

# 宫颈癌患者血浆中 E- 钙黏着蛋白基因 启动子区的甲基化状态

任晨春<sup>1,2</sup> 苗绪红<sup>2</sup> 杨 斌<sup>2</sup> 赵 磊<sup>2</sup> 孙 蕊<sup>2</sup> 宋文芹<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>天津市中心妇产科医院遗传室, 天津 300052; <sup>2</sup>南开大学生命科学学院, 天津 300071)

**摘要** 肿瘤细胞可以释放 DNA 进入患者的血浆/血清中, 并可作为无创伤性诊断肿瘤的标记物。采用甲基化特异性聚合酶链式反应(MS-PCR)结合亚硫酸盐测序法对 151 例宫颈癌患者血浆和对应的 30 例组织中 E- 钙黏着蛋白基因启动子区甲基化状态进行检测, 并与化学发光法检测患者血清的鳞状上皮癌抗原(SCC)相比较, 发现此方法的灵敏度为 40.39%, 特异性为 100%, 正确性为 49.72%, 血浆和组织的符合率为 76.67%。宫颈炎、子宫肌瘤和正常人的血浆中均未检测到甲基化状态的存在。随着临床分期和组织学分级的增加, E- 钙黏着蛋白基因甲基化的检出率也在逐渐增加, 与 SCC 结果相比, MS-PCR 方法在早期和恶性度高的宫颈癌中的诊断效果良好。使用 E- 钙黏着蛋白基因作为分子标记可以对宫颈癌患者进行无创伤性早期诊断和预后的评估。

**关键词** 宫颈癌; 甲基化状态; E- 钙黏着蛋白基因; 血浆

据统计, 全世界每年都有 371 000 例新增宫颈癌病例发生, 占女性所有恶性肿瘤的 16%<sup>[1]</sup>。在发展中国家, 宫颈癌的发生率仅次于乳腺癌而占女性恶性肿瘤的第二位<sup>[2,3]</sup>, 严重威胁妇女的健康。对宫颈癌的血清学诊断方法主要为检测鳞状上皮癌抗原(squamous cell carcinoma, SCC), 但该方法的敏感性不高, 一般到晚期才可发现。对宫颈癌确诊的方法主要是取宫颈病变组织活检, 再进行病理学诊断, 该方法为创伤性的, 且大部分患者已到晚期, 错过了诊疗的最佳时机。所以对宫颈癌患者的无创伤性早期诊断方法的研究一直是妇科肿瘤学家关注的热点之一。

1996 年, Boland 等<sup>[4]</sup>发现从肿瘤患者的血浆、血清及尿中可以检测到肿瘤的 DNA, 这为肿瘤的无创伤性诊断奠定了良好的基础。之后, 有研究报道在结肠癌<sup>[5]</sup>和肝癌<sup>[6]</sup>等患者血浆/血清中检测到了抑癌基因 p16(周期依赖性激酶抑制因子)启动子区存在高甲基化状态。Yang 等<sup>[7]</sup>对宫颈癌患者血浆进行相关基因启动子区的甲基化研究, 发现血浆中存在 p16, 死亡相关蛋白激酶(death-associated protein kinase, DAPK)和 O<sup>6</sup>- 甲基鸟氨酸 DNA 甲基化转移酶(O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)基因的高甲基化状态。我们采用甲基化特异性聚合酶链式反应(methylation specific polymerase chain

reaction, MS-PCR)结合亚硫酸盐测序对 E- 钙黏着蛋白基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态进行研究, 并与对应的组织样本相比较, 以提出诊断宫颈癌的新的分子标记。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选取 2004 年 1 月至 2005 年 8 月在天津市中心妇产科医院确诊的宫颈癌患者 151 名为研究对象, 平均年龄 44.84 岁(26~72 岁)。所有的病人于治疗前取静脉血。其中 30 名患者取宫颈癌活检组织。病理类型均为鳞癌。组织学分级(G)依 WHO 标准, 分别为 G1 级 40 例, G2 级 60 例, G3 级 51 例。临床分期依 FIGO(1995)标准, 分别为 I 期 31 例, II 期 37 例, III 期 82 例, IV 期 1 例。同时选取 60 名慢性宫颈炎患者和 35 名子宫肌瘤患者的血浆作为研究对象。另选 30 例正常宫颈组织及 30 例健康人的血浆作为对照。

### 1.2 SCC 的检测

取 2 ml 静脉血, 置于不含任何抗凝剂的空管中, 室温下 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层血

收稿日期: 2005-12-29 接受日期: 2006-06-07

\* 通讯作者。Tel: 022-23508241, Fax: 022-23508241, E-mail:

rccxq@yahoo.com.cn

清于 1.5 ml 的 eppendorf 管中, 采用化学发光的方法在全自动快速免疫分析系统中(雅培 IMX, 北京)进行检测。以 SCC 值 = 1.5 ng/ml 为阳性切割值。SCC 值 > 1.5 ng/ml 判定为阳性。

### 1.3 DNA 的提取

取 2 ml 静脉血, 枸橼酸钠抗凝。室温下 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层血浆于 1.5 ml 的 eppendorf 管中, 10 000 r/min 离心 10 min, 吸取血浆, -20 °C 保存待检。血浆 DNA 的提取依照 Wizard® 纯化试剂盒(Promega)的步骤进行。

组织 DNA 的提取依据传统蛋白酶 K 消化, Tris 饱和酚/氯仿抽提及乙醇沉淀的步骤进行。 $A_{260}/A_{280}$  在 1.6~2.0 之间。

### 1.4 DNA 亚硫酸氢盐修饰

取 1 µg 的基因组 DNA 溶于 50 µl 的双蒸水中稀释。稀释的基因组 DNA 或 50 µl 血浆 DNA 在 37 °C 的 0.3 mol/L NaOH 中变性 10 min。分别加入新鲜配制的 10 µmol/L 对苯二酚和 3 mol/L 亚硫酸氢钠(pH 5.0, 上海生工提供), 于 50 °C 温育 16 h。采用 SBS 公司的纯化试剂盒纯化脱盐。在 0.3 mol/L NaOH 中 55 °C 温育 15 min 后用乙醇沉淀。最后溶于 20 µl 的双蒸水中立即使用或于 -70 °C 保存待检。

### 1.5 PCR

扩增反应体系中包含 5 µl 的模板 DNA, E- 钙黏着蛋白基因的非甲基化引物为 Eu: 5'-TAA TTT TAG GTT AGA GGG TTA TTG T-3'(有义链), 和 5'-CAC AAC CAA TCA ACA ACA CA-3'(无义链); E- 钙黏着蛋白基因的甲基化引物为 Em: 5'-TTA GGT TAG AGG GTT ATC GCG T-3'(有义链), 和 5'-TAA CTA AAA ATT CAC CTA CCG AC-3'(无义链)<sup>[7]</sup>, 由上海生工合成。PCR 反应条件为 95 °C 5 min, 然后 95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s 做 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。采用热启动, 2 U Taq 酶。所有 PCR 反应在 Eppendorf Mastercycler 中进行。

取 9 µl 的扩增产物经 2% 含有溴乙锭的琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果, 在 Genius 凝胶成像系统(Syngene)下观察并照相, 扩增片段为 74 bp。

### 1.6 克隆并测序

对 Em 引物扩增阳性的病例电泳后, 切胶, 用 SBS 的 DNA 纯化试剂盒纯化 PCR 产物, 乙醇沉淀后连接 pUCm-T 载体并克隆到 *E. coli* DH5α 感受态细胞。上海生工公司测序。测序结果与基因组 DNA 进行比对。

### 1.7 统计处理

用 SPSS11.5C SPSS In C., Chicago, IL 统计软件包进行统计分析。各组间采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 组织中 E- 钙黏着蛋白基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态

用 Em 引物扩增 30 例正常宫颈鳞状上皮未见阳性片段, 30 例宫颈癌组织中有 18 例扩增出 116 bp 的阳性片段, 检出率为 60.0%(18/30)。正常宫颈组织与宫颈癌组织间存在显著性差异( $\chi^2=25.714$ ,  $P < 0.05$ )。用 Eu 引物检测发现, 30 例正常宫颈鳞状上皮均发现有阳性片段, 在 30 例宫颈癌组织中, 有 12 例发现阳性片段, 且均为 Em 扩增阴性的样本, 正常宫颈组织与宫颈癌组织间存在显著性差异( $P < 0.05$ ), 见图 1。

### 2.2 血浆中 E- 钙黏着蛋白基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态

用 Em 引物扩增的 30 例健康人血浆, 未见有阳性片段。151 例宫颈癌患者血浆中有 60 例扩增出了阳性片段, 检出率为 40.39% (60/151)。健康人血浆与宫颈癌患者血浆间存在显著性差异( $\chi^2=17.832$ ,  $P < 0.05$ )。用 Eu 引物检测发现, 30 例健康人血浆均发现阳性片段, 而 151 例宫颈癌患者血浆中 91 例

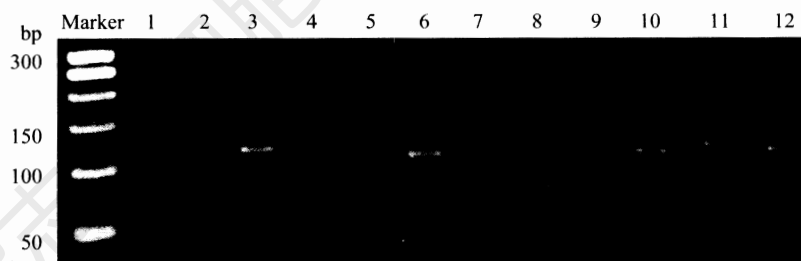


图1 用 MS-PCP 分析组织中 E- 钙黏着蛋白基因甲基化状态

1: Em 的阴性对照; 2: Eu 的阴性对照; 3: 病例 2 的 Em 结果; 4: 病例 2 的 Eu 结果; 5: 病例 8 的 Em 结果; 6: 病例 8 的 Eu 结果; 7: 病例 11 的 Em 结果; 8: 病例 11 的 Eu 结果; 9: 病例 12 的 Em 结果; 10: 病例 12 的 Eu 结果; 11: Em 的阳性对照; 12: Eu 的阳性对照。

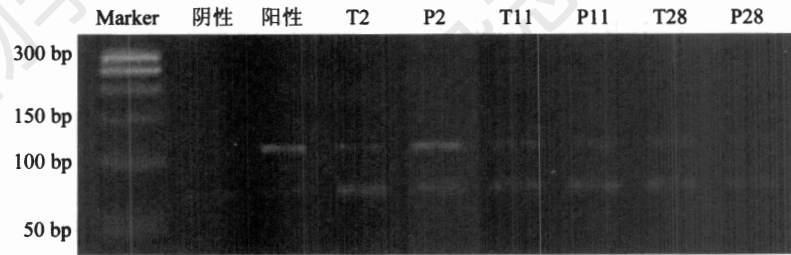


图2 组织与血浆中E-黏着蛋白基因甲基化状况的对比

T2: 病例2的组织结果; P2: 病例2的血浆结果; T11: 病例11的组织结果; P11: 病例11的血浆结果; T28: 病例28的组织结果; P28: 病例28的血浆结果。

1. CCA GGC TAG AGG GTC ACC GCG TC-TAT GCG AGG CCG GGT  
2. TTA GGT TAG AGG GTT ATC GCG TT-TAT GCG AGG TCG GGT  
3. TTA GGT TAG AGG GTT ATC GCG TT-TAT GCG AGG TCG GGT

1. GGG CGG GCC GTC AGC TCC GCC CTG GGG AGG GGT CCG  
2. GGG CCG GTC GTT AGT TTC GTT TTG GGG AGG GGT TCG  
3. GGG CCG GTC GTT AGT TTC GTT TTG GGG AGG GGT TCG

1. CGC TGC TG-ATT GGC TGT GGC CGG CAG GTG AAC CCT CAG CCA  
2. CGT TGT TG-ATT GGT TGT GGT CCG TAG GTG AAT TTT TAG TTA  
3. CGT TGT TG-ATT GGT TGT GGT CCG TAG GTG AAT TTT TAG TTA

图3 Em 阳性组织及对应血浆样本的测序结果

1: 基因组序列; 2: 亚硫酸氢钠修饰后的肿瘤组织序列; 3: 亚硫酸氢钠修饰后的与肿瘤组织对应的血浆样本序列。2与3测序结果完全一致, 基因组中未发生甲基化的C均转变为了T。

检测到阳性片段, 且均为Em扩增阴性的样本, 健康人血浆与宫颈癌患者血浆间存在显著性差异( $\chi^2=17.832$ ,  $P<0.05$ )。应用此方法检测宫颈癌患者的血浆的灵敏度为40.39%(60/151), 特异性为100%(30/30), 正确性为49.72%(90/181)。

在这151例血浆样本中, 有30例患者活检取宫颈癌组织进行对比, 发现组织是阳性的病例中, 血浆也为阳性的检出率为61.11%(11/18), 见图2。组织是阴性的病例中, 血浆中无1例出现阳性片段。组织与血浆的总体符合率为76.67%(23/30)。

用Em引物扩增60例慢性宫颈炎患者的血浆, 没有一例发现阳性片段; 而用Eu引物扩增, 均发现阳性片段。同样, 用Em引物扩增35例子宫颈癌患者的血浆, 也未发现一例有阳性片段; 用Eu引物扩增, 均发现阳性片段。这两组与对照组之间均无显著性差异( $P>0.05$ )。

### 2.3 测序结果

将组织及对应的血浆中用Em引物扩增为阳性的所有样本均进行测序, 并将所得的E-钙黏着蛋白基因5'端CpG岛DNA产物序列与基因组DNA相比, 结果发现在Em阳性标本中10个CG岛中的C没有转变成T, 说明该CG岛发生了甲基化(图3)。

表1 两种方法对不同临床分期病人血浆的检测

| 临床分期 | MS-PCR        | SCC           | $\chi^2$ | P     |
|------|---------------|---------------|----------|-------|
| I    | 19.35%(6/31)  | 0%(0/31)      | 6.643    | <0.05 |
| II   | 35.14%(13/37) | 13.51%(5/37)  | 4.698    | <0.05 |
| III  | 48.78%(40/82) | 36.59%(30/82) | 2.492    | >0.05 |

表2 两种方法对不同组织分级的病人血浆的检测

| 组织分级 | MS-PCR        | SCC           | $\chi^2$ | P     |
|------|---------------|---------------|----------|-------|
| G1   | 7.5%(3/40)    | 0%(0/40)      | 3.117    | >0.05 |
| G2   | 36.67%(22/60) | 16.67%(10/60) | 6.136    | <0.05 |
| G3   | 68.63%(35/51) | 49.02%(25/51) | 4.048    | <0.05 |

### 2.4 MS-PCR技术与SCC检测结果的比较

用化学发光的方法检测宫颈癌患者的血清, 发现SCC的平均值为( $2.49 \pm 4.15$ ) ng/ml, 阳性率为23.18%(35/151), 而正常人的SCC值平均为( $1.03 \pm 2.18$ ) ng/ml, 无1例阳性, 两组间存在显著性差异( $\chi^2=8.621$ ,  $P<0.05$ )。用化学发光的方法的灵敏度为23.18%(35/151), 特异性为100%(30/30), 正确性为35.91%(65/181)。

对不同临床分期的患者, 采用MS-PCR方法检测E-钙黏着蛋白基因启动子区的甲基化状态与SCC的检测结果相比较, 我们发现随着临床分期的增加, 两种方法的检出率均有增高的趋势。对临床I、II期, 两组的检出率存在显著性差异(I期 $\chi^2=6.643$ , II期 $\chi^2=4.698$ ,  $P<0.05$ ), 说明对I、II期宫颈癌的检测中, MS-PCR方法的检出率明显高于SCC方法。而对临床III期, 两组的检出率无差异( $\chi^2=2.492$ ,  $P>0.05$ ), 说明对于临床III期的检测两种方法的效果是一样的(表1)。

对于不同组织学分级的患者, 采用MS-PCR方法检测E-钙黏着蛋白基因启动子区的甲基化状态与SCC检测结果相比较, 发现随组织学分级的增加, 两种方法的检出率均有增加。但两组在G1级的检测中无显著性差异( $\chi^2=3.117$ ,  $P>0.05$ )。而对于G2和G3级的检测, 两种方法存在显著性差异(G2级

$\chi^2=6.136$ , G3 级  $\chi^2=4.048$ ,  $P<0.05$ ), 说明对 G1 级的检测, 两种方法无区别, 而对于 G2、G3 级的检测, MSP 方法优于 SCC(表 2)。

### 3 讨论

宫颈癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一, 死亡率居女性癌症死亡率的第二位<sup>[8]</sup>。现公认它的发生与 HPV 病毒的感染有关<sup>[9~11]</sup>。然而大多数有 HPV 感染的病人如宫颈上皮肉瘤样增生(cervical intraepithelial neoplasm, CIN)病情长期保持稳定<sup>[12]</sup>, 所以目前认为宫颈癌是多种遗传因素包括表观遗传因素共同作用的结果。在肿瘤表观遗传学中, DNA 的启动子区的甲基化是普遍存在的现象, 尤其抑癌基因甲基化可以引起基因的失活, 导致肿瘤的发生。E- 钙黏着蛋白基因是一种重要的肿瘤抑制基因, 它与肿瘤的侵袭和转移有密切的联系。有研究表明在鳞状上皮癌中存在 E- 钙黏着蛋白基因启动子区高甲基化状态<sup>[13]</sup>。宫颈癌的主要病理类型就是鳞状上皮癌, 所以 E- 钙黏着蛋白基因在宫颈癌发生中起重要的作用。Chen<sup>[14]</sup>等的研究报道也证实在宫颈癌的细胞系和肿瘤组织中存在由于 E- 钙黏着蛋白基因高甲基化而引起的蛋白质表达沉默。

从肿瘤患者血浆中检测抑癌基因启动子区的甲基化状态为无创伤性检验肿瘤抑癌基因的表观遗传状态进而疾病的诊断开辟了新的途径。以 MS-PCR 为基础结合亚硫酸氢盐测序使检测结果更加准确。MS-PCR 方法的原理是 DNA 经亚硫酸氢钠处理后, 非甲基化的胞嘧啶变为尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶保持不变。该方法的优点是快速, 只需极少量的 DNA 用于分析, 而且敏感性高, 在 1 000 个非甲基化的拷贝中有 1 个甲基化拷贝就可以检测出来<sup>[15]</sup>。本实验中该方法的灵敏度达到 40.39%, 明显高于化学发光法检测 SCC 的灵敏度(23.18%)。同时在对照的 30 例正常人以及 60 例慢性宫颈炎和 35 例子宫肌瘤患者的血浆中没有发现 1 例有甲基化发生, 说明在健康人和患有慢性宫颈炎及子宫良性肿瘤的病人中 E- 钙黏着蛋白基因启动子区未发生甲基化, 故该

方法对宫颈癌的诊断具有特异性。在本研究中, 我们还对经 Em 扩增呈阳性的宫颈癌组织及对应的血浆样本进行克隆和测序, 经与亚硫酸氢钠修饰后的基因组序列进行比对发现了 10 个 CG 岛均发生了甲基化, 而且血浆的结果与组织结果完全一致, 说明以血浆为样本检测 E- 钙黏着蛋白基因启动子区的甲基化状态对宫颈癌进行诊断是切实可行的。

本研究中, 对宫颈癌患者用 MS-PCR 方法检测血浆中 E- 钙黏着蛋白基因的甲基化状态与用化学发光的方法检测血清中的 SCC 进行的比较, 还发现随着临床分期的增加, 两种方法的阳性率均显著提高, 但是对于 I、II 期患者, 采用 MS-PCR 方法检验的阳性率明显高于用 SCC 方法的检出率, 说明 MS-PCR 方法对早期的宫颈癌的诊断效果良好。在不同组织分级时, 两种检测结果表明在 G1 期是无差别的, 而在 G2、G3 期, 用 MS-PCR 方法的阳性率显著高于用 SCC 方法的检测结果, 说明对恶性程度高的样本, MS-PCR 方法优于 SCC 方法。

总之, 用 MS-PCR 方法检测患者血浆中 E- 钙黏着蛋白基因启动子区的甲基化状态对早期辅助诊断宫颈癌以及判断治疗效果均具有重要的意义, E- 钙黏着蛋白基因启动子区的甲基化状态作为一种新的分子标记在宫颈癌的诊治中必将发挥重要作用。

### 参考文献 (References)

- [1] Parkin DM *et al.* *Int J Cancer*, 1993, **54**: 594
- [2] Parkin DM *et al.* *Int J Cancer*, 1999, **80**: 827
- [3] Sankaranarayanan R *et al.* *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2006, **20**: 207
- [4] Boland CR. *Nat Med*, 1996, **2**: 972
- [5] Zou HZ *et al.* *Clin Cancer Res*, 2002, **8**: 188
- [6] Wong IH *et al.* *Cancer Res*, 1999, **59**: 71
- [7] Yang HJ *et al.* *Gynecol Oncol*, 2004, **93**: 435
- [8] Chen CL *et al.* *Eur J Cancer*, 2003, **39**: 517
- [9] Rydstrom C *et al.* *Scand J Public Health*, 2006, **34**: 295
- [10] Waggoner SE. *Lancet*, 2003, **361**: 2217
- [11] Walboomers JM *et al.* *J Pathol*, 1999, **189**: 12
- [12] Schiffman MH *et al.* *J Natl Cancer Inst*, 2003, **95**: E2
- [13] Holowaty P *et al.* *J Natl Cancer Inst*, 1999, **91**: 252
- [14] Chen Q *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **315**: 850
- [15] Herman JG *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 9821

## The Promoter Methylation Status of E-cadherin Gene in Plasma Cervical Cancer Patients

Chen-Chun Ren<sup>1,2</sup>, Xu-Hong Miao<sup>2</sup>, Bin Yang<sup>2</sup>, Lei Zhao<sup>2</sup>, Rui Sun<sup>2</sup>, Wen-Qin Song<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Genetics, the Central Hospital of Gynecology and Obstetric, Tianjin 300052, China;

<sup>2</sup>College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract** Recent evidence suggests that tumor cells may release DNA into the serum and plasma of cancer patients and it can be used as a non-invasive marker for diagnosing cancer. In this study we examine the promoter methylation status of E-cadherin gene in 151 pretreatment plasma samples and 30 paired tumor tissue samples from cervical cancer patients using methylated specific polymerases chain reaction (MS-PCR). and sequencing. At the same time, chemical luminal immune assay (CLIA) was used to detect the squamous cell carcinoma (SCC) in plasma of cervical cancers. The results show that the sensitivity of the method is 40.39%, the specificity is 100% and the correct rate is 49.72%. The total concordant rate of methylation status between plasma samples and tissue samples was 76.67%. We could not find the methylation status in control groups. The higher of the clinical stage and histological grade is, the higher of the positive rate of methylation in E-cadherin gene in plasma samples. Compared with the results of SCC, MS-PCR is valuable in diagnosing cervical cancer in early stage and high grade. Using the E-cadherin gene as detecting marker we can diagnose and evaluate the effect of treatment to cervical cancers as soon as possible.

**Key words** cervical cancer; methylation status; E-cadherin gene; plasma

Received: December 29, 2005 Accepted: June 7, 2006

\*Corresponding author. Tel: 86-22-23508241, Fax: 86-22-23508241, E-mail: rccxqy@yahoo.com.cn