-1, DKK 和 E-cad)和幽门螺杆菌感染在胃癌预后中的价值。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2008~2010 年期间南通市肿瘤医院手术切除的经病理明确诊断的胃癌和相应的非癌临近组织以及配对的血清样本 75 例,男性 53 例,女性 22 例,年龄 31~76 岁,平均年龄 52.35±7.62 岁。2 周内未行抗肿瘤治疗采集血样。健康体检者 40 例血清作为对照,男性 18 例,女性 22 例,2 组人员均晨起空腹抽取外周静脉血。组织标本离体 10min 内取材,液氮速冻 5 min 后放置 -70℃ 保存。血清标本,3 000×g 离心 5~10 min,取上层血清, -80℃ 低温冰箱冻存或立即抽取 DNA。

## 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(TaKaRa 热启动酶系统),离心柱型临床组织基因组 DNA 提取试剂盒(购自上海闪晶生物公司),离心柱型临床血液基因组 DNA 提取试剂盒(上海闪晶生物公司);琼脂糖(Amresco 公司),EZ DNA Methylation-Gold Kit™(美国 ZYMO RESEARCH 公司)。

1.2.2 主要仪器:德国 Biometra 温度梯度 PCR 扩增仪,ECPS3000/150 电泳仪,BECKMAN Al-legra™ 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

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。收集到管内的核酸溶液,紫外分光光度计测定 DNA 含量,要求吸光度  $A_{260nm}/A_{280nm} \geq 1.8$ ,4℃ 保存备用。

1.3.2 引物设计与合成:根据 GenBank 设计相关

引物甲基化引物,由上海生工公司设计合成,引物序列见表 1。

表 1		7 种基因甲基化引物	
基 因		P 引物序列 e(5'-3')	
APC	U	F	GTGTTTATTGTGGAGTGTGGGT
		R	CCAATCAACAACTCCCAACAA
	M	F	TATTGCGGAGTGC GGCTC
		R	TCGACGAACCCCGACGA
WIF-1	U	F	GGGTGTTTATTGGGTGTATTGT
		R	AAAAAACTAACACAACAAATACAAAC
	M	F	CGTTTATTGGGCGTATCGT
		R	ACTAACGCGAACGAAATACGA
RUNX3	U	F	TTATGAGGGGTGGTTGTATGTGGG
		R	AAAACAACCAACACAACACCTCC
	M	F	TTACGAGGGCGGTGCTACGCGGG
		R	AAAACGACCGACGCGAACGCTCC
DLC-1	U	F	AAACCAACAAAAAACCCTAACA
		R	TTTTTTAAAGATTGAAATGAGGGAGTG
	M	F	CCCAACGAAAAAACCCTAACA
		R	TTTAAAGATCGAAACGACGACGG
SFRP-1	U	F	GAGTTAGTGTGTGTGTTGTTGTTTGT
		R	CCCAACATTACCACTCCACAACCA
	M	F	GTGTCGCGGTTCGTCGTTTCGC
		R	AACGTTACCGACTCCGCGACCG
DKK-3	U	F	TTAGGGTGGGTGGTGGGT
		R	CTACATCTCCACTCTACACCA
	M	F	GGGCGGGCGGGGGGGC
		R	ACATCTCCGCTCTACGCCCC
E-cad	U	F	TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT
		R	CCACCCAATACTAAATCACAACA
	M	F	TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT
		R	TAACTAAAAATTCACCTACCGAC

注:M. 甲基化;U. 未甲基化;F. 前导链;R. 后导链。

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。

1.3.4 幽门螺杆菌感染检测:幽门螺杆菌感染由血清幽门螺杆菌免疫球蛋白 G 抗体试验(PBM, 普林斯顿, 美国)和快速尿素酶试验(福建三强生物化工有限公司, 三明, 中国)检测。血清幽门螺杆菌免疫球蛋白 G 抗体试验和快速尿素酶试验的灵敏度  $\geq 90\%$  的幽门螺杆菌培养检测<sup>[7]</sup>。

1.3.5 所有病例术后进行了两年随访,最后一次随访是在 2010 年 9 月 12 日。患者术前未接受化疗。中位随访期是 17.5 个月(范围:8~28 个月)。患者均给予体格检查、腹部超声、胸部 X 射线检查,收集血清,并进行相关肿瘤标志物检测。在第一年,对局部复发和远处转移,每 3 个月用 CT/或

MRI 成像进行了监测。在 75 例患者中, 13 例 (17.33%) 死于肿瘤相关的原因。17 例 (22.67%) 出现胃癌复发, 14 例 (18.67%) 出现胃癌转移。62 例患者在最后一次随访时仍存活。

1.4 统计学分析 本资料采用 SPSS 13.0 统计软件, 计数资料用百分数表示, 采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 临床相关资料 肿瘤大小平均为 3.8 cm (范围 2.5~9.6 cm)。据 Edmondson-Steiner 分期, 分类为 I 期 6 例, II 期 22 例, III 期 40 例, IV 期 7 例。根据美国癌症联合委员会 (AJCC) (格林, 佛罗里达州等, 2002 年) 第 6 版 TNM 分期, I 期 24 例, II 期 31 例, III 期 20 例。

分析了 75 例肿瘤病人以及健康对照组相关标本 7 种基因 APC, WIF-1, RUNX-3, DLC-1, SFRP-1, DKK-3 和 E-cad 启动子甲基化状况。结果显示: 对照组均未发现相关基因启动子的甲基化改变, 75 例病人中有 69 例出现一个甚至多个基因的甲基化改变, 胃癌组织和相关血液中相关基因甲基化频率均超过 15%, 其中 APC 在胃癌组织为 48%, 在血清为 30.67%; WIF-1 在胃癌组织为 57.33%, 在血清为 34.67%; RUNX-3 在胃癌组织为 56%, 在血清为 37.33%; DLC-1 在胃癌组织为 50.67%, 在血清为 29.33%; SFRP-1 在胃癌组织为 52%, 在血清为 33.33%; DKK-3 在胃癌组织为 54.67%, 在血清为 32%; E-cad 在胃癌组织为 48%, 在血清为 26.67%。按照相关研究标准<sup>[8]</sup>, 75 例相关胃癌样本被分为 CIMP+ ( $\geq 3$  甲基化基因) 或 CIMP- (两个或更少的甲基化基因)。在本研究中, 由于临界值为 3, 肿瘤组织中的甲基化基因数平均为 3.6, 而血清中的甲基化基因数为 2。肿瘤组织样本中, 47 例 (62.67%) 样本被划分为 CIMP+, 28 例 (37.33%) 被划分为 CIMP-。血清样本中, 44 例 (58.67%) 被划分为 CIMP+, 31 例 (41.33%) 被划分为 CIMP-。非肿瘤组织和健康对照组血清均为 CIMP-。

2.2 胃癌中幽门螺杆菌感染及相关资料 经检测发现 75 例胃癌样本中有 51 例 (68%) 幽门螺杆菌感染阳性, 24 例 (32%) 未感染。在 51 例幽门螺杆菌阳性胃癌组织中, 发现 36 例 CIMP+ 和 15 例 CIMP-。而 24 例未感染胃癌组织中 11 例 CIMP+, 13 例 CIMP-。幽门螺杆菌阳性组和阴性组 CIMP 表达差异有统计学显著性意义 ( $\chi^2 = 4.27$ ,  $P < 0.05$ ), 51 例幽门螺杆菌阳性血清样本中, 34 例 CIMP+ 和 17 例 CIMP-; 24 例未感染血清样本中, 10 例 CIMP+, 14 例 CIMP-。两组间差异

有统计学显著性意义 ( $\chi^2 = 4.21$ ,  $P < 0.05$ )。

## 2.3 CIMP 在幽门螺杆菌感染的胃癌预后中价值

经过两年随访, 有 3 例 HP+/CIMP+ 病人失访; 31 例 HP+/CIMP+ 病人中, 有 9 例出现了转移, 10 例出现了复发, 7 例死亡; 17 例 HP+/CIMP- 病人中, 有 2 例发生了转移, 3 例出现了复发, 2 例死亡; 发现 HP+/CIMP+ 和 HP+/CIMP- 两组转移率明显不同, HP+/CIMP+ 病人有转移倾向 ( $\chi^2 = 3.593$ ,  $P < 0.05$ ); HP+/CIMP+ 组复发率明显高于 HP+/CIMP- 组 ( $\chi^2 = 2.369$ ,  $P < 0.05$ ); 生存率二者未见明显不同 ( $\chi^2 = 1.043$ ,  $P > 0.05$ )。

3 讨论 近年来, 表观遗传改变已被认为是肿瘤发生的重要早期事件<sup>[9]</sup>。富含 CpG 岛的 DNA 启动子区异常甲基化是表观遗传沉默的关键环节。异常基因表达可能是肿瘤的早期事件, 是肿瘤早期发现的潜在生物标志物<sup>[10]</sup>。研究证实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<sup>[11]</sup>。也有研究认为基因甲基化检测在胃癌早期诊断中的价值很高, 特异度高, 是一种有效的诊断方式, 在患者的临床诊断方面拥有广阔的治疗前景<sup>[12]</sup>。

研究发现, 幽门螺杆菌感染的胃黏膜活检标本中 DNA 异常甲基化是胃癌高发的危险因素<sup>[13]</sup>, 血液中白细胞的重叠元件低甲基化与恶性胃黏膜病变以及胃癌进展相联系<sup>[13]</sup>。近年来, 术语“CIMP”已被用于各种胃癌表观研究中。近年来幽门螺杆菌感染与多基因甲基化的关系已有了一些探讨, 但很少有人关注 CIMP 与幽门螺杆菌与胃癌的关联或血清中 CIMP 与胃癌中幽门螺杆菌之间存在的关联。本研究中我们收集了胃癌病人的组织和血清以及健康对照的相关组织和血清并进行了 7 个肿瘤相关基因 (APC, WIF-1, RUNX-3, DLC-1, SFRP-1, DKK-3 和 E-cad) CIMP 状态的检测。我们发现对照组均未发现相关基因启动子的甲基化改变, 胃癌组织和血清中相关基因甲基化频率均超过 15%, 也许多基因甲基化状态改变可能对胃癌的早期诊断具有一定帮助。我们还发现血清中 DNA 启动子区甲基化对肿瘤相关基因是高度特异的, 并且与肿瘤组织结果是相似的。我们检测了 75 例胃癌样本中的 CIMP 状态, 发现组织与血清具有很好的一致性。

75 例胃癌样本中有 51 例 (68%) 幽门螺杆菌感染阳性, 24 例 (32%) 未感染。胃癌中幽门螺杆菌是很普遍的, 这表明预防和治疗胃癌根除幽门螺杆菌感染可能是必要的。CIMP 状况在肿瘤预后中的价值已在多种肿瘤中进行了论证, 食管腺癌

中,CIMP与预后不良相关<sup>[15]</sup>。幽门螺杆菌也是胃癌预后的一个因素,我们研究发现 CIMP 与幽门螺杆菌之间存在关联。幽门螺杆菌还可引起宿主 DNA 损伤并改变 DNA 甲基化干扰下游信号<sup>[16]</sup>。

经过两年随访,发现 HP+/CIMP+和 HP+/CIMP-两组转移率明显不同,HP+/CIMP+病人有转移倾向( $P<0.05$ );复发率 HP+/CIMP+组明显高于 HP+/CIMP-组( $P<0.05$ );生存率二者未见明显不同( $P>0.05$ )。因此,异常的 DNA 甲基化可能与慢性炎症有关。多重的调控暗示 DNA 甲基化是在宿主对幽门螺杆菌感染的反应中扮演了一个重要角色。幽门螺杆菌通过降低 DNA 修复基因的表达促进遗传不稳定性<sup>[17]</sup>。经过两年随访后,我们发现 HP+/CIMP+与胃癌病人的转移和复发相关,与生存关系不大。提示 HP+/CIMP+参与了胃癌的发生发展过程,与生存无关也许是因为随访时间太短,结果有待进一步验证。

总之,我们研究发现胃癌患者血清 DNA 启动子区异常甲基化是具有很高的特异性的,并且与组织具有很好的一致性。因此血清中 CIMP 检测具有和组织中相似的结果,可以很好解决标本来源受限的相关病人的检测,并为预后的研究提供便利,解决临床实际标本困难。因而血清中 CIMP 检测是一个稳定的有用的胃癌预后监测指标。本研究由于研究病例相对较少,肿瘤相关基因也少,因而相关结果有待大样本证实。由于随访时间较短,仅仅两年,可能相关结论有些偏差,需要大样本长期随访进一步验证。

#### 参考文献:

- [1] Hohenberger P, Gretscher S. Gastric cancer[J]. Lancet. 2003,362(9380):305-315.
- [2] An C, Choi IS, Yao JC, et al. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma[J]. Clin Cancer Res. 2005,11(2):656-663.
- [3] Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, et al. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype[J]. Cancer Res. 1999,59(21):5438-5442.
- [4] Wang YC, Yu ZH, Liu C, et al. Detection of RASSF1A promoter hypermethylation in serum from gastric and colorectal adenocarcinoma patients[J]. World J Gastroenterol. 2008,14(19):3074-3080.
- [5] Shin CM, Kim N, Jung Y, et al. Role of *Helicobacter pylori* infection in aberrant DNA methylation along multistep gastric carcinogenesis[J]. Cancer Sci. 2010,101(6):1337-1346.
- [6] Nakajima T, Yamashita S, Maekita T, et al. The presence of a methylation fingerprint of *Helicobacter pylori* infection in human gastric mucosae[J]. Int J Cancer. 2009,124(4):905-910.
- [7] Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, et al. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk[J]. Clin Cancer Res. 2006,12(3pt1):989-995.
- [8] Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer[J]. Nat Genet. 2006,38(7):787-793.
- [9] Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer[J]. Nat Rev Genet. 2006,7(1):21-33.
- [10] Zhou X, Popescu NC, Klein G, et al. The interferon-alpha responsive gene TMEM7 suppresses cell proliferation and is downregulated in human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Genet Cytogenet. 2007,177(1):6-15.
- [11] 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.
- [12] 李 颖, 易 默, 何小勤. Reprimo 和 hMLH1 基因甲基化在胃癌早期诊断价值的研究[J]. 现代检验医学杂志. 2015,30(3):53-55,59.  
Li Y, Yi M, He XQ. Research on reprimo, hMLH1 gene methylation in early diagnosis value of gastric cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine. 2015,30(3):53-55,59.
- [13] Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, et al. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells[J]. Cancer Res. 2010,70(4):1430-1440.
- [14] Chen D, Zhang XR, Zhang Y, et al. Hypomethylation of repetitive elements in blood leukocyte DNA and risk of gastric lesions in a Chinese population[J]. Cancer Epidemiol. 2016(41):122-128.
- [15] Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, et al. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma[J]. Cancer Res. 2001,61(8):3410-3418.
- [16] Servetas SL, Bridge DR, Merrell DS. Molecular mechanisms of gastric cancer initiation and progression by *Helicobacter pylori*[J]. Curr Opin Infect Dis. 2016,29(3):304-310.
- [17] Sepulveda AR, Yao Y, Yan W, et al. CpG methylation and reduced expression of O6-methylguanine DNA methyltransferase is associated with *Helicobacter pylori* infection[J]. Gastroenterology. 2010,138(5):1836-1844.

收稿日期:2016-06-09  
修回日期:2016-11-09