

# 抑癌基因甲基化位点定量检测在宫颈癌早期诊断中的意义探讨

张秀茹 陈迪 田晓怡 郑直

**【摘要】 目的** 利用 Sequenom 定量检测宫颈癌抑癌基因(SOX-1、NKX6.1、PAX-1、LMX1A、ONECUT1、WT1)甲基化的程度和甲基化的位点。**方法** 利用石蜡切片提取组织DNA,对提取的DNA进行甲基化位点的保护并设计针对抑癌基因转录起始点前的富含CPG岛区域的引物进行PCR扩增,将扩增出的DNA转录成RNA后使用Sequenom质谱分析仪进行基因甲基化程度的定量检测和甲基化位点的检测。**结果** 正常对照组和宫颈上皮内瘤样病变(CIN) I级组各个基因的甲基化程度较低( $<20\%$ ),无统计学意义( $P>0.05$ ), CIN III级组各个基因的甲基化程度较高( $>45\%$ ),与正常对照组相比有统计学差异( $P<0.05$ )。**结论** 通过定量研究宫颈癌抑癌基因甲基化的程度可以为宫颈癌的早期预防和治疗方式提供靶标和理论指导。

**【关键词】** 宫颈上皮内瘤样病变; DNA甲基化; CPG岛

**Quantitative test of the methylation of the tumor-suppressor gene in cervical cancer early diagnosis** ZHANG Xiu-ru, CHEN Di, TIAN Xiao-yi, ZHENG Zhi. Department of Pathology, Aerospace Center Hospital, Beijing 100049, China

Corresponding author: ZHENG Zhi, Email: zhizheng10@yahoo.com

**【Abstract】 Objective** To detect quantitation of the methylation degree of cervical cancer suppressor genes (SOX-1, NKX6.1, PAX-1, LMX1A, ONECUT1, WT1) by Sequenom. **Methods** Extraction DNA from tissue in paraffin and protect the methylation sites of DNA, PCR primer was designed at the starting point of the CPG Island and DNA was transcribed into RNA, then we detected the gene methylation degree and the site of gene methylation with sequenome. **Results** All the gene methylation degree we detected was low ( $<20\%$ ) in the normal control group and CIN I group, there was no significant difference between the two groups ( $P>0.05$ ), the gene methylation degree was high ( $>45\%$ ) in CIN III group, compared with the normal control group, there was a significant difference ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Through the quantitative research of cervical cancer suppressor genes methylation, we can provide a new direction and the theoretical guidance for the earlier prevention and treatment of cervical cancer.

**【Key words】** Cervical intraepithelial neoplasia; DNA methylation; CpG islands

宫颈癌居女性恶性肿瘤第二位,每年全世界有52万例新发病例<sup>[1]</sup>。宫颈癌是迄今为止惟一一种有明确致病原因的肿瘤,人类乳头瘤病毒(HPV)感染导致宫颈癌发生<sup>[2]</sup>。随着分子生物学的发展,人们发现肿瘤的本质是基因病,是基因失调的结果,在各种环境和遗传的致癌因素的协同作用下引起DNA的损害,激活原癌基因和(或)灭活抑癌基因,加上凋亡调节基因和(或)DNA修复基因的改变,继而引起表达水平的异常,使靶细胞发生转化呈多克隆增生,最终形成恶性肿瘤<sup>[3]</sup>。以宫颈癌来说,HPV感染是外因,抑癌基因失活是内因,外因导致内因,最终导致宫颈癌的发生。大量

的研究证实宫颈癌抑癌基因甲基化是基因失活的主要机制,Lai等<sup>[4]</sup>做了大量的工作,从50多个基因中筛选出了6个宫颈癌的抑癌基因(SOX-1、NKX6.1、PAX-1、LMX1A、ONECUT1、WT1),这6个抑癌基因在HPV感染的宫颈鳞状上皮中发生甲基化。基因甲基化是指在DNA上添加甲基基团的一种化学修饰作用,导致基因结构和功能异常。启动子区中CPG岛的未甲基化状态是基因转录所必需的,CPG岛是基因组中长度为300~3000 bp的富含CPG二核苷酸的区域,主要存在于基因的5'区域,CPG岛中的C的甲基化可导致基因转录被抑制,基因失活,失去原有功能<sup>[5]</sup>。本研究利用Sequenome质谱分析仪定量地检测这6个宫颈癌抑癌基因甲基化的程度,为宫颈癌的早期诊断提供新的方向和理论依据。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.24.030

作者单位:100049 北京,航天中心医院病理科(张秀茹、陈迪);中国医学科学院北京协和医学院基础医学研究所(田晓怡、郑直)

通讯作者:郑直,Email:zhizheng10@yahoo.com

## 材料和方法

### 一、宫颈上皮内瘤样病变(CIN)DNA提取及纯化

收集2008~2011年宫颈CIN I级石蜡标本35例,中位年龄43岁(23~84岁);宫颈CIN III级石蜡标本45例,中位年龄41岁(27~63岁);正常宫颈组织石蜡标本20例,中位年龄43岁(30~75岁)。

1. 一步消化法提取石蜡组织DNA<sup>[6]</sup>:(1)取宫颈组织石蜡切片10 μm,4片放入EP Tube。(2)EP管中加入500 μl二甲苯,颠倒混匀数次,常温放置15 min。14 500 r/min,离心15 min,弃上清。(3)重复操作(2),即二甲苯脱蜡3次。(4)EP管中加入无水乙醇500 μl,混匀,14 500 r/min离心10 min,弃上清,洗脱二甲苯。(5)EP管中加入70%乙醇500 μl,混匀,14 500 r/min离心10 min,弃上清。(6)EP管中加入50%乙醇500 μl,混匀,14 500 r/min离心10 min,弃上清。(7)室温(或53℃)干燥数分钟。(8)加入约300 μl消化缓冲液(含蛋白酶K),混合均匀,55℃孵育3 h(或过夜孵育)。(9)检查消化情况,液体清亮可进行下一步,若液体浑浊可再加蛋白酶K 5 μl继续消化3~5 h,直至液体清亮。(10)消化完全的样品于95℃灭活10 min之后放于冰上。样品可于-20℃冰箱长期保存。

消化缓冲液配方:1 mmol/L EDTA,50 mmol/L Tris pH 8.5,注意现用现配:0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 200 μl;1 mol/L Tris/HCl (pH 8.5) 5 ml;H<sub>2</sub>O 94.8 ml;总计100 ml。蛋白酶K最终浓度为0.5 mg/ml。

2. DNAmate 纯化DNA:(1)在DNA溶液中加入1/10体积的pH 5.2的3 mol/L醋酸钠,手指轻弹混匀。(2)加入4 μl的DNAmate,充分混匀。(3)加入2.5倍体积(加入醋酸钠后计算体积)冰冷的100%乙醇,充分混匀。(4)12 000 r/min 4℃离心15 min,弃溶液,留白色沉淀。(5)加入-20℃预冷的70%乙醇1 ml,轻轻上下颠倒洗涤沉淀。(6)12 000 r/min 4℃离心5 min后小心弃去乙醇,真空干燥。(7)用适量TE buffer溶解沉淀,检测DNA含量及OD值,-20℃保存。

### 二、抑癌基因引物设计

设计6个抑癌基因包含大量CPG岛序列的引物,选取在基因启动子前包含大量CPG岛的基因片段,由于石蜡标本提取的DNA片段容易断裂,因此设计的引物的片段≤300 bp。见表1。

### 三、使用EZ DNA甲基化试剂盒进行Bisulfite处理

(1)准备5 μl M缓冲液、10 μl DNA (500 ng至1 μg)+35 μl水。(2)将样品37℃孵育15 min。(3)在每个样品中加100 μl CT转化反应液,弱旋转。(4)

表1 各个基因引物序列及CPG岛数量级长度

基因	引物(5'-3')	长度 (bp)	CPG (个)
SOX-1	GGGTATTTGGGAATTAGTATATGTTTA	301	35
	CACAAAACCACTTTACCAAAAAA		
NKX6.1	GTTGTTGGAATTTGTGTTTTTTT	214	15
	CCCTCAAATTTCTAATTCACAAAACC		
PAX-1	GATTTAAGTTTTGGGTTTTGGAGAAG	247	13
	TTCCAAAAATTAACCTATAAATCCCC		
LMX1A	TTTTAGTGAATTGGACTAGAGAGAAGTTG	283	31
	TACCTTCCCTTCTCAACCTTAAAAA		
ONECUT1	TGTTTACTTTGAAGTTATGGTTTTG	197	26
	CTAAACCCCTCCTTTCATTTATACC		
WT1	GTTGGAAGGTGTTTTGGATATTTTA	304	18
	ATCCTTCCAAAACCAACAAAACCTAA		

Bisulfite处理步骤:步骤1:95℃,30 s;步骤2:50℃,15 min;步骤3:重复步骤1~2共20个循环(时间约为5 h);步骤4:4℃长期保存。(5)将样品置于冰上10 min。(6)加400 μl M结合缓冲液并上下颠倒混匀。(7)将样品移入Zymo-Spin I柱子中,将柱子放入2 ml离心管。(8)高速离心15~30 s,弃上清。(9)柱子中加200 μl M清洗缓冲液高速离心15~30 s。(10)柱子中加200 μl的M脱硫缓冲液,室温(20~30℃)放置15 min充分反应后离心15~30 s。(11)柱子中加200 μl的M洗脱缓冲液,高速离心30 s。(12)再加入200 μl M洗脱缓冲液,高速离心1 min。(13)用100 μl水稀释。

### 四、PCR扩增

(1)准备1 μmol/L(每个引物)PCR引物混合物,包含F引物和R引物。(2)384孔板A1-N10的每个孔内加入2 μl PCR反应物。(3)封板离心。(4)每个孔内加入2 μl PCR引物混合物(1 μmol/L)。(5)封板离心。(6)每个孔内加入1 μl经Bisulphite处理过的DNA(10 ng/μl)。(7)封板离心。(8)384孔板PCR时间及循环:95℃4 min;45个循环;95℃20 s;56℃30 s;72℃60 s;72℃3 min;4℃保存。

### 五、SAP反应

(1)准备SAP混合液。(2)每个384孔板的反应孔内加入2 μl SAP混合液。(3)SAP反应步骤:37℃20 min;85℃5 min;4℃保存。

### 六、RNA转录反应

(1)准备转录和RNA酶的混合反应液。(2)转移2 μl的PCR产物到一个新的384孔板,每个孔加入5 μl

表2 各组样本各个基因 CPG 岛甲基化的数量和概率

组别	例数	LMX1A (CPG = 31)		NKX6.1 (CPG = 15)		ONECUT1 (CPG = 26)		PAX-1 (CPG = 13)		SOX-1 (CPG = 35)		WT1 (CPG = 18)	
		CM	%	CM	%	CM	%	CM	%	CM	%	CM	%
正常对照组	20	2	6	2	13	2	8	3	23	6	17	3	17
CIN I 组	35	5 <sup>a</sup>	17	4 <sup>a</sup>	26	3 <sup>a</sup>	11	3 <sup>a</sup>	23	7 <sup>a</sup>	20	2 <sup>a</sup>	11
CIN III 组	45	6 <sup>a</sup>	20	7 <sup>b</sup>	47	4 <sup>a</sup>	15	6 <sup>b</sup>	46	19 <sup>b</sup>	54	9 <sup>b</sup>	50

注:CM:甲基化的 CPG 岛个数;与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P > 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$

的转录反应液。(3)封板、涡旋、离心。(4)转录反应步骤:37℃ 3 h;4℃ 保存。

#### 七、基因甲基化概率

用 Sequenom 质谱仪进行分析。

#### 八、统计学分析

数据采用 SPSS 10.0 软件处理,应用  $\chi^2$  检验方法进行统计学分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 石蜡包埋组织 DNA 提取及纯化结果:经消化法及 DNAmate 纯化后的石蜡组织 DNA 含量平均为 300 ng/ $\mu$ l, OD260/280 为 1.7~1.9。

2. Bisulfite 处理后 PCR 结果:见图 1。

3. 基因甲基化检测结果:见图 2。黄色代表甲基化程度为 0,蓝色代表甲基化程度为 100%,颜色越深甲基化程度越高。

从肉眼上观察对于同一个 CPG 岛,正常对照组和 CIN I 组颜色偏向黄色,CIN III 组颜色偏向蓝色。

4. 基因甲基化和宫颈 CIN 的关系:见表 2,图 3,4。

表 2 显示正常对照组、CIN I 组、CIN III 组 6 个基因中每个基因各个 CPG 岛的甲基化情况,经统计学分析后,LMX1A 基因和 ONECUT1 基因各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),其余 4 个基因正常对照组和 CIN I 组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),正常对照组和 CIN III 组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

图 3 中绿色代表正常对照组,蓝色代表 CIN I 组,橘色代表 CIN III 组;图示抑癌基因 LMX1A 和 ONECUT1 3 组间甲基化概率无统计学差异( $P > 0.05$ );抑癌基因 NKX6.1、PAX-1、SOX-1 和 WT-1 正常对照组和 CIN I 组甲基化概率无统计学差异( $P > 0.05$ ),而 CIN III 组与正常对照组和 CIN I 组均有统计学差异( $P < 0.05$ )。

图 4 中 X 轴代表 CIN III 组中 45 个样本每个样本在 NKX6.1、PAX-1、SOX-1、WT1 这 4 个基因中发生甲基化的情况,其中有 5 例样本在这 4 个基因中都没有发生甲基化;有 10 例样本在这 4 个基因中有任何 1 个基因发生甲基化;有 8 例样本在这 4 个基因中有任何 2 个基因发生甲基化;有 12 例样本在这 4 个基因中有任何

3 个基因发生甲基化;有 10 例样本这 4 个基因全部发生甲基化。

### 讨 论

1977 年德国人哈拉尔德·楚尔·豪森提出 HPV 病毒感染可引起 CIN 和宫颈癌,HPV 病毒是一种 DNA 病毒,共有 30 多种分型。宫颈组织感染 HPV 病毒后有两个转归方向:自然消退或发展为 CIN<sup>[7]</sup>。在各种致病因素的作用下,宫颈上皮在修复的过程中发生化生-非典型化生-上皮内肿瘤,在此连续发展过程中发生的宫颈上皮的病变称为 CIN,根据病变的严重程度分为 3 个级别,即 CIN I、CIN II、CIN III,其中 CIN I 和 CIN II 相当于宫颈上皮的轻度及中度不典型增生,CIN III 是宫颈上皮重度不典型增生或宫颈原位癌。随着人们对宫颈癌的认识的提高,对于宫颈 CIN 的关注也越来越多,最新的研究指出宫颈 CIN I、CIN II 为高级别的意义不明确的不典型鳞状上皮细胞病变(ASC-US),CIN I、CIN II 可以向两个方向转归:第一是自身修复,完全转归成未感染的状态;第二是进一步升级,到 CIN III。而当今的临床医师无法判断一个宫颈 CIN I、CIN II 的患者转归情况,本试验正为此提供有力的转归证据,以此来决定临床的治疗方法。

肿瘤(包括宫颈癌)是基因调控失调的结果,包括原癌基因的激活和抑癌基因的失活,若能通过基因检测发现原癌基因或抑癌基因的改变,则是肿瘤早期诊断的金标准,以宫颈癌来说不论其是否有 HPV 病毒的感染,最终导致细胞癌变的根本原因是基因的变化。基因失活的常见原因是基因发生甲基化<sup>[8]</sup>,有报道指出 DNA 甲基化改变常常在癌前病变中就已经发生<sup>[5,9]</sup>,Fowler 等<sup>[9]</sup>报道 DAPK1、RARβ 和 TWIST1 这 3 个基因在 CIN 中的甲基化情况,结果发现这 3 个基因在 CIN III 中都发生甲基化,并且至少有一个基因甲基化的程度达到 57%,在宫颈腺癌中可以达到 74%,而在 CIN I 中只有 5%。

Lai 等<sup>[4]</sup>指出宫颈癌的抑癌基因 SOX1、PAX1、LMX1A、NKX6-1、WT1、ONECUT1 在宫颈癌组织发生甲基化,概率分别为 81.5%、94.4%、89.9%、80.4%、77.8%、





图1 PCR电泳: W: WT1; S: SOX-1; P: PAX-1; O: ONECUT1; N: NKX6.1; L: LMX1A; M: MARKER。提取的DNA经Biosuffer处理后进行PCR, 途中显示为6个基因的电泳结果, 各个条带亮度适中, 位置正确

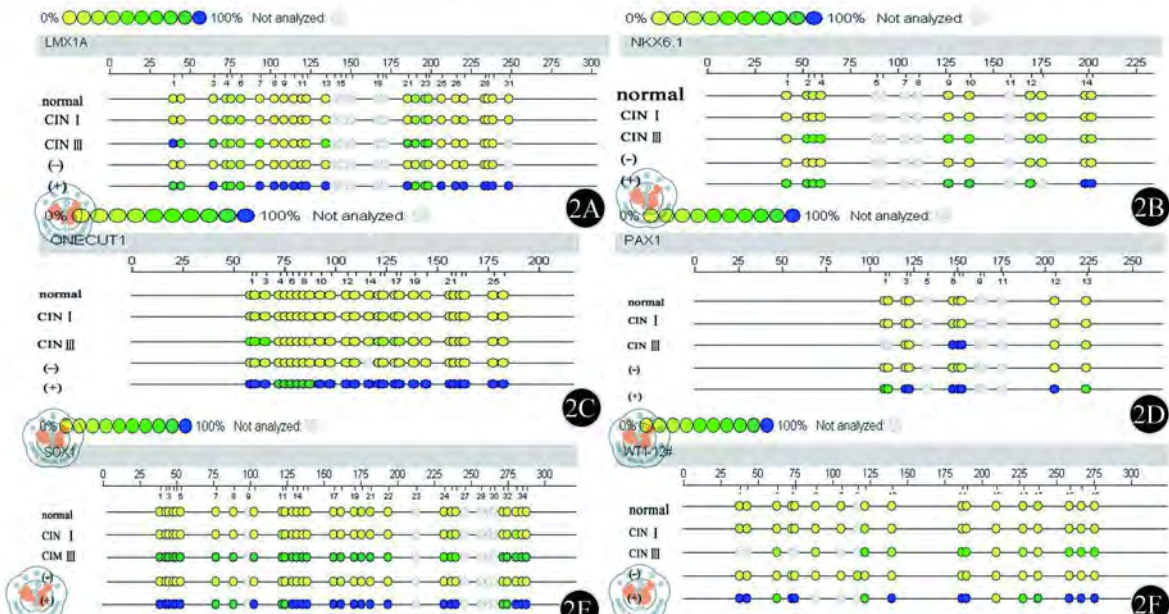


图2 各个基因CPG岛甲基化。2A: LMX1A; 2B: NKX6.1; 2C: ONECUT1; 2D: PAX-1; 2E: SOX-1; 2F: WT1; (-): 甲基化阴性对照; (+): 甲基化阳性对照

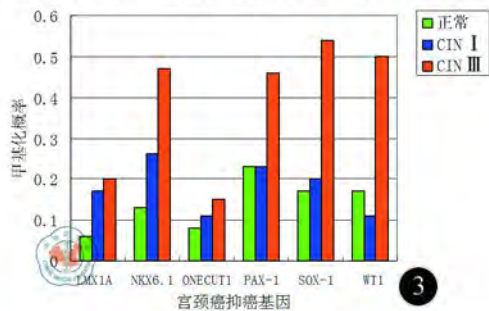


图3 各组抑癌基因甲基化概率

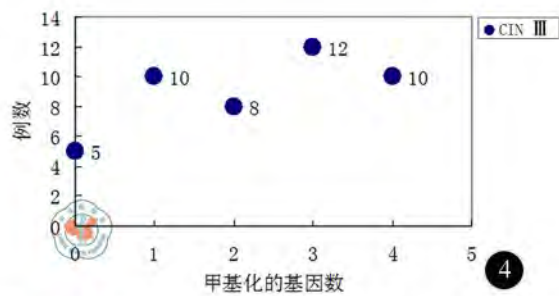


图4 CINIII样本组中样本的基因甲基化情况

20.4%, 而正常宫颈组织内这6个基因发生甲基化的概率为2.2%、0、6.7%、11.9%、11.1%、0, HPV和PAX1甲基化的联合检测检出率为80%, HPV单独检测检出率为66%, PAX1甲基化单独检测检出率高达

99%, 说明基因甲基化检测特异性高, 敏感性强, 适用于宫颈癌的早期诊断, 可以避免HPV检测带来的假阴性和假阳性。

我们的研究利用石蜡标本提取宫颈细胞DNA进

行 PCR 及 Sequenom 等一系列的检测,每个标本都是经过 2 名具有 5 年以上阅片经验的病理科主治医师确诊,从而保证了标本分级的准确性和可靠性,从图 1 可以看出这 6 个基因扩增后的 PCR 产物,得到了高亮度条带,且每个基因的长度都与表 1 中所列出的各个基因引物的长度相符,说明从石蜡标本中提取的 DNA 扩增的产物与我们的设计相符。

通过图 2 可以直观地看到各组样本各个基因的甲基化情况,黄色代表甲基化程度为 0,蓝色代表甲基化程度为 100%,从黄色到蓝色中间的过渡色中,颜色越深代表甲基化程度也越高。通过阴性对照和阳性对照,可以看出无论是正常组、CIN I 组、CIN III 组都有不同程度的甲基化,并且同一样本中各个 CPG 岛的甲基化情况也不尽相同,有的 CPG 岛甲基化为 0,而有的 CPG 岛甲基化为 100%,说明抑癌基因甲基化在各组别中是一个普遍存在的现象,只是甲基化程度存在差异。

表 2 所列出的的是各组样本各个基因 CPG 岛甲基化的数量和概率,正常宫颈组和 CIN I 组 6 个基因的 CPG 岛甲基化程度普遍低于 30%,而在 CIN III 组有 4 个基因(NKX6.1、PAX-1、SOX-1、WT1)的 CPG 岛甲基化程度在 50%左右,与正常宫颈组和 CIN I 级组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

图 4 所列出的的是 CIN III 样本组中样本基因甲基化情况,每个样本甲基化的基因也各有不同,其中只有 1 个基因发生甲基化的样本数占 21%;2 个基因发生甲基化的样本数占 18%;3 个基因发生甲基化的样本数占 29%;4 个基因全部甲基化的样本数占 21%。由此,我们认为对于 CIN 的患者,只要这 4 个基因(NKX6.1、PAX-1、SOX-1、WT1)中的一个发生甲基化且其甲基化程度  $> 45%$ ,则认为该患者发生宫颈癌变的概率较高。若 CIN 患者有 3 个以上(包括 3 个)基因发生甲基化且其甲基化程度  $> 45%$ ,则该患者迟早会发生宫颈癌变,应尽早进行有效治疗。同时我们发现在 CIN III 样品组中,有个别的样本对于所检测的这 6 个基因都没有发生甲基化,占总样本数的 10%,这部分阴性的结果提

示,是否还有其他的基因的参与,有待于我们今后做更深入的研究和探讨。

综上所述,本研究结果对于临床 CIN 的治疗时机以及治疗方式的确定和宫颈癌的早期诊断具有重要的意义,对于临床上 CIN I 期和 CIN II 期的患者,我们建议在检测 HPV 的同时,也检测 NKX6.1、PAX-1、SOX-1、WT1 这 4 个抑癌基因的甲基化程度。CIN I 期,若 4 个基因的甲基化程度全部  $< 45%$ ,则患者只需常规定期随访即可;若 4 个基因中任意一个基因的甲基化程度  $> 45%$ ,则病变有向更高级别进展的危险,建议密切随访。CIN II 期,若 4 个基因的甲基化程度全部  $< 45%$ ,建议患者定期随访即可;若 4 个基因中任意一个基因的甲基化程度  $> 45%$ ,则病变迟早会发展成 CIN III 期,建议患者采取有效的治疗措施防止病变的进展。

#### 参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistic. CA Cancer J Clin, 2011, 61: 69-90.
- [2] Franco EL. Viral etiology of cervical cancer: a critique of the evidence. Rev Infect Dis, 1991, 13: 1195-1206.
- [3] Arthur A, Axelrad MD. Gene, Chromosomes, and Antigens In the Evolution of Malignant Cell Populations. Canad Med Ass J, 1962, 86: 1153-1160.
- [4] Lai HC, Lin YW, Huang TH, et al. Identification of novel DNA methylation markers In cervical cancer. Int J Cancer, 2008, 123: 161-167.
- [5] Feng Q, Balasubramanian A, Hawes SE, et al. Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia. J Natl Cancer Inst, 2005, 97: 273-282.
- [6] Pikor LA, Enfield KS, Cameron H, et al. DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. J Vis Exp, 2011(49): 2763.
- [7] Walker BA, Morgan GJ. Could DNA methylation become a useful measure for multiple myeloma prognoses? Expert Rev Hematol, 2011, 4: 125-127.
- [8] Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? Genes Cancer, 2011, 2: 607-617.
- [9] Fowler BM, Giuliano AR, Piyathilake C, et al. Hypomethylation in cervical tissue; is there a correlation with folate status? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1998, 7: 901-906.

(收稿日期: 2012-05-04)

(本文编辑: 戚红丹)