

# 肝癌患者血液基因组中SFRP1、 SFRP2基因甲基化分析

刘艳红<sup>1</sup>, 韩雪<sup>2</sup>, 应晓玲<sup>2</sup>

(1. 武汉大学 人民医院检验科, 湖北 武汉 430070; 2. 江汉大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430056)

**摘要:** 利用MSP技术检测肝癌患者和健康人血液基因组中SFRP1及SFRP2的甲基化情况, 分析肿瘤相关基因SFRP1、SFRP2基因甲基化与肝癌的相关性。实验结果表明, SFRP2基因甲基化与肝癌相关, SFRP1基因甲基化与肝癌无相关性。

**关键词:** 肝癌; SFRP1; SFRP2; 甲基化; MSP

**中图分类号:** R735.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-0143(2012)06-0063-03

我国是一个肝癌大国, 全世界每年新发现的肝癌病人中, 有42.5%发生在中国<sup>[1]</sup>。临床证明, 肝癌发现得越早, 治疗效果越好, 能提高病人的预后及存活率, 但目前临床上未有十分有效的早期检测方法。研究发现, 肿瘤细胞的甲基化形式会发生改变, 基因组全面的低甲基化和特殊部位的高甲基化是肿瘤发生的重要特征。研究表明, 肝细胞癌组织中存在多种肿瘤相关基因CpG岛的甲基化, 构成其独特的甲基化谱, 成为肝细胞癌的表达标志<sup>[2-4]</sup>, 且在肿瘤发生的癌变前阶段中, 肿瘤相关因子启动子甲基化异常在肿瘤发生发展中起重要作用<sup>[5-6]</sup>, 这为肿瘤的早期诊断提供新的干预靶点。SFRP1、SFRP2属于SFRP(secreted frizzled-related protein)基因家族, 为Wnt/frizzled信号的胞外调节物, 通过与Wnt反应或直接与frizzled反应而调节Wnt信号的传导<sup>[7]</sup>, 具有调节凋亡的功能, 称为分泌型凋亡相关蛋白(SARP)。在各种恶性肿瘤中, SFRP1、SFRP2的表达沉默常常由于其启动子的甲基化。本文利用甲基化特异性聚合酶链反应技术(MSP), 对原发性肝癌病人及健康人血液样本中肿瘤相关基因SFRP1、SFRP2进行甲基化分析, 探讨肿瘤相关基因SFRP1、SFRP2基因甲基化与肝癌的相关性。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 材料

原发性肝癌患者血液样本20例, 所选患者全部病例符合国家卫生部制定的PHC诊断标准; 正常人血液样本20例, 血液样本均由武汉大学人民医院提供。

### 1.2 引物

由上海杰瑞生物工程有限公司合成, 序列如表1所示。

表1 引物序列

引物	序列
SFR1-M(+)	5'TGTAGTTTTTCGGAGTTAGTGTCCGCG3'
SFR1-M(-)	5'CCTACGATCGAAAACGACGCCAACG3'
SFR1-U(+)	5'GTTTTGTAGTTTTTGGAGTTAGTGTGTGT3'
SFR1-U(-)	5'CTCAACCTACAATCAAAAACAACACAAACA3'
SFR2-M(+)	5'GGTCCGAGTTTTTCGGAGTTGCCG3'
SFR2-M(-)	5'CCGCTCTCTTCGCTAAATACGACTCG3'
SFR2-U(+)	5'TTTTGGGTTGGAGTTTTTTGGAGTTGTGT3'
SFR2-U(-)	5'AACCCACTCTTCACTAAATACAACACTCA3'

### 1.3 血液基因组提取

抗凝血4℃静置, 取中间层(富含白细胞)300 μL加3倍体积红细胞裂解液, 12 000 r/min离心30 s, 弃上清, 重复一次操作。沉淀用500 μL血

收稿日期: 2012-09-05

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2008CDB057)

作者简介: 刘艳红(1975—), 女, 主治医师, 博士, 研究方向: 医学检验。

\*通信作者: 韩雪(1979—), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 微生物学。Email: hanxue\_whdx@163.com

胞裂解液(10 mmol/L Tris-Cl(Biosharp), 0.1 mmol/L EDTA(Biosharp), 0.5% SDS(Biosharp), 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase(捷瑞生物)), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶K(捷瑞生物), 37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h后转为50  $^{\circ}\text{C}$ 孵育3 h。冷却至室温加等体积平衡酚混匀, 12 000 r/min离心15 min。上清加入等体积氯仿/异戊醇(24:1)混匀, 12 000 r/min, 15 min。转上清于新EP管, 加1/10体积3 mol/L NaAC(国药)和2.5倍体积无水乙醇(国药), 4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀。12 000 r/min离心15 min, 弃上清。70%乙醇1 mL清洗2次。自然晾干DNA, TE溶解, -20  $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

#### 1.4 亚硫酸氢钠修饰基因组DNA

将约2  $\mu\text{g}$ 的DNA(10  $\mu\text{L}$ 左右)于1.5 mL EP管中使用双蒸水(灭菌)稀释至50  $\mu\text{L}$ ; 加5.5  $\mu\text{L}$ 新鲜配制的3 mol/L NaOH, 42  $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min; 加10 mmol/L对苯二酚(氢醌)30  $\mu\text{L}$ , 3.6 mol/L亚硫酸氢钠(Sigma, S9000)520  $\mu\text{L}$ 至上述溶液中, 避光混匀。将混合好后的溶液以每管150  $\mu\text{L}$ 分装到PCR管中, 放入PCR仪中恒温50  $^{\circ}\text{C}$ , 16 h。

#### 1.5 基因回收

使用Promega Wizard Cleanup DNA纯化回收系统(Promega, A7280)进行甲基化基因的回收。具体操作见Promega Wizard Cleanup DNA说明书。

#### 1.6 聚合酶链扩增反应

利用特异性检测引物, 对血液提取的基因组进行PCR, PCR反应参数为: 95 $^{\circ}\text{C}$  6 min, 按94 $^{\circ}\text{C}$  20 s, 58 $^{\circ}\text{C}$  20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  20 s, 45个循环之后最后72 $^{\circ}\text{C}$  7 min进行。

#### 1.7 电泳检测

PCR扩增产物5  $\mu\text{L}$ 于2%琼脂糖凝胶进行电泳, EB染色后, 凝胶电泳分析系统观察结果。

## 2 结果

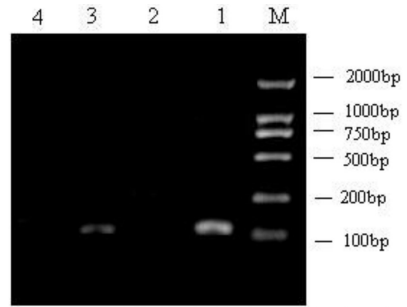
### 2.1 DNA的分离纯化

为了建立一个重复性好的鉴定DNA甲基化的方法, 收集了2例临床患者的血液样本用于血液DNA的分离纯化。1例为确诊的HCC患者, 是武汉大学人民医院病人, 1例为健康人体检样本, 收集其血液。提取的血液基因组有较好的完整性。

### 2.2 SFRP1基因启动子甲基化分析

利用SFRP1基因甲基化引物进行聚合酶链式反应, 结果如图1所示。聚合酶链式反应结果显示SFRP1基因甲基化扩增产物在100~200 bp处

出现一条特异性带, 与预期的126 bp符合, 非甲基化扩增产物在100~200 bp处出现特异性带, 与预期135 bp符合。表明MSP检测SFRP1基因启动子甲基化技术已建立。

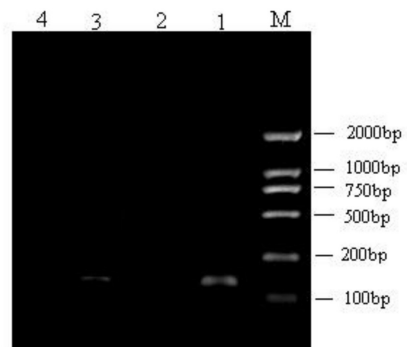


M: marker; lane 1: SFRP1 甲基化引物 PCR 产物阳性结果; lane 2: SFRP1 甲基化引物 PCR 产物阴性结果; lane 3: SFRP1 非甲基化引物 PCR 产物阳性结果; lane 4: SFRP1 非甲基化引物 PCR 产物阴性结果。

图1 SFRP1基因启动子甲基化/非甲基化特异性引物扩增结果

### 2.3 SFRP2基因启动子甲基化分析

利用SFRP2基因甲基化引物进行聚合酶链式反应, 结果如图2所示。聚合酶链式反应结果显示SFRP2基因甲基化引物扩增产物在100~200 bp处出现一条特异性带, 与预期的138 bp符合, 非甲基化引物扩增产物在100~200 bp处出现特异性带, 与预期145 bp符合。表明MSP检测SFRP2基因启动子甲基化技术已建立。



M: marker; lane 1: SFRP2 甲基化引物 PCR 产物阳性结果; lane 2: SFRP2 甲基化引物 PCR 产物阴性结果; lane 3: SFRP2 非甲基化引物 PCR 产物阳性结果; lane 4: SFRP2 非甲基化引物 PCR 产物阴性结果。

图2 SFRP2基因启动子甲基化/非甲基化特异性引物扩增结果

### 2.4 统计分析

对收集到的血液样本进行MSP分析, 统计结果如图3、图4所示。

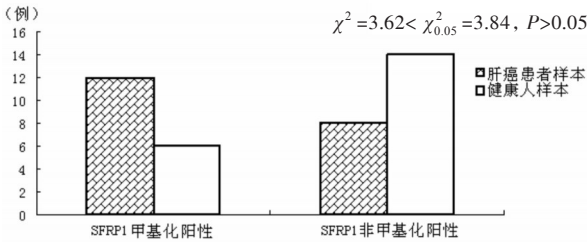


图3 样本SFRP1基因甲基化/非甲基化情况统计分析

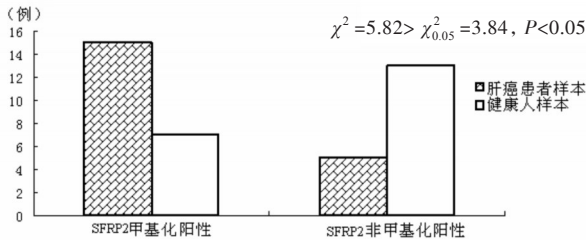


图4 样本SFRP2基因甲基化/非甲基化情况统计分析

20例原发性肝癌血液样本SFRP1基因启动子甲基化为12例,非甲基化为8例;20例健康人血液样本中SFRP1基因启动子甲基化为6例,非甲基化为14例。经卡方检验, $\chi^2 = 3.62 < \chi_{0.05}^2 = 3.84, P > 0.05$ ,表明SFRP1基因甲基化情况与肝癌不相关。

20例原发性肝癌患者样本中,SFRP2基因启动子甲基化为15例,非甲基化为5例;20例健康人血液样本中SFRP2基因启动子甲基化为7例,非甲基化为13例。经卡方检验, $\chi^2 = 5.82 > \chi_{0.05}^2 = 3.84, P < 0.05$ ,表明SFRP2基因甲基化情况与肝癌相关。

### 3 讨论

本组研究收集了20例原发性肝癌患者及健康人血液样本,并对肿瘤相关基因SFRP1、SFRP2进行了MSP分析,观察其启动子的甲基化

情况与原发性肝癌发生的一致性。实验结果表明,SFRP2基因甲基化与肝癌相关,SFRP1基因甲基化情况与肝癌不相关;但由于样本数目非常有限,SFRP2基因甲基化与肝癌的发生是否有高度一致性,其能否作为肝癌诊断的候选基因仍需要大量样本证明。在本研究中采用的MSP技术,可以实现从血液样本中提取基因组,检测肿瘤相关基因甲基化情况,使样本的收集更方便;实验结果稳定,重复性好,非常适合用于对高危人群的定期检查及相关人群的早期诊断,为肝癌的早期诊断提供了新思路和方法。

### 参考文献:

- [1] 李立民. 流行病学[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:298-303.
- [2] Jain S, Chen S T, Chang K C, et al. Impact of the Location of CpG Methylation within the GSTP1 Gene on Its Specificity as a DNA Marker for Hepatocellular Carcinoma[J]. PLoS ONE, 2012, 7(4):e35789.
- [3] Jung N, Kyung J Won, Kim B H, et al. Pharmacological unmasking microarray approach-based discovery of novel DNA methylation markers for hepatocellular carcinoma[J]. J Korean Med Sci, 2012, 27: 594-604.
- [4] Schaeffeler E, Hellerbrand C, Nies A T, et al. DNA methylation is associated with downregulation of the organic cation transporter OCT1 (SLC22A1) in human hepatocellular carcinoma[J]. Genome Medicine, 2011, 3(12):82.
- [5] Yan J, Lu Q, Dong J H, et al. Hepatitis B virus X protein suppresses caveolin-1 expression in hepatocellular carcinoma by regulating DNA methylation [J]. BMC Cancer, 2012, 12:353.
- [6] Mahmoudi T, Verrijzer C P. Chromatin silencing and activation by Polycomb and trithorax group proteins [J]. Oncogene, 2012, 20(24):3055-3066.
- [7] Melkonyan H S, Chang W C, Shapiro J P, et al. SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(25): 13636-13641.

## Analysis of SFRP1, SFRP2 Methylation in Blood Genome of Hepatocellular Carcinoma Patients

LIU Yan-hong<sup>1</sup>, HAN Xue<sup>2</sup>, YING Xiao-ling<sup>2</sup>

( 1. Clinical Laboratory, Remin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430070, Hubei, China;

2. School of Life Science, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei, China)

**Abstract:** Uses MSP technology to detect the SFRP1 and SFRP2 methylation in blood genome of hepatocellular carcinoma (HCC) patients and healthy person, analyses the correlation between HCC and tumor related gene SFRP1, SFRP2 methylation. The experiments showed SFRP2 gene methylation related to HCC while SFRP1 had no correlation.

**Key words:** hepatocellular carcinoma(HCC); SFRP1; SFRP2; methylation; MSP

(责任编辑:范建凤)