

· 论 著 ·

肺癌患者外周血 AKAP12 基因甲基化水平的检测及意义

廖和和¹,张云锋²,吴树强³,李寒春³,金磊³,任宏²

(1. 陕西省核工业 215 医院肿瘤外科, 陕西咸阳 712000; 2. 西安交通大学第一附属医院胸外科, 西安 710061; 3. 西安医学院第一附属医院胸外肿瘤科, 西安 710077)

摘要:目的 研究甲基化特异-高分辨融解曲线法(MS-HRM)检测肺癌患者外周血中 A 激酶锚定蛋白 12(AKAP12)基因甲基化水平及其临床意义。方法 采用 MS-HRM 法检测 60 例肺癌患者外周血中 AKAP12 基因的甲基化水平,分析其与肺癌患者病理参数的关系。结果 经 MS-HRM 检测,从 60 例肺癌患者标本中检出 34 例(56.7%) AKAP12 基因甲基化,其中,18 例(52.9%)甲基化程度为 1%~20%,14 例(41.2%)为 20%~60%,2 例(5.88%)为 60%~100%。外周血中 AKAP12 基因甲基化水平在不同患者年龄和性别中比较,差异无统计学意义($P>0.05$);而与肺癌的病理分期和分化程度比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 AKAP12 启动子甲基化改变与肿瘤进展及肿瘤恶性程度相关。

关键词: 肺肿瘤; A 激酶锚定蛋白 12; 甲基化; 甲基化特异-高分辨融解曲线法; 外周血

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.15.004

文献标识码: A

文章编号:1671-8348(2014)15-1834-03

The detection and significance of AKAP12 methylation levels in peripheral blood in patients with lung cancer

Liao Hehe¹, Zhang Yunfeng², Wu Shuqiang³, Li Hanchun³, Jin Lei³, Ren Hong²

(1. Department of Surgical Oncology, Shanxi Nuclear Industry Hospital, Xianyang, Shanxi 712000, China;

2. Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shanxi 710061, China;

3. Department of Thoracic Oncology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shanxi 710077, China)

Abstract: Objective To detect the levels of AKAP12 methylation by methylation-specific high-resolution melting curve(MS-HRM) in peripheral blood in patients with colorectal cancer and investigate its clinical significance. **Methods** We used MS-HRM technology to detect the levels of AKAP12 methylation in peripheral blood in 60 lung cancer patients, and analyzed the relationship between the levels of AKAP12 methylation and pathological parameters of lung cancer patients. **Results** 34(56.7%) of the 60 lung cancer patients were found to be methylated at the AKAP12 promoter region by MS-HRM, the methylation levels of 18 cases ranged between 1%—20%, 14 cases ranged between 20%—60%, 2 cases ranged between 60%—100%. There was no significant differences between the levels of AKAP12 methylation and lung cancer patients' age and gender($P>0.05$). However, it was significantly higher in the patients with high pathological stage and differentiation degree($P<0.05$). **Conclusion** AKAP12 promoter region methylation was related to tumor progression and malignant degree.

Key words: lung neoplasms; A-kinase anchoring protein 12; methylation; MS-HRM; peripheral blood

A 激酶锚定蛋白 12(A-kinase anchoring protein 12, AKAP12),在 1992 年由 Gordon 等^[1]从重症肌无力患者的血清中分离得到。AKAP12 能够锚定一些重要信号蛋白,参与了信号转导、G 蛋白偶联受体蛋白信号转导、蛋白定向以及细胞凋亡等过程^[2-3]。国内外研究发现,AKAP12 在多种肿瘤中表达下降或缺失^[4-5],能够抑制肿瘤发生与转移^[6-7]。目前,研究发现,外周血中存在高水平的游离 DNA,其中很大一部分来源于凋亡或者坏死的肿瘤细胞,因此,检测血液标本中异常甲基化的 DNA,能对疾病的诊断、预后及复发等提供新思路^[8]。本研究采用甲基化特异-高分辨融解曲线法(MS-HRM)检测肺癌外周血细胞游离 DNA 中 AKAP12 基因甲基化程度,并结合患者病理参数进行分析研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009 年 1 月至 2011 年 12 月在陕西省核工业 215 医院和西安医学院第一附属医院就诊的 60 例肺癌患者,其中男 32 例,女 28 例,年龄 28~76 岁,平均(48.0±12.6)岁;均经病理确诊,Ⅰ期 9 例,Ⅱ期 19 例,Ⅲ期 29 例,Ⅳ 3 例;分化好及中等 34 例,分化差 26 例。收集患者外周血 2~3 mL,分离去血清,-80℃冰箱保存备用。

1.2 试剂与材料 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit、Hot

Star Taq Master Mix(Qiagen 公司),EZ DNA Methylation-Gold Kit(ZYMO 公司),SYTO 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain(Invitrogen 公司),CpGenome Universal Methylated DNA(Millipore 公司)。PCR 基因扩增仪(Bio-Rad 公司),Rotor-Gene 6000 荧光定量 PCR 仪(Corbett 公司),NanoDrop ND-2000 分光光度计(Thermo 公司)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 分离血清,用 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit 提取细胞游离 DNA,NanoDrop ND-2000(超微量紫外分光光度仪上)检测 DNA 浓度及质量,要求光密度(OD)值(A260/A280)约为 1.80~2.00,调整 DNA 浓度至 10 ng/μL。

1.3.2 甲基化修饰 取上述 DNA 样本 1 ng,使用 EZ DNA Methylation Gold Kit,按照说明书进行甲基化修饰。

1.3.3 引物设计 使用软件 MethyPrimer 设计引物,引物由上海吉玛制药技术有限公司合成。上游引物序列:5'-GGC GGT TGT TTT GAT TTT GGT T-3',长度 83 bp,下游引物序列:5'-AAC ACG CCC TAC AAC AAC ATC TA-3',长度 83 bp。

1.3.4 构建标准品 以 CpGenome Universal Methylated DNA(Millipore 公司)作为 100%甲基化的标准品,以 100%非

甲基化的健康人外周血 DNA 作为稀释剂,按不同比例搭配制成 100%、80%、60%、40%、20%、10%、5%、1% 和 0 甲基化程度的标准品,进行下一步的 HRM 曲线分析后得到标准曲线图。

1.3.5 MS-HRM 测定 AKAP12 启动子区甲基化扩增条件:预变性 95 °C 5 min,1 个循环;94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环,72 °C 5 min 延伸。使用 PCR 基因扩增仪扩增后,使用 Rotor-Gene 6000 进行高分辨率熔解曲线分析:样本经 95 °C 2 min,40 °C 2 min 预处理后,溶解时温度由 76 °C 逐渐升高到 88 °C,每升高 0.1 °C 需记录数值。获得 MS-HRM 曲线图。待测标本需按照标准曲线上来测定其甲基化程度。

1.3.6 重复性检测 HRM 方法检测重复性,采用取 100%~0 系列浓度的甲基化标准品重复检测 2 次,观察 HRM 曲线的相符程度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计数资料以率(%)表示,AKAP12 甲基化与病理参数比较,采用 χ^2 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MS-HRM 标准曲线和重复性试验结果 分别将 100%~0 甲基化标准品基因扩增后进行 HRM 曲线检测,得到标准曲线图(图 1)。待测标本的甲基化程度可参照 100%~0 系列浓度曲线中的相应曲线得出。同时,取 100%~0 甲基化标准品重复检测 2 次,得到的 HRM 曲线形状基本一致。

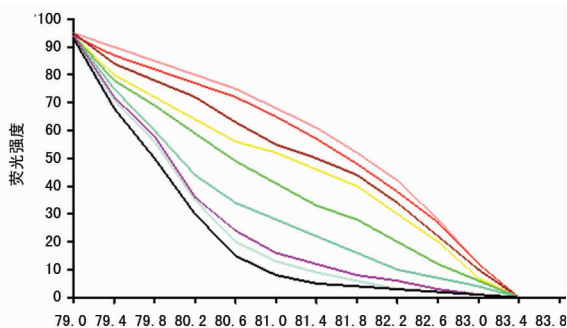


图 1 MS-HRM 法检测 AKAP12 基因甲基化程度的标准曲线图

2.2 MS-HRM 检测 AKAP12 基因甲基化结果 从 60 例肺癌患者标本中检出 34 例(56.7%)AKAP12 基因甲基化,其中,18 例(52.9%)甲基化程度为 1%~20%,14 例(41.2%)为 20%~60%,2 例(5.88%)为 60%~100%。

2.3 外周血 AKAP12 基因甲基化与患者病理参数相关性检测 外周血中 AKAP12 基因甲基化水平在不同患者年龄和性别中比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而与肺癌的病理分期和分化程度比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 外周血 AKAP12 基因甲基化与肺癌患者关系

临床资料	AKAP12 基因甲基化(n)		P
	+	-	
年龄(岁)			0.196
≤60	13	17	
>60	18	12	
性别			0.235
男	14	18	
女	16	12	

续表 2 外周血 AKAP12 基因甲基化与肺癌患者关系

临床资料	AKAP12 基因甲基化(n)		P
	+	-	
病理分期			0.010
I + II 期	10	18	
III + IV 期	22	10	
细胞分化程度			0.007
高中分化	13	21	
低分化	19	7	

3 讨 论

近年来,关于体液中(血液、尿液、唾液及痰液等)细胞游离 DNA 的研究得到越来越多的关注。目前,认为肿瘤患者血液游离 DNA 主要来自凋亡细胞、肿瘤细胞以及淋巴细胞等,其中来源于凋亡细胞或坏死肿瘤细胞占较大比例(可高达 93%)^[8]。目前,国内外研究发现,体液游离 DNA 抑癌基因启动子 CpG 岛的异常高甲基化常常与肿瘤的发生、发展、预后以及复发等密切相关^[9-11]。因此,体液标本中游离 DNA 甲基化水平可以为肿瘤早期筛查、早期诊断、转移及复发监测的一项重要指标,并能有助于早期发现有癌变倾向的细胞^[12]。

AKAP12 能够锚定一些重要信号蛋白,主要参与蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)、蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)复合物的形成,细胞骨架的重塑,β₂ 肾上腺素受体复合物的调节及细胞凋亡等过程^[2-3]。国内外研究发现,AKAP12 在多种肿瘤中表达下降或缺失,可见于黑色素瘤、乳腺癌、视网膜母细胞瘤、食管腺癌、骨肉瘤、前列腺癌、胃癌、血液系统恶性肿瘤等^[4-5],提示 AKAP12 可能为一种潜在的抑癌基因。此外,研究还发现 AKAP12 具有抑制肿瘤发生与转移,阻滞细胞周期以及促进细胞凋亡等作用^[13-14]。目前,已经在多种肿瘤中发现 AKAP12 的高甲基化现象,Choi 等^[15]在胃癌组织和细胞株中发现高甲基化(56%)的存在,且与 AKAP12 表达缺失相对应。

本研究通过建立 MS-HRM,检测 50 例肺癌患者外周血清游离 DNA 中 AKAP12 启动子的甲基化状况,以此探讨肺癌患者外周血 AKAP12 高甲基化与肿瘤发生的关系。MS-HRM 作为一种先进的技术手段,具有较高的灵敏度、特异性和重复性,利用此方法可以检测出最低 1% 的基因甲基化,这大大提高了肺癌的检出率,有利于进行高危人群的筛选,早期诊断,转移和复发的监测。本研究结果显示,34 例(56.7%)肺癌患者标本中检出 AKAP12 基因甲基化,其中,18 例(52.9%)甲基化程度为 1%~20%,14 例(41.2%)为 20%~60%,2 例(5.88%)为 60%~100%。随后,笔者研究了肺癌患者外周血 AKAP12 基因甲基化水平与病理参数的相关性,研究表明患者年龄、性别与 AKAP12 甲基化水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而肺癌的病理分期和分化程度与 AKAP12 甲基化水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 AKAP12 的甲基化与肺癌的进展有关,可以用来评估肺癌的分期和恶性程度。

综上所述,肿瘤中抑癌基因的高甲基化现象普遍存在,单个基因的甲基化往往不能完整反映肿瘤的基本情况,而进一步研究表明每种抑癌基因都存在不同的启动子甲基化模式,因此,对于 AKAP12 基因启动子甲基化研究为临床上多方面、多角度监测肿瘤提供了一个重要指标。

参考文献:

[1] Cordon T, Grove B, Loftus JC, et al. Molecular cloning

- and preliminary characterization of a novel cytoplasmic antigen recognized by myasthenia gravis sera[J]. *J Clin Invest*, 1992, 90(3):992-999.
- [2] Diviani D, Scott JD. AKAP signaling complexes at the cytoskeleton[J]. *Cell Sci*, 2001, 125(21):1431-1437.
- [3] Yoon DK, Jeong CH, Jun HO, et al. AKAP12 induces apoptotic cell death in human fibrosarcoma cells by regulating CDKI-cyclin D1 and caspase-3 activity[J]. *Cancer Lett*, 2007, 254(1):111-118.
- [4] Choi YK, Kim JH, Kim WJ, et al. AKAP12 regulates human blood-retinal barrier formation by downregulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(16):4472-4481.
- [5] Jin Z, Hamilton JP, Yang J, et al. Hypermethylation of the AKAP12 promoter is a biomarker of Barrett's-associated esophageal neoplastic progression[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17(1):111-117.
- [6] Xia W, Unger P, Miller L, et al. The Src-suppressed C kinase substrate, SSeCKS is a potential metastasis inhibitor in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(14):5644-5651.
- [7] Gelman IH, Gao L. SSeCKS/Gravin/AKAP12 metastasis suppressor inhibits pcd080me formation via RhoA-and Cde42-dependent pathways[J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(3):151-158.
- [8] Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA, et al. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine [J]. *Cancer Treat Rev*, 2002, 28(5):255-271.
- [9] Zhong XY, Ladewig A, Schmid SE, et al. Elevated level of cell-free Plasma DNA is associated with breast cancer Arch[J]. *Gynecol Obstet*, 2007, 276(4):327-331.
- [10] Ellinger J, Haan K, Heukamp LC, et al. CPG island hypermethylation in cell free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer [J]. *Prostate*, 2008, 68(1):42-49.
- [11] Chanm KC, Laim PB, Mokm TS, et al. Quantitative analysis of circulating methylated DNA as a biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Chem*, 2008, 54(9):1525-1536.
- [12] Esteller M, Fraga MF, Paz MF, et al. Herman. Cancer epigenetic and methylation [J]. *Science*, 2002, 297(20):1807-1808.
- [13] Lin X, Nelson P, Gelman IH, et al. SSeCKS, a major protein kinase C substrate with tumor suppressor activity, regulates G→S progression by controlling the expression and cellular compartmentalization of cyclinD[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(19):7259-7272.
- [14] Cohen SB, Waha A, Gelman IH, et al. Expression of a down-regulated target, SSeCKS, reverses v-Jun- induced transformation of 10 T1/2 murine fibroblasts[J]. *Oncogene*, 2001, 20(2):141-146.
- [15] Choi MC, Jong HS, Kim TY, et al. AKAP12/Gravin is inactivated by epigenetic mechanism in human gastric carcinoma and shows growth suppressor activity[J]. *Oncogene*, 2004, 23(42):7095-7103.

(收稿日期:2013-10-08 修回日期:2013-12-18)

(上接第 1833 页)

- C. External validation of the endometriosis fertility index (EFI) staging system for predicting non-ART pregnancy after endometriosis surgery[J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(5):1280-1288.
- [3] 单伟颖, 秦殿菊, 李青, 等. 承德地区女性不孕症相关因素分析[J]. *中国妇幼保健*, 2011, 3(4):265-267.
- [4] Adamson GD, Pasta DJ. Endometriceis fertility index; the new validated endometris stasig system[J]. *Fertil Steril*, 2010, 94(5):1609-1615.
- [5] 高敏华, 李莉. 腹腔镜诊断不孕症 107 例临床分析[J]. *重庆医学*, 2012, 3(2):163-164.
- [6] Wei DM, Yu Q, Sun AJ. Relationship between endometriosis fertility index and pregnancies after laparoscopic surgery in endometriosis-associated infertility[J]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2011, 46(11):806-808.
- [7] 全佳丽, 郎景和, 朱兰, 等. 内异症患者在位内膜病理特征分析[J]. *中华妇产科杂志*, 2012, 11(4):365-366.
- [8] Adamson GD. Endometriosis classification; an update[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2011, 23(4):213-220.
- [9] 杨学舟, 章汉旺. III/IV 期子宫内膜异位症不孕患者预处理对辅助生殖技术结果的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2011, 30(2):798-799.
- [10] Adamson GD. Endometriosis Fertility Index; is it better than the present staging systems[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2013, 25(3):186-192.
- [11] 曹华斌, 涂灵. 子宫内膜息肉性状与不孕症关系的研究[J]. *重庆医学*, 2012, 32(3):465-466.
- [12] Anicic R, Djukic M, Rakic S. Evaluation of utero-ovarian hemodynamics in relation to fertility and stage of endometriosis[J]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2012, 39(4):526-528.
- [13] Haas D, Chvatal R, Habelsberger A. Peritoneal cytokines and adhesion formation in endometriosis; an inverse association with vascular endothelial growth factor concentration[J]. *Fertil Steril*, 2012, 97(6):1380-1386.
- [14] Gong J, Chen L, Zhang D. Efficiency of postoperative ovulation induction on infertile women with minimal-mild endometriosis[J]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2013, 44(4):677-680.
- [15] Wang YQ. Role of epidermal growth factor signaling system in the pathogenesis of endometriosis under estrogen deprivation conditions[J]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2013, 48(6):447-452.

(收稿日期:2013-10-10 修回日期:2013-12-20)