

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01279

## NPTX2 甲基化在胰腺癌中的定量检测及诊断应用

曹 佳,高 军,杜奕奇,李兆申\*,龚燕芳,林 寒,宋 健,金 晶,吴洪玉

第二军医大学长海医院消化内科,上海 200433

**[摘要]** **目的:**检测 NPTX2 甲基化水平在胰腺癌中变化并评价其用于胰腺癌诊断的价值。**方法:**在 10 例胰腺癌组织和 10 例癌旁正常胰腺组织中,分别应用定量 RT-PCR 和 SYBR Green 荧光掺入甲基化特异性定量检测法检测 NPTX2 mRNA 表达量及 CpG 岛的甲基化量。应用上述建立甲基化特异性定量检测方法分析 NPTX2 甲基化在胰腺癌及健康志愿者全血 DNA 中的差异。**结果:**NPTX2 基因在胰腺癌组织中 mRNA 表达量低于癌旁正常胰腺组织 ( $RQ, 0.276 \pm 0.263$  vs  $3.526 \pm 3.037$ ,  $P=0.001$ ),而其甲基化指数(MI)较癌旁正常胰腺组织高 [ $(9.02 \pm 7.52)\%$  vs  $(1.28 \pm 0.98)\%$ ,  $P=0.003$ ]。 $RQ$  与  $MI$  两者之间存在负相关关系 ( $R=-0.552$ ,  $P=0.012$ )。NPTX2 基因  $MI$  在胰腺癌患者全血 DNA 中显著高于健康人 [ $(1.80 \pm 1.76)\%$  vs  $(0.84 \pm 0.45)\%$ ,  $P<0.05$ ]。**结论:**在胰腺癌组织中 NPTX2 发生高甲基化变化,检测其在临床样品中的  $MI$  可辅助用于胰腺癌诊断。

**[关键词]** 胰腺肿瘤;DNA 甲基化;NPTX2;CpG 岛

**[中图分类号]** R 735.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1279-05

### Quantitative analysis of NPTX2 hypermethylation in pancreatic cancer and its application in diagnosis of pancreatic cancer

CAO Jia,GAO Jun,DU Yi-qi,LI Zhao-shen\*,GONG Yan-fang,LIN Han,SONG Jian,JIN Jing,WU Hong-yu

Department of Gastroenterology,Changhai Hospital,Second Military Medical University,Shanghai 200433,China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the methylation level of NPTX2 gene in pancreatic cancer and assess its clinical value in diagnosis of pancreatic cancer. **Methods:** We detected the mRNA expression and methylation levels of NPTX2 gene by qRT-PCR and quantitative methylation with SYBR Green in 10 primary pancreatic carcinoma tissues and the matched adjacent normal tissues. The methylation levels of NPTX2 gene were then detected and compared using the above-mentioned method in the whole blood of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and healthy volunteers. **Results:** The relative quantification ( $RQ$ ) of NPTX2 expression in pancreatic carcinoma tissues was significantly lower than that in the adjacent tissues ( $0.276 \pm 0.263$  vs  $3.526 \pm 3.037$ ,  $P=0.001$ ). The result of quantitative methylation indicated that the methylation index ( $MI$ ) of the carcinoma tissues was significantly higher than that of the adjacent tissues ( $[9.02 \pm 7.52]\%$  vs  $[1.28 \pm 0.98]\%$ ,  $P=0.003$ ).  $MI$  of NPTX2 gene was negatively correlated with  $RQ$  value ( $R=-0.552$ ,  $P=0.012$ ). We also found that the  $MI$  of the whole blood DNA methylation of patients with pancreatic cancer was significantly higher than that of healthy volunteers ( $[1.80 \pm 1.76]\%$  vs  $[0.84 \pm 0.45]\%$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion:** Our findings strongly suggest that NPTX2 gene is aberrantly hypermethylated in pancreatic ductal adenocarcinoma. Detection of  $MI$  of NPTX2 gene might be of great value for diagnosis of pancreatic cancer.

**[KEY WORDS]** pancreatic neoplasms; DNA methylation; NPTX2; CpG islands

[Acad J Sec Mil Med Univ,2008,29(11):1279-1283]

胰腺癌是一种恶性程度很高的肿瘤,近年来其患病率在全球范围内呈上升趋势,在恶性消化道肿瘤中居第4位。目前外科手术切除是治愈胰腺癌的唯一方法,肿瘤完整切除的病例术后5年生存率为

20%~30%。因此敏感的早期诊断方法与行之有效的治疗手段成为有效治疗胰腺癌、改善预后的关键。本实验室前期研究致力于探索胰腺癌特异性肿瘤靶向分子,从而寻求胰腺癌诊断及治疗的方法<sup>[1-4]</sup>。

**[收稿日期]** 2008-04-03 **[接受日期]** 2008-06-07

**[基金项目]** 国家科技部支撑计划课题(2006BAI02A12)。Supported by the Key Technology R&D Program of Ministry of Science and Technology of China(2006BAI02A12)。

**[作者简介]** 曹 佳,博士。E-mail:jia-cao@yahoo.cn

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel:021-25070552,E-mail:zhsl@81890.net

随着表观遗传学的发展,发现 DNA 的高甲基化或低甲基化均可影响肿瘤相关基因的转录。近年的大量研究表明<sup>[5-7]</sup>,抑癌基因启动子区 CpG 岛甲基化程度的改变对肿瘤的发生发展起重要作用。启动子区 CpG 岛高甲基化使抑癌基因沉默失活,从而促进肿瘤的发生发展,抑癌基因启动子区 CpG 岛异常甲基化为肿瘤所特有,并且一些基因甲基化改变发生在肿瘤形成的早期阶段,因而有可能成为癌变早期的检测指标。在胰腺癌中,NPTX2 基因被发现其启动子区 CpG 岛发生异常高甲基化<sup>[8]</sup>,但能否作为早期诊断及判断预后的标志物尚无相关的研究。本课题研究了胰腺癌、癌旁胰腺组织中该基因的表达水平、甲基化水平及其相关性,并试用建立的 SYBR Green 荧光掺入甲基化特异性定量 PCR 方法对胰腺癌及健康志愿者的外周血全血 DNA 中该基因的甲基化程度进行了检测,为胰腺癌诊断打下一定的分子生物学基础。

## 1 材料和方法

1.1 组织标本 取自 2006 年 1~12 月第二军医大学长海医院胰腺外科手术切除标本,在手术切除病灶后用锋利刀片迅速切取原发肿瘤和(或)切缘癌旁正常组织各 1 块,立即冷冻于液氮中保存,取材时间不超过 10 min。所有胰腺癌经 H-E 染色病理学证实均为导管源性,并用冰冻切片进行粗分离。胰腺癌与胰腺癌旁组织各 10 例,胰腺癌组男性 5 例,女性 5 例,年龄 41~74 岁,中位年龄 63 岁;癌旁组男性 6 例,女性 4 例,年龄 12~64 岁,中位年龄 56 岁。

1.2 全血标本 取自 2006 年 6 月至 2007 年 1 月第二军医大学长海医院住院的 30 例胰腺癌患者,其中男性 18 例,女性 12 例,年龄 43~82 岁,中位年龄 64.5 岁。所有病例均有完整的临床资料,包括影像学检查、手术记录、术后病理学检查、B 超及内镜超声检查等。30 例胰腺癌患者入选病例的确诊标准是:恶性病变通过术后病理学检查或者术前穿刺细胞学检查明确发现癌细胞确诊;如果无术后病理学检查或细胞学检查未发现明确的癌细胞,通过影像学检查及随访资料确诊。28 例健康志愿者,其中男性 12 例,女性 16 例,年龄 20~57 岁,中位年龄 30.5 岁。

1.3 细胞系 SW1990 胰腺癌细胞系,购于美国 ATCC 公司,来源于一中度分化胰腺导管腺癌患者,其倍增时间为 64 h,具有局部浸润转移能力。

1.4 定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测

胰腺癌及癌旁胰腺组织中 NPTX2 基因的表达 应用 TRIzol 试剂(上海英骏生物技术有限公司)抽提胰腺组织、胰腺癌细胞株 RNA。按照 TIANScript M. MLV 逆转录酶(北京天根生化科技有限公司)说明书进行逆转录。应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(上海英骏生物技术有限公司合成),引物序列:NPTX2 上游 5'-CCT CCC ACT CCG CAC AAA C-3',下游 5'-CAC CGC ATA GGA GAA GGG G-3',扩增片段长度 133 bp; GAPDH 上游 5'-GGT GGT CTC CTC TGA CTT CAA CA -3',下游 5'-GTT GCT GTA GCC AAA TTC GTT GT -3',扩增片段大小 127 bp。运用 SYBR Green(日本 TOYOBO 生物有限公司)荧光掺入法利用 ABI 7500 Real Time PCR 仪(美国应用生物系统公司)进行 real-time PCR 反应,反应体系 25  $\mu$ l,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min;94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 40 个循环。利用 ABI 7500 Real Time PCR 仪得到 Ct 值,以胰腺癌细胞株 SW1990 作为比对,通过以下换算得到比值(RQ)。 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_T - \Delta Ct_S = (Ct_T - Ct_{TE}) - (Ct_S - Ct_{SE})$ , $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,式中 T 为待测样本,S 为 SW1990,E 为内参照。

1.5 甲基化特异性定量 PCR 检测组织、全血 DNA 中 NPTX2 基因的甲基化水平 以酚氯仿法抽提胰腺组织及全血 DNA,NanoDrop ND-1000 全波长紫外/可见光扫描分光光度计(NanoDrop Technologies 公司)测定 260 nm 与 280 nm 处光密度(D)比值,以此判定 DNA 纯度和含量。参照 EZ DNA Methylation-Gold Kit<sup>TM</sup>(北京天漠科技开发有限公司)说明书,将抽提的 DNA 进行亚硫酸氢盐处理。引用 Saito 等<sup>[8]</sup>研究中 NPTX2 基因的引物(上海英骏生物技术有限公司合成),引物序列:甲基化引物上游 5'-GAA AGG GCG CGC GGA TTC-3',下游 5'-CGC TAT CGT CTC GAA AAT CG-3',扩增片段大小 112 bp;非甲基化引物上游 5'-AAG AAA GGG TGT GTG GAT TTG-3',下游 5'-CCA CAC TAT CAT CTC AAA AAT-3',扩增片段大小 111 bp。分别取 2  $\mu$ l 亚硫酸氢盐处理后的 DNA 为模板,运用 SYBR Green 荧光掺入法进行甲基化引物与非甲基化引物的扩增,反应体系 25  $\mu$ l,反应条件同前。利用 ABI 7500 Real Time PCR 仪得到两组 Ct 值( $Ct_M$ 与  $Ct_U$ ),运用以下公式换算得到甲基化指数(MI):

$$\frac{U}{M} = 2^{-\Delta Ct} = 2^{Ct_M - Ct_U}$$

$$MI = \frac{M}{M+U} = \frac{1}{1 + \frac{U}{M}} = \frac{1}{1 + 2^{Ct_M - Ct_U}}$$

1.6 统计学处理 两组 NPTX2 基因 mRNA 表达水平(RQ)与甲基化水平(MI)成偏态分布、方差不齐,差异性分析采用 Mann-Whitney U 检验。所有统计学分析均应用 SPSS15.0 for Windows 软件,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 胰腺癌组织与癌旁组织 NPTX2 mRNA 的表达 NPTX2 基因在 10 例胰腺癌组织中有 2 例未测出 Ct 值,而 10 例癌旁胰腺组织均测得相应的 Ct 值,通过运算得到两组的 RQ 值,运用 Mann-Whitney U 检验,胰腺癌组织中 NPTX2 在 mRNA 水平上明显低于癌旁组织 ( $0.276 \pm 0.263$  vs  $3.526 \pm 3.037$ ,  $P = 0.001$ , 图 1)。

2.2 胰腺癌组织与癌旁组织 NPTX2 基因的甲基化水平 NPTX2 基因在胰腺癌组织组及癌旁组织组中甲基化特异性定量 PCR 检测的扩增曲线与熔

解曲线如图 2,均得到  $Ct_M$  与  $Ct_U$  值,通过数据转换得到两组的 MI。运用 Mann-Whitney U 检验,胰腺癌组织组中 NPTX2 基因的甲基化水平明显高于癌旁组织组 [ $(9.02 \pm 7.52)\%$  vs  $(1.28 \pm 0.98)\%$ ,  $P = 0.003$ , 图 3]。

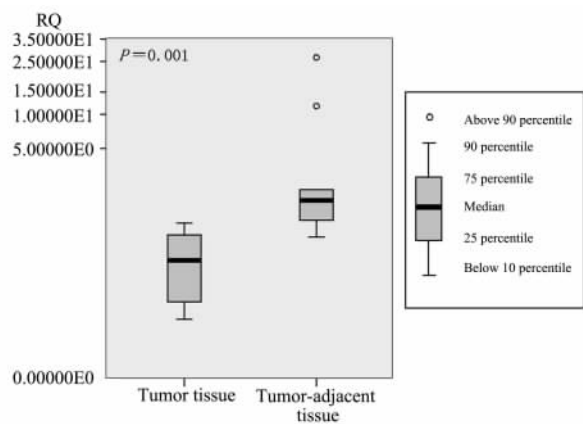


图 1 胰腺癌组织与癌旁组织 qRT-PCR RQ 值比较  
Fig 1 Comparison of RQ between pancreatic carcinoma tissues and adjacent tissues

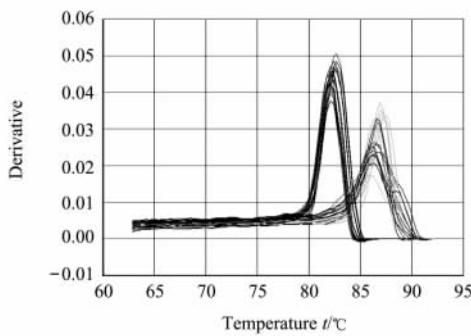
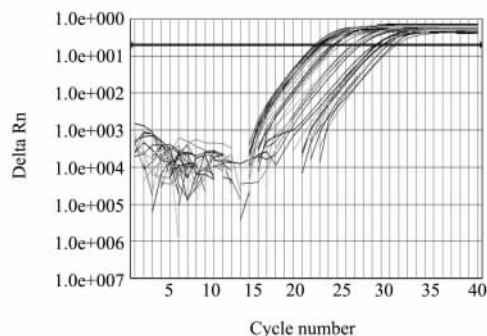


图 2 组织 DNA 甲基化定量 PCR 扩增曲线(A)和溶解曲线(B)

Fig 2 Amplification curve (A) and dissociation curve (B) in tissue DNA by quantitative methylation

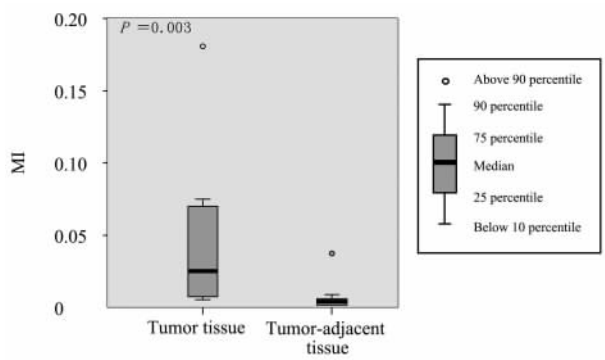


图 3 胰腺癌组织与癌旁组织  
甲基化特异性定量 PCR MI 的比较

Fig 3 Comparison of MI between pancreatic carcinoma tissues and adjacent tissues by quantitative methylation

通过 Spearman's 相关性分析,得到 RQ 与 MI 负相关,相关系数  $r = -0.552$ ,  $P = 0.012$ 。MI 中位数为 1.34%,以此中位数为分界点,将胰腺癌组织与癌旁组织按 MI 的大小分为两组,小于 1.34% 的 10 例为相对低甲基化组,大于 1.34% 的 10 例为相对高甲基化组,结果低甲基化组的 RQ 值大于相对高甲基化组(图 4)。

2.3 胰腺癌患者与健康志愿者全血 DNA 中 NPTX2 基因的甲基化水平 胰腺癌患者组及健康志愿者组的全血 DNA 应用甲基化特异性定量 PCR 检测的扩增曲线与溶解曲线如图 5,得到  $Ct_M$  与  $Ct_U$  值,通过数据转换得到两组的 MI,运用 Mann-Whitney U 检验,胰腺癌患者组中 NPTX2 基

因的甲基化水平高于健康人组 $[(1.80 \pm 1.76)\% \text{ vs } (0.84 \pm 0.45)\%]$ ,图 6]。

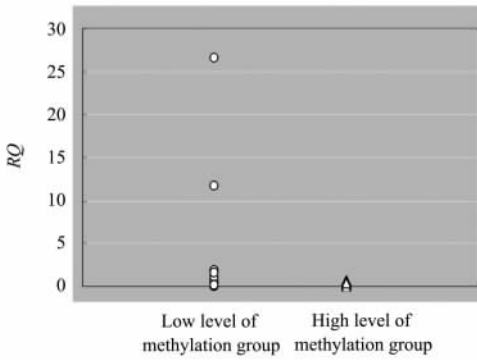


图 4 相对低、高甲基化组的 RQ 值比较

Fig 4 Comparison of RQ between 2 groups with different levels of methylation

### 3 讨论

目前应用最为普遍的检测 DNA 甲基化的方法为甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP),是由 Herman 等<sup>[9]</sup> 1996 年在使用重亚硫酸盐处理的基础上建立的一种方法。MSP 中设计两对引物分别与重亚硫酸盐处理后的序列互补配对,即一对结合处理后的甲基化序列,另一对结合处理后的非甲基化序列。如果用针对处理后甲基化 DNA 链的引物能扩增出片段,则说明该被检测的位点存在甲基化;若用针对处理后的非甲基化 DNA 链的引物扩增出片段,则说明被检测的位点不存在甲基化。此种方法尽管敏感性较高,但无法对检测样本进行量化,反应的循环数需根据样品及基因的不同进行调整。因此,2000 年 Eads 等<sup>[10]</sup> 提出甲基化

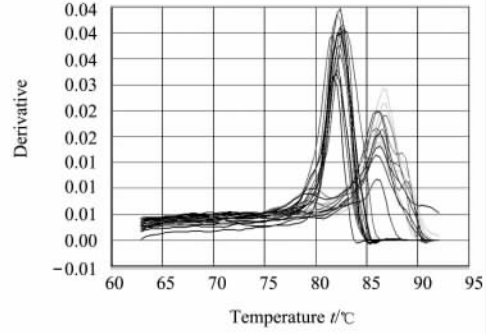
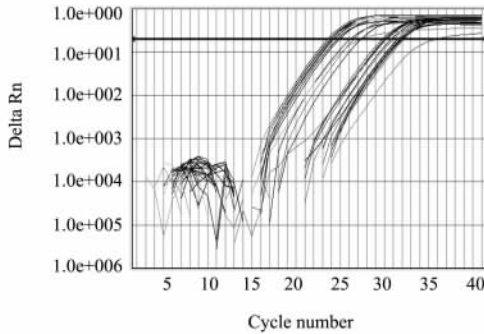


图 5 代表样品全血 DNA 甲基化定量 PCR 扩增曲线(A)和溶解曲线(B)

Fig 5 Amplification curve (A) and dissociation curve (B) in whole blood DNA samples by quantitative methylation

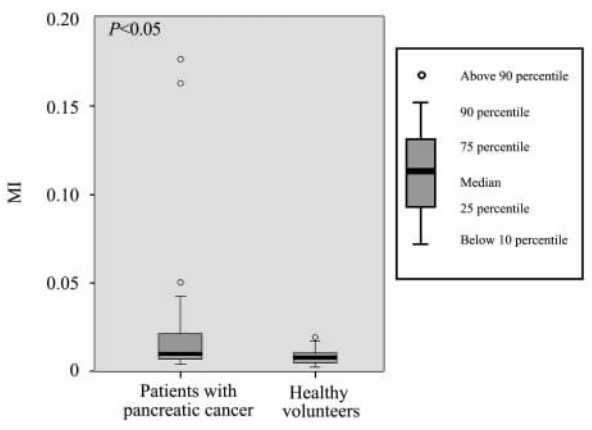


图 6 胰腺癌患者与健康志愿者全血 DNA 甲基化特异性定量 PCR 的甲基化检测比较

Fig 6 Comparison of whole blood DNA methylation between patients with pancreatic cancer and healthy volunteers by quantitative methylation

荧光法(methylight),它实现了甲基化的实时定量分析,也是将样品经重亚硫酸盐处理后,针对待测位点设计与甲基化序列互补的探针,通过测定该报告荧光信号的强弱即可判断出 DNA 的甲基化状况。此方法实现了甲基化定量检测,且无需电泳分离。但运用探针方法成本高,引物与探针需要进行匹配设计,难度较大。因此,本实验在甲基化荧光法原理基础上建立了 SYBR Green 荧光掺入甲基化特异性定量 PCR 方法,降低了实验成本,有助于推广。

NPTX2(Neuronal Pentraxin 2)基因位于 7 号染色体长臂(7q21.3-q22.1),是神经元五聚蛋白(Neuronal Pentraxin)家族中的成员,此家族目前由 NPTX1(Neuronal pentraxin 1)、NPTX2、NPTR(Neuronal Pentraxin receptor)三个成员组成<sup>[11]</sup>。Neuronal Pentraxin 家族与 C 反应蛋白等急性反应

蛋白同源,并且与神经突触的重塑相关<sup>[12]</sup>。NPTX2 基因在肿瘤发生发展过程中所起的作用尚未明了,但在 Sato 等<sup>[8]</sup>的研究中,通过 5Aza-dC 处理胰腺癌细胞株,筛查出 NPTX2 基因在处理后的 AsPC1、MiaPaCa2、PanC1 细胞株中表达量明显增加,提示 NPTX2 基因的表达抑制可能与胰腺癌的发生相关,且其机制可能与 DNA 高甲基化相关。本研究利用定量方法检测到 NPTX2 基因在胰腺癌组织中表达水平低于癌旁组织,并且甲基化水平高于癌旁组织,mRNA 表达水平与甲基化水平呈明显负相关,证实 NPTX2 基因的高甲基化参与胰腺癌的发生,但 NPTX2 基因调控胰腺癌发生的通路尚未清楚,仍需对其功能及相关信号通路进行进一步的研究。

由于外周血相对容易获得,所以部分对如食管癌、结肠癌等恶性肿瘤的研究表明对血清中 DNA 异常甲基化进行检测,可作为多种肿瘤的早期筛查的一种方法<sup>[13-14]</sup>。但对于胰腺癌患者外周血 DNA 中基因甲基化水平检测,国际上未有报道。血清中 DNA 含量较低,抽提方法成本高,且较为烦琐,本研究试用 SYBR Green 荧光掺入的甲基化特异性 PCR 方法对胰腺癌患者的外周全血 DNA 进行 NPTX2 基因的甲基化检测,并且得到结果显示胰腺癌患者组中 NPTX2 基因的甲基化水平高于健康人组,为今后作为胰腺癌的筛查提供了新的途径。但全血 DNA 中掺入了白细胞 DNA 的混杂因素,笔者认为血清 DNA 的甲基化水平应具有更高的特异性与敏感性,因此,对于胰腺癌血清中的 DNA 甲基化水平有待进一步的研究。

综上所述,本研究首次对胰腺癌组织中 NPTX2 基因的 mRNA 表达水平及甲基化程度进行了定量检测,证实了两者的相关性。更重要的是证实 NPTX2 基因在胰腺癌患者的外周全血 DNA 中可检测到相对高甲基化。尽管 NPTX2 基因参与胰腺癌发生的机制仍需进一步研究,但对其甲基化水平的检测为胰腺癌的早期诊断提供了思路。

#### [参考文献]

[1] Shao J, Zhang L, Gao J, Li Z, Chen Z. Aberrant expression of PTCH (patched gene) and Smo (smoothed gene) in human pancreatic cancerous tissues and its association with hyperglycemia[J]. *Pancreas*, 2006, 33: 38-44.

- [2] Gao J, Li Z, Chen Z, Shao J, Zhang L, Xu G, et al. Antisense Smo under the control of the PTCH1 promoter delivered by an adenoviral vector inhibits the growth of human pancreatic cancer[J]. *Gene Ther*, 2006, 13: 1587-1594.
- [3] Wang Y, Gao J, Li Z, Jin Z, Gong Y, Man X. Diagnostic value of mucins (MUC1, MUC2 and MUC5AC) expression profile in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration specimens of the pancreas[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121: 2716-2722.
- [4] 邵建国, 李兆申, 屠振兴, 高 军, 龚燕芳, 许爱芳, 等. 人胰腺癌 Hedgehog 信号转导途径中 PTCH 基因表达载体的构建[J]. *第二军医大学学报*, 2005, 26: 101-102.
- [5] Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones P A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy[J]. *Nature*, 2004, 429: 457-463.
- [6] Issa J P. CpG island methylator phenotype in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 988-993.
- [7] Laird P W. The power and the promise of DNA methylation markers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 253-266.
- [8] Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo C J, Cameron J L, et al. Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 3735-3742.
- [9] Herman J G, Graff J R, Myöhänen S, Nelkin B D, Baylin S B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 9821-9826.
- [10] Eads C A, Danenberg K D, Kawakami K, Saltz L B, Blake C, Shibata D, et al. Methylight, a high-throughput assay to measure DNA methylation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: E32.
- [11] Dodds D C, Omeis I A, Cushman S J, Helms J A, Perin M S. Neuronal pentraxin receptor, a novel putative integral membrane pentraxin that interacts with neuronal pentraxin 1 and 2 and taipoxin-associated calcium-binding protein 49 [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 21488-21494.
- [12] Bjartmar L, Huberman A D, Ullian E M, Rentería R C, Liu X, Xu W, et al. Neuronal pentraxins mediate synaptic refinement in the developing visual system[J]. *J Neurosci*, 2006, 26: 6269-6281.
- [13] Kawakami K, Brabender J, Lord R V, Groshen S, Greenwald B D, Krasna M J, et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92: 1805-1811.
- [14] Grady W M, Rajput A, Lutterbaugh J D, Markowitz S D. Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 900-902.

[本文编辑] 孙 岩