

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.029.html

检测血浆中 p16 及 CDO1 基因甲基化在胶质瘤诊断中的价值

李显雄¹, 徐培坤¹, 李式浩¹, 胡光东², 邓鹏程¹, 杨成子¹

摘要 采用甲基化特异 PCR(MSP)法分别检测 49 例胶质瘤患者组织及其对应的术前血浆, 10 例颅脑外伤患者挫伤的脑组织及其对应的术前血浆和 16 例健康体检者血浆中 p16 及半胱氨酸双加氧酶 1(CDO1)基因的甲基化状态, 以探讨血浆中检测 p16 及 CDO1 基因甲基化在胶质瘤临床诊断中的价值。胶质瘤组织中 p16 及 CDO1 基因甲基化率分别为 53.1% (26/49)、42.9% (21/49), 对应的血浆甲基化率为 39.0% (19/49)、34.7% (17/49)。在肿瘤组织和血浆中 p16 及 CDO1 至少一个 [p16 和(或) CDO1] 基因甲基化的频率为 75.5% (37/49) 和 67.3% (33/49)。血浆中 p16 及 CDO1 基因(甲基化)联合检测胶质瘤的灵敏度为 67.3%, 较单基因检测的灵敏度明显提高。单因素分析显示术前患者血浆中 p16 和(或) CDO1 基因的甲基化与年龄、性别、肿瘤分级无关。对一些肿瘤特异基因的甲基化状态进行联合检测可提高胶质瘤在血清学诊断水平上的灵敏度, 为胶质瘤的筛查及早期诊断提供新的临床诊断思路。

关键词 DNA 甲基化; 胶质瘤; 早期诊断; p16 基因; CDO1 基因

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0593-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.029

神经胶质瘤是由神经外胚叶衍化而来的胶质细胞发生的一类原发性颅内恶性肿瘤的总称^[1]。其发病率及病死率均居所有颅内原发肿瘤之首^[2]。目前, 影像学检查和立体定向脑活检术是诊断胶质瘤的主要方法^[3-4]。但由于检查对技术和设备要求苛刻以及活检的高风险使得胶质瘤在人群中的筛查难以实施。然而早期诊断对于胶质瘤患者的临床治疗及预后改善尤为重要^[5-6]。如何利用无创、简便的手段有效地进行胶质瘤的筛查和早期诊断是神经外科迫切需要解决的问题之一。既往研究^[7]表明, 在表观遗传学水平上发生的 DNA 甲基化是抑癌基

因转录失活的重要原因之一, 属于肿瘤发生的早期事件。同时 p16 基因和半胱氨酸双加氧酶 1(cysteine dioxygenase 1, CDO1) 基因同属于肿瘤抑制基因, 其失活的方式主要通过启动子的甲基化。该研究采用甲基化特异 PCR(methylation-specific PCR, MSP) 技术, 探讨血浆中联合检测 p16 及 CDO1 基因甲基化在胶质瘤临床诊断中的价值。

1 材料与方法

1.1 标本收集 收集 2014 年 2 月~2016 年 2 月安徽医科大学第一附属医院神经外科收治的 49 例胶质瘤患者的肿瘤组织及该患者的术前血浆为病例组, 入组条件: ① 术前均未行化疗、放疗及立体定向放射等治疗; ② 术后经过病理学确诊为神经胶质瘤; ③ 无其他肿瘤病史。其中男 25 例, 女 24 例; 年龄 24~74 岁, 中位年龄 48 岁。另收集同期 10 例因颅脑外伤在本科室行去骨瓣减压术患者其无法还纳的挫伤坏死脑组织(且收集后确认患者无肿瘤病史和家族史)及其术前血浆以及同期 16 例健康体检者的血浆为对照组。其中颅脑外伤患者男 5 例, 女 5 例; 年龄 21~80 岁, 中位年龄 47.5 岁; 健康体检者性男 8 例, 女 8 例; 年龄 18~70 岁, 中位年龄 42.5 岁。胶质瘤及脑挫伤标本离体后一部分送往病理科确诊, 剩余部分立即放入液氮罐中送往 -80℃ 冰箱保存, 血液被抽取后提血清亦于 -80℃ 保存。本研究经过本院伦理委员会批准后实施, 研究开始前受试者或其委托人已签署相关知情同意书。

1.2 检测方法

1.2.1 病例组与对照组中组织和血清中 DNA 提取
① 切取 10 mg 的组织标本, 剪碎后放入冰水浴预冷的研钵中, 磨成匀浆。抽取血清标本 200 μl; ② 按 AxyPrep 基因组 DNA 试剂盒说明分别对组织和血清各个标本的 DNA 进行提取, 并应用紫外分光光度计检测提取的 DNA 含量和纯度。

1.2.2 对样本进行亚硫酸氢钠处理 准备 DNA 样品, 体积 20 μl, 总量约 500 ng, 根据 MethylCode™ Bisulfite Conversion Kit 试剂盒说明行亚硫酸氢钠修饰。

2016-12-26 接收

基金项目: 安徽省科技攻关计划项目(编号: 1301042208)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院神经外科, 合肥 230022

²安徽医科大学第四附属医院神经外科, 合肥 230013

作者简介: 李显雄, 男, 硕士研究生;

徐培坤, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xp-kayfy@163.com

1.2.3 对亚硫酸氢钠处理后的样本 DNA 行 PCR 扩增引物由上海 Invitrogen 公司设计, 具体引物序列见表 1。PCR 反应体系如下: 1 μ l 修饰后的 DNA; 上游及下游引物各 1 μ l; 50 mmol/L MgCl₂ 0.8 μ l; Platinum[®] Taq DNA 聚合酶 0.2 μ l; 10 mmol/L dNTP 混合液 0.5 μ l; 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l; 双蒸水 18 μ l, 总体积共 25 μ l。反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共循环 35 个周期; 72 $^{\circ}$ C 终末延伸 5 min。MSP 产物混合适当的上样缓冲液, 于 3.0% 琼脂糖凝胶电泳。p16 及 CD01 电泳图见图 1、2。

表 1 p16 及 CD01 基因的引物序列及扩展片段长度

基因	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
p16	M-F: TCGTCGTTGTGCTTTTCGTG	206
	M-R: AAACCTCCACCGACGATTATCT	
	U-F: GGGGTGTTTGTGTGTGTT	191
	U-R: ATCTCCTCCTCCTCAACCTA	
CD01	M-F: TTCGCGTAGGTTGTTCCTA	203
	M-R: CGCGAAAACGCAACCAAC	
	U-F: GTTTTGCTAGGTTGTTCCTA	191
	U-R: CAACAATCCCACCCCAATC	

M: 甲基化; U: 非甲基化

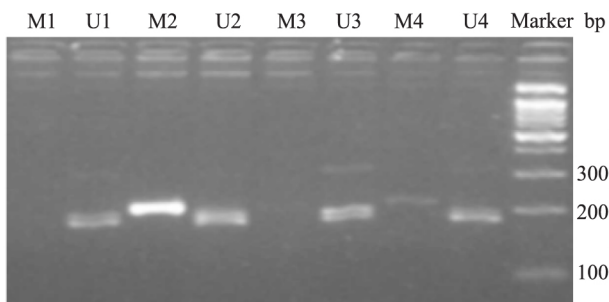


图 1 p16 基因相关 PCR 扩增产物电泳图

1、3: 分别为外伤患者脑挫伤组织及其对应血清; 2、4: 分别为胶质瘤患者肿瘤组织及其对应血清; M: 甲基化; U: 非甲基化

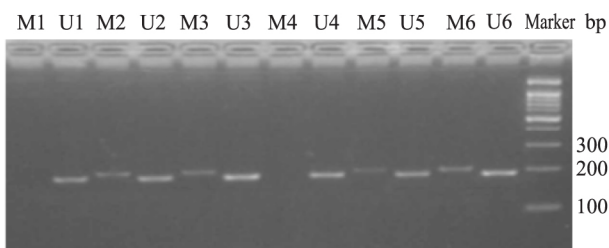


图 2 CD01 基因相关 PCR 扩增产物电泳图

1、4: 分别为外伤患者脑挫伤组织及其对应血清; 2、5: 分别为胶质瘤男性患者肿瘤组织及其对应血清; 3、6: 分别为胶质瘤女性患者肿瘤组织及其对应血清; M: 甲基化; U: 非甲基化

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 组间比较采用 χ^2 检验或校正 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。灵敏度 = 真阳性例数 / (真阳性例数 + 假阴性例数); 特异度 = 真阴性例数 / (真阴性例数 + 假阳性例数); 约登指数 = (灵敏度 + 特异度) - 1。

2 结果

2.1 病例组和对对照组各组的甲基化状态 胶质瘤组织中检测 p16 和 CD01 基因甲基化率分别为 53.1% (26/49) 和 42.9% (21/49), 对应的血浆两者检出率分别为 39.0% (19/49) 和 34.7% (17/49)。49 例胶质瘤组织中 p16 和(或) CD01(至少有一个基因)甲基化为 37 例, 甲基化率为 75.5%, 相对应的血浆 p16 和(或) CD01 基因甲基率 67.3% (33/49)。所有外伤患者的挫伤组织及其术前血浆和健康体检者血浆为未检出 p16 及 CD01 基因甲基化, 病例组与对照组之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。此外, 在胶质瘤组织中 p16 和(或) CD01 基因甲基化为阳性的 37 例患者中, 对应的血清检出 32 例为甲基化阳性, 而胶质瘤组织 p16 和 CD01 基因检测为阴性的 12 例患者中, 只有 1 例在血清中检测出甲基化阳性, 即 49 例患者的组织与血清中甲基化检出率的一致性较好 (Kappa 值 = 0.702)。

2.2 血清中 p16 及 CD01 甲基化单独或联合检测的灵敏度和特异度等相关统计学结果 与单个基因检测的相比, 两者联合检测的灵敏度明显上升, 见表 2。

表 2 p16 及 CD01 基因甲基化检测的相关统计学结果

基因	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	约登指数
p16	39.0	100.0	100.0	46.4	0.39
CD01	34.7	100.0	100.0	44.8	0.35
p16 和(或) CD01	67.3	100.0	100.0	61.9	0.67

2.3 p16 和(或) CD01 基因甲基化与胶质瘤的临床病理特征的关系 单因素分析显示术前患者血浆中 p16 和(或) CD01 基因的甲基化与年龄、性别、肿瘤分级无关, 见表 3。

3 讨论

Wakabayashi et al^[8] 在胶质瘤患者的血清及肿瘤组织中发现 p16 基因处于高甲基化状态是普遍发生的现象。Brait et al^[9] 研究得出在不同肿瘤组织

表3 p16 和(或) CDO1 基因甲基化与胶质瘤的临床病理特征的关系(n)

项目	n	组织				n	血清			
		M	U	χ^2 值	P 值		M	U	χ^2 值	P 值
性别				1.577	0.212				1.253	0.263
男	25	17	8			25	15	10		
女	24	20	4			24	18	6		
年龄(岁)				1.181	0.277				0.850	0.375
≤45	23	19	4			23	17	6		
>45	26	18	8			26	16	10		
肿瘤分级				0.166	0.684				0.085	0.771
低级别(I ~ II 级)	20	14	6			20	13	7		
高级别(III ~ IV 级)	29	23	6			29	20	9		

中 CDO1 基因也都存在异常的高甲基化,并表现其相应信使 RNA 和蛋白质表达下调。与此同时,研究^[10-11]显示恶性肿瘤患者外周血中的 DNA 碎片含量较高,这些循环于外周血中的 DNA 多起源于凋亡或坏死的肿瘤细胞,一些特异基因启动子常常被检测出处于高甲基化状态,并且这种状态的改变总伴随于肿瘤细胞内的抑癌基因的甲基化改变而发生,同时在遗传特性上的两者变异是一致的。因此,检测外周血中相关特异性基因是否发生甲基化给恶性肿瘤的早期诊断提供了可能。

本研究通过 MSP 法检测 p16 及 CDO1 在胶质瘤和脑挫伤组织中甲基化状态,显示胶质瘤组织中 p16 及 CDO1 和脑挫伤组织中其甲基化率分别为 53.1% (26/49)、42.9% (21/49) 和 0 (0/10)、0 (0/10)。这一结果与文献报道 p16 基因^[8]及 CDO1 基因^[12]在胶质瘤中处于高甲基化状态相一致,反映出 p16 和 CDO1 基因甲基化在胶质瘤发生发展中可能起着重要作用。

通过检测胶质瘤患者血清中 p16 及 CDO1 基因甲基化得出两者甲基化率分别为 39.0%、34.7%,同时 p16 和(或) CDO1 基因甲基化率为 67.3%。与单个基因检测的相比,两者联合检测的灵敏度明显上升,而在对照组的组织和血浆中未检测到两者甲基化,提示特异度 100%。因此在胶质瘤中 p16 和 CDO1 单基因的甲基化检测的意义是有限的,联合检测提高了检出的灵敏度,减少漏诊,具有更高的诊断价值。

单因素分析显示术前患者血浆中 p16 和(或) CDO1 基因的甲基化与年龄、性别、肿瘤分级之间差异无统计学意义。但是联合检测的结果不论在组织中还是血浆中,女性患者的甲基化率均高于男性,虽差异无统计学意义。究其原因可能有:①与 CDO1 基因在女性患者中高甲基化率有关^[12];②研究为

联合检验,属平行检验(并联检验)。因此这种差异是否存在还需下一步大样本的临床研究支持。

在胶质瘤组织中 p16 和(或) CDO1 基因甲基化为阳性的 37 例患者中相应的血清有 32 例检测出甲基化,而胶质瘤组织 p16 和 CDO1 基因检测为阴性的 12 例患者中,只有 1 例在组织中检测出甲基化阳性。分析这例患者只检测出血清中 p16 基因甲基化,而组织中未检测到该基因甲基化可能是因为收集标本时得到组织量过少,导致相应的甲基化修饰的 DNA 含量少,出现了组织学中“假阴性”的结果。同时,在一部分患者肿瘤组织中未能检测到两者处于甲基化状态,分析原因:可能与取样较少或肿瘤发生其他生物学改变(包括其他位点基因启动子甲基化)等有关,这有待下一步继续研究。

在统计资料时,本研究显示收集的 49 例病例中肿瘤的病理级别基本上以 WHO II 级以上的标本为主,而胶质瘤 WHO I 级的患者标本几乎没有,这可能与 WHO I 级本身发病率以及患者症状不典型和神经系统检查多正常而难以早期发现有关。但值得注意的是若是漏诊了低级别肿瘤的存在且不采取任何有效的临床干预,肿瘤会继续成浸润式的快速生长并侵袭更多有功能的正常脑组织^[5],甚至有可能进一步去分化为高级别胶质瘤^[6]。多基因联合甲基化检测提高了检测的灵敏度,这或许给 WHO I 级胶质瘤早期诊断开辟新的思路,但这还需要后期大样本、多中心的研究以及循证医学资料的支持。

在方法学方面,研究^[13-14]及实践表明 MSP 法检测 DNA 甲基化是一种简单、精确、高效、价格适中的检测方法。首先,在肿瘤细胞及其相应的正常细胞中,对完全相反状态(纯合甲基化或去甲基化)的靶基因, MSP 法能够从多达 10^4 个正常细胞中检测出 1 个肿瘤细胞。其次与定量性表达性指标相比, DNA 甲基化(为定性指标)状态不易受患者体内非

肿瘤因素的影响,使得对肿瘤样品中非肿瘤细胞污染有高度的抗性。因此,通过 MSP 法检测 DNA 甲基化给胶质瘤早期诊断提供了一种可靠的临床检测路径。

综上所述,联合检测血清中 DNA 甲基化在胶质瘤诊断中具有深远的意义,同时血清标本极易获得,这又使被检人群具有良好的依从性。可以预见是随着更多胶质瘤中异常甲基化的基因被发现以及胶质瘤 DNA 甲基化谱^[14]的进一步完善,联合检测 DNA 中的甲基化改变可能为胶质瘤的分类、早期诊断、复发监测、疗效评价和预后判断提供重要的临床价值。

参考文献

- [1] 中华医学会. 临床诊疗指南神经外科学分册(2012版) [M]. 北京:人民卫生出版社,2013:30.
- [2] Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas [J]. *Acta Neuropathol* 2005, 109(1): 93-108.
- [3] Landy H J, Lee T T, Potter P, et al. Early MRI findings in high grade glioma [J]. *J Neurooncol* 2000, 47(1): 65-72.
- [4] 刘宗惠,于新,陈琳,等. 影像学引导的立体定向脑活检手术 [J]. *中华神经外科杂志*, 2004, 20(2): 156-8.
- [5] Yamini B, Sikorski C W. Surgery for low-grade gliomas: current evidence and controversies [J]. *Expert Rev Neurother* 2005, 5(6 Suppl): S13-9.
- [6] Keles G E, Lamborn K R, Berger M S. Low-grade hemispheric gliomas in adults: a critical review of extent of resection as a factor influencing outcome [J]. *J Neurosurg*, 2001, 95(5): 735-45.
- [7] 张丽丽,吴建新. DNA 甲基化-肿瘤产生的一种表观遗传学机制 [J]. *遗传*, 2006, 28(7): 880-5.
- [8] Wakabayashi T, Natsume A, Hatano H, et al. p16 promoter methylation in the serum as a basis for the molecular diagnosis of gliomas [J]. *Neurosurgery* 2009, 64(3): 455-61.
- [9] Brait M, Ling S, Nagpal J K, et al. Cysteine dioxygenase 1 is a tumor suppressor gene silenced by promoter methylation in multiple human cancers [J]. *PLoS One* 2012, 7(9): e44951.
- [10] Jahr S, Hentze H, Englisch S, 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(4): 1659-65.
- [11] Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, et al. The origin and mechanism of circulating DNA [J]. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 906: 161-8.
- [12] 杨成子,徐培坤,王斌,等. 脑胶质瘤组织与血清 CDO1 基因启动子甲基化状态研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(6): 846-50.
- [13] Herman J G, Graff J R, 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.
- [14] 朱景德. DNA 甲基化及其在肿瘤分子诊断中的前景 [J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(7): 679-83.

The value of detecting p16 and *CDO1* genes methylation in the diagnosis of glioma in plasma

Li Xianxiong, Xu Peikun, Li Shihao, et al

(Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Methylation-specific polymerase chain reaction was used to detect the methylation statuses of gene p16 and gene *CDO1* from 49 patients with glioma tissues and their corresponding preoperative plasma, 10 patients with craniocerebral brain tissues their corresponding preoperative plasma, as well as 16 samples of plasma from healthy subjects, respectively, in order to investigate the value of the methylation detection of gene p16 and gene *CDO1* from plasma in the clinical diagnosis of glioma. For glioma tissues, the methylation rates of gene p16 and gene *CDO1* were 53.1% (26/49) and 42.9% (21/49), respectively, while the methylation rates of the corresponding plasma were 39.0% (19/49) and 34.7% (17/49), respectively. As for tumor tissues and plasma, the frequencies for methylation of gene p16 and/or gene *CDO1* were 75.5% (37/49) and 67.3% (33/49). The joint detection of the methylation of gene p16 and gene *CDO1* in the plasma for the sensitivity of glioma was 67.3%, an obvious improvement compared with single gene detection. In addition, a univariate analysis showed that the methylation of gene p16 and gene *CDO1* from the preoperative plasma had no significant correlation with the patient's age, sex or tumor grade. Therefore, we draw a conclusion that a joint detection of the methylation status of some specific tumor genes can improve the sensitivity of glioma at the serological diagnosis level, which may provide new clinical thoughts for screening and early diagnosis of glioma.

Key words methylation; glioma; early diagnosis; p16; *CDO1*