

子宫颈病变中 CADM1、DAPK 及 RARB 基因的甲基化状态

徐彩炎 张为远 张淦文 武明辉

摘要 目的 了解基因启动子的甲基化在宫颈癌发生、发展过程中的模式,为筛选和调整一个能用于诊断宫颈刮片标本中宫颈高度病变及宫颈癌的诊断标志物提供依据。方法 利用实时定量甲基特异性 PCR(QMSP)分析 CADM1、DAPK 及 RARB 3 个基因启动子在宫颈病变组织中的甲基化状态。样本包括石蜡包埋正常宫颈组织 20 例, CIN1 40 例, CIN2 40 例, CIN3 18 例及宫颈癌 3 例。同时用导流杂交法检测标本中 HPV 亚型。结果 CADM1 及 RARB 两个基因的甲基化水平及甲基化阳性率都随着标本的恶性度增加而增加,在各组样本中差异有统计学意义($P < 0.05$)。DAPK 基因的甲基化在各组样本中处于低水平,各组样本中差异无统计学意义($P > 0.05$)。CADM1/RARB 组合敏感度、特异性最高,为 82.0% 及 70.0%。基因甲基化水平与 HPV 亚型及年龄无关。结论 CADM1 及 RARB 基因甲基化程度随宫颈病变增加而增加,两者联合检测可有效区分 LSIL 和 HSIL 病变。

关键词 甲基化 宫颈上皮内瘤变

中图分类号 R71

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.12.027

Promoter Methylation of CADM1, DAPK and RARB Genes in Cervical Neoplasia. Xu Caiyan, Zhang Weiyuan, Zhang Songwen, et al. Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China

Abstract Objective To examined whether DNA methylation changes might be used as markers of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer (CC). **Methods** We used quantitative methylation specific PCR(QMSP) to analyze promoter hypermethylation of 3 genes, CADM1, DAPK and RARB, in 121 paraffin embedded tissue specimens collected during the previously studies of Beijing women, including normal cervix ($n = 20$), CIN1 ($n = 40$), CIN2 ($n = 40$), CIN3 ($n = 18$) and cervical cancers($n = 3$). **Results** For genes CADM1 and RARB, the level and frequency of hypermethylation increased statistically significantly with increasing severity of neoplasia present in the cervical biopsy ($P < 0.05$ for each). The best panel of hypermethylated genes included CADM1 or RARB. At least one of the three genes was hypermethylated in 72.2% of samples with CIN3/CIS and in 100% of samples with CC but in only 5% to 30% of samples with CIN1 or less. Detection of the CADM1 or RARB hypermethylated gene would reveal histologically confirmed CIN2 or worse with a sensitivity of 82.0% and a specificity of 70.0%. HPV type and age has no influence on overall level and frequency of promoter methylation. **Conclusion** Aberrant promoter methylation analysis on exfoliated cell samples is a potential diagnostic tool for cervical cancer screening that potentially may be used alone or in conjunction with cytology and/or human papillomavirus testing.

Key words Methylation; Cervical intraepithelial neoplasia

宫颈癌是女性第二高发恶性肿瘤,原癌基因激活、抑癌基因失活等影响着宫颈癌的发生和发展。基因高度甲基化被广泛认为是除基因突变和染色体杂合性丢失以外细胞遭受的“二次打击”,是抑癌基因功能失活的关键机制^[1~5]。抑癌基因高甲基化是宫颈癌发生过程中一个重要的早期事件,在肿瘤发展过程中逐步增加,并且多基因共同甲基化是一个重要现象^[6~14]。CADM1、DAPK 及 RARB 3 个抑癌基因在宫

颈各级病变组织中单独和共同甲基化状态和作用尚未见报道。本研究对宫颈炎、宫颈上皮内瘤变(CIN1、CIN2、CIN3)、宫颈癌(CC)等不同宫颈病变中 CADM1、DAPK 及 RARB 3 个基因的甲基化程度进行检测,以了解其与各级 CIN 及宫颈癌发生发展的关系,并分析基因甲基化与 HR-HPV 感染及年龄的相关性。

对象与方法

1. 一般资料:在前期开展的“北京市宫颈病变流行病学调查”课题(课题号 D0906008040491)中,笔者从北京地区 12 个区县共 137 个社区内随机抽取 25 ~ 54 岁已婚育龄妇女 6339 例进行了调查,而后对所有

基金项目:北京市科委重大科研项目(D0906008040491)

作者单位:100730 首都医科大学附属北京同仁医院(徐彩炎);
100026 首都医科大学附属北京妇产医院(张为远、张淦文、武明辉)

通讯作者:徐彩炎,电子信箱:xucaiyant2011@163.com

宫颈细胞学诊断为 ASCUS 以上的病例,进行了阴道镜检查及宫颈活检。本研究从这些宫颈活检石蜡标本随机选取宫颈炎 (NL) 40 例、CIN1 40 例、CIN2 40 例、CIN3 18 例、CC 13 例,患者在北京地区居住半年以上,包括本市和外地户籍,无宫颈手术史、检查时未怀孕、无骨盆放射治疗史,1 年内未做过妇科检查和治疗^[9]。

2. 方法:笔者对这些标本进行 QMSP 法甲基化分析及 HPV 核酸扩增分型检测。每个标本均进行 3 次重复,一个标本只有在 3 次重复中的 2 个或以上并在 40 个循环前出现指数形曲线才被当做是阳性的。甲基化的程度由探针 FAM 通道检测到的甲基化 DNA 的 CT 值和探针 VIC 通道检测到的未甲基化 DNA 的 CT 值计算而得。计算公式为:甲基化百分比 = $100 / (1 + 2^{\Delta CT}) \%$, $\Delta CT = \text{靶基因 CT (CG)} - \text{靶基因 CT (TG)}$ 。

3. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计学软件对数据进行统计分析处理。用 *Mann - Whitney U* 检验来比较宫颈炎症组和 CIN1/CIN2/CIN3/CC 组甲基化率的差异。数字参数间用 χ^2 检验分析,小样本用 *Fisher's* 精确检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同宫颈病变组织中 3 个基因的甲基化程度: CADM1 基因在 NL 组中甲基化程度为 14.3%,随标本病变程度增加逐渐增加,CC 组为 70.22%;NL 组与 CIN1、CIN2、CIN3、CC 各组比较,甲基化程度差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);CIN1 组与 CIN2 组、CIN3、CC 组比较,CIN2 组与 CIN3、CC 组比较,CIN3 组与 CC 组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。RARB 基因在 NL 组为 16.41%,随标本病变程度增加而增加,CC 组为 65.71%;NL 组与 CIN1、CIN2、CIN3、CC 各组比较,甲基化程度差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);CIN1 组与 CIN2 组、CIN3 组与 CC 组分别比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);CIN1 组与 CIN3、CC 组比较,CIN2 组与 CIN3、CC 组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。DAPK 基因在各组中甲基化程度为 15.90% ~ 31.55%,不随病变程度增加而明显增加,各组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$,图 1)。

2. 不同宫颈病变组织中基因的甲基化阳性率:计算各基因对应的宫颈炎组甲基化率均数及标准差,以均数加 3 个标准差作为各基因甲基化率的截取值,分

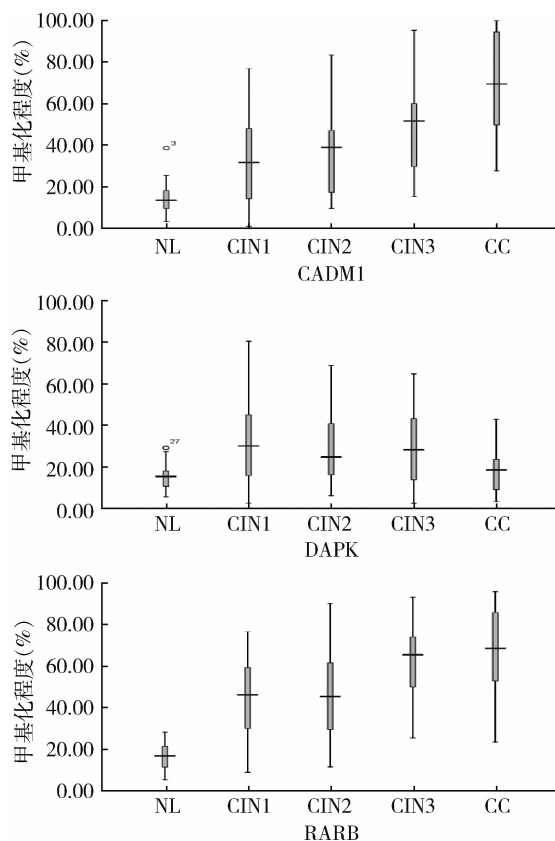


图 1 3 个基因的甲基化程度按照组织病理学类型分类的箱图

别为 CADM1 34.68%、DAPK 33.31%、RARB 93%。甲基化程度高于截取值即诊断为甲基化阳性,否则为阴性。CADM1 及 RARB 基因甲基化阳性率随着宫颈病变恶性度增加而增加的,CC 组 100% 甲基化,各组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 DAPK 基因甲基化阳性率较 CADM1 及 RARB 基因低,而且没有随着宫颈恶性程度的增加而增加,各不同病变组间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 1)。

3. 不同宫颈病变组织中基因联合检测的甲基化阳性率:2 个或 3 个基因启动子联合检测,只要其中一个基因甲基化阳性即诊断为联合检测阳性。CADM1/DAPK 联合、CADM1/RARB 联合、DAPK/RARB 联合及 CADM1/DAPK/RARB 联合,能检测出 50.0% 以上的 CIN1、70.0% 以上的 CIN2 + 及 100% CC。在二联合中,CADM1/RARB 联合检测阳性率最高,检测 CIN3 及 CC 阳性率与三联合相同,但比三联合检测 CIN1 及 CIN2 阳性率稍低。宫颈炎组与各病变组甲基化阳性率比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$,表 1)。

表 1 不同宫颈病变组织中基因甲基化阳性率 [$n(\%)$]

基因	NL($n=40$)	CIN1($n=40$)	CIN2($n=40$)	CIN3($n=18$)	CC($n=13$)	P_1	P_2
CADM1	1(2.5)	12(30.0)	24(60.0)	13(72.2)	11(84.6)	0.000	0.000
DAPK	0(0)	10(25.0)	9(22.5)	4(22.2)	3(23.1)	0.153	0.703
RARB	0(0)	26(65.0)	28(70.0)	16(88.9)	12(92.3)	0.000	0.000
CADM1/DAPK	1(2.5)	20(50.0)	28(70.0)	13(72.2)	11(84.6)	0.000	0.002
CADM1/RARB	1(2.5)	27(67.5)	30(75.0)	17(94.4)	13(100.0)	0.000	0.000
DAPK/RARB	0(0)	26(65.0)	33(82.5)	16(88.9)	12(92.3)	0.000	0.000
CADM1/DAPK/RARB	1(2.5)	30(75.0)	35(87.5)	17(94.4)	13(100.0)	0.000	0.000

P_1 为 NL、CIN1、CIN2、CIN3、CC 之间的 χ^2 检验; P_2 为 NL/CIN1 与 CIN2 + 之间的检验

4. 不同宫颈病变组织中 HPV 亚型感染率以及 HPV 亚型与基因甲基化的关系:在笔者前期的研究中,北京地区 HPV 感染亚型前 3 名分别是 HPV16、HPV58、HPV33。在本研究的 151 例石蜡包埋样品中 HPV16 感染率是最高的,其次为 HPV33。在所有的 13 例宫颈癌中有 10 例(76.9%)为 HPV16 的感染。HPV16、复合感染率随着标本恶性度增加而增加,HPV58、33 及其他亚型感染率没有随着标本恶性度增加而增加。笔者按 HPV 亚型感染分为 6 组:HPV16、HPV58、HPV33、其他亚型、复合感染及无感染组。CADM1、DAPK 及三基因联合检测甲基化阳性率在各组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。RARB 基因甲基化阳性率在无感染组中为 50%,在 HPV16 亚型中为 77.1%,在复合感染组中为 100%,在各组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

表 2 HPV 亚型感染与基因甲基化阳性率 [$n(\%)$]

HPV 亚型	n	CADM1	DAPK	RARB	CADM1/ DAPK/RARB
16	35	21(60.0)	10(28.6)	27(77.1)	27(77.1)
58	6	3(50.0)	2(33.3)	3(50.0)	4(66.7)
33	8	2(25.0)	2(25.0)	5(62.5)	6(75.0)
其他亚型	43	17(39.5)	6(14.0)	32(74.4)	32(74.4)
复合感染	24	14(58.3)	11(45.8)	24(100.0)	24(100.0)
无 HPV 感染	54	26(48.1)	15(27.8)	27(50.0)	37(68.5)
P		0.205	0.082	0.035	0.097

5. 年龄与基因甲基化的关系:前期研究显示,HR-HPV 感染率及宫颈病变发生率随年龄增长先增高,30~34 岁女性处于最高峰,然后渐下降。故我们将研究对象按年龄分成 3 组:<30 岁、30~34 岁及 ≥ 35 岁。在任一年龄组中,三基因联合检测甲基化阳性率都是最高的,约 80%;RARB 次之,约 60%;CADM1 和 DAPK 相近,约 50%。对于 CADM1 的甲基化率,30~34 岁组稍高,但与其他两组比较差异无统计学意义。DAPK、RARB 单个基因及联合检测甲

基化阳性率在 3 个年龄组中相近,差异均无统计学意义($P > 0.05$,表 3)。

表 3 年龄与基因甲基化阳性率 [$n(\%)$]

年龄(岁)	n	CADM1	DAPK	RARB	CADM1/ DAPK/RARB
<30	12	6(50.0)	6(50.0)	8(66.7)	10(83.3)
30~34	34	23(67.6)	18(52.9)	21(61.8)	26(76.4)
≥ 35	75	35(46.7)	35(46.7)	47(62.6)	56(76.4)
P		0.124	0.828	0.955	0.8806

讨 论

抑癌基因甲基化可影响转录激活因子与其识别序列结合,直接抑制基因表达;或通过与甲基结合蛋白结合,募集组蛋白去乙酰化酶及组蛋白甲基化转移酶,使染色体重构,间接抑制转录,从而导致抑癌基因功能失活^[15,16]。越来越多的甲基化基因被发现在各级宫颈病变中^[10]。Feng 等^[12]于 2009 年对 Medline 中的文献进行综合分析,发现共有 51 项研究对 4376 例宫颈癌样本的 68 种不同基因的甲基化程度进行研究,其中在 5 项或超过 5 项的研究中分析了 15 种基因,7 种基因的甲基化程度在宫颈癌中超过 60%,3 种基因在整个研究中始终显示出甲基化增高。多数研究发现,部分基因甲基化的程度随着宫颈病变级别的增加而增加,甲基化基因的数目也随着宫颈病变级别的加重而增多。本研究探讨了 CADM1、DAPK 及 RARB 3 个抑癌基因甲基化在宫颈炎及宫颈各级病变发生、发展中的作用。

三个研究结果发现,CADM1 基因在宫颈炎及 CIN1 中甲基化率较低,分别为 5% 和 30%,但在 CIN2 + 中为 60%,CC 组中更达到 100%。表明 CADM1 基因甲基化与宫颈癌变关系密切,可能是宫颈癌变过程中一个早期事件,检测 CADM1 基因甲基化可能成为区分宫颈炎/CIN1 和 CIN2 + 的指标。RARB 基因在宫颈炎中无甲基化,而在 CIN1 中甲基

化率已达到 40%, 在 CIN2 + 中更高, CC 中为 100%, 印证了其作为宫颈癌发生的早期事件, 可有效区别宫颈炎与 CIN。而 DAPK 基因的甲基化程度在各级宫颈病变组织中处于较低平稳状态, 在宫颈炎中为 10%, 在宫颈癌中甲基化率 33.3%, 比 Gopeshwar Narayan 报道的 43.3% 稍低, DAPK 基因的甲基化程度不能很好区分各级病变。

本研究还发现, 单个基因甲基化程度与宫颈癌变的进程有一定的相关性, 但诊断的敏感度及特异性都处于中等程度, 目前还没有可以用于宫颈癌筛查或分流的甲基化标志物。多基因共同甲基化是一个重要的现象, 同时对多个相关基因的甲基化程度进行检测可以提高预警宫颈癌的敏感度, 所以, 多个抑癌基因组合甲基化作为宫颈病变诊断标志物应用于临床是很有发展前景的。Wentzensen 等 Meta 分析报道, 共有 51 个研究对 68 个候选抑癌基因甲基化进行了分析, CADM1、DAPK、RARB 3 个基因联合检测是很有希望的诊断标志物。本研究发现, 此 3 个基因单独甲基化检测, 敏感度、特异性最好的是 RARB, 分别为 80.3% 及 73.3%; 联合检测中 CADM1/RARB 组合敏感度、特异性最高, 为 82.0% 及 70.0%, 但都比报道的低, 可能是由于笔者的实验方法不同, 样本量也不一样, 所以不好做比较。

本研究显示, HPV16 感染组 CADM1 及 RARB 基因甲基化程度较其他亚型组高, 但差异均无统计学意义, 与 Narayan 等报道的研究结果相似。但 RARB 基因甲基化阳性率, 在无感染组中为 50%, 在 HPV16 亚型中为 77.1%, 在复合 HPV 感染组中为 100%, 各组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。目前已公认 HPV 感染是引起宫颈病变的必要条件, 抑癌基因甲基化又被发现是宫颈病变发生发展的重要事件, 但 HPV 亚型与基因甲基化程度关系并不密切, 表明宫颈病变组织中高甲基化的形成机制可能很复杂。

年龄与甲基化的关系上, 目前没有统一的结论。大多数只是发现个别基因甲基化与年龄相关。研究报道年龄与基因的总体甲基化程度无关, 在笔者的研究中, HR-HPV 感染率及宫颈病变发生率随年龄增长先增高, 30~34 岁妇女处于最高峰, 然后渐下降。大体上年龄 30~34 岁组较其他年龄组基因的甲基化率稍高, 但是这种变化趋势并不明显。再一次表明了

虽然 HPV 感染及年龄与宫颈病变发生、发展密切相关, 基因甲基化也随着宫颈病变程度加重而增加, 但基因甲基化又与 HPV 及年龄没有直接密切的关系。宫颈病变组织中高甲基化的形成机制很复杂, 值得开展更深入地研究。

参考文献

- Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence[J]. J Clin Virol, 2000, 19(1/2): 1-5
- Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression[J]. Nature, 2004, 432(7015): 307-315
- Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer[J]. Nat GeneL, 2003, 33(Suppl): 238-244
- Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics[J]. Science, 2001, 293(5532): 1068-1107
- Issa JP. Aging, DNA methylation and cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 1999, 32: 31-43
- Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, et al. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer[J]. Oncogene, 2001, 20(24): 3156-3165
- Greger V, Passarge E, Hopping W, et al. Epigenetic changes contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma[J]. Hum Genet, 1989, 83(2): 155-158
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer[J]. Cell, 2007, 128: 683-692
- Esteller M. Epigenetics in cancer[J]. New Engl J Med, 2008, 358: 1148-1159
- Wisman GA, Nijhuis ER, Hoque MO, et al. Assessment of gene promoter hypermethylation for detection of cervical neoplasia[J]. Int J Cancer, 2006, 119: 1908-1914
- Kim J, Choi YD, Lee JS, et al. Assessment of DNA methylation for the detection of cervical neoplasia in liquid-based cytology specimens[J]. Gynecologic Oncology, 2010, 116: 99-104
- Feng Q, Balasubramanian A, Hawes SE, et al. Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia[J]. J Natl Cancer Institute, 2005, 97: 273-282
- Lai HC, Lin YW, Huang RL, et al. Quantitative DNA methylation analysis detects cervical intraepithelial neoplasia type 3 and worse[J]. Cancer, 2010, 116: 4266-4274
- Wentzensen N, Sherman ME, Schiffman M, et al. Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: Appraisal of the state-of-the-science[J]. Gynecol Oncol, 2009, 112: 293-299
- 杨楠. 检测 DNA 甲基化的不同方法[D]. 北京: 北京大学, 2008, 107-122
- Roberston KD. DNA methylation and human disease[J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(8): 597-610

(收稿日期: 2017-09-26)

(修回日期: 2017-09-28)