

多重 MethyLight 在结直肠癌相关基因 *ALX4* 和 *SEPT9* 甲基化检测中的应用

何 琼¹, 王 冕², 周建文¹, 刘 妮¹, 赖英荣^{1*}

(中山大学附属第一医院 1.病理科,2.血管外科,广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探讨多重 MethyLight 方法在检测结直肠癌(CRC)外周血 *ALX4*、*SEPT9* 基因甲基化状态中的价值,为 CRC 无创检测提供新方法。【方法】采用不同的荧光报告基团标记 *ALX4*、*SEPT9* 基因甲基化探针,利用高敏感性、高特异性的多重实时定量甲基化特异性 PCR 方法(MSP, MethyLight),同时检测 *ALX4*、*SEPT9* 基因在 CRC 外周血中的甲基化情况。【结果】*ALX4*、*SEPT9* 基因可分别在 48% (24/50), 75% (38/50) 的 CRC 患者外周血及 6% (3/50), 4% (2/50) 的健康人群外周血中检测到甲基化;与健康人群相比,CRC 患者外周血中 *ALX4*、*SEPT9* 基因的甲基化水平明显升高 ($P < 0.001$)。【结论】利用多重 MethyLight 多基因联合检测技术,可高效特异地检测到 CRC 外周血中 *ALX4*、*SEPT9* 基因甲基化水平明显升高。

关键词: 荧光定量甲基化特异性 PCR; 结直肠癌; 甲基化

中图分类号: R73

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2015)05-0657-06

Detection of *ALX4* and *SEPT9* Methylation in Human Colorectal Cancer by Multiplex MethyLight Assay

HE Qiong¹, WANG Mian², ZHOU Jian-wen¹, LIU Ni¹, LAI Ying-rong^{1*}

(1. Department of Pathology, 2. Department of Vascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: LAI Ying-rong; E-mail: laiy@126.com

Abstract: 【Objective】 To detect the methylation of *ALX4* and *SEPT9* in the peripheral blood samples from CRC patients and investigate multiplex MethyLight assay could be used for CRC detection as a non-invasive modality. 【Methods】 In the present study, we used a PCR multiplex method that in a fast and reliable manner to detect and quantify the methylation level of *ALX4* and *SEPT9* at the same time and applied this method to the detection of CRC through blood samples. 【Results】 In the peripheral blood plasma, the presence of *ALX4*, *SEPT9* methylation was detected in 48% (24/50) and 75% (38/50) of our tested samples from CRC patients and 6% (3/50) and 4% (2/50) of normal controls, respectively. The difference in incidence of the methylation of CRC plasma samples compared with normal plasma samples was statistically significant (Pearson Chi-Square, *ALX4*, $P < 0.001$; *SEPT9*, $P < 0.001$). 【Conclusion】 In conclusion, the multiplex MethyLight assay for *ALX4* and *SEPT9* is an available high-throughput quantitative multigene methylation assay that can detect CRC using peripheral blood samples with a high sensitivity and specificity.

Key words: methy light assay; colorectal cancer; methylation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(5): 657-662]

就结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的自然病程发展来看,早期发现肿瘤是影响 CRC 总体预后最重要的因素。早期 CRC 的 5 年生存率可达

90%以上,因此 CRC 高危个体的识别和早期诊断显得尤其重要^[1]。大量研究结果表明,DNA 甲基化与肿瘤的发生关系密切^[2]。在散发性 CRC 中,

收稿日期: 2015-05-10

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(81200231)

作者简介: 何琼, 博士, 技师, E-mail: joanhe2013@163.com; * 通信作者: 赖英荣, 副主任技师, E-mail: laiy@126.com

甲基化是肿瘤发生的早期分子事件^[3-4]。近年不少研究选用相关基因DNA 甲基化作为检测CRC 的分子标记物^[5],尤其是外周血 DNA 的检测^[6-7],既可以拥有比大便潜血试验(FOBT)高的敏感度,又可以避免电子肠镜检查的不适,提高人群依从性,不但有重要的临床诊断意义,而且在大规模人群筛查有广阔的应用前景^[8]。在生物医学研究中,甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 和实时定量甲基化特异性 PCR (quantitative MSP, MethyLight) 应用最广^[9]。MethyLight 是一种高敏感、高特异的甲基化检测方法^[10-11]。有研究报告,与 MSP 相比,MethyLight 可检测到更低含量的 DNA;且上下游引物扩增目的片段后,只有结合所需探针的目的片段,才能被识别,因此与单以引物为基础的 PCR 传统方法相比,具有更高的特异性^[12]。此外,由于肿瘤本身存在的异质性和个体之间的差异,单基因的检测方法受到敏感性或特异性的困扰。我们的前期研究亚硫酸盐测序(bisulfite sequencing PCR, BSP)结果显示,与健康人群外周血相比,结肠癌细胞、结肠癌组织及结肠癌患者外周血标本中的 *ALX4*(Aristaless-like homeobox-4)、*SEPT9*(Septin-9)基因甲基化水平增高。*ALX4* 被认为是可以直接调控 LEF-1 的间质特异活性,而后者是与 CRC 发病密切相关的 Wnt/ β -catenin 通路的重要组成部分,因而 *ALX4* 可能在上皮间质转化作用中有重要作用,并参与 CRC 的起病。*SEPT9* 是 Septins 家族中的一个成员,研究认为,*SEPT9* 正常生理功能与维持细胞骨架、囊泡运输、细胞极性有关,*SEPT9* 的调节异常,如甲基化,可能引起细胞内外物质转运障碍、细胞微管结构功能和细胞动力异常,并与癌症的发生密切相关。据此,我们利用多重 MethyLight 联合检测结直肠癌患者外周血中 *ALX4*, *SEPT9* 基因甲基化情况,探讨该方法在外周血中检测 CRC 的应用价值。

1 材料与方

1.1 材 料

1.1.1 样本信息 实验所需标本 50 例 CRC 患者外周血来自中山大学附属第一医院,收集时间为 2013 年 7 月 1 日-2013 年 12 月 20 日。50 例正常人外周血来自健康志愿者。采集外周血的 50 例 CRC 患者(男 31 例;女 19 例)手术时中位年龄为

58 岁(28 ~ 85 岁)。肿瘤分期依据 WHO 消化道肿瘤分期标准。采集外周血的研究对象相关临床数据见表 1。所有 CRC 病例均经病理确诊。外周血标本采集自空腹静脉血,抽取 5 mL 至干燥试管。

表 1 研究对象临床资料

Table 1 Clinical characteristics of patients and healthy controls in this study

Group	Stage	n	Age/years				Median age
			< 50	50~59	60~69	≥70	
CRC	I	17	3	5	6	3	58
	II	20	6	3	9	2	61
	III	11	1	5	4	1	65
	IV	2	0	1	0	3	76
Normal		50	10	14	19	9	62

1.1.2 仪器与试剂 ABI7500 扩增仪(ABI, USA); 细胞和外周血基因组抽提均用 QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA)。DNA 的甲基化亚硫酸盐修饰(Sodium Bisulfite Modified)利用的 EZ DNA Methylation-Gold Kit 试剂盒(ZYMO, USA)。具体抽提步骤按照试剂盒说明书所述。

1.2 方 法

1.2.1 样本 DNA 提取及亚硫酸盐修饰 利用 ZYMOEZ DNA Methylation-Gold Kit 试剂盒对 DNA 甲基化修饰,具体操作步骤依据试剂盒说明书。

1.2.2 阳性、阴性对照 DNA 结肠癌细胞株 Lovo 基因组 DNA 提取后,紫外分光光度计测试 OD 值。用 M.SssI Methyltransferase (新英格兰生物公司,美国)处理。具体步骤参照试剂盒说明书。

处理后 DNA 即已经过 M.SssI 酶修饰过的 DNA,再经亚硫酸盐修饰后,BSP 反应单克隆测序,获得 100%甲基化后,作为阳性对照 DNA。甲基化阴性对照 DNA 购自 Chemicon 公司(加州,美国),获得商业 DNA 后,参照上述步骤,经亚硫酸盐修饰、BSP 反应后测序,确证 100%非甲基化后,作为阴性对照 DNA。所有 DNA 经亚硫酸盐修饰后,冻存于-80℃备用。

1.2.3 *ALX4*、*SEPT9* 甲基化处理产物纯化克隆测序 琼脂糖凝胶电泳进行割胶纯化,采用 QIA Gel Extraction Kit 试剂盒(Qiagen,USA),操作步骤依据试剂盒说明书。

1.2.4 多重 MethyLight 联合检测 *ALX4*、*SEPT9* 基因数据分析 内参基因 ACTB, 目标基因 *ALX4*,

SEPT9 三个基因分别探针标记不同荧光报告/淬灭基团:*ALX4* 基因-Texas Red/ECLIPSE;*SEPT9* 基因-FAM/ECLIPSE;ACTB 基因-CY5/BHQ2 (表 2)。ABI7500,95 ℃预变性 15 min;94 ℃变性 15 s,60 ℃退火 45 sec,ABI 7500 读取 FAM, Texas Red 和 CY5 荧光,共 40 个循环。对于多重的荧光定量 PCR 来说,PCR 反应添加剂可以有效地提高 PCR 反应效率,或者降低组分之间的互相干扰和抑制作用。在该多重体系中,添加甜菜碱作为 PCR 反应添加剂。实验结果证明它对于 GC 含量高的模板解链以及稳定单链 DNA 分子具有明显的作用。数据分析:本研究 MethyLight 检测各基因的甲基化含量 (Percentage of Methylated Reference, PMR) 值计算方法如下:[(基因/ACTB) 样本:(基因/ACTB) 阳性对照 DNA]×100,该值 ≥ 4%,则判断该基因为甲基化,否则为非甲基化^[10]。

1.3 统计方法

连续性计量资料,采用平均数与标准差或中位数与数值范围的描述。计数资料间比较采用卡方检验 (Pearson Chi-Square,χ²),所有统计描述及

检验均用 SPSS 13.0 软件进行。*P* < 0.05 表示有统计学差异。

2 结 果

2.1 CRC 细胞株 Lovo 中 *ALX4*,*SEPT9* 基因甲基化测序鉴定(见图 1)

2.2 *ALX4* 和 *SEPT9* 基因启动反应 CpG 位点甲基化情况

与健康志愿者外周血相比,CRC 患者外周血中 *ALX4*,*SEPT9* 基因甲基化水平增高图 2、3。

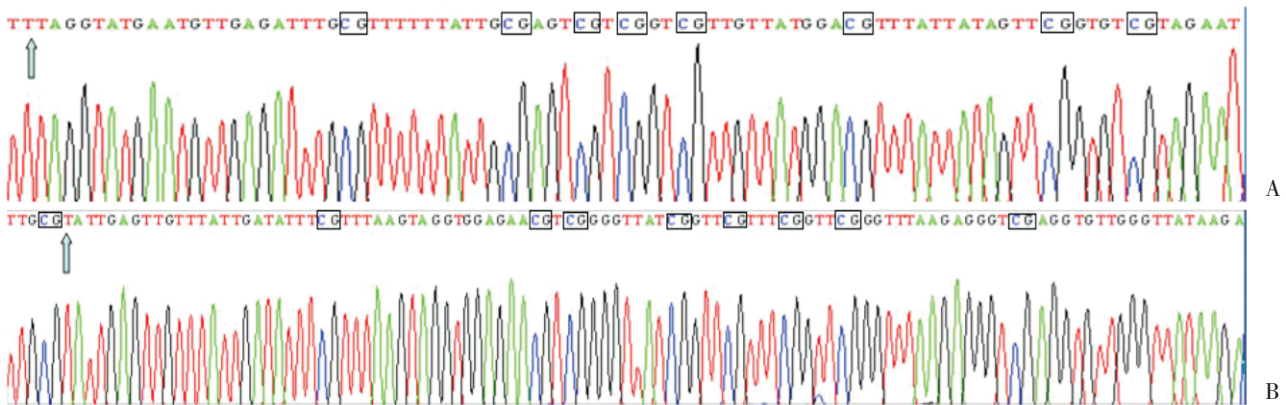
2.3 多重 MethyLight 联合检测 CRC 外周血中 *ALX4*,*SEPT9* 基因甲基化

在 CRC 外周血样本中,可检测到 ACTB(内参基因),*ALX4*,*SEPT9* 基因的扩增信号(图 4)。

ALX4,*SEPT9* 基因可分别在 48% (24/50),75% (38/50)的 CRC 患者外周血及 6% (3/50),4% (2/50)的健康人群外周血中检测到甲基化;与健康人群相比,CRC 患者外周血中 *ALX4*,*SEPT9* 基因的甲基化水平均明显升高 (all *P* < 0.001,卡

表 2 ACTB(内参基因), *ALX4*, *SEPT9* 基因 MethyLight 引物及探针序列
Table 2 MethyLight primer and probe of ACTB(control gene), *ALX4*, and *SEPT9* gene

gene	primer (5'→3')	probe (5'→3')
ACTB	F: TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAAGT	CY5-ACCACCACCCAACAC
	R: AACCAATAAACCTACTCCT CCCTTAA	ACAATAACAAACACA-BHQ2
<i>ALX4</i>	F: TTAGGTATGAATGTTGAGATTTGCCG	TexasRed-TTATTGCGAGTCGT
	R: CTACGACACCGAACTATAATAAACG	CGGTCGTTGTTATGG-Eclipse
<i>SEPT9</i>	F: GTCTTATAACCCAACACCTCGAC	FAM-ACCCGAACCGAAAC
	R: GCGTATTGAGTTGTTTATTGATATTTTCG	GAACCGATAACCC-TAMRA



CpG sites are enclosed in rectangular boxes, and arrows indicate the cytosines(C) that were converted to thymine (T) by bisulfite modification.

图 1 *ALX4*, *SEPT9* 基因甲基化修饰后序列鉴定
Fig. 1 The sequence chromatogram fragments of *ALX4* and *SEPT9* gene

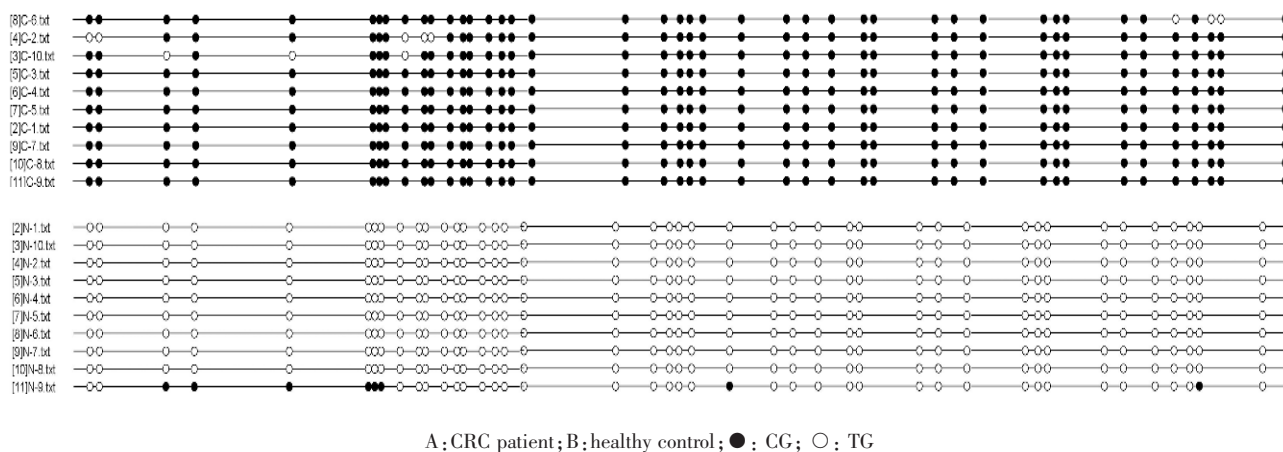


图 2 ALX4 基因启动子区 CpG 位点甲基化情况 (BiQ Analyzer 2.0)

Fig.2 CpG Methylation in promoter region of ALX4 gene (BiQ Analyzer 2.0)

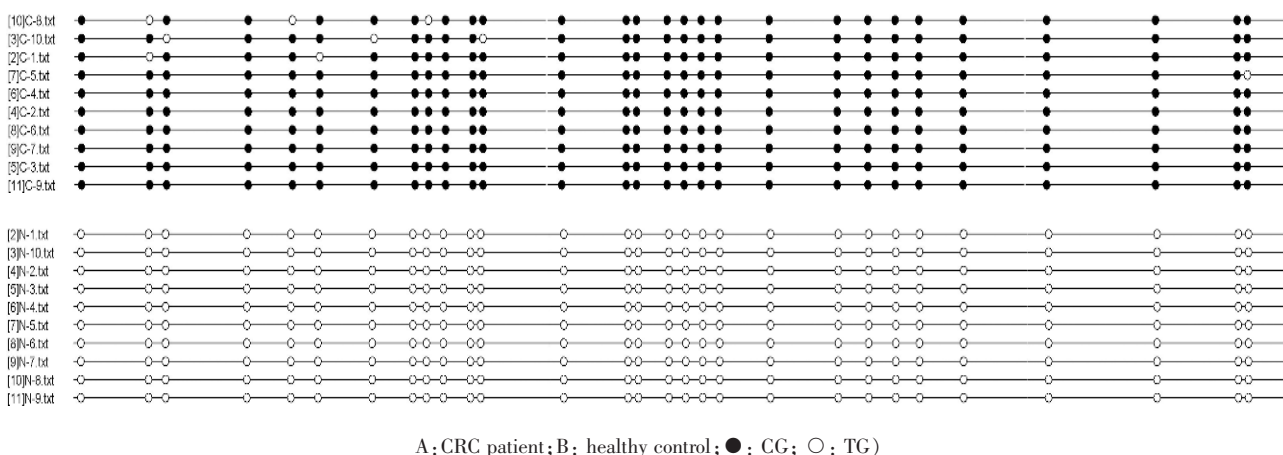


图 3 SEPT9 基因启动子区 CpG 位点甲基化情况 (BiQ Analyzer 2.0)

Fig.3 CpG Methylation in promoter region of SEPT9 gene (BiQ Analyzer 2.0)

方检验,表 3)。

3 讨 论

全世界每年约有 100 万的新发病例,并有接近 50 万患者死于 CRC。CRC 已成为危害人类健康的最常见恶性肿瘤之一^[13]。CRC 的发病机制及治疗转归研究表明,早期发现 CRC 的癌前病变——结直肠腺瘤、并切除腺瘤,可明显减低 CRC 发病和肿瘤死亡相关风险;另外,早期发现肿瘤,也是影响 CRC 自然转归及预后最重要的因素。尽管人群筛查取得了一定成效,并使局部地区发病率有所下降,但因目前尚缺乏有效、敏感、简便的大规模筛查方法,全世界范围内,尤其是经济欠发达国家的 CRC 发病率,正在逐年上升,其中,包括中国。

临床运用最广泛的 FOBT 或肠镜为基础的检查手段,由于检查敏感度低或费用昂贵、检查有创并有潜在的严重并发症导致检查依从性低,难以用于大规模人群筛查。尤其是在现今医疗体制下的中国,人群筛查若采用电子肠镜,还受到经济因素的制约。即便是在筛查体系相对完善的美国,愿意接受电子肠镜作为筛查手段的人群比例也比较低。为此,临床医生、预防医学专家和 CRC 肿瘤基础研究专家都在共同努力着,试图寻找一种比传统 FOBT 或电子结肠镜更为合适、准确、方便、依从性好的检查手段。近年来,有不少研究结果显示,采用外周血中相关基因 DNA 甲基化检测 CRC,就是一种有效的手段。

目前用于检测 DNA 甲基化众多,但最常用的方法是甲基化特异性 PCR (MSP)。MSP 的原理是

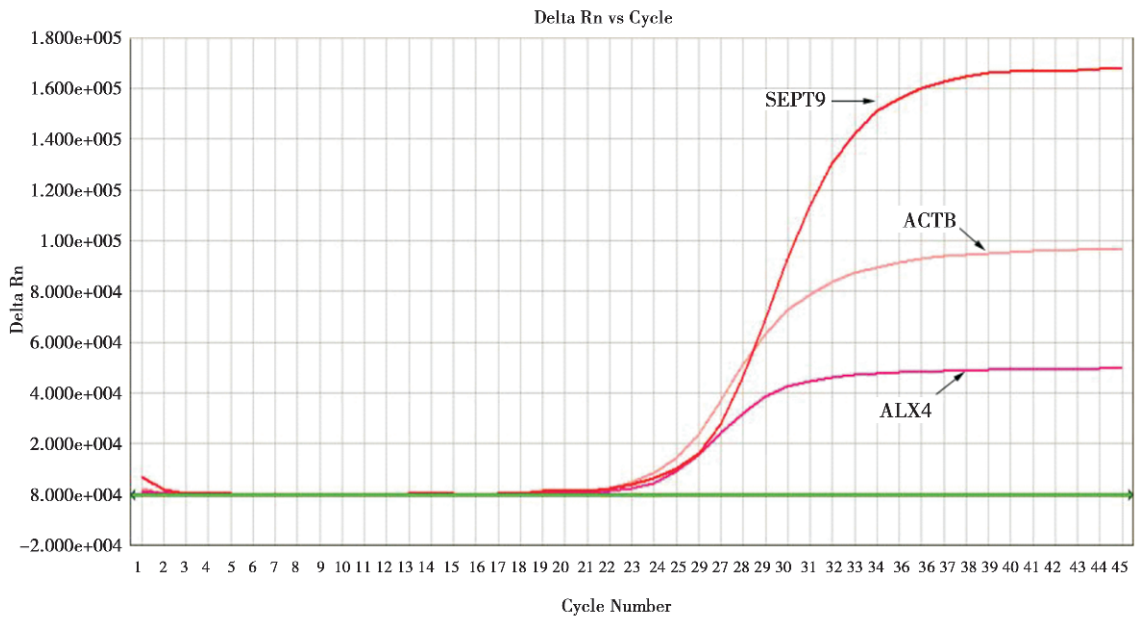


图 4 结直肠癌患者外周血中 *ALX4*, *SEPT9* 基因多重 MethyLight PCR 扩增曲线

Fig.4 The PCR amplification curve of *ALX4*, *SEPT9* gene using MethyLight assay in CRC peripheral blood

表 3 多重 MethyLight 检测 CRC 外周血 DNA 中 *ALX4*, *SEPT9* 基因甲基化结果

Table 3 The methylation of *ALX4*, *SEPT9* in the peripheral blood of CRC patients and healthy control using by multiplex MethyLight assay

gene	peripheral blood		<i>P</i> value ¹⁾
	CRC (<i>n</i> = 50)	normal (<i>n</i> = 50)	
<i>ALX4</i>	24 (48%)	3 (6%)	< 0.001
<i>SEPT9</i>	38 (75%)	2 (4%)	< 0.001

DNA 序列中的 CpG 在亚硫酸盐修饰后, 5'-C 未发生甲基化的 CpG (Unmethylated CpG, uCpG) 中的 C 碱基会修饰成 U; 而 5'-C 甲基化的 CpG (Methylated CpG, mCpG) 则保持不变^[14]。因此可设计上下游不通的引物, 分别扩增出修饰后的甲基化序列和非甲基化序列, 根据产物大小从而判断起始 DNA 的 CpG 中 5'-C 甲基化状态。但是, 由于亚硫酸盐修饰的效率受 DNA 质量等因素的影响, 有时候 uCpG 并不能完全修成 UG, 进而与甲基化引物发生非特异性结合, 因此假阳性率高。DNA 甲基化检测的另外一种方法——实时定量甲基化特异性 PCR (quantitative methylation specific PCR, qMSP; MethyLight), 则解决了这一难题。MethyLight 是在 MSP 扩增产物中, 用荧光标

记的特异性甲基化序列探针结合甲基化产物, 实时定量检测 DNA 甲基化水平^[10]。与 MSP 相比, MethyLight 具有高敏感度、高特异度、假阳性率低的特点, 所以受到越来越多的关注。

尽管 MethyLight 检测 DNA 甲基化的结果令人鼓舞, 但由于肿瘤异质性及不同个体之间的差异, 单基因甲基化检测 CRC 的敏感性受到一定程度的制约。因此, 近年来不少学者采用多基因甲基化联合检测, 以图获得更好的检测结果^[12]。在本课题中, 我们采用不同的荧光分别标记不同基因的甲基化探针, 在各自相应的引物扩增后, 同时检测 DNA 中多个基因甲基化水平的多重 MethyLight 检测方法。在预试验中我们发现, 多重 MethyLight 检测多基因 DNA 甲基化结果稳定、重复性好, 且可减少试验 DNA 模板所需量。

大量的研究表明, 部分基因启动子区域甲基化 (Methylation) 畸变在 CRC 的发病中扮演重要作用, 越来越多的 CRC 疾病相关基因的 DNA 甲基化标记物受到关注。*ALX4*、*SEPT9* 基因在 CRC 的发生、发展或转移中有着重要的病理生理学功能, 应用分子生物学的手段联合检测 CRC 患者外周血 *ALX4*, *SEPT9* 基因的甲基化畸变, 可以达到早期筛查的目的。

已有研究发现, *ALX4* 可在 68% 的 CRC 组织

中检测到甲基化,有趣的是,*ALX4*可在83%CRC患者的外周血中检测到甲基化^[15]。*SEPT9*被认为是与肿瘤的起始密切相关,外周血中*SEPT9*甲基化可能作为CRC的分子标记物^[16-17]。此外,*SEPT9*甲基化被报道可阻滞TGF β 信号转到通路,而后者被认为在CRC的发生阶段有抑癌功能^[18]。基于这些临床标本检测的结果和功能的发现,我们认为*ALX4*、*SEPT9*基因甲基化可能在CRC的发生、发展中有重要的病理生理学功能,有可能是检测CRC的重要分子标记物。

因此,本研究采用建立好的多重MethyLight检测了CRC外周血中*ALX4*、*SEPT9*基因甲基化水平,结果发现,与健康志愿者外周血相比,CRC患者外周血中*ALX4*、*SEPT9*基因甲基化水平显著增高。*ALX4*、*SEPT9*在外周血中检测CRC的敏感度分别为48%、75%。外周血的检测结果令人鼓舞,据本研究结果认为,多重MethyLight检测外周血*ALX4*、*SEPT9*基因甲基化水平具有重要的诊断价值。

参考文献:

- [1] Hawk ET, Levin B. Colorectal cancer prevention[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(2): 378-391.
- [2] Wu C, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence[J]. Science, 2001, 293(5532): 1103-1105.
- [3] Ashktorab H, Brim H. DNA methylation and colorectal cancer[J]. Curr Colorectal Cancer Rep, 2014, 10(4): 425-430.
- [4] Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics [J]. Trends Genet, 2000, 16(4): 168-174.
- [5] Kostin PA, Zakharzhevskaya NB, Generozov EV, et al. Hypermethylation of the CDH1, SEPT9, HMTF and ALX4 genes and their diagnostic significance in colorectal cancer[J]. Vopr Onkol, 2010, 56(2): 162-168.
- [6] Lofton-Day C, Model F, Devos T, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening[J]. Clin Chem, 2008, 54(2): 414-423.
- [7] Devos T, Tetzner R, Model F, et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer[J]. Clin Chem, 2009, 55(7): 1337-1346.
- [8] Ata A, Elzey JD, Insaf TZ, et al. Colorectal cancer prevention: adherence patterns and correlates of tests done for screening purposes within United States populations [J]. Cancer Detect Prev, 2006, 30(2): 134-143.
- [9] Quillien V, Lavenu A, Karayan-Tapon L, et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients [J]. Cancer, 2012, 118(17): 4201-4211.
- [10] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(8): E32.
- [11] Campan M, Weisenberger DJ, Trinh B, et al. MethyLight [J]. Methods Mol Biol, 2009, 507: 325-337.
- [12] Olkhov-Mitsel E, Zdravic D, Kron K, et al. Novel multiplex MethyLight protocol for detection of DNA methylation in patient tissues and bodily fluids [J]. Sci Rep, 2014, 4: 4432.
- [13] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [14] Cottrell SE, Distler J, Goodman NS, et al. A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(1): e10.
- [15] Tanzer M, Balluff B, Distler J, et al. Performance of epigenetic markers SEPT9 and ALX4 in plasma for detection of colorectal precancerous lesions [J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9061.
- [16] Kang Q, Jin P, Yang L, et al. Significance of Septin 9 gene methylation detection of plasma circulation DNA in colorectal cancer screening [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2014, 94(48): 3839-3841.
- [17] Toth K, Wasserkort R, Sipos F, et al. Detection of methylated septin 9 in tissue and plasma of colorectal patients with neoplasia and the relationship to the amount of circulating cell-free DNA [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115415.
- [18] Razin A. Steps in the study of DNA methylation from phiX174 to genomic imprinting [J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(19-20): 2147-2149.

(编辑 孙慧兰)