

SHOX2 基因甲基化在肺癌诊断中的研究及应用

基因启动子区域的超甲基化会造成基因转录沉默，于是，基因功能戛然而止，超甲基化便有可能化身成为一枚足以改变人类命运的休止符。这是好事还是坏事呢？这得根据该基因的功能而定，如果是一个抑癌基因，显然，这类基因发生超甲基化绝非好事。事实上，基因启动子区域的超甲基化就是肿瘤发生早期的一个里程碑事件，这并不是什么新鲜事儿。尤其是全球第一大癌症，肺癌，有关肺癌与甲基化的研究层出不穷。早在 2005 年，德国海涅大学的 Schmiemann 等人就已发现在肺癌患者中存在 *RASSF1A*、*APC*、*p16* (*INK4a*) 等基因的甲基化状态异常，于是提出了**利用甲基化检测来进行肺癌早期诊断**^[1]。后来随着甲基化特异性 PCR (MS-PCR) 等技术的开发，涉及到基于特定基因甲基化的肺癌早期诊断等研究日益增多，**甲基化也成为肺癌诊断的新型分子标志物**。现在，随便在 PubMed 上搜搜“methylation” & “lung cancer”，就能搜索出 3100 多篇文献。目前已发现的与肺癌发生有关的甲基化异常基因不少，今天，我们就来说说其中的一个基因：*SHOX2*。

揭开 SHOX2 基因的面纱

在一系列与肺癌有关的甲基化异常基因中，*SHOX2* 研究得较为深入。作为一个常见的转录调控因子，其甲基化水平的高低影响着肿瘤发生的进程。

SHOX2，全称 *Short Stature Homobox 2*，译为“矮小同源盒基因”，是同源盒基因家族的一员，其基因表达调控与器官发育密切相关。研究发现，*SHOX2* 基因在胚胎时期表达于中胚层和外胚层，对骨骼、心脏和神经系统的发育起到重要作用。另外，*SHOX2* 基因甲基化与肺癌等肿瘤有关，其是否有望成为肿瘤的诊断监测指标备受关注^[2]。

SHOX2 基因启动子区域甲基化与肿瘤

研究发现，*SHOX2* 基因启动子区域甲基化与一些肿瘤的发生有关。张建东^[3]采用甲基化特异性 PCR (MS-PCR) 方法对 39 例前列腺癌石蜡组织、15 例前列腺增生石蜡组织和 3 例正常前列腺组织进行 *SHOX2* 的甲基化研究，结果发现 *SHOX2* 启动子区域的 CpG 岛低甲基化频率在前列腺癌中显著高于在前列腺增生中，提示在前列腺癌的发生和发展中，*SHOX2* 可能扮演一种原癌基因的角色，通过低甲基化改变，导致染色体稳定性丢失，细胞增殖失控，从而促进肿瘤的形成和浸润。Zhang TA 等^[4]发现在神经胶质瘤中 *SHOX2* 基因的甲基化水平随着肿瘤恶性程度的升高而上升。Wei SH 等^[5]则发现在卵巢癌中 *SHOX2* 基因发生了超甲基化。与其它肿瘤相比，作为全球发病率与死亡率排名第一的癌症，肺癌，关于 *SHOX2* 基因甲基化的研究则更加丰富、详实，且目前 *SHOX2* 基因甲基化已应用于临床检测，其在肺癌诊断、鉴别中的作用日渐明确。下面，将为大家做详细介绍。

SHOX2 基因启动子区域甲基化与肺癌发生密切相关

Berend Schmidt 等^[6]通过差异性甲基化杂交技术对肺癌患者肺泡灌洗液中的癌细胞进行全基因组分析，并通过重甲基 (HeavyMethyl) 特异性甲基化实验分析，表明 *SHOX2* 甲基化能帮助鉴别肺部的良性疾病和恶性肿瘤，其特异性可达 95%，敏感性为 68%。研究还发现，*SHOX2* 甲基化对诊断肺鳞癌和小细胞肺癌 (SCLC)

更敏感,敏感性分别为82%和97%,但诊断 I 期肺癌的敏感性相对较低(54%)。在62%的支气管镜检查组织学和细胞学均阴性的肺癌患者,其SHOX2甲基化为阳性,这提示SHOX2甲基化可能成为肺癌的早期筛查指标。

Katja U Schneider等^[7]进一步比较肺癌组织和癌旁正常组织SHOX2甲基化、SHOX2基因扩增和基因表达的关系,发现96%的肺癌患者SHOX2发生高度甲基化,并且与基因拷贝数扩增明显相关($P < 0.0001$),推测基因拷贝数的扩增可能与基因甲基化后导致染色体不稳定有关。但SHOX2的表达却没有变化,这不能排除SHOX2 mRNA受到背景干扰,建议采用激光显微切割单个肿瘤细胞减少正常细胞的干扰。

为了寻找简便易行、创伤较小的临床指标,Christoph Kneip等^[8]研究了血浆中SHOX2基因甲基化对肺癌的诊断和监测能力,研究表明,血浆中的SHOX2甲基化诊断肺癌的特异性较高,为90%,灵敏度为60%,**低于支气管肺泡灌洗液标本来源,可能与肺泡灌洗液比血液中含有的肿瘤细胞浓度高有关。**

研究^[6,7]还发现 I 期肺癌SHOX2甲基化程度明显低于其他各进展期,推测可能与肿瘤体积较小,释放到血液或者支气管肺泡液中的肿瘤特异性的DNA较少有关,**SCLC和鳞癌比腺癌细胞具有更高的SHOX2甲基化水平**($P = 0.0006$),但原因不清。

以上研究表明,SHOX2甲基化在肺癌检测方面具有较高的特异性及一定的敏感性。在选择样本类型方面,主要有血浆及支气管吸出液两种。选用血浆的优点是取材方便,可以作为广泛筛查的工具,缺点是**血浆中肿瘤细胞稀少,另外,其它部位的肿瘤细胞同样可以释放入血,器官特异性较差。**选用支气管吸出液的优点是**取材特异,不易混入其它肿瘤细胞,且肿瘤细胞量相对较多**;缺点是半侵入性操作,不太可能成为大规模筛查工具,而应**定位为诊断手段**。栗少飞等^[9]选用胸腔积液作为标本,**优点在于取材肺部特异性高,缺点是恶性胸腔积液患者已是IV期,所以SHOX2甲基化在胸腔积液中更重要的临床意义是作为鉴别良恶性胸腔积液的工具。**从结果上看,恶性胸腔积液组中10/28出现阳性,而非肺部恶性肿瘤组及良性胸腔积液组未见甲基化,肺癌导致的胸腔积液与良性胸腔积液具有统计学差异($P < 0.05$)。

SHOX2同其它基因甲基化联合检测在肺癌诊断中的应用

从以上研究可以看出,SHOX2**单基因**甲基化检测对肺癌的诊断效力并未给人耳目一新的感觉。除了肺泡灌洗液中肺鳞癌和小细胞肺癌(SCLC)的检测灵敏度达到80%以上外,其它方面,如腺癌、I期肺癌、胸腔积液中的灵敏度都还有待改进。现在,已有成熟产品(人SHOX2、RASSF1A基因甲基化DNA检测,CFDA20173403354,透景生命)将SHOX2同另一个与肺癌发生相关的基因RASSF1A结合起来进行**双基因甲基化联合检测**。结果表明,与传统细胞学相比,SHOX2、RASSF1A双基因甲基化联合检测对不同时期、不同类型肺癌的诊断效力均带来了大幅提升,在肺泡灌洗液中的检测灵敏度达到71.5-83.2%,特异性达到90.0-97.4%^[10-12]。

那么,关于RASSF1A这个基因及其甲基化的故事,以及SHOX2、RASSF1A双基因甲基化联合检测肺癌的详细内容,2019年将陆续为大家介绍。

参考文献

- [1] Heichman KA, Warren JD. DNA methylation biomarkers and their utility for solid cancer diagnostics. Clin Chem Lab Med, 2012, 50(10): 1707-1721.
- [2] Semina EV, Reiter RS, Murray JC, et al. A new human homeobox gene OGI2X is a member of the most conserved homeobox gene family and is expressed during heart development in mouse [J]. Human Molecular Genetics, 1998, 7(3): 415-422.
- [3] 张建东. SHOX2甲基化在前列腺癌诊断中的意义[D]. 太原: 山西医科大学, 2013.

- [4] Zhang YA, Zhou Y, et al. SHOX2 is a Potent Independent Biomarker to Predict Survival of WHO Grade II-III Diffuse Gliomas. *EBioMedicine*. 2016 Nov;13:80-89.
- [5] Wei SH, Balch C, et al. Prognostic DNA methylation biomarkers in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 May 1;12(9):2788-94.
- [6] Schmidt B, Liebenberg V, Dietrich D, et al. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates [J]. *BMC Cancer*, 2010, (10) : 600-608 .
- [7] Schneider KU, Dietrich D, Fleischhacker M, et al. Correlation of SHOX2 gene amplification and DNA methylation in lung cancer tumors [J]. *BMC Cancer*, 2011, (11) : 102-110 .
- [8] Kneip C, Schmidt B, Seegebarth A, et al. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma [J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2011, 6(10) : 1732-1638 .
- [9] 栗少飞, 聂立功. 胸水中SHOX2基因甲基化程度与肺癌的关系. *医药与保健*. 2014,22(2): 3-5.
- [10] 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. *Journal of Chinese Oncology*,2016,22(12):1032-1036.
- [11] Ren M.P., et al. Methylation analysis of SHOX2 and RASSF1A in bronchoalveolar lavage fluid for early lung cancer diagnosis. *Annals of Diagnostic Pathology* 27(2017): 57-61.
- [12] Zhang C.Z., et al. DNA Methylation Analysis of the SHOX2 and RASSF1A Panel in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Lung Cancer Diagnosis. *Journal of Cancer* 8(2017) 17:3585-3591.