

宫颈脱落细胞 RASSF1A 基因甲基化在宫颈癌中的临床意义

李 琦¹, 胡昌华¹, 张 婧^{2△} (1. 武汉市汉阳医院妇产科, 湖北武汉 430050; 2. 襄阳市中心医院妇产科, 湖北襄阳 441021)

【摘要】 目的 研究宫颈脱落细胞 RAS 相关区域家族 1A(RASSF1A)基因启动子甲基化在宫颈癌中的临床意义。**方法** 应用甲基化特异性聚合酶链反应检测宫颈癌患者和健康女性宫颈脱落细胞 RASSF1A 基因启动子甲基化,分析与病理因素间的关系。**结果** 宫颈癌患者宫颈脱落细胞 RASSF1A 基因启动子甲基化率为 64.0%,高于健康女性的 1.3%($P<0.05$)。宫颈脱落细胞 RASSF1A 基因启动子甲基化率在宫颈癌不同组织学分级、肿瘤最大径、淋巴结转移、器官转移、Figo 分期患者间的差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 宫颈脱落细胞 RASSF1A 基因启动子甲基化与宫颈癌病理因素密切相关,可作为宫颈癌病情判断和预后评估的标志物。

【关键词】 宫颈癌; RAS 相关区域家族 1A; 甲基化; 临床意义
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.12.015 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)12-1518-02

Promoter methylation of RASSF1A gene in exfoliated cervical cytology from cervical carcinoma and its clinical application LI Qi¹, HU Chang-hua¹, ZHANG Jing^{2△} (1. Gynecology and Obstetrics, Hanyang Hospital, Wuhan, Hubei 430050, Chian; 2. Gynecology and Obstetrics, Xiangyang Zhongxin Hospital, Xiangyang, Hubei 441021, China)

【Abstract】 Objective To detect promoter methylation of Ras association domain family 1A (RASSF1A) gene in exfoliated cervical cytology in cervical carcinoma and study its clinical application. **Methods** Methylation specific polymerase chain reaction was applied to detect RASSF1A gene promoter's methylation in exfoliated cervical cytology from cervical carcinoma patients and healthy females. The relationship between clinicopathological factors and RASSF1A gene promoter's methylation was analyzed. **Results** The methylation rate in exfoliated cervical cytology from cervical carcinoma patients was 64.0%, higher than 1.3% in healthy females ($P<0.05$). The differences of RASSF1A gene's methylation rates in histology staging, tumor diameters, lymph node metastasis, metastasis and Figo staging were statistics significant ($P<0.05$). **Conclusion** Methylation of RASSF1A gene promoter could be served as a tumor biomarker for cervical carcinoma in disease condition and prognosis evaluation.

【Key words】 cervical carcinoma; RASSF1A; methylation; clinical application

RAS 相关区域家族 1A(RASSF1A)可增强丝氨酸-苏氨酸激酶 MstI 活化,抑制 Cyclin D1 积聚而促进细胞死亡受体信号传导通路,与肿瘤发生、发展及转归密切相关^[1-2]。RASSF1A 基因在宫颈癌组织中呈高甲基化状态,可作为宫颈癌分子诊断和预后评估的标志物^[3-4],但仅可用于术后组织标本检测,临床应用受限。本研究采用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)检测宫颈癌患者和健康女性宫颈脱落细胞 RASSF1A 基因启动子甲基化状态,研究宫颈脱落细胞 RASSF1A 基因甲基化在宫颈癌中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 1 月至 2012 年 6 月经手术治疗的 75 例初治宫颈癌患者,年龄 35~80 岁,平均 50.5 岁,包括鳞状细

胞癌 56 例、腺癌 12 例、腺鳞癌 7 例,根据 2009 年国际妇产科联盟(Figo)宫颈癌分期标准,分为 I 期 15 例、II 期 35 例、III 期 17 例、IV 期 8 例。同期体检健康女性 75 例纳入对照组,年龄 34~80 岁,平均 50.4 岁。年龄分布组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法 由临床医生采集宫颈脱落细胞标本,以 DNA 提取试剂盒(北京天根)提取细胞 DNA,经甲基化修饰试剂盒(北京天漠)处理后,进行 MSP 检测。采用 Methyl Primer Express V1.0 设计 MSP 引物,引序列见表 1,由大连宝生物工程有限公司合成。MSP 反应体系为 25 μ L,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 1 min、65 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s 循环 35 次,72 $^{\circ}$ C 10 min,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后检测。

表 1 RASSF1A 基因 MSP 引物序列(5'→3')

引物	正向	反向
甲基化引物(M)	AGAAATACGGGTATTTTCGC	TCGCTAACTTTAAACGCTAACA
非甲基化引物(U)	TTTAGAAATATGGGTATTTTGT	ACTTCACTAACTTTAAACACTAACA

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件进行数据分析。计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验法;显著性检验水准为 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为比较差异有统计

学意义。

2 结 果

2.1 RASSF1A 基因启动子甲基化检测结果 宫颈癌患者宫

△ 通讯作者, E-mail: mirror1219@sohu.com。

颈脱落细胞 RASSF1A 基因启动子甲基化率为 64.0%(48/75),健康女性为甲基化率为 1.3%(1/75),宫颈癌患者甲基化率高于健康女性($P<0.05$)。

2.2 RASSF1A 基因启动子甲基化与病理因素的关系 不同年龄和病理类型宫颈癌患者 RASSF1A 基因启动子甲基化率比较差异无统计学意义($P>0.05$),但不同组织学分级、肿瘤最大径、淋巴结转移、器官转移、Figo 分期患者比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 宫颈癌患者宫颈脱落细胞 RASSF1A 基因启动子甲基化与病理因素的关系

病理因素	<i>n</i>	甲基化率[<i>n</i> (%)]	χ^2	<i>P</i>
年龄(岁)	<50	35 22(62.9)	0.002	0.962
	≥50	40 26(65.0)		
病理组织类型	鳞状细胞癌	56 36(64.3)	0.152	0.972
	腺癌	12 8(66.7)		
	腺鳞癌	7 5(71.4)		
组织学分级	I	40 19(47.5)	6.775	0.034
	II	26 17(65.4)		
	III	14 12(85.7)		
肿瘤最大径(cm)	≤4	50 27(54.0)	5.273	0.022
	>4	25 21(84.0)		
淋巴结转移	有	30 26(86.7)	9.570	0.002
	无	45 22(48.9)		
器官转移	有	8 8(100.0)	-	0.045
	无	67 40(59.7)		
Figo 分期	I期	15 7(46.7)	13.191	0.004
	II期	35 18(51.4)		
	III期	17 15(88.2)		
	IV期	8 8(100.0)		

3 讨 论

RASSF1A 基因位于 3 号染色体短臂中的抑癌基因,可抑制 Cyclin D1 积聚而促进细胞死亡受体信号传导通路,与肿瘤发生、发展及转归密切相关^[5]。RASSF1A 基因在结肠癌、胃癌等消化系统肿瘤中呈高甲基化状态,甲基化导致基因发生表观遗传学改变,通过阻遏转录因子与启动子结合,抑制或下调 RASSF1A 表达水平,使其失去对细胞周期的调控作用,最终导致细胞癌变^[6-8]。崔华英等^[3]研究结果表明,宫颈癌组织 RASSF1A 基因启动子甲基化率高达 73.8%,认为 RASSF1A 基因启动子甲基化可作为宫颈癌的分子诊断和预后评估的生物标志物。本研究中,宫颈癌患者宫颈脱落细胞 RASSF1A 基因启动子甲基化率为 64.0%,高于健康女性,与宫颈癌组织检测结果相比,甲基化率稍低,但宫颈脱落细胞检测可在术前进行,使其具有更好的预测性。

甲基化是表观遗传学最重要的转录前调控机制,可引起染色体及 DNA 空间构象发生改变,主动或被动阻遏转录因子结合到转录起始点而调控基因表达^[9]。基因启动子甲基化与肿瘤发生、病情进展及预后紧密相关,可作为肿瘤的基因水平生

物学标志物,比蛋白质类肿瘤标志物具有更高的灵敏度及特异性^[10]。本研究中,宫颈癌患者宫颈脱落细胞 RASSF1A 基因启动子甲基化率在不同年龄和病理类型患者间的差异无统计学差异($P>0.05$),但在不同组织学分级、肿瘤最大径、淋巴结转移、器官转移、Figo 分期患者间的差异具有统计学意义($P<0.05$),组织学分级高、肿瘤最大径大、有淋巴结转移及器官转移、Figo 分期晚的患者宫颈脱落细胞 RASSF1A 基因启动子甲基化率高于组织学分级低、肿瘤最大径小、无淋巴结转移及器官转移、Figo 分期早的患者,说明与宫颈癌组织类似,宫颈脱落细胞 RASSF1A 基因启动子甲基化与宫颈癌患者病情及预后密切相关,可作为分子诊断及病情预后评估的标志物。

参考文献

[1] Scrace SF, O'Neill E. RASSF signaling and DNA damage: monitoring the integrity of the genome[J/OL]. Mol Biol Int, 2012-04-11 [2012-11-12], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3337673/>.

[2] Sherwood V, Recino A, Jeffries A, et al. The N-terminal RASSF family: a new group of Ras-association-domain-containing proteins, with emerging links to cancer formation[J]. Biochem J, 2010, 425(2):303-311.

[3] 崔华英,周栩茹,韩庆,等. 宫颈癌 RAS 相关区域家族 1A 基因启动子甲基化检测及临床意义研究[J]. 中国全科医学, 2011, 14(14):1529-1531, 1534.

[4] 乔玉环,王琳,刘红彦,等. 宫颈鳞癌组织中 RASSF1A 基因甲基化状态及其临床意义[J]. 中国癌症杂志, 2010, 20(8):611-614.

[5] Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF proteins in cancer: from epigenetic silencing to functional characterization[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1796(2):114-128.

[6] Fernandes MS, Carneiro F, Oliveira C, et al. Colorectal cancer and RASSF family-A special emphasis on RASSF1A[J]. Int J Cancer, 2013, 132(2):251-258.

[7] Paikos D, Stravaravdi P, Voyatzis S, et al. Detection of methylation in the CpG islands of the p16INK4A, RASSF1A and methylguanine methyltransferase gene promoters in pancreatic adenocarcinoma[J]. Ecancermedicalscience, 2009, 3(2):131-135.

[8] van der Weyden L, Adams DJ. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1776(1):58-85.

[9] Clarke MA, Wentzensen N, Mirabello L, et al. Human papillomavirus DNA methylation as a potential biomarker for cervical cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012, 21(12):2125-2137.

[10] Li L, Choi JY, Lee KM, et al. DNA methylation in peripheral blood: a potential biomarker for cancer molecular epidemiology[J]. J Epidemiol, 2012, 22(5):384-394.