

# 巢式甲基化特异性 PCR 检测肝细胞癌患者血清中 *RASSF1A* 和 *CDH13* 基因启动子区甲基化

龚环宇, 刘振国, 张浩晔

(中南大学 湘雅三医院 感染科, 中国湖南 长沙 410013)

**摘要:** 为了检测肝细胞癌患者血清中 *RASSF1A* 和 *CDH13* 基因启动子的甲基化状态, 收集肝细胞癌患者及健康对照者的血清标本, 采用巢式甲基化特异性 PCR (nMSP) 法检测 *RASSF1A* 和 *CDH13* 基因启动子区甲基化状态。结果肝细胞癌患者血清样品中 *RASSF1A* 和 *CDH13* 基因启动子区甲基化率为 53.12% 和 31.25%, 68.75% 的患者血清可以检测到异常甲基化, 正常对照血清中未检测到 *RASSF1A* 和 *CDH13* 基因启动子区甲基化, *RASSF1A* 和 *CDH13* 基因甲基化与患者的临床病理资料无明显相关性 ( $P>0.05$ ); 表明 nMSP 法检测血清中 *RASSF1A* 和 *CDH13* 基因启动子区甲基化具有较高的敏感性, 可为肝细胞癌的筛查、早期诊断和预后判断提供有价值的信息。

**关键词:** 肝细胞癌; 甲基化; *RASSF1A* 基因; *CDH13* 基因; 巢式甲基化特异性聚合酶链反应

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)01-0056-05

## Detection of Promoter Hypermethylation of *RASSF1A* and *CDH13* Gene by Nested Methylation Specific Polymerase Chain Reaction in Hepatocellular Carcinoma Patients

GONG Huan-yu, LIU Zhen-guo, ZHANG Hao-ye

(Infection Section, The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, Hunan, China)

**Abstract:** To evaluate the methylation status of the promoter region of *RASSF1A* and *CDH13* gene using serum samples from hepatocellular carcinoma (HCC) patients, nested methylation-specific PCR (nMSP) was used to detect *RASSF1A* and *CDH13* promoter hypermethylation in serum DNA from 32 cases of HCC, while serum samples from 20 healthy individuals were used as controls. The positive rate of promoter hypermethylation in *RASSF1A* and *CDH13* gene were 53.12% and 31.25% in the serum of HCC patients. Overall, 68.75% patients with HCC can be detected with promoter hypermethylation in serum DNA. No aberrant promoter methylation was detected in the controls. Clinical data including age, sex, HBV, levels of AFP, clinical stages, invasion and metastasis showed no correlation with aberrant methylation of *RASSF1A* and *CDH13* ( $P>0.05$ ). The data showed that it is sensitive for nMSP to detect the aberrant methylation in the promoter of *RASSF1A* and *CDH13* gene in HCC. The detection of *RASSF1A* and *CDH13* gene promoter hypermethylation in the serum of HCC patients can give useful information for the screening, early diagnosis, and prediction of prognosis of HCC.

**Key words:** hepatocellular carcinoma; hypermethylation; *RASSF1A*; *CDH13*; nested methylation-specific PCR

(Life Science Research, 2011, 15(1): 056-060)

收稿日期: 2010-04-02; 修回日期: 2010-09-20

基金项目: 湖南省卫生厅科研基金资助项目(BD006090)

作者简介: 龚环宇(1967-), 男, 湖南安化人, 中南大学湘雅三医院副教授, 博士, 主要从事肝脏病学方面的研究, E-mail: gonghy2005@126.com; 张浩晔(1975-), 女, 湖南邵东人, 中南大学湘雅三医院主治医师, 主要从事感染病学研究, E-mail: zhanghh@yahoo.com.

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌的主要类型,也是我国高发肿瘤之一。基因启动子区 CpG 岛异常甲基化是肿瘤细胞中抑癌基因失活的重要机制之一。研究发现肝细胞癌的发生、发展过程中涉及多个抑癌基因启动子区异常甲基化,包括 P16、RASSF1A、APC、RIZ1 等,并且这种异常甲基化在肝癌发生的早期就能检测到,是一种新的肿瘤分子标志物<sup>[1,2]</sup>。RASSF1A 基因启动子区 CpG 岛异常甲基化是该基因转录失活的主要原因<sup>[3,4]</sup>,在 HCC 患者肝癌组织中 RASSF1A 基因启动子区 CpG 岛异常甲基化阳性率高达 80%以上,但在血清/血浆中却较低<sup>[5,6]</sup>。张志发、Chan Dw 等<sup>[7,8]</sup>的研究结果表明,在 HCC 中 CDH13 启动子区 CpG 岛甲基化是 CDH13 基因失活的主要机制,而国内外关于 HCC 患者血清中 CDH13 基因甲基化的状态还未见报导。本研究采用改进的巢式甲基化特异性 PCR(nMSP)检测 HCC 患者血清中 RASSF1A 和 CDH13 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态,分析 RASSF1A 和 CDH13 基因甲基化状态与肝细胞癌患者临床病理特征的关系,探讨其在肝细胞癌的诊断中的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本

HCC 患者 32 例来自 2008 年 10 月~2009 年 10 月在我院肿瘤科、感染科、普外科诊治的患者,男性 25 例,女性 7 例;平均年龄 56.6 岁;其中 HBV 阳性 28 例;血清 AFP 检测结果按  $<400 \mu\text{g/L}$ ,  $\geq 400 \mu\text{g/L}$  分 2 组;按肝癌 TNM 分期: I~II 期 24 例、III~IV 期 8 例;全部病例均经组织病理学证实,手术或放化疗前收集患者血液标本 5 mL。正常对照组血清来自 20 名健康体检者。

### 1.2 试剂盒和试剂

主要试剂: QIAamp Blood Mini kit(德国 Qiagen 公司), EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research Orange, CA), dNTP、蛋白酶 K、RNaseA、LA Taq DNA 聚合酶(Takara 公司产品), DL2000 DNA ladder (北京博大泰克公司产品), Tris 碱、琼脂糖及酚、氯仿(美国 Sigma 公司)。PCR 引物序列见实验方法,引物由上海博尚生物技术有限公司合成。DMEM 培养基购自 Gibco 公司;无支原体小牛血清,杭州四季青生物工程公司产。

### 1.3 DNA 的提取和定量

血清中游离 DNA 的提取:取 600  $\mu\text{L}$  血清严格按照 QIAamp Blood Mini kit 说明书进行提取。HepG2 细胞 DNA 的提取:按常规方法复苏肝癌细胞株 HepG2,含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液培养,胰蛋白酶消化传代收集细胞,并以酚-氯仿抽提法提取 DNA。正常人外周血淋巴细胞 DNA 的提取:以淋巴细胞分离液分离获得淋巴细胞,用酚-氯仿抽提法提取淋巴细胞 DNA。所有提取的血清 DNA 和细胞 DNA 均测定  $A_{260}/A_{280}$  比值并定量后,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

### 1.4 DNA 的修饰与纯化

血清中来源于肿瘤细胞的 DNA 经过亚硫酸氢钠修饰, CpG 中未甲基化的胞嘧啶被转变为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则不发生变化。用 EZ DNA Methylation-Gold Kit 试剂盒修饰与纯化已提取的血清 DNA 及细胞 DNA,具体操作按说明书进行。

### 1.5 nMSP 扩增及凝胶电泳分析

用于 nMSP 扩增 RASSF1A 和 CDH13 基因引物序列见表 1, PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ : 包含 10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$  (含  $\text{Mg}^{2+}$ ), 2.5 mmol/L 的 dNTP 2.0  $\mu\text{L}$ , LA Taq DNA 聚合酶 0.3  $\mu\text{L}$ , 10 pmol/L 的外侧引物各 0.8  $\mu\text{L}$ , 亚硫酸氢钠修饰后的模板 DNA 2.0  $\mu\text{L}$ , 用去离子水定容至 25  $\mu\text{L}$ , 外侧 PCR 循环参数: 95  $^\circ\text{C}$  8 min, 1 个循环; 94  $^\circ\text{C}$  30 s, 按表 1 所列退火温度退火 35 s, 72  $^\circ\text{C}$  35 s 35 个循环; 72  $^\circ\text{C}$  5 min。第二轮 PCR 用甲基化和非甲基化内侧引物分别扩增(引物序列见表 1), 25  $\mu\text{L}$  PCR 体系包含 10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$  (含  $\text{Mg}^{2+}$ ), 2.5 mmol/L 的 dNTP 2.0  $\mu\text{L}$ , LA Taq DNA 聚合酶 0.3  $\mu\text{L}$ , 10 pmol/L 的甲基化和非甲基化上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 外侧 PCR 的扩增产物 1.0  $\mu\text{L}$ , 用去离子水定容至 25  $\mu\text{L}$ , 内侧 PCR 循环参数: 95  $^\circ\text{C}$  5 min, 1 个循环; 94  $^\circ\text{C}$  30 s, 按表 1 所列退火温度退火 30 s, 72  $^\circ\text{C}$  40 s, 32 个循环, 72  $^\circ\text{C}$  延伸 10 min。用肝癌细胞株 HepG2 的 DNA<sup>[8,9]</sup>及正常人外周血淋巴细胞 DNA 作为甲基化阳性对照和非甲基化阳性对照,以等量去离子水作空白对照。最后取 10  $\mu\text{L}$  PCR 产物经 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色,于凝胶成像系统下观察结果。

### 1.6 统计学分析

统计软件采用 SPSS 软件包进行统计学分

析,率的比较采用 $\chi^2$ 检验或 Fisher 精确概率法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 *RASSF1A* 和 *CDH13* 引物序列、退火温度及扩增片段大小

Table 1 Primer sequences, annealing temperature and amplified fragment size of *RAASF1A* and *CDH13*

Gene	Sense	Anti-sense	Annealing/( $t \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$ )	Length/bp
RASSF1A-F	AGGAGGGAAGGAAGGGTAAG	TAACTTTAAACACTAACAAAC	52	207
RASSF1A-M	GGGTTTTGCGAGAGCGCG	GCTAACAAACGCGAACCG	51	169
RASSF1A-U	GGTTTTGTGAGACTGTGTTTAG	CACTAACAAACACAAACCAAAC	60	169
CDH13-F	TTGAAAAGTGAATTAGTTGGTAT	CTCTTCCCTACCTAAAACAAAAAAC	52	410
CDH13-M	TCGCGGGGTTTCGTTTTTCGC	GAGGTTTTTCATTCATACACGCG	60	243
CDH13-U	TTGTGGGGTTTGTTTTTTGT	AACATTTTCATACACACA	60	243

## 2 结果

### 2.1 血清 *RASSF1A* 和 *CDH13* 基因启动子区甲基化检测结果

本研究采用 nMSP 法检测肝细胞癌病人血清中 *RASSF1A*、*CDH13* 基因的甲基化状态。首先用 *RASSF1A-F* 和 *CDH13-F* 外侧引物分别扩增出 207 bp 和 410 bp 的 *RASSF1A* 基因及 *CDH13* 基因的启动子区片段,全部 DNA 标本中均可扩增出相应片段。然后分别用 *RASSF1A-M*、*RASSF1A-U* 和 *CDH13-M*、*CDH13-U* 特异性引物进行第 2 次扩增,对于阳性(甲基化)标本,用甲基化和非甲基化引物扩增,都有特异性扩增产物;对于阴性(未甲基化)标本,只有未甲基化引物的扩增产物。结果显示,有 17 例肝细胞癌患者血清中出现 *RASSF1A* 基因高甲基化(图 1),检出率为 53.12%,10 例出现 *CDH13* 基因启动子区异常甲基化(图 2),检出率为 31.25%;而 20 例正常对照组血清均未检测出两基因的异常甲基化,肝细胞癌患者血清和正常对照组血清的两基因异常甲基化检出率比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

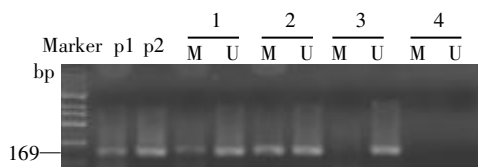


图 1 *RASSF1A* 基因 nMSP 产物凝胶电泳图

Marker: DNA marker; p1: 甲基化阳性对照; p2: 未甲基化阳性对照; M: 甲基化条带; U: 未甲基化条带; 1、2: 肝细胞癌患者血清; 3: 正常对照血清; 4: 空白对照。

Fig.1 nMSP products of *RASSF1A* gene detected by gel electrophoresis

Marker: DNA marker; p1: Methylation positive control; p2: Unmethylation positive control; M: Methylation band; U: Unmethylation band; 1, 2: HCC serum; 3: Normal serum; 4: Blank control.

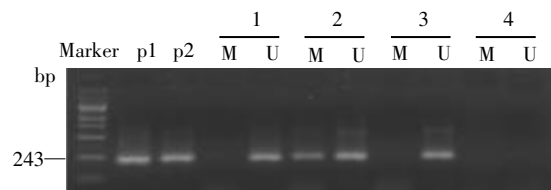


图 2 *CDH13* 基因 nMSP 产物凝胶电泳图

Marker: DNA marker; p1: 甲基化阳性对照; p2: 未甲基化阳性对照; M: 甲基化条带; U: 未甲基化条带; 1、2 肝细胞癌患者血清; 3: 正常对照血清; 4: 空白对照。

Fig.2 nMSP products of *CDH13* gene detected by gel electrophoresis

Marker: DNA marker; p1: Methylation positive control; p2: Unmethylation positive control; M: Methylation band; U: Unmethylation band; 1, 2: HCC serum; 3: Normal serum; 4: Blank control.

### 2.2 *RASSF1A* 和 *CDH13* 基因甲基化与患者临床病理特征的关系

统计分析发现,血清 *RASSF1A* 和 *CDH13* 基因异常甲基化与患者年龄、性别、血清 AFP、HBV 感染,以及肿瘤分期、侵犯及转移等均无明显相关性( $P > 0.05$ )。14 例有淋巴结转移的 HCC 患者血清中 *RASSF1A* 基因、*CDH13* 基因异常甲基化有较高的检出率,但差异无统计学意义,这可能与标本量偏少有关,有待进一步证实。

### 2.3 两基因异常甲基化检出率的比较

HCC 患者血清 *RASSF1A* 基因甲基化检出率为 53.12%(17/32),*CDH13* 基因甲基化检出率为 31.25%(10/32),32 例 HCC 血清中有 68.75%(22/32)至少能检测到一个基因异常甲基化。有 15.63%(5/32)病例血清中能同时检测到 *RASSF1A* 和 *CDH13* 两个基因的甲基化。

表 2 RASSF1A 和 CDH13 基因甲基化状态与 HCC 患者临床病理资料间的关系  
Table 2 Relation between methylation status of RASSF1A and CDH13 gene in serum and clinicopathological features of patients with HCC

Clinical data	n	RASSF1A gene			CDH13 gene		
		Methylation/(%)	$\chi^2$	P	Methylation/(%)	$\chi^2$	P
Age(Years)							
<55	15	7	0.473	0.723	4	0.276	0.712
≥55	17	10			6		
Gender							
Male	25	14	0.379	0.678	8	0.030	1.000
Female	7	3			2		
HBV							
Positive	28	15	0.018	1.000	9	0.083	1.000
Negative	4	2			1		
AFP/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )							
<400	10	5	0.057	1.000	3	0.011	1.000
≥400	22	12			7		
TNM stage							
I~II	24	12	0.376	0.691	6	1.745	0.218
III~IV	8	5			4		
Metastasis							
No	18	8	1.245	0.308	3	4.073	0.062
Yes	14	9			7		

### 3 讨论

肝细胞癌是原发性肝癌的主要类型,其发病率及死亡率均较高.手术切除是治疗肝癌的首选方法,手术切除率低和术后转移及复发是制约手术疗效的重要因素.在临床上绝大部分患者确诊时已为晚期,错过了治疗的最好时机.因此,肝细胞癌的早期诊断对治疗及预后具有重要意义.随着对恶性肿瘤发病机制的深入研究,发现抑癌基因启动子区 CpG 岛甲基化使该基因在转录水平失活,导致相关蛋白表达缺失,促进了肿瘤的发生<sup>[10]</sup>.近来研究结果显示肝细胞癌的发生、发展过程中涉及多个抑癌基因的异常甲基化,包括 RASSF1A、P16、APC、R1Z1 等<sup>[1,2]</sup>,并且这种异常甲基化在肝癌发生的早期就能检测到,是一种新的肿瘤分子标志物.

RASSF1A 基因是 2000 年发现的一个位于人染色体 3p21.3 上的抑癌基因. Yeo W 等<sup>[4]</sup>进行了肝细胞癌患者手术切除肝癌组织与相应患者外周血清中 RASSF1A 基因甲基化的对照研究,发现血清 MSP 检测结果与其相应的肿瘤组织检测结果符合率达 100%,血清 RASSF1A 异常甲基化

能较好的反应其肿瘤来源特异性.但是其结果也显示血清中 RASSF1A 甲基化的比例(42.5%)远小于肝癌组织中 RASSF1A 甲基化的比例(92.5%);赵强子等也检测了 HCC 患者血浆中 RASSF1A 甲基化率,其异常高甲基化率为 41.5%<sup>[11]</sup>.甲基化特异性 PCR(MSP)法是目前检测 CpG 岛异常甲基化的主要方法,但 MSP 法的影响因素也多,灵敏度较低,应用于检测血清/血清、唾液等体液中的微量 DNA 的甲基化状态还不够理想.本研究结果显示, nMSP 法检测血清中 RASSF1A 基因甲基化率高达 53.12%, nMSP 法适于检测 HCC 患者血清标本中 DNA 的甲基化状态.

钙粘蛋白-13(CHD13)是 cadherin 家族的成员之一,是一种新型的、非常独特的钙粘蛋白分子. CHD13 在细胞粘附、信号转导及细胞生长调节等方面发挥着重要作用. CHD13 在鼻咽癌、乳腺癌、肺癌、子宫癌等中表达下调,其下调机制和 CHD13 启动子甲基化明显相关<sup>[12-14]</sup>,且甲基化大多在这些疾病的早期就被检测到.张志发等<sup>[8]</sup>的研究结果显示,在肝细胞癌中 CDH13 启动子甲基化是 CDH13 基因失活的主要机制,而肝细胞癌患者血清/血清中 CDH13 基因的甲基化状态

国内外尚未见报道. 我们采用 nMSP 法对 32 例肝细胞癌患者血清游离 DNA 样本 *CHD13* 基因 5'端 CpG 岛甲基化状态进行了检测, 甲基化检出率达 31.25%, 且在淋巴结转移组 *CHD13* 甲基化发生率较高, 提示该基因甲基化可能与 HCC 转移有关, 今后将增加样本数并与病人的预后情况结合起来进行分析研究.

总之在 32 例 HCC 患者血清中有 22 例 (68.75%) 至少能检测到 *RASSF1A* 或 *CHD13* 基因中的一个基因异常甲基化. 检测血清中 *RASSF1A*、*CHD13* 基因甲基化对肝细胞癌早期预测及治疗监测有一定的指导意义.

#### 参考文献 (References):

- [1] CALVISI D F, LADU S, GORDEN A, *et al.* Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117(9): 2713-2732.
- [2] NOMOTO S, KINOSHITA T, KATO K, *et al.* Hypermethylation of multiple genes as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma[J]. *British Journal of Cancer*, 2007, 97(9): 1260-1265.
- [3] 周晓俊, 薛万江, 秦磊, 等. 原发性肝癌中 *RASSF1A* 基因表达失活及其临床意义[J]. *江苏医药* (ZHOU Xiao-jun, XUE Wan-jiang, QIN Lei, *et al.* Epigenetic inactivation and clinical significance of tumor suppressor gene *RASSF1A* in hepatocellular carcinoma[J]. *Jiangsu Medical Journal*), 2007, 33(1): 24-27.
- [4] SCHAGDARSURENGIN U, WILKENS L, STEINEMANN D, *et al.* Frequent epigenetic inactivation of the *RASSF1A* gene in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2003, 22(12): 1866-1871.
- [5] YEO W, WONG N, WONG W L, *et al.* High frequency of promoter hypermethylation of *RASSF1A* in tumor and serum of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Liver International*, 2005, 25(2): 266-272.
- [6] 仇小强, 陈罡, 余红平, 等. 肝癌患者血液 *RASSF1A* 基因甲基化的检测及其临床意义[J]. *世界华人消化杂志* (QIU Xiao-qiang, CHEN Gang, YU Hong-ping, *et al.* Detection of *RASSF1A* promoter hypermethylation in serum of patients with primary hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. *World Chinese Journal of Digestology*), 2009, 17(1): 90-93.
- [7] CHAN D W, LEE J M, CHAN P C, *et al.* Genetic and epigenetic inactivation of T-cadherin in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *International Journal of Cancer*, 2008, 123(5): 1043-1052.
- [8] 张志发, 黄志勇, 陈孝平, 等. T-cadherin 启动子甲基化与人肝癌 T-cadherin 表达的关系[J]. *世界华人消化杂志* (ZHANG Zhi-fa, HUANG Zhi-yong, CHEN Xiao-pin, *et al.* Relationship between aberrant methylation of T-cadherin promoter and T-cadherin expression in human hepatocellular carcinoma[J]. *World Chinese Journal of Digestology*), 2008, 16(11): 1194-1198.
- [9] 张莉君, 王先良, 孙晞, 等. 改进的亚硫酸氢钠测序法检测 HepG2 *RASSF1A* 基因 CpG 岛甲基化状态[J]. *华中科技大学学报 (医学版)* (ZHANG Li-jun, WANG Xian-liang, SUN Xi, *et al.* Analysis of methylation at CPG island of *RASSF1A* in HepG2 by modified bisulfite sequencing[J]. *Journal of Huazhong University of Science and Technology (Health Sciences)*, 2006, 35(3): 411-412.
- [10] HERMAN J G, BAYLIN S B. Gene silencing in cancer is association with promoter hypermethylations[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2003, 349(21): 2042-2054.
- [11] 赵强子, 祁志芳, 魏万礼, 等. 肝癌患者血清 *RASSF1A* 异常甲基化检测的意义[J]. *第四军医大学学报* (ZHAO Qiang-zi, QI Zhi-fang, WEI Wan-li, *et al.* Diagnostic value of detection of aberrant methylated *RASSF1A* in serum of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of the Fourth Military Medical University*), 2006, 27 (17): 1577-1579.
- [12] SUN D, ZHANG Z, VANDO N, *et al.* Aberrant methylation of *CDH13* gene in nasopharyngeal carcinoma could serve as a potential diagnostic biomarker[J]. *Oral Oncology*, 2007, 43 (1): 82-87.
- [13] HSU H S, CHEN T P, HUNQ V H, *et al.* Characterization of a multiple epigenetic marker panel for lung cancer detection and risk assessment in serum[J]. *Cancer*, 2007, 110(9): 2019-2026.
- [14] WIDSCHWENDTER A, IVARSSON L, BLASSNIG A, *et al.* *CDH1* and *CDH13* methylation in serum is an independent prognostic marker in cervical cancer patients[J]. *International Journal of Cancer*, 2004, 109(2): 163-166.