

TaqMan 探针检测结直肠癌血浆中微量甲基化 EphA7 基因

王建东¹, 王绪林², 董迎春¹, 李国立², 鲍 杨², 马恒辉¹, 周晓军¹
(南京军区南京总医院, 1. 病理科; 2. 普外科, 江苏南京 210002)

[摘 要] **目的** 从结直肠癌症患者血浆中分离微量来源于肿瘤细胞的游离 DNA, 检测甲基化 EphA7 作为肿瘤标志。**方法** 提取血浆中微量游离 DNA, 并以亚硫酸氢钠修饰 DNA。根据修饰后的 DNA 序列, 设计 EphA7 甲基化特异性引物和探针, 利用 Real Time PCR 仪扩增甲基化 EphA7 基因。**结果** 从大肠癌患者血浆中检出微量甲基化 EphA7 基因。**结论** 应用荧光标记 TaqMan 探针 Real Time PCR 可以检测出结直肠癌患者血浆中微量游离 DNA 中甲基化 EphA7 基因, 血浆甲基化 EphA7 可能作为一种新的肿瘤标志物。

[关键词] 荧光标记探针; 实时 PCR; 血浆; 甲基化; EphA7

中图分类号: R735.3⁺7 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2009)02-0097-04

Microamount of hypermethylated EphA7 detected in plasma of colorectal cancer with a TaqMan probe

WANG Jian-dong¹, WANG Xu-lin², DONG Ying-chun¹, LI Guo-li², BAO Yang², MA Heng-hui¹, ZHOU Xiao-jun¹ (1. Department of Pathology; 2. Department of Surgery, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective** To detect hypermethylated EphA7 in plasma DNA released from colorectal cancer cells as a tumor marker. **Methods** The free DNA in plasma was extracted using a QIAamp DNA Blood Mini kit and treated with sodium bisulfite. The Real time PCR primer sets and fluorescence labeled probe for detection of hypermethylated EphA7 were designed according to the sodium bisulfite converted DNA sequence. Hypermethylated EphA7 DNA was detected using an ABI PRISM 7000 sequence detection system. **Results** The hypermethylated EphA7 gene was detected in plasma of colorectal cancer. **Conclusion** Real-time PCR with a fluorescence labeled TaqMan probe can detect hypermethylated EphA7 gene from plasma of colorectal cancer, and hypermethylated EphA7 in plasma maybe used as a new tumor marker.

[Key words] Fluorescent TaqMan probe; Real-time PCR; Plasma; Hypermethylation; EphA7

许多抑癌基因如 P53、APC、hMLH1 等等在肿瘤组织中发生高甲基化, 这些抑癌基因在同一患者的正常组织中通常不发生甲基化, 或者很少甲基化。因此, 它们有可能成为重要的肿瘤标志物。在肿瘤患者血浆中存在微量由肿瘤组织释放的游离 DNA^[1], 有许多文章报道从血浆中检测微量游离 DNA 中的突变基因^[2-3], 杂合性缺失 (LOH) 作为肿瘤标志物^[4-7]。利用甲基化特异性 PCR (MSP) 从血浆中检测

微量 DNA 中甲基化基因, 虽然有文献报道, 但由于受检测敏感性的限制, 很难在临床实践中推广。应用实时 PCR 检测血浆中甲基化的抑癌基因是最近肿瘤标志物研究中的热点^[8-12]。我们曾报道酪氨酸激酶受体 EphA7 基因在 49% 大肠癌患者的癌组织中发生甲基化, 而在同一患者的正常黏膜中不发生甲基化, 是一种肿瘤的特异性甲基化现象^[13]。检测血浆中甲基化 EphA7 基因有可能成为大肠癌早期诊断

基金项目: 国家基础研究 973 项目 (2006, CB 705707);

南京军区医学科学技术研究“十一五”计划重点课题 (06Z37)

作者简介: 王建东 (1963-), 男, 江苏南京人, 日本浜松医科大学博士, 副主任技师, 主要从事分子病理学诊断和研究。

的辅助指标和对手术后进行复发监测,血浆甲基化 EphA7 可能成为一种新的肿瘤标志物。本文报告建立荧光标记 TaqMan 探针实时 PCR 方法检测血浆中甲基化 EphA7 基因的方法。

1 材料与方法

1.1 标本收集和血浆DNA提取 癌症患者术前抽取 1 ml 静脉血,肝素抗凝。以 3000 r/min 离心 10 min,分离血浆和血细胞。血浆立刻提取DNA 或者-80℃低温冰箱保存备用。应用 Qiagen 公司的 QIAamp DNA Blood Mini kit 提取血浆中微量游离DNA,提取方法按试剂盒提供的程序并作改进。具体如下:取400 μl 血浆加入 40 μl QIAGEN Protease 消化液,然后加入400 μl AL 液,漩涡振荡 15 s,56℃水浴10 min,短暂离心后加入乙醇400 μl,漩涡振荡 15 s,将液体加入试剂盒的DNA 吸附柱,6 000×g 离心1 min,将吸附柱换新套管。将剩余液体加入吸附柱,6 000×g 离心1 min,将吸附柱换新套管。分别用 AW1 和 AW2 清洗和离心,最后以 50 μl AE 溶液洗脱下DNA, -20℃保存备用。

1.2 引物和探针设计 所设计引物扩增片断大小在 80~150 bp 范围,引物长度 17~25 bp,GC 含量在 40%~60%,两条引物的 Tm 值尽量接近。避免引物内部或之间形成 3 bp 以上的互补序列等等。探针长度 20~24 bp,探针的 Tm 值比引物高 8~10℃,探针内标或探针与引物之间避免形成 3 bp 以上的互补序列。除了遵循以上规则外,用于检测甲基化的探针和引物还要注意以下几点。①引物和探针的序列是根据亚硫酸氢钠对 DNA 修饰后的新序列设计的,而不是从原来的基因库中的序列。甲基化的胞嘧啶在修饰后,不发生改变;而非甲基化的胞嘧啶,在亚硫酸氢钠处理后变成尿嘧啶。因此,设计引物时,原来序列中的C,根据其是否甲基化,将引物定为C(甲基化)或T(非甲基化),其他碱基不发生改变(图1)。②引物和探针中尽量多包含5'-CG-3'位点,才能更好区分甲基化和非甲基化DNA。③对引物和探针以及扩增序列(亚硫酸氢钠处理后的DNA)进行Blast 检查,防止出现非特异性扩增。检测甲基化 EphA7 基因的引物和 TaqMan 荧光探针序列见图 1。

1.3 亚硫酸氢钠修饰DNA 血浆提取DNA 溶解在 50 μl AE 缓冲液,存放在1.5 ml Eppendorf 管中,加入 5.6 μl 新鲜配制的 3 mol/L 氢氧化钠,37℃变性

基因库序列	5'.....TGGCCGGGGCGGCCATTTCG.....3'
EphA7MSP-M 探针	5'- (FAM) TGGTCGGGGCGGTTATTTCG (Eclipse) -3'
基因库序列	5'-ACCTGACTCCGCTCGGCACCG-3'
EphA7MSP-Mf	5'-ATTTGATTTCGTTTCGGTATCG-3'
基因库互补序列	5'-GGCCAAGGGCGGGTCCCG-3'
EphA7MSP-Mr	5'-AACCAAAAAACGAATCCCG-3'

图 1 EphA7 的 TaqMan 探针和引物设计

15 min。加入 2.9 μl 新鲜配制的 10 mmol/L 对苯二酚(Sigma),使终浓度为0.5 mmol/L。加入 363 μl 新鲜配制的 3.6 mol/L 亚硫酸氢钠(Sigam, S-8890),使终浓度为 3.1 mmol/L。亚硫酸氢钠配制时,用 10 mol/L NaOH 调节 pH 至 5.0。滴上液体石蜡油,50~55℃反应 16 h。应用 Promega 公司的 DNA wizard cleanup kit 纯化处理的DNA。按其说明书操作。利用真空泵过吸附柱,最后将DNA 溶解在50 μl TE 缓冲液中(pH8.0)。加入 5.6 μl 3 mol/L NaOH 到TE 溶解的DNA 中,37℃孵育 15 min,终止亚硫酸氢钠反应。利用乙醇和 3 mol/L 醋酸钠沉淀DNA。70%乙醇清洗后,用 30 μl TE 缓冲液溶解备用。

1.4 Real time PCR 检测甲基化 EphA7 将引物、探针、dNTPs、缓冲液和Taq 酶等预先混合后分装到 200 μl PCR 反应管中,为了保证高效扩增,我们使用热启动Taq 酶(大连宝生物)。反应体积为 30 μl,各成份的最终浓度分别如下:dNTPs,200 μmol/L;引物为 0.3 μmol/L;探针为 0.1 μmol/L;Taq 酶为 1U。加入 2 μl 亚硫酸氢钠处理的DNA。混合后快速离心反应管。应用ABI Prism 7000 Real time 检测系统扩增。反应温度和时间:95℃,2 min,随后按下列参数 40 个循环,94℃变性 30 s;52℃退火 30 s;72℃延伸 1 min。

DNA 经亚硫酸氢钠处理后,EphA7 启动子区 CpG 岛 DNA 序列发生改变,甲基化的胞嘧啶(C)被化学修饰为尿嘧啶(U),设计出特异性的引物和荧光 TaqMan 探针。在实时 PCR 时,只有检测到甲基化 EphA7 基因,才会出现荧光信号。如图 2 所示,不同颜色的曲线代表不同的检测标本,荧光强度大于 40 的线条为含有 EphA7 甲基化 DNA 血浆,小于 40 的为阴性标本。

2 结 果

应用荧光 TaqMan 探针实时 PCR,检测到了大肠癌患者血浆中微量甲基化 EphA7 基因 DNA,见图 2。

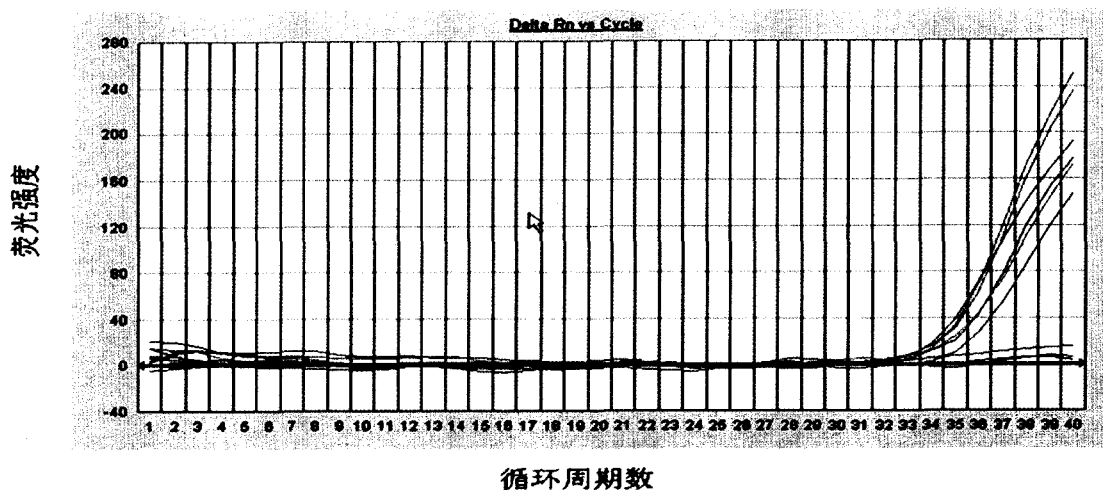


图 2 荧光 TaqMan 探针 Real time PCR 检测出大肠癌血浆中甲基化 EphA7 基因

3 讨论

到目前为止,人们已发现多种抑癌基因在肿瘤组织中发生了甲基化,如 P53、APC、hMLH1 等等。这些抑癌基因在同一患者的正常组织中通常不发生甲基化,或者甲基化频率非常低。许多研究已证实,在肿瘤患者血浆中存在微量由肿瘤组织释放的游离 DNA^[14],检测肿瘤患者血浆中这些基因的甲基化可能成为重要的肿瘤标志物^[2,15]。用普通的甲基化特异性 PCR 方法可以检测血浆中甲基化 DNA,其敏感性相对较低,实用性差;而检测血浆中非常微量的甲基化 DNA 对于技术要求非常高,很难普及。目前,国内许多大型医院已开展了实时定量 PCR (real time PCR)检测项目。利用高度灵敏和特异的荧光 TaqMan 探针进行实时 PCR,容易检测出血浆微量 DNA 中甲基化的抑癌基因,便于临床开展检测。

Eph 基因是一组最大的受体酪氨酸激酶家族,分为 EphA 和 EphB 两类,共有 14 种受体。Eph 基因家族在生长发育中发挥重要作用,同时也与多种肿瘤的发生、发展和转移有关。作者从事 Eph 基因在消化道肿瘤中的表达研究^[13,16-18],发现 EphA7 在结直肠癌组织中表达下调,EphA7 基因的下调与结直肠癌的预后也有一定关系。EphA7 表达下调与启动子区的 CpG 岛甲基化有关^[13]。为了深入研究 EphA7 甲基化在临床结直肠癌诊断和预后方面的应用,我们建立了荧光标记 TaqMan 探针,从大肠癌患者血浆中检测甲基化 EphA7 基因 DNA 的方法,血浆甲基化 EphA7 可能成为一种新的肿瘤标志物。该方法同样也适用于在肿瘤患者血浆中检测其他甲基化抑癌

基因。原发肿瘤切除以后,来源于肿瘤组织的游离 DNA 会逐渐消失。但是当肿瘤复发时,血浆中又会出现肿瘤来源的 DNA。对于肿瘤患者手术后检测血浆某些抑癌基因甲基化 DNA,可以用来进行肿瘤复发的监测。应用荧光标记的 TaqMan 探针检测甲基化 DNA,具有特异性高和敏感性高的特点,除了检测血浆外,还可以检测胸腹水、痰液以及尿液中来源于肿瘤细胞的微量甲基化 DNA。本方法将为临床开展血浆甲基化抑癌基因检测提供参考。

参考文献

- [1] Frattini M, Gallino G, Signoroni S, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer [J]. *Cancer Lett*, 2008, 263(2): 170-181.
- [2] Ludovini V, Pistola L, Gregorc V, et al. Plasma DNA, microsatellite alterations, and p53 tumor mutations are associated with disease-free survival in radically resected non-small cell lung cancer patients: a study of the perugia multidisciplinary team for thoracic oncology [J]. *J Thorac Oncol*, 2008, 3(4): 365-373.
- [3] Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4): 366-377.
- [4] Schwarzenbach H, Chun FK, Lange I, et al. Detection of tumor-specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate cancer [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(7): 1465-1471.
- [5] Takagi R, Nakamoto D, Mizoe JE, et al. LOH analysis of free DNA in the plasma of patients with mucosal malignant melanoma in the head and neck [J]. *Int J Clin Oncol*, 2007, 12(3): 199-204.

(下转第 130 页)

年^[8]。本组 8 例患者随访半年至 6 年,无一例出现复发和转移,与文献报道^[9-10]基本一致,其良好的预后及存活期较长也是此肿瘤的一大特点,故该肿瘤的正确诊断,对选择合适的治疗方案十分必要。

参考文献

[1] Frantz VK. Tumor of the pancreas. Anonymous Atlas of Tumor Pathology [M]. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology,1959:32-33.

[2] Klimstra DS, Wenig BM, Heffess CS. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: a typically cystic carcinoma of low malignant potential[J]. Semin Diagn Pathol,2002,17 (1): 66-80.

[3] Abraham SC,Klimstra DS,Wilentz RE,et al. Solid-pseudopapillary tumors of the pancreas are genetically distinct from pancreatic ductal adenocarcinomas and almost always harbor beta-catenin mutations[J]. Am J Pathol,2002,160(4):1361-1369.

[4] Thambugala GM, Pereira J, Sugo E, et al. Solid and cystic papillary epithelial neoplasm of the pancreas in an 11-year-old girl: imaging features with pathological correlation [J]. Australas Radiol,2006,50(4):373-376.

[5] Al-Aynati MM,Radulovich N, Riddell RH,et al. Epithelial-cadherin and beta-catenin expression changes in pancreatic intraepithelial neoplasia[J]. Clin Cancer Res, 2004,10 (4): 1235-1240.

[6] Miao J,Kusafuka T,Kuroda S,et al. Mutation of betacatenin and its protein accumulation in solid and cystic tumor of the pancreas associated with metastasis[J]. Int J Mol med, 2003, 11(4):461-464.

[7] Nakagohri T,Kinoshita T,Konishi M,et al. Surgical outcome of solid pseudopapillary tumor of the pancreas [J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg,2008,15(3):318-321.

[8] Martin RC,Klimstra DS,Brennan MF,et al. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: a surgical enigma[J]. Ann Surg Oncol, 2002,9(1):35-40.

[9] Donatella S,Francesca P,Stefania L. Solid-papillary tumors of the pancreas;histopathology [J]. J Pancreas,2006,7(1):131-136.

[10] Chen C,Wen J. Melanocytic differentiation in a solid pseudopapillary tumor of the pancreas[J]. J Gastroenterol,2004,39 (6):579-583.

(收稿日期:2008-07-24;修回日期:2008-11-18)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)

(上接第 99 页)

[6] Muller I,Beeger C,Alix-Panabieres C,et al. Identification of loss of heterozygosity on circulating free DNA in peripheral blood of prostate cancer patients: potential and technical improvements [J]. Clin Chem,2008, 54(4):688-696.

[7] Schwarzenbach H, Chun FK, Muller I, et al. Microsatellite analysis of allelic imbalance in tumour and blood from patients with prostate cancer [J]. BJU Int,2008,102(2):253-258.

[8] Tan SH, Ida H, Lau QC, et al. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3 [J]. Oncol Rep,2007,18 (5):1225-1230.

[9] Ellinger J,El Kassem N,Heukamp LC,et al. Hypermethylation of cell-free serum DNA indicates worse outcome in patients with bladder cancer [J]. J Urol,2008,179(1):346-352.

[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] Martinez-Galan J, Torres B, Del Moral R, et al. Quantitative detection of methylated ESR1 and 14-3-3-sigma gene promoters in serum as candidate biomarkers for diagnosis of breast cancer and evaluation of treatment efficacy [J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(6):958-965.

[12] Sirera R, Gil M, Blasco A, et al. Retrospective analysis of

the prognostic role of p16 protein inactivation in plasma in patients with locally advanced non-small cell lung cancer [J]. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands), 2008, 61(1):104-108.

[13] Wang J, Kataoka H, Suzuki M, et al. Downregulation of EphA7 by hypermethylation in colorectal cancer [J]. Oncogene,2005,24(36):5637-5647.

[14] Ikoma D,Ichikawa D,Ueda Y,et al. Circulating tumor cells and aberrant methylation as tumor markers in patients with esophageal cancer [J]. Anticancer Res,2007,27 (1B): 535-539.

[15] Nakayama G,Hibi K,Kodera Y,et al. P16 methylation in serum as a potential marker for the malignancy of colorectal carcinoma [J]. Anticancer Res,2007,27(5A):3367-3370.

[16] Wang J,Li G,Ma H,et al. Differential expression of EphA7 receptor tyrosine kinase in gastric carcinoma [J]. Hum Pathol,2007,38(11):1649-1656.

[17] Wang JD,Dong YC,Sheng Z,et al. Loss of expression of EphB1 protein in gastric carcinoma associated with invasion and metastasis [J]. Oncology,2007,73(3-4):238-245.

[18] Dong Y, Wang J, Sheng Z, et al. Downregulation of EphA1 in colorectal carcinomas correlates with invasion and metastasis [J]. Mod Pathol, 2009, 22(1):151-160.

(收稿日期:2009-01-12)

(本文编辑:潘雪飞)