

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.08.011

非小细胞肺癌患者血浆 *DAPK* 基因甲基化检测及其临床意义

宋超¹, 张云¹, 金永堂², 于在诚³, 薛绍礼¹

Detection and Clinical Significance of *DAPK* Gene Methylation in Plasma of Non-small Cell Lung Cancer Patients

SONG Chao¹, ZHANG Yun¹, JIN Yongtang², YU Zaicheng³, XUE Shaoli¹

1. Department of Medical Bioengineering, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Department of Environmental Medicine, Zhejiang University Medical School; 3. Department of Thoracic and General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University

Corresponding Author: Xue Shaoli, E-mail: xuesl@sina.com

Abstract: Objective To detect the methylation status of the death associated protein kinase (*DAPK*) gene in the plasma of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients, and to evaluate its clinical significance in screening and early diagnosis of NSCLC. **Methods** 112 cases of NSCLC patients and corresponding control cases were enrolled, by using nested methylation-specific polymerase chain reaction (nMSP), we determined the methylation status of the *DAPK* gene in the lung cancer tissues, adjacent tissues, plasma from peripheral blood and 112 normal control blood samples. The result of each group was compared. **Results** The total frequency of the *DAPK* gene methylation was 59.8% in NSCLC tissues, significantly higher than that in the adjacent tissues at 8.0% ($P < 0.001$). Compared to adjacent tissues groups, the hypermethylation frequency in the lung cancer tissues exhibited significant difference in squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma ($P < 0.001$). The hypermethylation frequency for *DAPK* gene was 21.4% in the plasma of the 112 NSCLC cases, without positive result in the plasma of the control group ($P < 0.001$). The hypermethylation frequency in plasma did not significantly correlate to the clinical classification, pathologic type and clinical staging of the NSCLC. **Conclusion** Detection of the *DAPK* gene methylation in the plasma of NSCLC patients may provide valuable information for early screening and diagnosis of the NSCLC.

Key words: Death associated protein kinase; Methylation; Non-small cell lung cancer; Nested methylation-specific polymerase chain reaction

摘要:目的 分析非小细胞肺癌(NSCLC)患者血浆中死亡相关蛋白激酶(*DAPK*)基因异常甲基化及其在 NSCLC 筛查和诊断方面的临床意义。**方法** 用巢式甲基化特异性聚合酶链反应(nMSP)检测 112 例 NSCLC 患者癌组织、癌旁组织、外周血血浆和 112 例正常对照组血浆样品中 *DAPK* 基因的甲基化情况,并比较各组检测结果。**结果** 癌组织 *DAPK* 基因甲基化率为 59.8%,高于癌旁组织的 8.0% ($P < 0.001$),其中鳞癌、腺癌、腺鳞癌癌组织和癌旁组织间的甲基化检出率比较差异均有统计学意义 ($P < 0.001$); NSCLC 患者血浆中 *DAPK* 基因甲基化检测率为 21.4%,对照组血浆未检测到 *DAPK* 基因甲基化 ($P < 0.001$)。血浆中 *DAPK* 基因甲基化检出率与 NSCLC 临床分类、临床分期和病理类型无明显相关性。**结论** 利用 nMSP 法对血浆样本 *DAPK* 基因甲基化检测可为非小细胞肺癌的筛查和诊断提供有价值的信息。

关键词: 死亡相关蛋白激酶(*DAPK*); 甲基化; 非小细胞肺癌; 巢式甲基化特异性聚合酶链反应法

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

收稿日期: 2012-09-12; **修回日期:** 2013-01-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471427); 安徽省重点科研基金资助项目(07021017)

作者单位: 1. 230032 合肥, 安徽医科大学生物工程教研室; 2. 浙江大学医学院环境医学系; 3. 安徽医科大学第一附属医院胸外科

通信作者: 薛绍礼, E-mail: xuesl@sina.com

作者简介: 宋超(1986-), 男, 硕士在读, 主要从事肺癌早期的基因和血清学指标检测的研究

0 引言

2008 年世界卫生组织公布全球死于肺癌人数占有癌症死亡人数的 18%^[1], 位居第一位。我国卫生部发布的第三次全国死因调查显示, 在我国过去 30 年里肺癌死亡率上升了 465%, 发病率平均每年增长 26.9%, 已代替肝癌成为我国首位恶性肿瘤

死亡原因。肺癌患者中约 80% 属于非小细胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC), 其初期症状不明显, 初诊患者半数以上处于肺癌晚期且预后不佳, 因此早发现、早诊断是提高 NSCLC 治疗的关键。文献报道, 死亡相关蛋白激酶 (DAPK) 是一种新发现的促凋亡丝氨酸/苏氨酸激酶, 其表达可诱导癌变细胞程序性死亡, 也可失活突变保护细胞不被 γ 射线诱导凋亡, 维持细胞的体内平衡^[2]。抑癌基因启动子区 CpG 岛的甲基化, 会导致其表达沉默, 而使细胞有发展成肿瘤的可能性, 被认为是肿瘤发生的早期事件^[3], 目前已在多种肿瘤中检测出 DAPK 启动子 CpG 岛频繁甲基化^[4-5]。本研究拟通过检测患者血浆、癌组织、癌旁组织以及健康者血浆中 DAPK 基因甲基化状态, 阐明血浆中 DAPK 基因甲基化与 NSCLC 的关系, 并探讨其在 NSCLC 筛查、诊断中的意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

随机选择安徽医科大学第一附属医院 2005 年 6 月至 2008 年 11 月间行外科切除术、并经病理学确诊的 112 例安徽籍原发性非小细胞肺癌患者为研究对象。男 91 例, 女 21 例, 年龄 38~79 岁, 平均年龄 61 岁。按 WHO 标准分类: 腺癌 27 例, 鳞癌 56 例, 腺鳞癌 29 例; TNM 分期分类: 0 期 1 例, I 期 42 例, II 期 46 例, III 期 21 例, IV 期 2 例。患者手术前 (空腹) 肘部静脉取血液标本 5 ml 于 EDTA 抗凝管中, 立即 3 000 g 离心 15 min 分离血浆, -20°C 冷藏保存。另选取同期经病理检查无呼吸系统疾病且未患任何肿瘤, 在年龄和性别组成上与肺癌组有可比性的 112 例自愿健康体检者, 取其血浆样本作为对照。在进行外科手术时收集患者肺肿瘤组织及远离肿瘤部位 3 cm 以上病理学确定的癌旁正常组织各 1 cm^3 , 采集后立刻液氮冻存。

1.2 主要仪器和试剂

QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒, HotstarTaq 酶 (德国 Qiagen 公司), hema8000 基因扩增仪 (北京瑞德迈普公司), Wizard DNA 纯化系统 (美国 Promega 公司), 亚硫酸氢钠、氢醌 (美国 Sigma 公司), DL2000 DNA Marker、DAPK 基因甲基化与非甲基化引物 (上海生工公司), DYY-10 型三恒电泳仪 (北京六一仪器厂)。

1.3 DNA 的提取

1.3.1 组织 DNA 的提取 采用酚-氯仿法对组织 DNA 进行提取^[6]。简述步骤如下: 研磨粉碎组织, 将粉末浸没于 10 倍体积的裂解液中, 37°C 温育 1 h。

加蛋白酶 K, 温和混匀, 50°C 水浴 3 h。取出冷却至室温, 加等体积苯酚, 温和混匀, 5 000 g 离心 15 min 分离, 转移上层水相, 重复抽提 (第三次用酚) 二次后转移水相, 加 0.2 倍体积 10 mol/L 醋酸铵和 2 倍体积乙醇, 旋转混匀。5 000 g 离心 5 min 后弃上清液, 70% 乙醇洗涤沉淀, 彻底挥发后加 TE 缓冲液于 4°C 温和溶解, 保存备用。

1.3.2 血浆 DNA 的提取 采用德国 Qiagen 公司的 QIAamp DNA Blood Mini Kit (cat. no. 51104) 试剂盒, 按其“血液和体液”方案进行操作: 向 2 ml 离心管中分别加入 400 μl 血浆、400 μl 裂解液 AL、40 μl 蛋白酶液混匀, 56°C 水浴 10 min, 加入 400 μl 无水乙醇混匀后转移入 QIAamp 离心柱中 6 000 g 离心 1 min, 弃液, 往管中加入洗脱缓冲液 AW 1 500 μl , 6 000 g 离心 1 min, 再加入 500 μl 洗脱缓冲液 AW2 洗涤 20 000 g 离心 3 min, 最后用 50 μl 缓冲液洗脱 DNA, 置于 -20°C 冷藏保存。

1.4 基因甲基化的检测

具体方法按照文献描述^[7]进行, 主要步骤如下:

1.4.1 DNA 修饰 取 50 μl DNA 样品, 加入 3 mol/L NaOH 5.5 μl , 42°C 水浴 30 min。再加入 10 mmol/L 氢醌 30 μl 、3.9 mol/L 亚硫酸氢钠 510 μl , 滴两滴石蜡油, 55°C 避光水浴 16 h。

1.4.2 DNA 纯化 采用 Wizard DNA 纯化系统, 具体步骤按操作说明进行, 最终 50 μl Tris-EDTA 缓冲液溶解 DNA。

1.4.3 引物设计 甲基化 DAPK 上游引物: 5'-GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC-3', 下游引物: 5'-CCCTCCCAAACGCCGA-3', 扩增产物 98bp, 退火温度 61°C ; 非甲基化 DAPK 上游引物: 5'-GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT-3', 下游引物: 5'-CAAATCCCTCCCAAACACCAA-3', 扩增产物 106 bp, 退火温度 60°C 。内对照引物上游引物: 5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3', 下游引物 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3', 扩增长度 268 bp, 退火温度 59°C 。引物均由上海生工生物工程公司合成。

1.4.4 PCR 过程及分析 PCR 反应体系 (25 μl): Q 液 5.0 μl , Buffer 2.5 μl , 10 mM/L 的 dNTPs 0.5 μl , 20 μM /L 的引物各 0.5 μl , HotstarTaq 酶 (Qiagen) 0.75u, 修饰后的 DNA 5.0 μl 。用经 Sss I 酶处理的和未处理的健康者外周血 DNA 作为甲基化及非甲基化的阳性对照。扩增条件为: 95°C 预变性 15 min, 94°C 热循环 50 s, 退火 50 s, 72°C 50 s, 35 个循环, 72°C 延伸 10 min。扩增产物经溴化乙锭染色, 2.0% 琼脂糖凝胶电泳。

甲基化确定标准:甲基化引物扩增有条带即说明该样本发生了甲基化。

1.5 统计学方法

采用 Epi6 软件建立数据库,数据采用 SPSS 18.0 软件包分析。甲基化率为该基因甲基化标本数/总标本数,以百分率表示,甲基化率的比较采用卡方检验。主要指标为 P 值, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同取材样本中 DAPK 基因甲基化检测结果

本实验 DAPK 基因 NSCLC 癌组织中甲基化检出率为 59.8% (67/112),癌旁组织中甲基化检出率为 8.0% (9/112),差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。NSCLC 患者血浆中甲基化检出率为 21.4% (24/112)、与癌组织 59.8% 的检出率比较差异有统计学意义 ($P < 0.001$);健康者血浆中甲基化检出率为 0,与患者血浆 21.4% 的检出率比较差异亦有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2.2 不同类型癌组织中 DAPK 基因甲基化检测结果比较

癌组织和癌旁组织的甲基化检出率对比差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。其中鳞癌、腺癌、腺鳞癌组织和癌旁组织中甲基化检出率比较差异均有统计学意义 ($P < 0.001$);腺癌和腺鳞癌组织总检出率与鳞癌组织甲基化检出率比较差异无统计学意义

($P > 0.05$)。癌组织中 DAPK 甲基化检出率在临床分期、临床分类和病理分型中差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

2.3 不同类型肺癌患者血浆中 DAPK 基因甲基化检测结果比较

患者血浆中 DAPK 甲基化检出率在临床分期、临床分类和病理分型间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2。

3 讨论

DNA 甲基化作为真核细胞中一种重要的遗传修饰调控方式,主要发生在基因启动子区 CpG 岛中胞嘧啶的 5 位碳原子上。CpG 岛甲基化可通过引起 DNA 的构型、稳定性及与蛋白因子相互作用方式的改变来实现对基因表达的调控^[8]。当 CpG 岛高甲基化时,抑癌基因表达受到抑制,当 CpG 岛低甲基化时,表达则可顺利进行。DAPK 定位于人 9 号染色体长臂 3 区 4 带,属于程序性细胞凋亡的正向调控因子,参与体内多种细胞凋亡及自溶过程。关于 DAPK 基因表达与沉默的研究近年来逐步成为热点。Tang 等^[9]在研究 NSCLC 中甲基化与其预后关系时发现,DAPK 基因过甲基化的 NSCLC 患者 5 年存活率(56%)相比未发生甲基化的 NSCLC 患者(92%)明显偏低。Sugita 等^[10]报道了检测出 DAPK 基因甲基化的胃癌患者无进展生存时间比没有检测出 DAPK 基因甲基化的患者明显要短(P

表 1 不同临床类型非小细胞肺癌组织中 DAPK 基因甲基化检测结果

Table 1 DAPK methylation frequency in the tissues from patients with different clinical types of non-small cell lung cancer

Characteristics of lung cancer patients		DAPK methylation		χ^2	P	OR	95%CI
		Positive	Negative				
Clinical staging	0 - I stage	25	18	0.082	0.774	0.893	0.411 - 1.938
	II - IV stage	42	27				
Clinical classification	Central type	37	17	3.580	0.058	2.101	0.969 - 4.558
	Peripheral type	29	28				
Pathological type	Squamous cell carcinoma	37	19	1.820	0.177	1.688	0.787 - 3.619
	Adenocarcinoma and other	30	26				

表 2 不同临床类型非小细胞肺癌患者血浆中 DAPK 基因甲基化检测结果

Table 2 DAPK methylation frequency in the plasma from patients with different clinical types of non-small cell lung cancer

Characteristics of lung cancer patients		DAPK methylation		χ^2	P	OR	95%CI
		Positive	Negative				
Clinical staging	0 - I stage	9	34	0.010	0.919	0.953	0.376 - 2.418
	II - IV stage	15	54				
Clinical classification	Central type	10	44	0.598	0.440	0.698	0.280 - 1.741
	Peripheral type	14	43				
Pathological type	Squamous cell carcinoma	13	43	0.212	0.645	1.237	0.500 - 3.058
	Adenocarcinoma and other	11	45				

= 0.007), *DAPK* 基因的甲基化可能预示着低化疗反应和不良预后。Su 等^[11] 发现对 *DAPK* 等相关基因进行脱甲基作用, 可有效抑制人白血病 HL60 细胞的增殖与扩散。文献研究显示, CpG 岛异常甲基化所导致的 *DAPK* 基因低表达或沉默可能是细胞癌变的重要机制之一, 提示 *DAPK* 基因可作为潜在的肿瘤治疗的靶基因。

本次实验结果显示非小细胞肺癌组织中 *DAPK* 甲基化率明显高于癌旁组织, 对比差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 其中鳞癌、腺癌及腺鳞癌中的癌组织与癌旁组织的甲基化检出率间差异均有统计学意义 ($P < 0.001$), 而癌组织中各种临床分期、临床分类和病理分型之间对比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示癌组织中 *DAPK* 基因的甲基化可能对所有非小细胞肺癌均有诊断意义。现阶段约 75% 的肺癌病例发现时已属晚期, 失去根治机会, 因此癌组织中 *DAPK* 基因甲基化检测或许有助于肺癌的早期诊断。

目前认为肿瘤细胞释放 DNA 入血液循环中, 患者血浆 DNA 与相对应的肿瘤组织存在一致的基因改变。本研究 24 例患者血浆中检出了 *DAPK* 基因甲基化, 而 112 例正常对照组血浆未检测出基因甲基化, 血浆 *DAPK* 基因甲基化在不同的临床分期、临床分类和病理分型之间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示血浆中 *DAPK* 基因甲基化的检测可能对所有肺癌均有诊断意义。而且血浆检测比癌组织取材方便、现实可行、易于操作, 有可能用于早期筛查和诊断。患者血浆 *DAPK* 基因甲基化检出率与癌组织 ($P < 0.001$) 及癌旁组织 ($P = 0.005$) 相比差异均有统计学意义, 分析原因可能是血浆中 *DAPK* 基因甲基化程度本就较低、血浆中检测方法不够灵敏或者还有其他因素的影响。

综上所述, *DAPK* 基因甲基化与 NSCLC 密切相关, 通过对癌组织中 *DAPK* 基因甲基化的检测提示了基因甲基化与肺癌的关系, 检测血浆中 *DAPK* 基因甲基化可能成为有价值的肺癌辅助诊断指标之一, 而如何提高其检测的灵敏度和可靠性则是下一步要研究的课题。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global Cancer Statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 134.
- [2] Schneider-Stock R, Roessner A, Ullrich O. DAP-kinase-protector or enemy in apoptotic cell death [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(9): 1763-7.
- [3] Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(2): 143-53.
- [4] Jablonowski Z, Reszka E, Gromadzińska J, *et al.* Hypermethylation of p16 and *DAPK* promoter gene regions in patients with non-invasive urinary bladder cancer [J]. *Arch Med Sci*, 2011, 7(3): 512-6.
- [5] Xiaofang L, Kun T, Shaoping Y, *et al.* Correlation between promoter methylation of p14ARF, TMS1/ASC, and *DAPK*, and p53 mutation with prognosis in cholangiocarcinoma [J]. *World J Surg Oncol*, 2012, 10: 5.
- [6] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning a laboratory manual* [M]. Huang PT, translation. Third edition. Beijing: Science Press, 2002: 463-71. [J. 萨姆布鲁克, D. W 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 463-71.]
- [7] Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(18): 9821-6.
- [8] Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P, *et al.* Aberrant promoter methylation of multiple genes in oligodendrogliomas and ependymomas [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2003, 144(2): 134-42.
- [9] Tang X, Khu riFR, Lee JJ, *et al.* Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(18): 1511-6.
- [10] Sugita H, Iida S, Inokuchi M, *et al.* Methylation of BNIP3 and *DAPK* indicates lower response to chemotherapy and poor prognosis in gastric cancer [J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(2): 513-8.
- [11] Su Y, Xu H, Xu Y, *et al.* Azacytidine inhibits the proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by demethylation of MGMT, *DAPK* and p16 genes [J]. *Hematology*, 2012, 17(1): 41-6.

[编辑: 安 凤; 校对: 杨 卉]