

• 临床检验研究论著 •

血清 GSTP1 基因甲基化定量分析在肝细胞癌的早期诊断价值*

冉贵萍^{1,2}, 杨国珍^{2△}, 方 文², 袁 勇¹, 张瑞霞¹

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院奉城分院, 上海 201411;

2. 贵阳医学院附院生化科, 贵州贵阳 550004)

摘 要:目的 建立实时荧光定量甲基化方法研究肝细胞癌(HCC)患者外周血血清中游离谷胱甘肽-硫-转移酶 P1 基因(GSTP1)启动子区域甲基化状态,探讨其是否可作为 HCC 早期诊断的指标。**方法** 收集 95 例血清标本,包括 40 例 HCC、30 例肝硬化和 25 例健康体检者,采用实时荧光定量甲基化特异性聚合酶链反应(PCR)技术对血清中 GSTP1 基因的甲基化水平进行定量分析,应用接受者操作特性(ROC)曲线评估其诊断价值。**结果** 肝癌患者血清中 GSTP1 基因甲基化定量水平明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。ROC 曲线分析表明通过 GSTP1 基因甲基化定量分析能够高效区分肝癌和肝硬化及健康者($AUC=0.8641$),以甲基化率 2% 作为诊断 HCC 的临界值,其诊断特异度为 87.5%,敏感度达 69.6%;联合检测血清 GSTP1 基因甲基化和血清 AFP 可将 HCC 检出率提高至 75%。**结论** 实时荧光定量甲基化方法可精确定量血清中 GSTP1 基因甲基化水平,在 HCC 的早期诊断中有一定的应用价值。

关键词:癌,肝细胞; 谷胱甘肽转移酶; DNA 甲基化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.05.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)05-0540-03

Value of serum GSTP1 gene quantitative methylation analysis for early diagnosis of hepatocellular carcinoma*

Ran Guiping^{1,2}, Yang Guozhen^{2△}, Fang Wen², Yuan Yong¹, Zhang Ruixia¹

(1. Fengcheng Branch Hospital, Affiliated Ninth People's Hospital, Medical College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201411, China; 2. Department of Biochemistry, Guiyang Medical College Affiliated Hospital, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract: **Objective** To establish a real-time fluorescence quantitative methylation assay to investigate the methylation status of GSH-sulphur-transferase P1(GSTP1) gene promoter region in hepatocellular carcinoma(HCC) and to investigate whether which can be used as the early diagnostic indicator of HCC. **Methods** Ninety-five serum samples were collected from 40 patients with HCC, 30 patients with liver cirrhosis and 25 individuals with healthy physical examination as controls. The methylation level of GSTP1 gene in these serum samples were quantitatively determined by using the real-time fluorescence quantitative methylated specific PCR technique. The receiver-operation characteristic(ROC) curves were adopted to evaluate its diagnostic value for HCC. **Results** The methylation quantitative level of GSTP1 gene in HCC serum was significantly higher than that in the healthy controls ($P<0.05$). The ROC curve analysis demonstrated that the methylation quantitative analysis of GSTP1 gene could efficiently distinguish HCC and cirrhosis from healthy controls ($AUC=0.8641$). With the methylation rate of 2% as the critical value for diagnosing HCC, its diagnostic specificity was 87.5%, the sensitivity was 69.6%; the combination detection of serum GSTP1 gene methylation and serum AFP could increase the detection rate of HCC to 75%. **Conclusion** The real-time fluorescence quantitative methylation assay can accurately quantify the methylation level of serum GSTP1 gene, which has certain application value for the early diagnosis of HCC.

Key words: carcinoma, hepatocellular; glutathione transferase; DNA methylation

早期诊断是肝细胞癌(HCC)获得早期治疗的前提,肝癌有强大的代偿能力,早期常无症状,这给肝癌的早期诊断带来一定的困难,因此,寻找外周血肿瘤标记是临床上亟须解决的一个难题。循环无细胞 DNA(cfDNA)是存在于血清和血浆中的游离 DNA,近年研究表明^[1-3],肿瘤在生长过程中持续释放肿瘤细胞 DNA 进入外周血液,因此,检测血清或血浆的肿瘤特异性基因改变,可反映肿瘤的存在和严重程度。谷胱甘肽-硫-转移酶基因(GSTP1)是重要的 DNA 损伤修复基因,属抑癌基因,GSTP1 基因 CpG 岛高度甲基化可能参与了肝癌的发生、发展^[4-6],因此检测肝癌患者血清或血浆中 GSTP1 的甲基化水平将有助于了解肝癌的发生发展过程。本研究采用自行建立的实时荧光甲基化定量方法检测了 40 例 HCC 患者外周血血清中 GSTP1 基因启动子区的甲基化水平,探讨了其在 HCC 的早期诊断中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2012 年 1~12 月共收集贵阳医学院附院就诊的 95 例患者的血清标本。其中 40 例 HCC(肝癌组)均为住院病例,其中男性 29 例,女性 11 例,年龄 36~82 岁,中位年龄 58 岁,全部病例均经术后组织学诊断为 HCC;其中甲胎蛋白(AFP) $\geq 400 \mu\text{g/L}$ 的 22 例。30 例肝硬化组,其中男性 18 例,女性 12 例,年龄 36~79 岁,中位年龄 65 岁。25 例健康对照组血清来自健康体检者,男性 15 例,女性 10 例,年龄 35~72 岁,中位年龄 60 岁。3 组资料在年龄及性别上比较差异无统计学意义($P>0.05$)。患者采集静脉血 5 mL,离心后分离血清,以每管 800 μL 分装置-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 试剂 GSTP1 基因甲基化引物序列和非甲基化引物序列(上海生工公司合成)、血液 DNA 快速提取试剂盒由深圳亚能生物技术有限公司提供, SssI 甲基转移酶购自美国 NEB

* 基金项目:国家级教学团队资助项目(教高函[2009]18 号)。 作者简介:冉贵萍,女,副主任技师,主要从事肿瘤分子诊断研究。 △ 通讯作者, E-mail: yangguozhen@gmc.edu.cn.

公司。

1.3 方法

1.3.1 PCR 引物设计 根据 Genebank (AY324387) 中人类 *GSTP1* 基因序列设计扩增 *GSTP1* 基因启动子区序列, 所设计的甲基化特异引物、非甲基化特异引物序列和内参 β -actin 引物序列见表 1。

表 1 引物序列			
引物	序列(5'~3')	产物 (bp)	退火温度 (°C)
<i>GSTP1</i> -M	TTC GGG GTG TAG CGG TCG TC	93	57
	GCC CCA ATA CTA AAT CAC GAC G		
<i>GSTP1</i> -U	GAT GTT TGG GGT GTA GTG GTT GTT	97	57
	CCA CCC CAA TAC TAA ATC ACA ACA		
β -actin	AAG GTG ACA GCA GTC GGT TGG A	156	60
	GAG AAG TGG GGT TTT AGG A		

M: 甲基化特异性引物; U: 非甲基化特异性引物。

1.3.2 血清 DNA 的抽提和纯化 血清 DNA 的抽提采用微量 DNA 抽提试剂盒(深圳亚能公司), 对其中的操作步骤适当改良(按比例扩大每次处理的血浆量, DNA 得率和纯度无影响), 每 300 μ L 血清获得 70 μ L 的 DNA, 所有保存血清标本均采用同一批号的试剂盒抽提 DNA 以减少批间误差, 并统一集中检测。

1.3.3 甲基化特异性 PCR 检测 修饰过程: 取已提取的血清 DNA 10 μ L, 加入 1.1 μ L 的 NaOH (3 mol/L), 于 37 °C 变性 10 min。加入 10 mmol/L 对苯二酚 6 μ L, 再加入 104 μ L (pH 5.0) 3 mol/L NaHSO₃ 混匀, 表面覆盖矿物油, 避光, 50 °C 水浴 16 h 进行甲基化修饰。水浴完毕后准备纯化 DNA, 于室温下加入 4 mol/L NaOH 至终浓度为 0.3 mol/L, 放置 10 min, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠和 2 倍体积的冰乙醇沉淀 DNA, -20 °C 放置过夜, 第 2 天以 70% 的乙醇洗涤沉淀物, 真空干燥, 加 30 μ L TE (pH 8.0) 溶解, -20 °C 保存。PCR 反应体系: 亚硫酸氢钠处理的模板 DNA 5.0 μ L, 各引物 (20 μ mol/L) 1.0 μ L, 10 mmol/L dNTP 1.0 μ L, 10 $\times$ buffer 5.0 μ L, TaqDNA 聚合酶 2.5 U, 加灭菌蒸馏水至 50 μ L。反应条件为: 95 °C 预变性 15 min, 继以 95 °C (50 s), 57 °C (1 min), 72 °C (1 min) 共 35 个循环, 最后于 72 °C 延伸 10 min, 以水为空白对照, 健康人白细胞基因组 DNA 作阴性对照, 以 SssI 甲基转移酶体外修饰的基因组 DNA 为阳性对照, 扩增产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪观察结果并拍照。

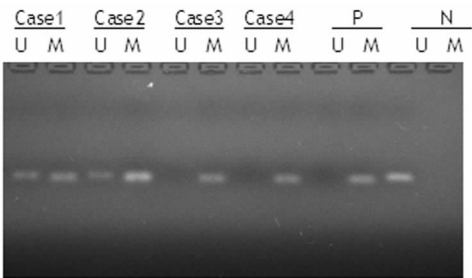
1.3.4 MethyLight 定量 PCR 方法 MethyLight 是建立在 Syber green I 实时荧光 PCR 技术上的甲基化定量分析技术, 通过一对甲基化特异性引物(即表 1 中 *GSTP1*-M 引物)和荧光染料 Syber green I 对目的基因进行定量, 同时以 β -actin 基因作为内参基因来校正样品间在模板量上的差异。定量 PCR 使用 Lightcycler480 荧光定量 PCR 仪进行扩增, 20 μ L 反应体系包含 7.2 μ L 蒸馏水, 10 μ L SYBR Green I, 0.4 μ L 的上游引物和 0.4 μ L 的下游引物, 2 μ L 模板。扩增条件为 95 °C 变性 30 s 后, 95 °C 5 s, 57 °C 25 s, 72 °C 10 s, 循环 40 次后进行熔解曲线分析。每次检测设置阴性对照为健康人白细胞基因组 DNA、阳性对照为 SssI 甲基转移酶体外修饰的基因组 DNA, 使用甲基化百分比参数 (PMR) 来描述血清 DNA 的 *GSTP1* 基因的甲基化水平; 其计算过程是首先通过 β -actin 内参基因来对目的基因进行相对定量, 然后再用甲基化酶体外修

饰 DNA 的相对定量值对实验样品值进一步作归一化处理。计算公式如下: $PMR = (GENE_{sample} / REF_{sample}) / (GENE_{positive} / REF_{positive}) \times 100\%$ (GENE 为目的基因; REF 为内参基因; sample 为样品; positive 为甲基化阳性对照 DNA)。

1.4 统计学处理 全部资料用 SPSS 13.0 软件分析, 采用非参数检验比较不同组间血清 DNA 甲基化水平的差异; 采用 ROC 曲线评估血清 *GSTP1* 基因甲基化对 HCC 的诊断价值, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, 分析使用绘制医学图表进行。

2 结 果

2.1 MSP 对 *GSTP1* 基因的定性检测 为了对所用引物和扩增条件进行验证, 首先对三组血清 DNA 样本进行 MSP 扩增, 结果如图 1 显示, *GSTP1* 基因的甲基化引物均扩增出 93 bp 大小的目的条带, 非甲基化引物均扩增出 97 bp 大小的目的条带, 扩增片段大小正确, 阳性对照和阴性对照均扩增出相应条带, MSP 的定性结果证实了引物扩增的正确性。



U: 用 *GSTP1*-U 非特异性引物扩增; M: 用 *GSTP1*-M 特异性引物扩增。Case1, 2: 部分甲基化血清标本; Case3, 4: 完全甲基化血清标本; P: 阳性对照 (SssI 甲基转移酶体外修饰基因组 DNA); N: 阴性对照 (健康人白细胞基因组 DNA)。

图 1 HCC 中 *GSTP1* 基因 MSP 电泳图

2.2 *GSTP1* 基因的 MethyLight 的相对定量分析 见图 2 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。 *GSTP1* 基因在 10 个肝癌血清样本荧光相对定量的分析结果, 蓝色柱表示 *GSTP1*/ β -actin 的相对定量值, 红色柱表示待测样本/甲基化阳性对照的比值。以 SssI 甲基转移酶体外修饰 DNA 扩增值作为甲基化阳性对照 (β -actin 基因为内参), 标准值为 1, 各肝癌患者血清样本 *GSTP1* 基因甲基化水平可以以甲基化百分率来进行定量。

2.3 *GSTP1* 基因的甲基化水平的定量分析 见图 3 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。肝癌组中 40 例患者血清的 PMR 的中位值为 0.117 2 (四分位距 0.034 2~0.285 1), 肝硬化组中 30 例患者血清的 PMR 的中位值为 0.027 4 (四分位距 0.013 1~0.045 3), 25 例健康对照组的 PMR 的中位值为 0.010 8 (四分位距 0.006 2~0.028 6), 其中肝硬化组与健康对照组的 *GSTP1* 基因的甲基化水平比较差异无统计学意义 ($P=0.257 9$), 而肝癌组的 *GSTP1* 甲基化水平明显高于肝硬化组和健康对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 ROC 曲线分析 见图 4 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”), 肝癌组与健康对照组的 PMR 进行比较, *GSTP1* 基因的 AUC 值 (0.864 1) 大于 0.5, 统计学表明 *GSTP1* 基因甲基化水平可作为辅助诊断肝癌的指标 ($P < 0.05$), 以甲基化率 2% 作为诊断 HCC 的临界值, 其诊断特异度为 87.5%, 敏感度达 69.6%; 肝癌组与肝硬化组的 PMR 进行比较, AUC 值为 0.775, 统计学表明可有效将肝癌和肝硬化区分开, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但敏感度较低

(39.8%);而肝硬化组与健康对照组比较的 AUC 值为 0.655 3,略高于 0.500 0,统计学比较表明不足以将两者区分开($P=0.584\ 2$)。

2.5 联合检测 2001 年 9 月全国肝癌学术会议确定将 $\text{AFP} \geq 400\ \mu\text{g/L}$ 作为 HCC 临床诊断的阳性阈值^[7]。在本研究中 22 例 $\text{AFP} \geq 400\ \mu\text{g/L}$ 的 HCC 患者中,其甲基化均为阳性,在 18 例 $\text{AFP} < 400\ \mu\text{g/L}$ 的 HCC 患者中,有 8 例甲基化定量结果为阳性,单独 AFP 指标对 HCC 的检出率为 55% (22/40),而联合检测血清 GSTP1 基因甲基化与血清 AFP 可将 HCC 的检出率提高至 75% (30/40)。

3 讨 论

循环 DNA 是存在于血清和血浆中的少量的游离 DNA,近年来日益增多的研究表明,肿瘤在生长过程中能持续释放肿瘤细胞 DNA 进入外周血液,循环 DNA 能维持和表达肿瘤细胞来源的分子遗传特性,因此通过检测血清 DNA 的变化可以反映肿瘤的存在和严重程度。

肿瘤患者血清或血浆中肿瘤相关基因改变如癌基因的突变、染色体微卫星不稳定性、抑癌基因的突变、基因杂合现象的丢失等与原发灶的改变相一致,为应用血清中 DNA 甲基化作为肿瘤标记检测和监测肿瘤的发生、发展提供了令人鼓舞的可能。有科学家发现,血清异常甲基化总是与肿瘤组织甲基化同时出现^[8-10]。Esteller 等^[11]采用甲基化特异性 PCR 法检测 22 例 NSCLC 肿瘤抑制基因 P16(CDKN2)启动子甲基化、死亡相关蛋白激酶(DAP 酶)、谷胱甘肽 S 转移酶 P1 和 O6 甲基鸟嘌呤 DNA 甲基化转移酶(MGMT),发现 68% (15/22) NSCLC 肿瘤组织中至少有 1 种以上基因发生甲基化异常,而健康对照组正常肺组织无类似变化,15 例有甲基化的原发肿瘤中 11 例(73%)血清里也发现基因不正常甲基化,所以,检测 DNA 甲基化的改变可以反映肿瘤中特异性的核酸改变,因此,建立一种快速、简便的方法对血清中 DNA 甲基化定量^[12-13],将有助于提高原发性肝癌早期检测的阳性率。

GSTP1 基因是一重要的 DNA 损伤修复基因,属抑癌基因,其编码的蛋白 GST π 类酶属于体内 II 相代谢解毒酶同工酶家族,在保护机体细胞不受毒物和致癌物基团的损害方面起着重要作用。研究报道在人原发性肝癌中具有高频率的 GSTP1 蛋白表达缺失或降低,且同时检测到 GSTP1 基因启动子区 CpG 岛的高甲基化,表明可能是由于其高甲基化而表达下调,进而促进了肝癌的发生发展。有研究表明^[5],88% 的原发性肝癌组织表达 GSTP1 基因 CpG 岛异常甲基化,少数健康组织中也可出现异常甲基化,但血清 DNA 的高甲基化却只存在于纯恶性疾病中,因此其特异性诊断价值受到重视。本研究通过 SYBR Green I 荧光定量法对肝癌、肝硬化及健康对照者血清中 GSTP1 基因甲基化水平进行定量,发现肝癌组和健康对照组的甲基化水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$),由健康对照组、肝硬化组到肝癌组 GSTP1 基因的甲基化定量水平总体呈上升趋势,进一步证实了 GSTP1 基因甲基化参与 HCC 的发生发展过程,是 HCC 形成中的早期事件,可以作为 HCC 早期诊断的一项敏感指标。本研究通过 ROC 曲线评估了 GSTP1 基因甲基化水平在肝癌诊断上的可行性,当以甲基化率 2% 作为诊断 HCC 的临界值时,其特异度为 87.5%,诊断敏感度达 69.6%,具有一定的诊断价值。目前临床上原发性肝癌常用的辅助诊断和监测的血清学指标是 AFP,然而 AFP 的灵敏度有限,AFP 诊断原发性肝癌的敏感度为 48%~62%,特异度为 81%~98%^[14]。本实验在血清 $\text{AFP} \geq 400\ \mu\text{g/L}$ 的 22 例患者中,其 GSTP1 基因甲基化均阳性,在 AFP 水平低于临

床诊断阈值($400\ \mu\text{g/L}$)的 18 例患者中有 8 例为甲基化阳性,可以看出血清 DNA 甲基化检测比传统的血清蛋白肿瘤标志物的检测更灵敏,更有利于肿瘤的早期诊断。因此通过甲基化荧光定量法检测肝癌患者血清中甲基化水平具有提高 HCC 检出率的重要作用。

总之,甲基化荧光定量法操作简便,利于临床检测推广,可对血清中 GSTP1 基因的甲基化水平定量检测,对 HCC 的早期诊断、早期治疗和预后判断有一定价值,由于入组病例不多,尚需扩大病例,开展前瞻性的研究,以全面评估血清 DNA 的甲基化检测用于 HCC 早期诊断、预后判断的价值。

参考文献

- [1] Papadopoulos E, Davilas E, Sotiriou V, et al. Cell-free DNA and RNA in plasma as a new molecular marker for prostate cancer [J]. *Oncol Res*, 2004, 14(9): 439-445.
- [2] 邓立春, 许晨, 姜蓁. 恶性肿瘤患者循环血 DNA 的研究进展[J]. *东南大学学报: 医学版*, 2007, 26(5): 382-385.
- [3] Yamamoto N, Nakayama T, Kajita M, et al. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RAR β 2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 132(1): 165-173.
- [4] 白同, 杨斌, 娄诚, 等. APC 和 CDKN2A 基因甲基化定量分析对肝细胞癌的诊断价值[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(29): 3001-3007.
- [5] 王锦红, 覃扬, 李波, 等. HCC 患者 GSTP1 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态研究[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2005, 36(5): 686-688.
- [6] 王丰, 华东, 吴玉玉, 等. 血浆 GSTP1 和 SFRP1 基因甲基化分析在肝细胞癌早期诊断中的价值[J]. *中国癌症杂志*, 2011, 21(1): 12-16.
- [7] 杨秉辉, 夏景林. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准[J]. *肝脏*, 2004, 9(S1): 67-68.
- [8] Chang H, Yi B, Li L, et al. Methylation of tumor associated genes in tissue and plasma samples from liver disease patients[J]. *Exp Mol Pathol*, 2008, 85(2): 96-100.
- [9] Lofton-Day C, Model F, Devos T, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening[J]. *Clin Chem*, 2008, 54(2): 414-423.
- [10] Van De Voorde L, Speeckaert R, Van Gestel D, et al. DNA methylation-based biomarkers in serum of patients with breast cancer [J]. *Mutat Res*, 2012, 751(2): 304-325.
- [11] Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(1): 67-70.
- [12] Malentacchi F, Forni G, Vinci S, et al. Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential-high resolution melt analysis protocol[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(12): e86.
- [13] Le T, Kim KP, Fan G, et al. A sensitive mass spectrometry method for simultaneous quantification of DNA methylation and hydroxymethylation levels in biological samples[J]. *Anal Biochem*, 2011, 412(2): 203-209.
- [14] Song P, Gao J, Inagaki Y, et al. Biomarkers: evaluation of screening for and early diagnosis of hepatocellular carcinoma in Japan and China[J]. *Liver Cancer*, 2013, 2(1): 31-39.