

GATA4 基因甲基化在早期结直肠癌诊断中的作用

余 昆, 李云峰, 杨之斌, 程先硕, 黄云超

(云南省肿瘤医院, 昆明医科大学第三附属医院, 云南 昆明 650118)

摘要: [目的] 检测早期结直肠癌(colorectal cancer, CRC)患者粪便中 GATA4 基因甲基化水平, 探讨其临床价值, 为 CRC 早期无创诊断探索新的途径。[方法] 60 例早期(I+II 期) CRC 患者、30 例正常对照者粪便中提取 DNA, 采用巢式甲基化特异性 PCR(nMSP)技术分析其 GATA4 基因甲基化状态。同时检测 60 例早期(I+II 期) CRC 患者血清 CEA 和粪便潜血。[结果] CRC 患者术前粪便标本中 GATA4 基因甲基化检测率显著高于正常对照组 GATA4 基因甲基化检测率和 CRC 患者粪便潜血检测率以及 CEA 检测率(76.7% vs 6.7%, $P=0.000$; vs 48.3%, $P=0.001$; vs 35.0%, $P=0.000$), 而 GATA4 基因甲基化检出率与患者性别、年龄和肿瘤部位无明显相关($P>0.05$)。[结论] CRC 早期患者粪便标本中 GATA4 基因甲基化检测率较高, 优于粪便潜血实验和血清 CEA, 可作为早期无创筛查诊断结直肠癌的重要线索。

关键词: GATA4 基因; 甲基化; 结直肠肿瘤; 粪便

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)01-0030-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.01.B007

The Role of Methylation of GATA4 Gene on the Diagnosis of Colorectal Cancer Early Stage

YU Kun, LI Yun-feng, YANG Zhi-bin, et al.

(Yunnan Cancer Hospital, the 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650118, China)

Abstract: [Purpose] To detect methylation level of GATA4 gene in faeces from early colorectal cancer (CRC) patients, to investigate its clinical value and to explore a new non-invasive diagnostic process for early CRC. [Methods] Fecal DNA was collected from 60 cases with early CRC(stage I+II) and 30 normal controls, nested methylation specific PCR (nMSP) was used to analyze methylation status of GATA4 gene. Serum CEA and fecal occult blood were also detected in patients with early CRC(stage I+II). [Results] GATA4 gene methylation detection rate in early CRC patients was significantly higher than that in normal controls, and also was higher than detection rates of fecal occult blood and serum CEA respectively (76.7% vs. 6.7%, $P=0.000$; vs. 48.3%, $P=0.001$; vs. 35.0%, $P=0.000$); and GATA4 gene methylation detection rate had no relation with gender, age and the location of tumor($P>0.05$). [Conclusion] GATA4 gene methylation detection rate in faeces from early CRC patients is higher than detection rates of fecal occult blood and serum CEA, which provide an important way of non-invasive screening and diagnosis for early CRC.

Subject words: GATA4 gene; methylation; colorectal neoplasms; faeces

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的恶性肿瘤之一,其死亡率居恶性肿瘤死亡的第3位^[1]。DNA 甲基化是一种最常见的表观遗传学修饰方式,近年的研究发现, DNA 甲基化异常与人类肿瘤关系

密切。早在 2004 年, Belshwa 等^[2]通过研究首先证实通过甲基化特异性 PCR 技术可以检测出粪便 DNA 甲基化水平。随后, Muller 等^[3]的研究显示, 在腺癌患者中 *SFRP2* 基因甲基化的检出率达 46%。Lenhard 等^[4]发现 CRC 患者的粪便中高甲基化基因 1(*HIC1*)的甲基化在腺癌患者中检出率达 42%。Hellebrekers 等^[5]研究报道, 结直肠癌患者粪便 GATA4 甲基化及

通讯作者: 黄云超, 主任医师, 博士; 昆明医科大学第三附属医院胸外科, 云南省昆明市西山区昆州路 519 号(650118); E-mail: huangych2001@aliyun.com

收稿日期: 2014-09-24; **修回日期:** 2014-10-16

GATA5 甲基化的检出率分别为 70%和 79%,而在正常人群中的检出率仅为 6%和 13%。这些研究表明特异基因的甲基化有望作为结直肠癌筛查和诊断的分子标志物。而 GATA4 在结直肠癌患者粪便中的检出率显著高于 SFRP2 和 HIC1, 因此, 我们选择 GATA4 进行研究,期望寻找到筛查和诊断结直肠癌的最佳指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2013 年 3 月至 2013 年 9 月昆明医科大学第三附属医院大肠癌临床研究中心 60 例早期结直肠癌患者(cTNM 分期 I 或 II 期)术前粪便标本。同时期 30 例健康正常人的粪便标本作为对照。所有患者术前均未接受过放化疗,临床资料完整,均签署了知情同意书。所有患者入院或门诊检查时均检测粪便潜血和血清癌胚抗原。患者粪便标本于手术前晚上排便时收集,对照者为早晨排便时收集,收集后半小时内送实验室,分装后置于-80℃超低温冰箱冻存备用。

1.2 方法

1.2.1 粪便 DNA 提取及亚硫酸氢盐修饰

采用 QIAGEN 公司 DNA 提取试剂盒 QIAmp DNA Stool Mini Kit 提取 DNA,方法按照各试剂盒说明进行。之后在紫外分光光度计上测 OD 值(OD 值均在 1.7~1.9 之间),计算出 DNA 的浓度及总量(DNA 量在 15~100μg 之间)。采用 Millipore 公司 CpGenome Turbo Bisulfite Modification Kit 试剂盒,方法按照说明进行。利用亚硫酸氢盐对 DNA 进行化学修饰,使甲基化及非甲基化的 DNA 序列产生不同转变。双链 DNA 变性解链后,在亚硫酸氢盐作用下,未发生甲基化的胞嘧啶(C)转变为尿嘧啶(U),而甲基化的 C 则不发生变化的原理进行 DNA 的亚硫酸氢盐修饰^[6]。

1.2.2 巢式甲基化特异性 PCR

利用巢式甲基化特异性 PCR^[7]原理检测 GATA4 基因的甲基化状态。巢式甲基化特异性 PCR 引物为:上游:5'-GGG AGT TTT TYG TAT AGT TTY GTA G-3';下游:5'-CCR ACC RCC TCC AAA TCC CCA AC-3'。巢式甲基化特异性 PCR 反应体系为 50μl:DNA 模板 1μl,10×扩增缓冲液 5μl,Long-

TaqDNA 聚合酶 0.25μl,dNTP 4μl,上下游引物各 1μl,灭菌用水 38μl。PCR 反应条件:94℃变性 5min,94℃变性 30s,56℃退火 45s,72℃延伸 45s,以上步骤共 35 个循环,72℃延伸 7min。

1.2.3 甲基化特异性 PCR

以巢式甲基化特异性 PCR 反应产物 1:100 稀释为模板,进行甲基化特异性 PCR 扩增。甲基化特异性 PCR 的引物:GATA4 基因甲基化的引物分别为,GATA4 基因甲基化 F:5'-GTA TAG TTT CGT AGT TTG CGT TTA GC-3',GATA4 基因甲基化 R:5'-AAC TCG CGA CTC GAA TCC CCG-3',PCR 产物大小为 136bp;GATA4 基因非甲基化的引物分别为:GATA4 基因非甲基化 F:5'-TTT GTA TAG TTT TGT AGT TTG TGT TTA GT-3',GATA4 基因非甲基化 R:5'-CCC AAC TCA CAA CTC AAA TCC CCA-3',PCR 产物大小为 140bp。

甲基化特异性 PCR 反应体系为 50μl:DNA 模板 1μl,10×PCR Buffer 5μl,LongTaqDNA 聚合酶 0.25μl,dNTP 4μl,上下游引物各 1μl,灭菌用水 38μl。GATA4 甲基化 PCR 反应条件:94℃变性 5min,94℃变性 30s,退火 45s,72℃延伸 45s,以上步骤共 30 个循环,72℃延伸 7min。其中 GATA4 基因甲基化的退火温度为 68℃,GATA4 基因非甲基化的退火温度为 64℃。

经上述两次 PCR 扩增后,将 5μl PCR 产物加到含 EB 的 2%琼脂糖凝胶上进行电泳,用凝胶成像系统观察结果并拍照。

1.3 统计学处理

本试验数据采用 SPSS16.0 统计软件处理,计数资料采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲基化检测结果

粪便标本均顺利提取 DNA,其含量为 20~110μg 之间,标本 DNA 均成功实现亚硫酸氢盐修饰、巢式甲基化特异性 PCR 和甲基化特异性 PCR(Figure 1,2)。

2.2 早期结直肠癌 GATA4 基因甲基化情况

60 例 I + II 期结直肠癌患者粪便脱落细胞 DNA 中有 GATA4 基因甲基化的 46 例 (76.7%),30 例正常人粪便脱落细胞 DNA 中有 GATA4 基因甲基化的

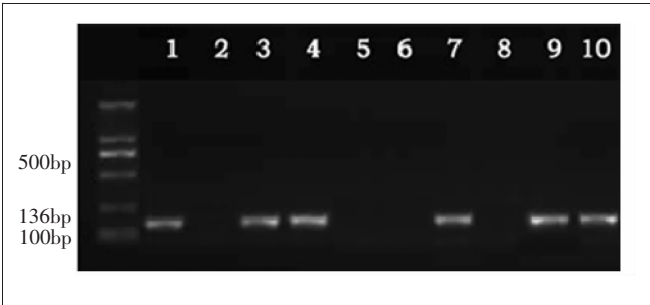


Figure 1 Methylation of GATA4 was detected by nested M-MSP in faeces from preoperative patients

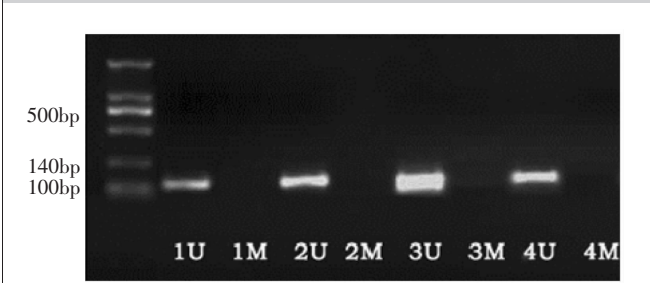


Figure 2 Methylation of GATA4 was detected by nested M-MSP in faecus from normal controls

2 例 (6.7%), 两者比较差异有统计学意义 ($\chi^2=39.375, P=0.000$)。

2.2 甲基化与粪便潜血试验和癌胚抗原检测结果比较

60 例 CRC 肿瘤患者粪便中的潜血试验和空腹抽外周血查癌胚抗原的检出率分别为 48.3% 和 35.0%, 均低于粪便标本 GATA4 基因甲基化检出率 76.7%, 差异有统计学意义 ($P=0.001, P=0.000$) (Table 1)。

Table 1 Comparison of methylation, fecal occult blood and CEA in early colorectal cancer patients				
Items	N	Positive rates(%)	χ^2	P
Methylation	60	46 (76.7)		
Fecal occult blood	60	29 (48.3)	10.276	0.001*
CEA	60	21 (35.0)	21.121	0.000*

Note: *: Compared with methylation.

2.3 CRC 患者年龄、性别、肿瘤部位与 GATA4 启动子甲基化改变的关系比较

60 例 CRC 患者中, 男性和女性 GATA4 基因甲基化检出率 (76.3% vs 77.3%) 差异没有统计学意义 ($P=0.933$); 年龄 <45 岁和 ≥ 45 岁患者 GATA4 基因甲基化检出率 (73.6% vs 78.0%) 差异没有统计学意义 ($P=0.710$); 结肠癌和直肠癌患者 GATA4 基因甲

基化检出率 (77.4% vs 75.9%) 差异没有统计学意义 ($P=0.887$) (Table 2)。

Table 2 Correlation between methylation of <i>GATA4</i> with gender ,age and location of tumor				
Items	N	Methylation rates of <i>GATA4</i>	χ^2	<i>P</i>
Gender				
Male	38	29(76.3)	0.007	0.933
Female	22	17(77.3)		
Age(Years old)				
<45	19	14(73.6)	0.138	0.710
≥45	41	32(78.0)		
Location				
Colon	31	24(77.4)	0.020	0.887
Rectum	29	22(75.9)		

3 讨论

DNA 甲基化是一种最常见的表观遗传学修饰方式, 在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 的作用下, 以 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 为甲基供体, 将甲基基团转移到胞嘧啶和鸟嘌呤 (CpG) 二核苷酸的胞嘧啶 5 位碳原子上, 生成 5-甲基胞嘧啶 (5-methylcytosine, m5C) [8]。甲基化 CpG 结合蛋白 (methyl-CpG binding protein, MeCPs) 选择性地特异结合于甲基化 DNA 导致染色质结构改变, 阻止转录因子与启动子结合从而抑制基因的转录 [9]。肿瘤细胞中 DNA 甲基化状态异常, 表现为基因组整体甲基化水平降低和特异性基因启动子区域 CpG 岛甲基化水平异常增高。多数癌组织中整个基因序列的低甲基化是由约占人类基因组 40% 的重复序列低甲基化所引起的, 这些 DNA 重复序列包括: 异染色质 DNA 重复、散在逆转录转座子和内源的逆转录病毒元件。DNA 异常甲基化可以促进肿瘤相关基因的突变和异常表达, 一些抑癌基因由于启动子区的甲基化而使该基因表达缺失从而导致肿瘤的发生 [10]。

人类 GATA4 基因是一类含有锌指结构的组织特异性表达的转录因子, 能结合共同序列 (A/T)GATA(A/G) [11]。它位于人类染色体 8p23.1-p22, 总长度 55 757bp, 有 7 个外显子, cDNA 全长 3372bp, 编码序列全长 1329bp。所有 GATA 蛋白质中锌指 C 末端的 DNA 识别区都是高度保守的。DNA 结合域由两个锌指结构组成, 每一个锌指结构区由两个 Cys-X-

Cys(Cys 半胱氨酸,X 为可变氨基酸)结构组成,中间有 17 个氨基酸间隔即序列为 Cys-X2-Cys-X17-Cys-X2-Cys, 其中 4 个半胱氨酸与 1 个锌离子组成四面体结构, 扭曲为折叠或螺旋状。两个锌指结构功能不同,C 梭基末端锌指是 DNA 结合所必需的,而 N 氨基末端锌指并不能直接结合 DNA,但能影响 DNA 结合的稳定性和特异性以及 GATA4 转录因子的转录活性^[12]。GATA4 的表达起始于心脏中胚层的早期, 并且在心脏组织中持续高水平表达。GATA 基因是一个包含 6 个转录因子, 研究表明 GATA4,5,6 在肿瘤的发生发展中起一定的作用^[13]。GATA4 基因启动子的甲基化导致其基因表达失活,而 GATA4 基因的失活能引起细胞无限制分裂增殖,最终导致肺癌^[14]、胃癌^[15]、结直肠癌^[16]等肿瘤的发生。

在本次小样本检测中,我们发现,早期结直肠癌患者粪便中 GATA4 甲基化检出率(76.7%)显著高于正常人(6.7%),并且与患者性别、年龄、肿瘤部位等无明显相关性。这与 Hellebrekers 等^[5]研究报道接近,因此,GATA4 可能成为筛查和诊断结直肠癌的一个新的指标。目前,降低 CRC 死亡率、提高患者生存率的最佳方案是筛查早期癌和癌前病变^[17]。结直肠癌诊断的“金标准”是纤维结肠镜。但是肠镜是一种侵入性的检查,要求完全彻底的肠道准备,隐私的暴露以及镇静等不便,让患者难于忍受。而目前常用的筛查方式有粪便隐血(FOBT)试验及癌胚抗原(CEA),McLoughlin 等^[18]报道的一项含超过 330 000 例受试者的 4 项随机对照试验和超过 200 000 例受试者的 3 项非随机试验的长期随访结果显示,FOBT 筛查使 CRC 死亡率降低 12%~33%。不足之处为敏感性和特异性较低^[19]。本次小样本实验 CRC 患者粪便 GATA4 阳性率较 CEA 检测(76.7% vs 35.0%)以及 FOBT 检测(76.7% vs 48.3%)占有优势。

综上所述,GATA4 可能成为无创筛查和诊断结直肠癌的一个新的指标,其最佳的检测手段是通过收集粪便标本。以上研究结果将为确立 GATA4 基因甲基化在筛查和诊断早期结直肠癌的作用提供理论依据,为开展无创的检查方式来减轻患者痛苦,提高早期结直肠癌的检出率提供技术支持。

参考文献:

- [1] Jemal A,Bray F,Center MM,et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90.
- [2] Belshaw NJ,Elliott GO,Williams EA,et al. Use of DNA

- from human stools to detect aberrant CpG island methylation of genes implicated in colorectal cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2004,13(9):1495-1501.
- [3] Oberwalder M,Zitt M,Wontner C,et al. SFRP2 methylation in fecal DNA—a marker for colorectal polyps[J]. Int J Colorectal Dis,2008,23(1):15-19.
- [4] Lenhard K,Bommer GT,Asutay S,et al. Analysis of promoter methylation in stool;a novel method for the detection of colorectal cancer [J]. Clin Gastroenterol Hepatol,2005,3(2):142-149.
- [5] Hellebrekers DM,Lentjes MH,van den Bosch SM,et al. GATA4 and GATA5 are potential tumor suppressors and biomarkers in colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res,2009,15(12):3990-3997.
- [6] Yao QF,Ning Y,Hao QL,et al. Chemiluminescence quantitative detection of p16 promoter hypermethylation based on mismatch hybridization [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine,2005,28(10):1057-1059. [姚群峰,宁勇,郝巧玲,等. 错配杂交化学发光法定量检测 p16 基因过甲基化 [J]. 中华检验医学杂志,2005,28(10):1057-1059.]
- [7] Yang Y,Xue JR,Xiao L,et al. Detection of methylation of p16 gene by nested methylation specific PCR[J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine,2008,19(2):8-10. [杨燕,薛津若,肖凌,等. 巢式甲基化特异性 PCR 检测 p16 基因甲基化 [J]. 公共卫生与预防医学,2008,19(2):8-10.]
- [8] Hermann A,Gowher H,Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases[J]. Cell Mol Life Sci,2004,61(19-20):2571-2587.
- [9] Jones PA,Baylin SB. The epigenomics of cancer [J]. Cell,2007,128(4):683-692.
- [10] Esteller M. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes:questions and answers [J]. J Pathol,2005,205(2):172-180.
- [11] Garg V,Kathiriyi IS,Barnes R,et al;GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5[J]. Nature,2003,424(6947):443-447.
- [12] Zhou L,Liu Y,Lu L,et al. Cardiac gene activation analysis in mammalian non-myoblastic cells by Nkx2-5,Tbx5, Gata4 and Myocd[J]. PLoS One,2012,7(10):e48028.
- [13] Wen XZ,Akiyama Y,Pan KF,et al. Methylation of GATA-4 and GATA-5 and development of sporadic gastric carcinomas[J]. World J Gastroenterol,2010,16(10):1201-1208.
- [14] Castro IC,Breiling A,Luetkenhaus K,et al. MYC-induced epigenetic activation of GATA4 in lung adenocarcinoma [J]. Mol Cancer Res,2013,11(2):161-172.
- [15] Varier RA,Vermeulen M. Differential epigenetic regulation of GATA4 in gastric adenocarcinomas [J]. Epigenomics,2012,4(4):367.
- [16] Bhat AA,Sharma A,Pope J,et al. Caudal homeobox protein Cdx-2 cooperates with Wnt pathway to regulate claudin-1 expression in colon cancer cells [J]. PLoS One,2012,7(6):e37174.
- [17] Lee KJ,Inoue M,Otani T,et al. Colorectal cancer screening using fecal occult blood test and subsequent risk of colorectal cancer;a prospective cohort study in Japan[J]. Cancer Detect and Prev,2007,31(1):3-11.
- [18] McLoughlin RM,O'Morain CA. Colorectal cancer screening[J]. World J Gastroenterol,2006,12(42):6747.
- [19] Stewart BW,Kleihues P. World cancer report [R]. Lyon: IARC Press,2003. 104-108.