

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00842

DLEC1 基因在结直肠癌中的甲基化水平及临床意义

叶晓兵¹, 张有为², 陈龙邦^{2*}

1. 南京大学医学院研究生班, 南京 210008
2. 南京大学医学院临床学院(南京军区南京总医院)肿瘤内科, 南京 210002

[摘要] **目的** 检测 DLEC1 (deleted in lung and esophageal cancer 1) 基因在结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 患者组织和血清中的甲基化状态, 分析其临床意义。 **方法** 留取 71 例 CRC 患者癌组织、相应正常组织及术前血清标本, 20 例肠道良性病变及 20 例健康志愿者血清标本, 甲基化特异性聚合酶链反应 (MSP) 检测 DLEC1 基因启动子区域甲基化情况。 **结果** 71 例 CRC 组织中, DLEC1 基因启动子甲基化比例为 45.1% (32/71), 而正常组织为 7.1% (4/56), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); DLEC1 基因启动子甲基化与患者临床病理特征及 CEA、CA19-9 水平之间无相关性。相应 CRC 血清 DNA 中 DLEC1 甲基化比例为 39.4% (28/71), 而对照组为 2.5% (1/40), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 且血清 DNA 甲基化状况与组织中具有良好的的一致性。 **结论** DLEC1 基因启动子甲基化在 CRC 患者中有着较高的检出率, 可望成为 CRC 辅助诊断的新型分子标记。

[关键词] 结直肠肿瘤; DLEC1; DNA 甲基化; 生物学标记

[中图分类号] R 735.35 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0842-04

Methylation status of DLEC1 promoter in colorectal cancer patients and its clinical relevance

YE Xiao-bing¹, ZHANG You-wei², CHEN Long-bang^{2*}

1. Postgraduate Class, Medical College, Nanjing University, Naniing 210008, Jiangsu, China
2. Department of Medical Oncology, Jinling Hospital (General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command), Medical School of Nanjing University, Nanjing 210002, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To detect the methylation status of DLEC1 promoter in the tissue and serum of colorectal cancer (CRC) patients and to evaluate its clinical relevance. **Methods** Genomic DNA was extracted from the tissues (cancer tissue and corresponding adjacent normal tissue) and sera of 71 CRC patients; serum genomic DNA was also obtained from 20 patients with benign gastrointestinal diseases and 20 healthy donors. Promoter methylation status of DLEC1 gene was detected by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP). **Results** The incidence of aberrant methylation of DLEC1 promoter was 45.1% (32/71) in CRC tissues, which was significantly higher than that in the adjacent normal tissues (7.1%, 4/56) ($P < 0.001$). The hypermethylation status of DLEC1 was not correlated with the clinicopathological features and CEA/CA19-9 levels of CRC patients. Moreover, DLEC1 promoter methylation was also found in 28 of 71 (39.4%) CRC serum samples and only 1 (2.5%) of the other 40 cancer-free serum samples ($P < 0.001$); the methylation was in accordance with that in the tumor tissues. **Conclusion** Hypermethylation of DLEC1 promoter is frequently seen in CRC patients, suggesting it might be a promising biomarker for the early diagnosis of CRC.

[Key words] colorectal neoplasms; DLEC1; DNA methylation; biological markers

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(8):842-845]

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是我国常见的恶性肿瘤, 因早期症状不典型, 临床发现和治疗的患者多属中晚期。目前 CRC 的诊断主要依赖于影像及内镜检查, 寻求更为方便和敏感的血清肿瘤标志物成为研究的热点。其中, 循环 DNA (circulating DNA) 甲基化检测表现出良好的前景^[1]。

DLEC1 (deleted in lung and esophageal cancer 1) 基因是一个在肺癌、食管癌和肾癌中鉴定的新型候选抑癌基因^[2]。研究表明, DLEC1 可抑制多种肿瘤细胞的生长及致瘤性^[3-5], 并且在多种肿瘤组织, 包括结直肠癌中^[6]表达下调或缺失, 而启动子甲基化可能是 DLEC1 基因失活的主要机制。本实验以

[收稿日期] 2010-01-07 **[接受日期]** 2010-06-09

[作者简介] 叶晓兵, 硕士生, 副主任医师。E-mail: yexiaobing@esco.org.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 025-80860153, E-mail: chenlongbang@yeah.net

改良的甲基化特异性聚合酶链反应 (methylation specific PCR, MSP) 平行检测 CRC 患者组织和血清 DNA 中 DLEC1 基因甲基化情况, 并分析其与临床病理特征的关系, 旨在为 CRC 早期诊断和高危人群筛查寻找新的标记物。

1 材料和方法

1.1 标本 CRC 患者的手术标本和血清标本 71 例, 相应的活检组织标本 56 例(癌组织及癌旁 >5 cm 处正常组织, 部分患者正常组织缺如), 来源于 2007 年 11 月至 2008 年 8 月南京军区南京总医院普通外科、消化内科和肿瘤内科住院患者。所有患者均经病理检查确诊为腺癌, 并未行放射治疗或化学治疗。肿瘤分期依据第 6 版 TNM 分期系统, 细胞分化依据 Broders' 分级系统。同期匹配 20 例肠道良性病变(结肠炎、息肉)患者、20 例健康献血者的血清标本作为对照。血清收集方法为: 清晨空腹抽取静脉血 4~5 ml, 促凝管收集, 3 000×g 离心 10 min, 小心吸取上层血清约 2 ml, -80℃ 保存。患者 CEA 和 CA19-9 水平来自其常规生化检查报告, 由我院检验科提供。

1.2 DNA 提取 分别采用 QIAamp DNA Mini Kit 和 QIAamp Blood Mini Kit 试剂盒(德国 Qia-gen 公司)提取组织和血清 DNA。操作严格依照说明书进行。血清标本每次使用 200 μl, 最后以 50 μl 灭菌去离子水洗脱 DNA, -80℃ 保存。

1.3 亚硫酸氢盐修饰 采用 EZ DNA Methylation-GOLD Kit (D5006) 试剂盒(美国 Zymo Research)。组织 DNA 经分光光度计测定浓度后取 1 μg 进行修饰; 而血清 DNA 含量较少, 将上一步得到的 50 μl DNA 全部用于修饰。最后以 10 μl M-Elution Buffer 洗脱 DNA, -80℃ 保存。经此步后, DNA 序列中未甲基化的胞嘧啶(C)转变为尿嘧啶(U)。

1.4 甲基化特异性 PCR DLEC1 基因引物由上海英骏生物技术有限公司合成, 具体序列为: 甲基化

(M) 上游引物: 5'-GAT TAT AGC GAT GAC GGG ATT C-3'; M 下游引物: 5'-ACC CGA CTA ATA ACG AAA TTA ACG-3'; 未甲基化(U)上游引物: 5'-TGA TTA TAG TGA TGA TGG GAT TTG A-3'; U 下游引物: 5'-CCC AAC TAA TAA CAA AAT TAA CAC C-3', 扩增产物大小均为 193 bp^[7]。PCR 反应体系 25 μl, 其中 10×PCR buffer 2.5 μl (含 Mg²⁺, 终浓度 1.5 mmol/L), dNTP mixture 2.5 μl (终浓度 250 μmol/L), 上、下游引物各 2 μl (30 pmol), 修饰后的 DNA 模板 2 μl, 灭菌去离子水 10.85 μl, Taq 酶 0.15 μl (日本 TaKaRa 公司)。反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。取扩增产物 5 μl 行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统拍照。正常人外周血淋巴细胞 DNA 作为非甲基化阳性对照; 过量 CpG (Sss I) 甲基化酶(美国 New England Biolabs 公司)修饰的淋巴细胞 DNA 作为甲基化阳性对照, ddH₂O 代替 DNA 作为阴性对照。部分 MSP 产物进行直接测序验证(南京金思特生物公司)。

1.5 统计学处理 采用 SAS V8 软件进行统计分析。率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法, 检验水平(α)为 0.05。血清 DNA 甲基化与相应肿瘤组织甲基化情况的一致性检验采用 Kappa 检验。

2 结果

2.1 组织 DNA 中 DLEC1 甲基化检测 71 例 CRC 组织中, 32 例 DLEC1 基因启动子区域 CpG 岛发生异常的过度甲基化, 检出率为 45.1%, 而相应正常组织甲基化比例为 7.1% (4/56), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。典型 MSP 电泳结果如图 1 所示。其中, 病例 15 的癌组织(T)和病例 17 的正常组织(N)为不完全甲基化(视为甲基化)。测序结果进一步证实 MSP 的准确性(图 2)。

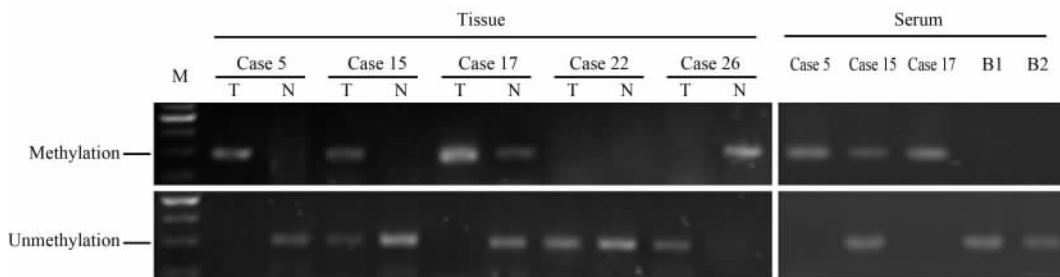


图 1 结直肠癌患者组织和血清 DNA 中 DLEC1 基因启动子甲基化检测结果

Fig 1 Methylation status of DLEC1 gene in matched tumor tissues and serum samples of CRC patients

T: CRC tumor tissue; N: Adjacent normal colorectal tissue; B: Benign colorectal diseases

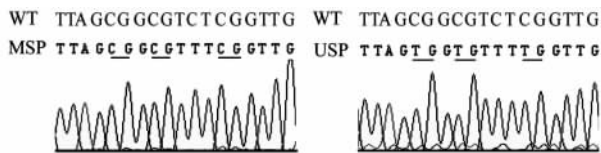


图2 DLEC1 基因 MSP 结果测序

Fig 2 MSP product of DLEC1 was directly sequenced and confirmed

Methylated cytosines (C) was not converted to uracil (T) and remained as C. WT: The wild-type DLEC1 gene sequence (shown here from nucleotides 19683-19701, GenBank accession number AP006309). MSP: Methylation; USP: Unmethylation

2.2 血清 DNA 中 DLEC1 甲基化检测 71 例 CRC 血清中, DLEC1 基因启动子甲基化比例为 39.4% (28/71), 而在 40 例非肿瘤对照组血清中, 仅 1 例为不完全甲基化 (2.5%), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。并且血清 DNA 甲基化与相应肿瘤组织甲基化情况有着良好的一致性 ($Kappa = 0.846$), 若以肿瘤组织甲基化情况为金标准, 血清 DNA 甲基化的敏感性为 84.4% (27/32), 特异性为 98.1% (52/53), 见表 1。

表 1 CRC 血清与相应肿瘤组织 DNA 中 DLEC1 甲基化的一致性

Tab 1 DLEC1 methylation in CRC sera was consistent with that in corresponding tumor tissues

DLEC1 methylation in CRC serum	DLEC1 methylation in CRC tissue		Kappa value
	Methylated	Unmethylated	
Methylated	27	1	0.846
Unmethylated	5	52	

2.3 DLEC1 启动子甲基化状态与临床病理特征的相关性 如表 2 所示, 肿瘤组织中 DLEC1 基因高甲基化与 CRC 患者的年龄、性别、肿瘤位置、分化程度、分期、淋巴结转移、远处转移以及血清 CEA、CA19-9 水平均无相关 ($P > 0.05$)。

3 讨论

DNA 甲基化是表观遗传学的一种调控机制, 高甲基化 (hypermethylation) 将引起抑癌基因表达下调甚至沉默, 进而导致肿瘤发生^[8]。由于 DNA 甲基化状态的改变常发生于遗传学改变之前^[9], 故早期检测到 CRC 特异性 CpG 岛甲基化改变可作为肿瘤发生的初期依据之一。

DLEC1 基因定位于染色体 3p22-p21.3^[2], 这是一个在肿瘤中经常发生基因缺失的区域。DLEC1 在大部分人类正常组织中表达, 而在肿瘤细胞及肿

瘤组织中表达下调或缺失。并且, 转染 DLEC1 基因到胃癌、结肠癌、肝癌、肺癌等细胞株中, 明显抑制细胞克隆形成及体内致瘤性^[2,5-6], 这些都表明 DLEC1 具有抑癌基因功能, 尽管其作用机制尚没有明确。进一步研究表明, 启动子高甲基化是导致 DLEC1 基因失活的重要原因, 在卵巢癌、鼻咽癌、肝癌、胃癌中都存在 DLEC1 的高频甲基化^[3-6]; 对肿瘤细胞株以去甲基化药物 5-氮杂胞苷 (5-aza-CdR) 处理, 可使 DLEC1 表达恢复^[3,10]。在结直肠癌中, Ying 等^[6]报道, DLEC1 异常甲基化在 29% (10/34) 的癌组织中存在, 而相应正常肠黏膜中则未检出 (0/17)。我们的结果也表明, 45.1% (32/71) 的 CRC 组织存在 DLEC1 高甲基化, 而相应正常组织为 7.1% (4/56), 差异有统计学意义, 但 DLEC1 甲基化与肿瘤分化、分期、淋巴结转移、远处转移等临床病理参数无相关性, 提示 DLEC1 甲基化可能是 CRC 发生中的早期事件。

表 2 DLEC1 基因高甲基化与 CRC 临床病理特征相关性分析

Tab 2 Association of DLEC1 hypermethylation with CRC clinicopathological features

Patients	No.	DLEC1 methylation		P value
		Methylation	Unmethylation	
Age (year)				
<60	40	16	24	0.329
≥60	31	16	15	
Sex				
Male	37	18	19	0.527
Female	34	14	20	
Tumor site				
Colon	43	19	24	0.534
Rectum	28	13	15	
Differentiation				
Well/moderately	44	21	23	0.566
Poorly/undifferentiated	27	11	16	
Stage				
I/II	33	14	19	0.676
III/IV	38	18	20	
Lymph metastasis				
No	36	15	21	0.559
Yes	35	17	18	
Distant metastasis				
No	57	24	33	0.311
Yes	14	8	6	
CEA ρ_B / (ng · ml ⁻¹)				
≥5.0 ng/ml	21	10	11	0.780
<5.0 ng/ml	50	22	28	
CA19-9 z_B / (U · ml ⁻¹)				
≥37	24	13	11	0.271
<37	47	19	28	

χ^2 test or Fisher's exact test

已知肿瘤患者外周血中存在一定数量的 DNA

(circulating DNA),含量远远高于正常人,其主要来源于肿瘤细胞的坏死或凋亡以及循环肿瘤细胞或微转移灶的裂解和增殖旺盛的肿瘤细胞所释放,且循环DNA具有肿瘤特征性的DNA改变^[11],可作为恶性肿瘤诊断、监测的指标。因此,我们平行检测CRC患者血清DNA中DLEC1甲基化状况,结果显示,28.2%(22/78)的血清标本中存在DLEC1基因高甲基化,而非肿瘤对照组仅为2.5%(1/40),差异具有统计学意义。这与之之前CRC血清/血浆中研究较多的一些甲基化位点,如p15^{INK4b}、p16^{INK4a}、APC、hMLH1、MGMT、RASSF1A等^[12-13]相比,敏感性和特异性都是令人满意的。同时,以PCR为基础的甲基化检测技术的高度灵敏性,以及最新的一些高通量检测手段的出现^[14],使其相对于目前临床上常用的以蛋白检测为基础的血清标记物,如癌胚抗原(CEA)、大分子糖蛋白抗原CA125、CA19-9等^[15],也具有一定优势。可见血清DLEC1甲基化检测有望成为CRC辅助诊断的新型分子标记。值得注意的是,血清DNA中DLEC1甲基化与相应CRC组织具有良好的一致性,更加肯定了其潜在的应用价值。我们也发现,DLEC1甲基化与升高的CEA、CA19-9水平无关,提示DLEC1甲基化检测可以作为传统血清标记物的补充。

[参考文献]

- [1] 高玉洁,张 伶.肿瘤循环核酸的提取检测及临床应用[J].生命的化学,2009,29:600-603.
- [2] Daigo Y,Nishiwaki T,Kawasoe T,Tamari M,Tsuchiya E,Nakamura Y. Molecular cloning of a candidate tumor suppressor gene,DL1,from chromosome 3p21.3[J].Cancer Res,1999,59:1966-1972.
- [3] Kwong J,Lee J Y,Wong K K,Zhou X,Wong D T,Lo K W,et al. Candidate tumor-suppressor gene DLEC1 is frequently down-regulated by promoter hypermethylation and histone hypoacetylation in human epithelial ovarian cancer[J].Neoplasia,2006,8:268-278.
- [4] Kwong J,Chow L S,Wong A Y,Hung W K,Chung G T,To K F,et al. Epigenetic inactivation of the deleted in lung and esophageal cancer 1 gene in nasopharyngeal carcinoma[J]. Genes

Chromosomes Cancer,2007,46:171-180.

- [5] Qiu G H,Salto-Tellez M,Ross J A,Yeo W,Cui Y,Wheelhouse N,et al. The tumor suppressor gene DLEC1 is frequently silenced by DNA methylation in hepatocellular carcinoma and induces G₁ arrest in cell cycle[J].J Hepatol,2008,48:433-441.
- [6] Ying J,Poon F F,Yu J,Geng H,Wong A H,Qiu G H,et al. DLEC1 is a functional 3p22.3 tumour suppressor silenced by promoter CpG methylation in colon and gastric cancers[J].Br J Cancer,2009,100:663-669.
- [7] Ayadi W,Karray-Hakim H,Khabir A,Feki L,Charfi S,Boudawara T,et al. Aberrant methylation of p16,DLEC1,BLU and E-cadherin gene promoters in nasopharyngeal carcinoma biopsies from Tunisian patients[J].Anticancer Res,2008,28(4B):2161-2167.
- [8] 腾丽娟,张长松,李 克.营养与肿瘤表观遗传学关系的研究进展——DNA甲基化机制[J].医学研究生学报,2008,21:95-97.
- [9] Kim H C,Roh S A,Ga I H,Kim J S,Yu C S,Kim J C. CpG island methylation as an early event during adenoma progression in carcinogenesis of sporadic colorectal cancer[J].J Gastroenterol Hepatol,2005,20:1920-1926.
- [10] Seng T J,Currey N,Cooper W A,Lee C S,Chan C,Horvath L,et al. DLEC1 and MLH1 promoter methylation are associated with poor prognosis in non-small cell lung carcinoma[J].Br J Cancer,2008,99:375-382.
- [11] Jahr S,Hentze H,Englisch S,Hardt D,Fackelmayer F O,Hesch R D,et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients:quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells[J].Cancer Res,2001,61:1659-1665.
- [12] Kim M S,Lee J,Sidransky D. DNA methylation markers in colorectal cancer[J].Cancer Metastasis Rev,2010,29:181-206.
- [13] Wang Y C,Yu Z H,Liu C,Xu L Z,Yu W,Lu J,et al. Detection of RASSF1A promoter hypermethylation in serum from gastric and colorectal adenocarcinoma patients[J].World J Gastroenterol,2008,14:3074-3080.
- [14] Rauch T A,Zhong X,Wu X,Wang M,Kernstine K H,Wang Z,et al. High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer [J].Proc Natl Acad Sci USA,2008,105:252-257.
- [15] Koike H,Ichikawa D,Ikoma H,Tani N,Ikoma D,Otsuji E,et al. Comparison of serum aberrant methylation and conventional tumor markers in gastric cancer patients[J].Hepatogastroenterology,2005,52:1293-1296.

[本文编辑] 孙 岩