

DNA 甲基化——新一代癌症早期诊断指标（肺癌篇）

导读：在全世界范围内，肺癌是威胁公众健康的头号恶性肿瘤，早期诊断可大大提高 5 年存活率。肺泡灌洗液（BALF）由于创伤小、毗邻肿瘤细胞，有望成为肺癌的早期诊断标本。然而，受诸多因素影响，BALF 的细胞学检查灵敏度并不高。近年来，随着分子遗传学技术的发展，灵敏度高、特异性强的肿瘤标志基因检测被广泛地应用于临床诊断、治疗及预后评估。BALF 遗传学标志物的检测有望辅助肺癌早期诊断。

1、肺癌与 DNA 甲基化

DNA 甲基化是表型修饰的一种，与癌症的发生密切相关。尤其是 CpG 岛区的启动子超甲基化可能会导致抑癌基因转录沉默，从而影响肿瘤发生的进程。由于 DNA 甲基化几乎在所有癌症中均有发现，并且发生在癌前或者癌症早期阶段，因而有望成为癌症早期诊断的理想标志物。矮小同源盒基因（SHOX2）和 RAS 相关家族 1A(RASSF1A)是常见的肺癌 DNA 甲基化标志物。

SHOX2 属 SHOX 基因家族，位于 3 号染色体 q25-q26.1 区域，编码 60 个氨基酸构成的 DNA 结合区域蛋白，是一种常见的转录调控因子。RASSF1A 是 Ras 信号通路的成员，位于 3 号染色体 p21.3，调控细胞的增殖和自噬。研究显示，相比于肺腺癌，SHOX2 基因甲基化检测对于小细胞肺癌和鳞癌具有更高的特异性。而 RASSF1A 的表达下调对肺腺癌的发展至关重要。

2、DNA 甲基化检测方法

对于特定片段的甲基化检测方法很多，包括甲基化特异性 PCR（MS-PCR）、亚硫酸盐处理+测序、联合亚硫酸盐的限制性内切酶法（COBRA）、焦磷酸测序、PCR 荧光变性曲线分析及荧光定量法（MethyLight）等。

MS-PCR: DNA 经亚硫酸盐处理后，非甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶保持不变。在 PCR 反应时，有两套不同的引物对，分别针对经处理后的甲基化和非甲基化链，若甲基化的链被扩增出说明检测位点生了甲基化，若非甲基化的链被扩增出，则说明无甲基化。

亚硫酸盐测序: DNA 经亚硫酸盐处理后，PCR 扩增待测片段，随后对产物进行测序，并于未经处理的序列进行比对，判断是否发生甲基化。

COBRA: DNA 经亚硫酸盐处理后，对待测片段进行 PCR 扩增，并用限制性内切酶进行切割，完全甲基化的片段可被识别切割，非甲基化的则不能被识别切割。对酶切产物进行电泳分析，根据条带判断样本中甲基化程度。

焦磷酸法测序: 通过酶级联反应每个 dNTP 的聚合与荧光信号的释放偶联，通过检测荧光的释放和强度，可实现 DNA 测序的目的。

PCR 荧光变性曲线分析: DNA 经亚硫酸盐处理后，对待检 DNA 片段进行 PCR 扩增，检测 DNA 结合染料的荧光强度，获得待检 DNA 的溶解曲线。通过变性温度的不同即可区分甲

基化与非甲基化的 DNA。

MethyLight: 此法结合了亚硫酸盐修饰与 Taqman 探针技术。DNA 经亚硫酸盐处理后, 非甲基化的 C 被修饰成 U (扩增时被 T 取代), 而甲基化 C 保持不变。随后的 RT-PCR 扩增过程中, 对于甲基化的样本, 探针可与待检位点杂交, PCR 延伸时, 报告荧光基团会被 Taq 酶切下释放光信号, 而非甲基化样本则不能被引物结合扩增, 通过检测荧光信号的强弱即可判断 DNA 的甲基化状态。

张毅敏等、Ren 等及 Zhang 等基于此法对临床上疑似肺癌患者的 SHOX2 和 RASSF1A 基因进行了甲基化检测, 并与测序法进行了比对。在张毅敏等的研究中, 两种方法对 SHOX2 和 RASSF1A 基因甲基化检测的一致率分别为 97.5%和 98.0%。Ren 等的研究中, 一致率则分别达到了 99%和 100%。Zhang 等的研究中也表现出了极好的一致性。说明了此法用于甲基化检测的可靠性。与测序法相比, 该法操作简单、成本低, 且所需 DNA 样本量很少, 减少了样本搜集难度, 故有望取代前者的甲基化检测。

3、DNA 甲基化检测助力肺癌临床诊断

3.1 大大高于传统指标的灵敏度和特异性

张毅敏等的研究结果显示, SHOX2 和 RASSF1A 任意甲基化阳性对肺癌的敏感性和特异性分别为 74.3%和 87.1%。Ren 等的研究结果与此十分接近, 分别为 71.5%和 90%。而 Zhang 等则分别达到 81.0%和 97.4%。Zhang 等还对细胞学和血清 CEA 对肺癌的灵敏度进行了统计, 分别为 68.3%和 30.6%。

3.2 区分其他恶性肿瘤和良性疾病

三项研究中均用其他恶性肿瘤和良性疾病做了对照, 甲基化阳性率均远远低于肺癌, 因而提示 SHOX2/RASSF1A 甲基化检测有望用于区分肺癌和其他恶性肿瘤和良性疾病, 具体数据见表 1:

SHOX2/RASSF1A 基因甲基化任意阳性率			
	张毅敏	Ren	Zhang
肺癌	74.3%	71.5%	81.6%
良性肺病/其他恶性肿瘤	12.9%	10.0%	2.6%

3.3 重要的早期诊断价值

Zhang 等的研究表明, BALF 的 SHOX2/RASSF1A 甲基化检测对 I 期的肺癌患者有极高的检出率, 为 85.7%, 远高于血清 CEA 和细胞学的 10.7%和 46.4%。Ren 等的研究中 SHOX2/RASSF1A 甲基化对肺癌 I 期检出率则为 70.2%。因此, SHOX2/RASSF1A 甲基化对于肺癌的早期诊断具有重要意义。

4、透景肺癌 DNA 甲基化检测试剂盒重磅上市

本文提及的几篇研究采用的都是透景生命开发的国际首创专利产品——人 SHOX2、

RASSF1A 基因甲基化 DNA 检测试剂盒 (专利证号: ZL2015 1 0203539.1), 产品注册证号: 国械 20173403354, 现已全面上市! 此外, 公司正在报批的同类产品还有结直肠癌 Septin9 甲基化检测试剂盒, 敬请期待!

参考文献

张毅敏, 王明丽, 吴杰, 等. 肺泡灌洗液中 SHOX2 和 RASSF1A 基因甲基化联合检测对肺癌的诊断价值[J]. 肿瘤学杂志, 2016, 22(12):1032-1036.

范保星. DNA 甲基化检测方法[J]. 国际遗传学杂志, 2002, 25(2):99-101.

Ren M, Wang C, Sheng D, et al. Methylation analysis of SHOX2 and RASSF1A in bronchoalveolar lavage fluid for early lung cancer diagnosis.[J]. Annals of Diagnostic Pathology, 2017, 27:57-61.

Zhang C, Yu W, Wang L, et al. DNA Methylation Analysis of the SHOX2 and RASSF1A Panel in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Lung Cancer Diagnosis. Journal of Cancer. 2017, 8(17):3585-3591.
