

·转化医学研究·

散发性结直肠癌患者血 RASSF2 和 sFRP1 启动子区甲基化检测

吕忠船 陈红兵 姜立新 郑海涛 胡金晨

【摘要】目的 检测散发性结直肠癌患者血清 RASSF2 和 sFRP1 启动子区甲基化情况, 从而为散发性结直肠癌的早期筛查提供参考。**方法** 使用甲基化特异性 PCR 检测 59 例散发性直结肠癌患者和 59 例健康对照血清 sFRP1 和 RASSF2 基因启动子区甲基化的情况, 并分析其与结直肠癌临床病理特征的关系。**结果** 59 例结直肠癌患者中 RASSF2 和 sFRP1 甲基化者分别为 16 例(27.1%)和 18 例(30.5%); 而 59 例健康对照无一例发现 RASSF2 或 sFRP1 基因甲基化, 差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。29 例(49.2%)结直肠癌患者有至少 1 个基因甲基化, 其甲基化率明显高于 RASSF2 和 sFRP1 单一基因甲基化率(均 $P<0.05$)。结直肠癌患者血清 RASSF2 和 sFRP1 基因甲基化率与结直肠癌临床病理特征均无明显关系(均 $P>0.05$)。**结论** 血清 RASSF2 和 sFRP1 基因启动子区甲基化水平在结直肠癌组织异常升高, 联合两基因的血清甲基化检测可为散发性结直肠癌的早期筛查提供参考。

【关键词】 结直肠肿瘤; RASSF2 基因; sFRP1 基因; DNA 甲基化

Detection of RASSF2 and sFRP1 promoter region methylation in sporadic colorectal cancer patients Lyu Zhongchuan, Chen Hongbing, Jiang Lixin, Zheng Haitao, Hu Jinchen. Department of Gastrointestinal Surgery, The Affiliated Yantai Yuhuangding Hospital, Qingdao University Medical College, Shandong Yantai 264000, China

Corresponding author: Chen Hongbing, Email: chb2087@sina.com

【Abstract】Objective To investigate the methylation in promoter region of RASSF2 and sFRP1 in sporadic colorectal cancer patients in order to provide screening method for early colorectal cancer. **Methods** The methylation in promoter region of RASSF2 and sFRP1 in serum samples of 59 sporadic colorectal cancer patients and 59 healthy volunteers was detected by methylation specific PCR. The association between clinicopathological features of sporadic colorectal cancer patients and methylation in promoter region of RASSF2 and sFRP1 was analyzed. **Results** The methylation rates of RASSF2 and sFRP1 gene in serum of 59 sporadic colorectal cancer patients were 27.1% and 30.5%, significantly higher than those in healthy volunteers(0%, both $P<0.01$). The methylation of RASSF2 or sFRP1 occurred in 29(49.2%) patients, which was significantly higher than the methylation rate of single gene($P<0.05$). No association was found between methylation ratio of RASSF2 and sFRP1 and clinicopathological features in sporadic colorectal cancer patients. **Conclusions** Methylation in promoter region of RASSF2 and sFRP1 is often detected in serum of colorectal cancer patients. The combination detection of methylation for the two genes may provide information for early screening of colorectal cancer.

【Key words】 Colorectal neoplasms; Gene, RASSF2; Gene, sFRP1; DNA methylation

肿瘤的早期诊断和早期治疗至关重要, 不断优化肿瘤的早期筛查条件成为近几年的研究热点。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2014.01.009

基金项目: 山东省自然科学基金(Y2008C135)

作者单位: 264000 山东烟台, 青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院胃肠外一科

通信作者: 陈红兵, Email: chb2087@sina.com

RASSF2 和 sFRP1 是近年来新发现的两个抑癌基因, 分别通过影响 RAS 和 WNT 信号通路而参与多个肿瘤的发生机制。研究表明, 结直肠癌的发生过程中可表现为抑癌基因启动子区域的甲基化, 且甲基化与抑癌基因功能性失活密切相关^[1]。本研究拟以甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 的方法分别检测散发性结直肠癌患者血清 sFRP1

和 RASSF2 基因启动子区甲基化的情况，并分析其与临床病理特征的关系，为进一步研究结直肠癌发生的分子机制提供理论参考。

资料与方法

一、研究对象

研究对象来自 2009 年 10 月至 2010 年 5 月青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院胃肠外一科的 59 例结直肠癌患者，其中男性 39 例，女性 20 例。所有患者均需经术前结肠镜活检及术后大病理确诊为直肠癌或结肠癌，并排除家族性结直肠癌。所有研究对象均登记年龄、性别、既往肠息肉良性病史、病变部位(术前结肠镜定位及术后大病理精确定位)、病理类型(术后大病理石蜡切片)、肿瘤分化级别(术后大病理石蜡切片)、病理 TNM 分期(术后大病理石蜡切片)、血清 CEA 水平(术前清晨空腹)及血清 CRP 水平(术前清晨空腹)。所有受试者于术前清晨空腹抽取静脉血 2 ml，收集于 EDTA 抗凝管。收集同期 59 名健康志愿者的血清标本作为对照。

二、DNA 的提取及甲基化修饰

使用 QIAamp Blood Midi Kit(Catalog No:51185) 进行全血提取全基因组 DNA。紫外分光光度计检测 DNA 含量和纯度(A_{260}/A_{280} 须大于 1.8)，琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。全基因组 DNA 的甲基化修饰使用 Active Motif Methyl Detector™ Bisulfite Modification 试剂盒来完成。取 130 μ l CT Conversion Reagent 放入 200 μ l EP 管，再加入 20 μ l DNA 样品，98℃ 10 min，64℃ 2.5 h，4℃ 贮存。将其加入使用 600 μ l M-Binding Buffer 处理后的 Zymo-Spin™ IC Column，12 000 r/min 离心 30 s，弃上层液；加入 100 μ l M-Wash Buffer，12 000 r/min 离心 30 s，弃上层液；加 200 μ l M-Desulph onation Buffer，室温放置 15 min，12 000 r/min 离心 30 s，弃上层液；加 200 μ l M-Wash Buffer，12 000 r/min 离心 30 s，弃上层液。取另一个 1.5 ml EP 管代替收集管，加入 10 μ l

M-Elution Buffer，12 000 r/min 离心 30 s。

三、甲基化特异性 PCR(MSP)

RASSF2 和 sFRP1 基因引物序列见表 1。50 μ l PCR 反应体系：5×定性 PCR buffer 10 μ l，10 pmol/ μ l 上下游引物各 1 μ l，10 mmol/L dNTPs 1 μ l，3 U/ μ l Taq 酶 1 μ l，DNA 2 μ l，ddH₂O 34 μ l。RASSF2 基因定性 PCR 反应条件：93℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 30 s，65℃(甲基化)或 64℃(非甲基化)退火 45 s，72℃ 延伸 45 s，共 40 个循环；72℃ 再延伸 7 min。sFRP1 基因定性 PCR 反应条件：93℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 30 s，退火温度 62℃(甲基化)或 63℃(非甲基化)退火 45 s，72℃ 延伸 45 s，共 40 个循环；72℃ 再延伸 7 min。取 5 μ l 扩增产物，加入 1 μ l 6×buffer，行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

四、统计学分析

使用 SPSS 16.0 软件进行统计分析，率的比较采用 χ^2 检验。

结 果

一、RASSF2 和 sFRP1 甲基化的检出情况

59 例结直肠癌患者中 RASSF2 甲基化 16 例(27.1%)，sFRP1 甲基化 18 例(30.5%)；而 59 例健康对照均无一例发现 RASSF2 和 sFRP1 基因甲基化，差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。29 例(49.2%) 结直肠癌患者有至少 1 个基因甲基化，其甲基化率明显高于 RASSF2 和 sFRP1 单一基因甲基化率(均 $P<0.05$)。RASSF2 基因和 sFRP1 基因的阳性甲基化结果图见图 1。

二、RASSF2 和 sFRP1 甲基化与结直肠癌临床病理特征的关系

血清 RASSF2 和 sFRP1 基因甲基化与结直肠癌患者临床病理特征均无关，见表 2。

讨 论

在结直肠癌和肝癌等肿瘤中，DNA 甲基化是

表 1 RASSF2 和 sFRP1 基因引物序列

基因	正义链	反义链	产物(bp)
RASSF2			
甲基化	5'-ATTCGCTCGTCTTTTACGCC-3'	5'-AAAAACCAACCACCCCCC-3'	108
非甲基化	5'-AATTCTGTGTTGTTAGTGG-3'	5'-AAAAACCAACAACCCCA-3'	108
sFRP1			
甲基化	5'-GTGTCGCCGCTCGTCGTTCG-3'	5'-AACGTTACCCGACTCCGCGACCG-3'	175
非甲基化	5'-GAGTTAGTGTGTTGTTGTTGTT-3'	5'-CCCAACATTACCCAACCTCCACAAACCA-3'	180

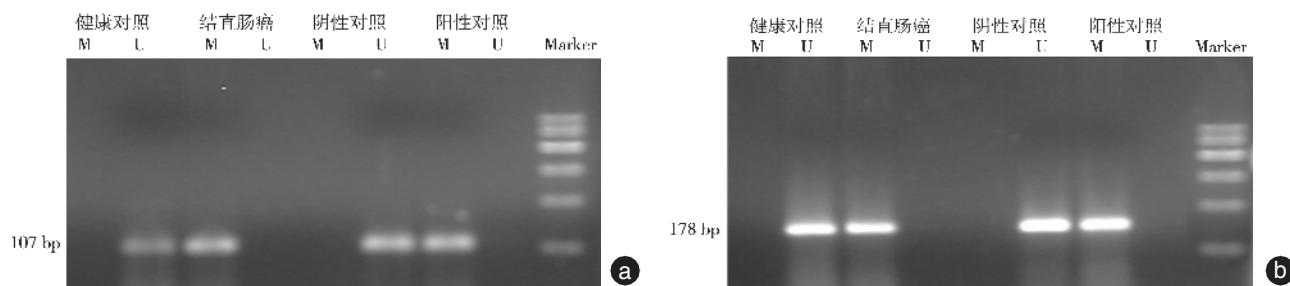


图 1 基因启动子区甲基化检测电泳图(M:甲基化;U:非甲基化) a.RASSF2 基因;b.sFRP1 基因

表 2 RASSF2 和 sFRP1 基因甲基化与结直肠癌临床病理特征的关系

临床特点	例数	RASSF2		χ^2 值	P 值	sFRP1		χ^2 值	P 值
		甲基化	非甲基化			甲基化	非甲基化		
性别				2.25	>0.05			0.43	>0.05
男	39	13(33.3)	26(66.7)			13(33.3)	26(66.7)		
女	20	3(15.0)	17(85.0)			5(25.0)	15(75.0)		
年龄(岁)				3.83	>0.05			0.08	>0.05
>60	22	9(40.9)	13(59.1)			6(27.3)	16(72.7)		
≤60	37	7(18.9)	30(81.1)			12(30.8)	25(69.2)		
肠息肉病史				0.52	>0.05			0.85	>0.05
有	15	3(20.0)	12(80.0)			6(40.0)	9(60.0)		
无	44	13(29.5)	31(70.5)			12(27.3)	32(72.7)		
病变部位				0.04	>0.05			0.49	>0.05
结肠	32	9(28.1)	23(71.9)			11(34.4)	21(65.6)		
直肠	27	7(25.9)	20(74.1)			7(25.9)	20(74.1)		
病理类型				0.66	>0.05			0.01	>0.05
腺癌	52	15(28.8)	37(71.2)			16(30.8)	36(69.2)		
鳞癌	7	1(14.3)	6(85.7)			2(28.6)	5(71.4)		
肿瘤分化				0.57	>0.05			2.70	>0.05
高	6	2(33.3)	4(66.7)			2(33.3)	4(66.7)		
中	38	11(28.9)	27(71.1)			9(23.7)	29(76.3)		
低	15	3(20.0)	12(80.0)			7(46.7)	8(53.3)		
T 分期				0.40	>0.05			0.13	>0.05
T ₁	6	1(16.7)	5(83.3)			2(33.3)	4(66.7)		
T ₂	10	3(30.0)	7(70.0)			3(30.0)	7(70.0)		
T ₃	22	6(27.3)	16(72.7)			7(31.8)	15(68.2)		
T ₄	21	6(28.6)	15(71.4)			6(28.6)	15(71.4)		
N 分期				0.75	>0.05			3.07	>0.05
N ₀	47	13(27.7)	34(72.3)			10(21.3)	37(78.7)		
N ₁	7	3(42.9)	4(57.1)			2(28.6)	5(71.4)		
N ₂	5	1(20.0)	4(80.0)			2(40.0)	3(60.0)		
M 分期				0.31	>0.05			2.39	>0.05
M ₀	49	14(28.6)	35(71.4)			17(34.7)	32(65.3)		
M ₁	10	2(20.0)	8(80.0)			1(10.0)	9(90.0)		
CEA(ng/ml)				0.44	>0.05			0.01	>0.05
>5	29	9(31.0)	20(69.0)			9(31.0)	20(69.0)		
≤5	30	7(23.3)	23(76.7)			9(30.0)	21(70.0)		
CRP(mg/L)				0.78	>0.05			0.00	>0.05
>10	39	12(30.8)	27(69.2)			12(30.8)	27(69.2)		
≤10	20	4(20.0)	16(80.0)			6(30.0)	14(70.0)		

一种重要的使 RNA 聚合酶Ⅱ转录的基因表达沉默的表观遗传学方式,DNA 甲基化可使 miRNA 表达失调^[2-3]。因此,异常的 DNA 甲基化,经常引起一些肿瘤抑制基因失活或正常情况下受到抑制的一些基因得到大量表达,导致肿瘤的发生^[1]。

RASSF2 是一种新发现的肿瘤抑制因子,作为 Ras 的负效应物以 GTP 依赖形式结合 Ras,抑制 Ras 的活化从而抑制肿瘤形成。它对细胞增殖的抑制作用主要依赖于细胞凋亡或细胞周期停滞^[4]。在结肠癌和肺癌等肿瘤组织和细胞中,RASSF2 表达量通常较高;而在正常的组织和细胞中,其表达量较低^[5-6]。在原代结肠癌细胞系中有 70% 的 RASSF2 基因启动子呈现甲基化,并且这种甲基化具有肿瘤特异性,比 RASSF 家族其他的成员启动子发生甲基化的频率更高^[7]。Nagasaki 等^[8]研究发现,57.1% 的结直肠癌患者粪便具有 RASSF2 或 sFRP2 至少 1 种基因启动子区出现甲基化。Lee 等^[9]研究发现,韩国结直肠患者血清 RASSF2A 启动子甲基化概率为 58%。Le Pessot 等^[10]研究指出,血清 RASSF2 甲基化可以提示结直肠癌患者预后不良。

sFRP1 是 Wnt 信号调节因子,其异常表达会干扰 Wnt-frizzled 信号传导通路^[11]。Wnt 信号通路调节控制着细胞的增殖、分化、极化、凋亡与抗凋亡等许多生命过程,该通路的异常激活与包括膀胱癌等多种肿瘤的发生密切相关^[12]。2007 年 Qi 等^[13]研究发现,结直肠癌组织 sFRP1 甲基化比率为 93.1%。翟国栋等^[14]研究发现,结直肠癌组织 sFRP1 基因甲基化率为 61.5%。上述结果均提示,sFRP1 基因启动子区甲基化是早期结直肠癌肿瘤常见的调控机制。

本结果显示,本组结直肠癌患者血清 RASSF2 和 sFRP1 甲基化率分别为 27.1% 和 30.5%,两者仅有其一项甲基化率为 49.2%,明显低于国外文献中报道的比率,且未发现其与临床病理特征有关。分析其主要原因可能在于血清和肿瘤组织含量存在差异性;另外,研究样本数量不等以及地域因素等都可能影响最终的数据。本实验结果也提示,单个基因的血清学甲基化检测效率并不高,需联合其他抑癌基因共同进行筛选。

本研究采用血清肿瘤抑癌基因 MSP 甲基化的检测,相较于有创的结肠镜检及昂贵的粪便标本甲基化检测,更为安全、经济,患者易于接受。同时联合两个不同作用通路上的肿瘤抑制基因甲基化的

检测可提高敏感性。血清 RASSF2 和 sFRP1 基因启动子区甲基化可能作为散发性结直肠癌发生发展的标记物,为早期诊断或预后评估提供了新思路。

参 考 文 献

- [1] 裴雷,夏加增,黄红宇,等. miR-124a 基因甲基化状态在人胃癌组织中的作用 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2011, 14: 136-139.
- [2] Bandres E, Agirre X, Bitarte N, et al. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer [J]. Int J Cancer, 2009, 125: 2737-2743.
- [3] He Y, Cui Y, Wang W, et al. Hypomethylation of the hsa-miR-191 locus causes high expression of hsa-mir-191 and promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma [J]. Neoplasia, 2011, 13: 841-853.
- [4] Donninger H, Hesson L, Vos M, et al. The Ras effector RASSF2 controls the PAR-4 tumor suppressor [J]. Mol Cell Biol, 2010, 30: 2608-2620.
- [5] Akino K, Toyota M, Suzuki H, et al. The Ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer [J]. Gastroenterology, 2005, 129: 156-169.
- [6] Clark J, Freeman J, Donninger H. Loss of RASSF2 enhances tumorigenicity of lung cancer cells and confers resistance to chemotherapy [J]. Mol Biol Int, 2012, 2012: 705948.
- [7] Praskova M, Khoklatchev A, Ortiz-Vega S, et al. Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation by the growth inhibitory proteins RASSF1 and NORE1, and by Ras [J]. Biochem J, 2004, 381: 453-462.
- [8] Nagasaki T, Tanaka N, Cullings HM, et al. Analysis of fecal DNA methylation to detect gastrointestinal neoplasia [J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101: 1244-1258.
- [9] Lee BB, Lee EJ, Jung EH, et al. Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15: 6185-6191.
- [10] Le Pessot F, Michot F, Michel P, et al. Prognostic value of circulating mutant DNA in unresectable metastatic colorectal cancer [J]. Ann Surg, 2010, 251: 275-280.
- [11] He B, Lee AY, Dadfarmay S, et al. Secreted frizzled-related protein 4 is silenced by hypermethylation and induces apoptosis in beta-catenin-deficient human mesothelioma cells [J]. Cancer Res, 2005, 65: 743-748.
- [12] Urakami S, Shiina H, Enokida H, et al. Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 plays an important role in bladder cancer through aberrant canonical Wnt/β-catenin signaling pathway [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12: 383-391.
- [13] Qi J, Zhu YQ, Luo J, et al. The role of secreted Wnt-antagonist genes hypermethylation in early detection of colorectal tumor [J]. Chin Med J, 2007, 87: 1954-1957.
- [14] 翟国栋,王新颖,龚伟,等. 大肠侧向发育型肿瘤中 sfrp1 基因存在高甲基化 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2011, 16: 105-108.

(收稿日期:2013-05-04)