

G₀S₂ 基因在 NSCLC 中的表观遗传性改变

丁艺晖 江 洪 苏 丹 王小红

摘 要 **目的** 检测 G₀S₂ 基因在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中的甲基化率及表达量,并探讨其成为 NSCLC 早期诊断和预后预测特异性分子标志物的可能性。**方法** 采用焦磷酸测序法测定组织细胞中 G₀S₂ 基因甲基化率,荧光定量 PCR 测定组织细胞中 G₀S₂ 基因 mRNA 的表达量,根据 NSCLC 患者的人数平均分为两组后, cut-off 值为 0.2, 以此分为 G₀S₂ 基因高表达组与低表达组,并对 G₀S₂ 基因表达量的影响因素进行单因素分析,并分析该基因表达量与患者预后之间的关系。**结果** 在 NSCLC 患者中 G₀S₂ 基因存在高甲基化率(40%),并且该基因在正常组织中的表达量与肿瘤组织中的表达量比较差异有统计学意义($P=0.000$);在单因素分析中发现 NSCLC 患者的年龄、性别、吸烟史、肿瘤的病例类型、分期分级对 G₀S₂ 基因的表达量均无明显影响($P>0.05$);G₀S₂ 基因的表达量与 NSCLC 患者的预后无明显相关性($P>0.05$)。**结论** 检测 G₀S₂ 基因的表达情况对 NSCLC 患者早期诊断有一定的作用,但在后续指导肺癌分期、预测患者预后等方面无明显参考价值。

关键词 NSCLC 基因表达 早期诊断 预后

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.07.018

Epigenetic Changes of G₀S₂ Gene in NSCLC Patients. Ding Yihui, Jiang Hong, Su Dan, et al. Hangzhou People's First Hospital, Zhejiang 310006, China

Abstract **Objective** To evaluate the value of methylation levels and expression of G₀S₂ gene in early diagnosis and predicting prognosis of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** We used pyrosequencing to detect G₀S₂ methylation levels and reverse transcription PCR to detect its expression in the tissue of NSCLC patients. According to the G₀S₂ expression levels, patients were divided into high and low expression groups. We further analyzed the clinical characteristics and prognosis in these groups. **Results** The hypermethylation rate of G₀S₂ gene in NSCLC patients was high (40%). And the expression of the gene in normal tissues was much higher than those in tumor tissues ($P=0.000$). There were no significant relationships between the level of expression of this gene and patients' age, sex, smoking history and tumor type cases ($P>0.05$). Also we couldn't find any relationship between the prognosis and the level of G₀S₂ gene. **Conclusion** The expression level of G₀S₂ gene has some value in the early diagnosis of NSCLC, but there is no obvious value in staging of NSCLC and predicting prognosis.

Key words NSCLC; Gene expression; Early diagnosis; Prognosis

肺癌是全球最常见及致死率最高的恶性肿瘤之一,目前居全球癌症首位,其发生率和病死率在我国呈逐年上升趋势,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占 85%^[1]。肺癌的发病原因尚不明确,其发生可能与基因突变、年龄、社会环境等因素有关。由于缺乏敏感度和特异性高的早期筛查手段,临床表现无特异性,在我国临床约 70% 的肺癌患者在确诊时已属晚期,无法手术彻底切除,尽管放化疗能延长肺癌患者总生存率和提高生活质量,但肺

癌患者 5 年生存率仍低于 15%^[2]。因此研发有效的早期诊断方法、寻找新的治疗靶点和发展新的治疗手段仍是 NSCLC 研究领域急需解决的问题。

癌症的最大特点是细胞分化的失控和变异细胞的异常生长。因此,抑制细胞过度增殖的抑癌基因及调节细胞分化的细胞周期调节基因的异常成为肿瘤形成过程中必不可少的因素。肿瘤癌变过程中最为常见的表观遗传学改变是抑癌基因启动子区域 CpG 岛发生甲基化,许多研究表明 DNA 启动子区域 CpG 岛甲基化是抑癌基因转录缺失的常见机制。目前,研究者已在多种肿瘤细胞中发现了因甲基化而失活的抑癌基因及细胞周期调节基因,如结直肠癌、乳腺癌等^[3]。对于新基因的探索有助于找到肿瘤治疗的新靶点。鉴于肺癌的特殊生物学行为和临床表现,

基金项目:浙江省卫生厅重点学科平台骨干人才项目(2011RCA008)

作者单位:310006 杭州市第一人民医院心胸外科(丁艺晖、江洪);杭州,浙江省肿瘤医院(苏丹、王小红)

通讯作者:王小红,电子邮箱:hh737@126.com

人们希望通过研究肺癌的分子生物学特点来早期诊断这一疾病,改善肺癌的预后。最近研究显示参与细胞周期调控的基因 G_0/G_1 期开关基因 2 (G_0/G_1 switch 2, G_0S_2) 与肺癌的发生有关。本文通过研究 G_0S_2 基因在肺癌及正常人群中的表达情况来评价该基因是否能在 NSCLC 患者的早期诊断、判定预后中起作用。

对象与方法

1. 研究对象:选择浙江省肿瘤医院住院 NSCLC 患者 132 例,中位年龄 61 岁(37 ~ 75 岁),平均年龄 59.02 岁,所有 NSCLC 患者均经手术病理确诊。收集 NSCLC 患者术中组织标本,取肿瘤组织及距癌灶最远端的瘤旁正常组织。

2. 检测方法及检测指标:运用焦磷酸测序法对 NSCLC 患者肿瘤组织细胞进行甲基化检测;采用实时荧光定量 PCR (real-time-PCR, RT-PCR) 技术检测 NSCLC 患者肿瘤组织及正常对照组织中的 G_0S_2 的 mRNA 表达情况。选择 Takara primerscript RT reagent kit 反转录试剂盒、TaKaRa SYBR premix Extaq II 试剂盒,在冰上配制反应体系,应用 primer premier 5.0 软件设计引物,以 GAPDH 为内参,引物序列, GAPDH: 上游引物: 5' - CGACAGTCAGCCG-CATCT - 3'、下游引物: 5' - ACCTTCCCCATGGT-GTCTCA - 3', G_0S_2 : 上游引物: 5' - ACCTACCACAAG-CATCCACC - 3'、下游引物: 5' - CATTTATCCTTC-CTCCCTAG - 3', 反应结束由计算机自动计算得到各反应管循环阈值 (threshold cycle, CT), 若复孔间 Ct 值之差 > 1, 需重复实验样品。目的基因的相对表达率 (relative expression, RQ) 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算。上述检测过程均严格遵照 MIEQ 指南进行。

3. 统计学方法:采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析, $K-S$ 检验数据是否符合正态分布, 计量资料数值用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 计数资料用百分率表示。计量资料两组间比较用 t 检验; 计数资料两组间比较用 χ^2 检验; 采用 Kaplan Meier 分析 G_0S_2 基因表达量高低对患者预后的影响, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. G_0S_2 基因在 NSCLC 患者肿瘤组织中的甲基化情况: 对 50 例 NSCLC 患者的肿瘤组织标本进行 G_0S_2 基因甲基化检测, 检测得 20 例患者中存在甲基化, G_0S_2 甲基化率为 40%。

2. G_0S_2 基因在 NSCLC 患者及正常对照组中的

表达情况: 在 NSCLC 患者正常组中 G_0S_2 基因表达量相对较高 [中位数 0.47 (0.00 ~ 42.21)], 平均表达量 2.09), 而在 NSCLC 患者肿瘤组织中 G_0S_2 基因表达量相对较低 [中位数 0.21 (0.00 ~ 46.77), 平均表达量 1.10], 两者比较差异有统计学意义 ($P = 0.000$)。见表 1, 图 1。

表 1 G_0S_2 基因在 NSCLC 患者及正常对照组中的表达情况 [M (最小值 ~ 最大值)]

组别	n	G_0S_2 表达量	P
NSCLC 患者组	132	0.21 (0.00 ~ 46.77)	0.000
正常对照组	132	0.47 (0.00 ~ 42.21)	

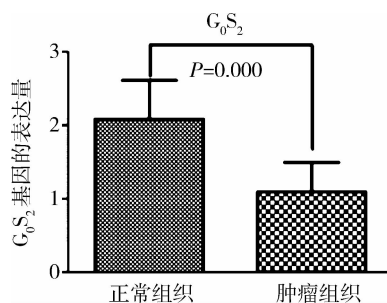


图 1 G_0S_2 基因在 NSCLC 肿瘤组织及正常组织中的表达情况

3. G_0S_2 基因在 NSCLC 患者中的表达情况: 根据 NSCLC 患者的人数平均分为两组后, 相对应的 cut-off 值为 0.2。以 0.2 为分界, 确定 G_0S_2 低值及高值, RT-PCR 测得结果低表达组相对含量 0 ~ 0.20, 高表达组相对含量 0.21 ~ 46.77。对影响 G_0S_2 基因在 NSCLC 患者肿瘤组织中的表达情况进行单因素分析, 结果显示 NSCLC 患者的年龄、性别、吸烟史 (不包括二手烟史)、肿瘤的病理类型、分期分级对 G_0S_2 基因表达的影响差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

4. G_0S_2 基因对 NSCLC 患者预后的影响: 术后对 NSCLC 患者进行跟踪随访, 最后随访时间为 2013 年 1 月。对患者无疾病生存时间 (DFS) 的分析中, 完成随访的患者 122 例, G_0S_2 基因高表达 61 例, 16 例 (26.2%) 发生疾病进展, G_0S_2 基因低表达 61 例, 12 例 (19.7%) 发生疾病进展, 差异无统计学意义 ($P = 0.876$), 见图 2。对患者总生存期 (OS) 的分析中, 完成随访的患者 130 例, G_0S_2 基因高表达 64 例, 13 例 (20.3%) 死亡, G_0S_2 基因低表达 66 例, 9 例 (13.6%) 死亡, 差异无统计学意义 ($P = 0.934$), 见图 3。

表 2 G₀S₂ 基因在 NSCLC 患者中的表达情况 [n(%)]

项目	n	G ₀ S ₂ 低值	G ₀ S ₂ 高值	P
年龄(岁)				0.333
<65	95(72.0)	50(52.6)	45(47.4)	
≥65	37(28.0)	16(43.2)	21(56.8)	
性别				0.819
男性	109(82.6)	55(50.5)	54(49.5)	
女性	23(17.4)	11(47.8)	12(52.2)	
分级				0.554
中、高级	68(51.5)	37(54.4)	31(45.6)	
低级	59(44.7)	29(49.2)	30(50.8)	
缺失	5(3.8)			
病理分类				0.118
肺鳞状细胞癌	79(59.8)	44(55.7)	35(44.3)	
肺腺癌	47(35.6)	18(38.3)	29(61.7)	
其他	6(4.5)	4(66.7)	2(33.3)	
分期				0.359
I~II	87(65.9)	46(52.9)	41(47.1)	
III~IV	45(34.1)	20(44.4)	25(55.6)	
吸烟史				0.794
有	27(20.5)	13(48.1)	14(51.9)	
无	102(77.3)	52(51.0)	50(49.0)	
缺失	3(2.2)			

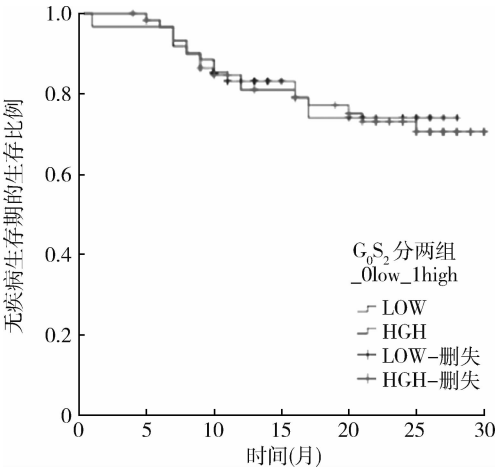


图 2 G₀S₂ 基因在肿瘤组织中表达量对患者无疾病生存期的影响

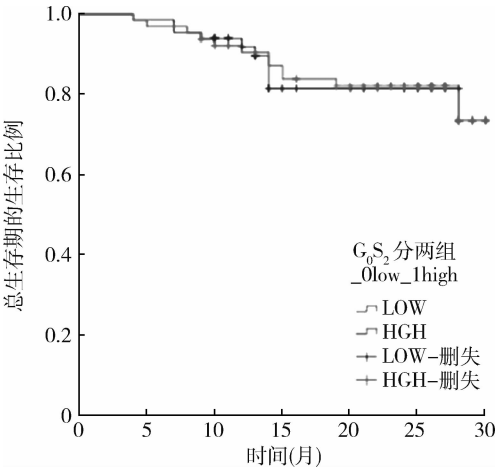


图 3 G₀S₂ 基因在肿瘤组织中表达量对患者总生存期的影响

讨 论

G₀S₂ 基因位于 1 号染色体,编码 103 个氨基酸组成的碱性蛋白质,是细胞内脂肪分解的关键的内源性抑制剂,与肥胖、脂肪肝等密切相关^[4,5]。另外,研究者们发现 G₀S₂ 基因为全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, RA)和过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)激动剂的靶基因^[6]。RA 治疗急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)的基础在于介导早幼粒细胞终末期分化。用 RA 处理的 APL 细胞及 APL 小鼠模型细胞中,G₀S₂ 基因表达的 mRNA 及 G₀S₂ 蛋白都有显著提高^[7]。尽管 G₀S₂ 基因作为 RA 作用的靶点是令人信服的,但是该基因的作用却仍无法明确。

近年来研究发现 G₀S₂ 基因不仅与脂肪代谢相关,对肿瘤抑制、免疫调节有一定的作用,并发现在头颈部鳞癌及肺鳞癌的发生、发展中起一定的作用^[8-10]。随着对 G₀S₂ 基因的深入研究,研究者们发现该基因是细胞内一个潜在的抑癌基因。Heckmann 等^[4]发现在细胞凋亡前,细胞内 G₀S₂ 基因会高表达,这证实了 G₀S₂ 基因可能是抑癌基因的一种。而在细胞内将 G₀S₂ 基因敲除,会促进癌基因诱导转化,这也从另一方面支持了 G₀S₂ 是一种抑癌基因的猜测^[10]。而 Kusakabe 等^[6]对 LC-1/sq 肿瘤细胞的研究中并没有观察到 G₀S₂ 基因的高表达与细胞周期停滞及细胞凋亡之间存在联系,并且发现 G₀S₂ 基因高表达后会引起细胞增殖轻度增加,但这种细胞增殖的现象研究者们认为更像是由致癌作用引起的,而不是对 G₀S₂ 基因高表达的应答。因此,我们需要进一步的研究来阐明 G₀S₂ 基因在细胞致癌过程中所起的作用。而后,Welch 等^[10]发现 G₀S₂ 基因编码的线粒体蛋白能与 Bcl-2 特异性相互作用,通过防止保护性 Bcl-2/Bax 异二聚体形成而促进凋亡。在对肺鳞癌细胞系的研究中发现,G₀S₂ 基因的表达主要受该基因甲基化的调控,当 G₀S₂ 基因发生甲基化时,该基因表达的 mRNA 则明显减少^[6]。在肺鳞癌细胞系中 G₀S₂ mRNA 的表达主要被其 DNA 甲基化调节,两者呈负相关,G₀S₂ 基因甲基化可作为肺鳞癌的一种重要生物标志物,肺鳞癌 G₀S₂ 甲基化频率明显高于非鳞癌^[11]。另有体外实验表明,G₀S₂ 基因在顺铂耐药的癌细胞中高甲基化而低表达^[12]。

本研究结果显示,在 NSCLC 患者肿瘤组织中约有 40% 的人存在该基因的甲基化,高于 Kusakabe

等^[11]的研究结果(肺鳞癌: $n=18$,甲基化率15%),这样的差异可能由多种原因引起,如样本量、检测方式、取材过程等,仍需要开展多中心、大样本的研究。另外,与正常对照组比较,NSCLC患者细胞中的 G_0S_2 基因表达量明显下降。鉴于 G_0S_2 基因在NSCLC肿瘤组织中的高甲基化率及表达量的下降,笔者猜测检测 G_0S_2 基因的甲基化率或该基因的表达水平对NSCLC的早期诊断有一定的参考价值。但在 G_0S_2 基因表达量影响的单因素分析结果显示NSCLC患者的年龄、性别、吸烟史(不包括二手烟史)、肿瘤的病理类型、分期分级对 G_0S_2 基因表达的影响差异均无统计学意义,并且 G_0S_2 基因表达量的多少与NSCLC患者的DFS及OS无明显相关性,但笔者可以看到,在 G_0S_2 基因表达高低组中,发生疾病进展及死亡的病例数在数值上有一定的差异,这种差异在小样本的实验研究中无法体现,提高样本量的情况下这种差异是否会进一步拉大并具有统计学意义,仍需开展进一步的研究来证实。笔者认为 G_0S_2 基因在肿瘤形成过程中起着一定的作用。

综上所述,检测 G_0S_2 基因的表达情况对NSCLC患者早期诊断有一定的作用,但在后续指导肺癌分期、预测患者预后等方面无明显参考价值。本研究结果对于该基因在NSCLC患者发生、发展中的作用有一定的指导意义,为后续研究和临床决策提供参考意义。

参考文献

- 1 Li X, Zhu G. Clinical developments for the EGFR-TKI combined with radiotherapy in advanced non-small cell lung cancer [J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2014, 17(4):357-362
- 2 Molina JR, Yang P, Cassivi SD, *et al.* Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship [J]. *Mayo*

- Clin Proc*, 2008, 83(5):584-594
- 3 Ting AH, Schuebel KE, Baylin SB, *et al.* Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(8):906-910
- 4 Heckmann BL, Zhang X, Xie X, *et al.* The G_0/G_1 switch gene 2 (G_0S_2): regulating metabolism and beyond [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(2):276-281
- 5 Cerik IK, Salzburger B, Boeszoermenyi A, *et al.* A peptide derived from G_0/G_1 switch gene 2 acts as noncompetitive inhibitor of adipose triglyceride lipase [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(47):32559-32570
- 6 Kusakabe M, Watanabe K, Emoto N, *et al.* Impact of DNA demethylation of the G_0S_2 gene on the transcription of G_0S_2 in squamous lung cancer cell lines with or without nuclear receptor agonists [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390(4):1283-1287
- 7 Kitareewan S, Blumen S, Sekula D, *et al.* G_0S_2 is an all-trans-retinoic acid target gene [J]. *Int J Oncol*, 2008, 33(2):397-404
- 8 Ma T, Lopez-Aguilar AG, Lu Y, *et al.* Mice lacking G_0S_2 are lean and cold-tolerant [J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(5):643-650
- 9 Tokumaru Y, Yamashita K, Osada M, *et al.* Inverse correlation between cyclin A1 hypermethylation and p53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(17):5982-5987
- 10 Welch C, Santra MK, El-Asaad W, *et al.* Identification of a protein, G_0S_2 , that lacks Bcl-2 homology domains and interacts with and antagonizes Bcl-2 [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(17):6782-6789
- 11 Kusakabe M, Kutomi T, Watanabe K, *et al.* Identification of G_0S_2 as a gene frequently methylated in squamous lung cancer by combination of in silico and experimental approaches [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(8):1895-1902
- 12 Chang X, Monitto CL, Demokan S, *et al.* Identification of hypermethylated genes associated with cisplatin resistance in human cancers [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7):2870-2879

(收稿日期:2016-07-20)

(修回日期:2016-09-03)

右美托咪定对神经病理性疼痛的作用及其机制

杨颖聪 夏中元 孟庆涛 刘康 赵博

摘要 目的 观察右美托咪定对坐骨神经结扎所致神经病理性疼痛的镇痛作用,从离子通道角度探讨其机制。**方法** SD大鼠随机分为3组:CCI组、CCI+Dex组及Sham组,每组9只。CCI组和CCI+Dex组通过结扎坐骨神经建立神经病理性疼痛模型,Sham组只暴露坐骨神经不结扎。术后7天,CCI+Dex组腹腔注射右美托咪定 $40\mu\text{g/kg}$,CCI组腹腔注射等量生理盐水,1次/天,连续3天。大鼠术前、CCI术后7天及注药后3天采用Von Frey纤维测定机械性缩足阈值(PWMT),热辐射法测定缩足潜伏期(TWL)。麻醉后处死大鼠,采用酶解法分离大鼠的腰段背根神经节(DRG)细胞,另将HCN1与HCN2质粒转染至HEK293细

作者单位:430060 武汉大学人民医院麻醉科

通讯作者:夏中元,教授,主任医师,博士生导师,电子信箱:xiazhongyuan2005@aliyun.com