

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.004

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.004>

血清甲基化 SFRP2 在上消化道肿瘤诊断中的可行性

王真真¹, 赵国栋^{2,3}, 陈莹¹, 马萍^{1,4}, 顾兵^{1,4}, 李洪春^{1,4}

(1. 徐州医科大学医学技术学院, 江苏 徐州 221004; 2. 浙江大学昆山创新中心, 浙江大学昆山生物检测实验室, 江苏 昆山 215300; 3. 苏州唯善生物科技有限公司, 江苏 苏州 215300; 4. 徐州医科大学附属医院检验科, 江苏 徐州 221004)

[摘要] 目的: 探究结直肠癌(colorectal cancer, CRC)癌甲基化分泌卷曲相关蛋白2(secreted frizzled-related protein 2, SFRP2)在上消化道肿瘤诊断中的可行性。方法: 收集41例上消化道肿瘤患者和36例无相关胃肠疾病患者的血清, 采用基于甲基化特异性PCR的方法检测甲基化的SFRP2(mSFRP2)。结果: SFRP2的灵敏度在上消化道癌中为68.3%, 在食管癌中为60.0%, 在胃癌中为71.0%。特异性为77.8%, 提示SFRP2的甲基化状态与患者年龄、性别及肿瘤属性(原发性或继发性)之间不存在相关性($P>0.05$)。此外, 随着肿瘤大小和病理分化程度的增加, SFRP2甲基化阳性率也逐渐增加。结论: CRC甲基化标志物SFRP2用于上消化道肿瘤的筛查是可行的, 尤其在胃癌检测方面。SFRP2的甲基化检测将是一个新的很有前景的非侵入性的上消化道肿瘤筛查工具。

[关键词] 上消化道肿瘤; 甲基化标志物; SFRP2基因

Feasibility of methylated SFRP2 in serum for diagnosis of upper gastrointestinal tract cancers

WANG Zhenzhen¹, ZHAO Guodong^{2,3}, CHEN Ying¹, MA Ping^{1,4}, GU Bing^{1,4}, LI Hongchun^{1,4}

(1. School of Medical Technology, Xuzhou Medical University, Xuzhou Jiangsu 221004; 2. Zhejiang University Kunshan Innovation Institute, Zhejiang University Kunshan Biotechnology Laboratory, Kunshan Jiangsu 215300; 3. Suzhou VersaBio Technologies Inc., Suzhou Jiangsu 215300; 4. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou Jiangsu 221004, China)

Abstract **Objective:** To explore the feasibility of serum methylation SFRP2 in the diagnosis of upper gastrointestinal tract cancers (UGITC). **Methods:** The serum of 41 patients with UGITC and 36 patients without gastrointestinal tract diseases individuals were collected and tested by methylation specific PCR based assay detecting methylated biomarkers—methylated SFRP2 (mSFRP2). **Results:** The sensitivities of SFRP2 were 68.3% in UGITC, 60.0% in esophageal carcinoma and 71.0% in gastric carcinoma. The specificity was 77.8%. There was no evidence proving the correlation between methylation status of SFRP2 and patients' age, gender and tumor attribute (primary or

收稿日期 (Date of reception): 2018-12-01

通信作者 (Corresponding author): 李洪春, Email: 13775891123@163.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81702103); 江苏省自然科学基金 (BK20170252); 江苏省高校自然科学基金项目 (16KJD320005); 江苏省青年医学人才 (QNRC2016780); 徐州市科技计划项目 (KC16SY157)。This work was supported by the National Natural Science Foundation (81702103), Jiangsu Provincial Natural Science Foundation (BK20170252), General Program of the Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions (16KJD320005), Projects for Jiangsu Provincial Young Medical Talents (QNRC2016780), Xuzhou Science and Technology Planning Project (KC16SY157), China.

secondary) ($P>0.05$). In addition, methylation positive rates were increasing gradually with the increasing of tumor size and clinical differentiation. **Conclusion:** It is possible to use colorectal cancer methylated biomarkers (SFRP2) to detect upper gastrointestinal tract cancers. Methylated SFRP2 in serum may have a new promising prospect as the non-invasive screening tool for UGITC.

Keywords upper gastrointestinal tract cancers; methylated biomarker; SFRP2 gene

一直以来, 上消化道肿瘤都是人类健康不可忽视的威胁^[1-2]。近些年, 由于外卖及其他快餐类行业的迅猛发展, 中国人的饮食结构发生了巨大的变化, 大量腌制、熏烤及油炸类食品的长期摄入使得上消化道肿瘤的发病率逐年上涨^[3-4]。为提高晚期癌症患者的5年生存率, 临床工作人员做出了许多努力, 但收效甚微^[5]。因此, 癌症的早期筛查是降低病死率最有希望的一条途径, 找到一种准确有效的癌症早期筛查方法也就显得尤为重要。

近几年, 启动子异常甲基化的检测被认为是癌症早期检测的有效方法。启动子区的CpG岛是最常见的甲基化区域, 这些区域的过度甲基化常导致抑癌基因的失活和相关转录的沉默, 进而促进癌症的发生发展^[6-7]。异常甲基化的DNA片段将在肿瘤发生发展的过程中被释放到循环外周血中^[8]。因此, 通过对循环外周血中DNA片段(cfDNA)的检测来监测肿瘤, 可达到筛查的目的。

分泌卷曲相关蛋白2(secreted frizzled-related protein 2, SFRP2)是分泌卷曲相关蛋白(SFRP)家族成员之一, 在Wingless/Wnt信号通路中起抑制因子的作用^[9]。SFRP2启动子甲基化的检测已被许多研究者用于结直肠癌(colorectal cancer, CRC)的筛查。在胚胎时期, 上消化道与下消化道具有相同的起源^[10], 但目前很少有使用甲基化SFRP2(mSFRP2)检测上消化道肿瘤的相关文献。基于上述调查, 本研究使用临床样本对mSFRP2作为上消化道肿瘤筛查的甲基化标志物的可行性进行了探索。

1 材料与方法

1.1 材料

经徐州医科大学附属医院医学伦理委员会许可, 本研究在该医院进行了标本采集工作, 共收集到36例健康志愿者和41例上消化道肿瘤患者(其中包括10例食管癌患者和31例胃癌患者)的血清标本。健康志愿者均无相关胃肠疾病及胃肠道肿瘤家族史, 癌症患者为接受过胃镜及病理检查的新确诊病例, 均未接受过手术和相关抗癌药物

的治疗。采集每个参与者静脉血5 mL, 4 000 r/min离心15 min, 将分离出的血清移至5 mL EP管后置于-80 °C冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取、转化和纯化

根据操作说明书, 使用cfDNA提取试剂盒(购自苏州唯善生物科技有限公司)对每位参与者血清样本中的基因组DNA进行提取。随后用亚硫酸氢盐转化试剂盒(购自苏州唯善生物科技有限公司)对提取出的DNA进行转化, 经过80 °C, 45 min的亚硫酸氢盐作用, 基因组DNA中未甲基化的胞嘧啶将转化为尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶不变。再用洗涤液对转化后的基因组进行纯化洗涤。最后将纯化的DNA在60 μL洗脱缓冲液中洗脱。

1.2.2 甲基化特异性PCR的检测

将从上述步骤中获得的纯化DNA作为PCR模板, 以ACTB为内参基因, 根据操作说明将甲基化SFRP2筛查试剂盒(购自苏州唯善生物科技有限公司)中的PCR反应混合液与模板混合。每个反应体系为30 μL, 在96孔板内每个样本做2个PCR重复。使用ABI 7500 fast PCR扩增仪进行DNA的扩增和检测。反应条件为: 95 °C, 预变性30 min, 然后95 °C 10 s, 56 °C 30 s, 共进行50个循环, 最后40 °C延伸30 s冷却结束。

1.2.3 结果判读标准

当SFRP2-Ct值<40时, 该PCR反应为阳性; SFRP2-Ct值≥40时, 该PCR反应为阴性。使用1/2算法对样本结果进行规定, 即若1个样本的2个PCR反应中有1个PCR反应为阳性, 即可判定该样本的检测结果为阳性; 而在2个PCR反应均为阴性时, 才可判定此样本的检测结果为阴性。

1.3 统计学处理

应用SPSS 22.0统计软件进行数据分析, 使用 χ^2 检验和Kruskal-Wallis检验对数据进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 mSFRP2 与患者年龄、性别及肿瘤属性之间的相关性

患者年龄为(65.09±10.02)岁。mSFRP2阳性率与患者的年龄、性别和肿瘤属性(原发性或继发性)之间差异无统计学意义($P>0.05$, 表1)。

表1 mSFRP2与患者的年龄、性别和肿瘤属性的相关性
Table 1 Correlations of mSFRP2 and patient's age, gender and attribute

项目	n	阳性例数(%)	P
年龄/岁			0.265
>60	21	16 (76.2)	
≤60	20	12 (60.0)	
性别			0.926
男	35	24 (68.6)	
女	6	4 (66.7)	
肿瘤属性			0.548
原发性	36	24 (66.7)	
继发性	5	4 (80.0)	

2.2 mSFRP2 在上消化道肿瘤患者和健康志愿者中的阳性率

如表2所示, mSFRP2在上消化道癌中的检测阳性率为68.3%, 即检测灵敏度为68.3%, 在健康志愿者中的阳性率为22.2%, 即检测特异性为77.8%($P<0.05$)。ROC曲线(图1)示: mSFRP2在上消化道肿瘤诊断中曲线下面积(AUC)为0.801(95%CI: 0.703~0.899)。

表2 mSFRP2在上消化道肿瘤患者和健康志愿者中的阳性率

Table 2 Positive rates of mSFRP2 between UGITC patients and healthy volunteers

标本来源	mSFRP2 阳性例数	mSFRP2 阴性例数	合计
上消化道肿瘤患者	28	13	41
健康志愿者	8	28	36
合计	36	41	77

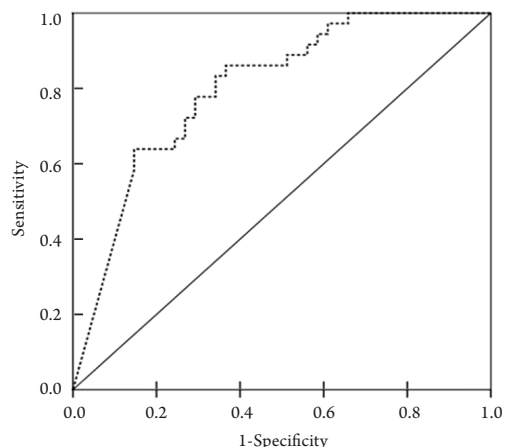


图1 mSFRP2在上消化道肿瘤检测中的ROC曲线
Figure 1 ROC curve of mSFRP2 in UGITC patients' detection

进一步对上消化道肿瘤进行区分, SFRP2基因甲基化在食管癌中的阳性6例, 胃癌中的阳性22例, 但由于标本例数过少, 还不足以说明SFRP2基因甲基化在上消化道癌症各分组中的检测优势倾向($P>0.05$, 表3)。

表3 mSFRP2在食管癌和胃癌中的阳性率

Table 3 Positive rates of esophageal cancer and gastric cancer

上消化道癌	阳性例数	阴性例数	合计
食管癌	6	4	10
胃癌	22	9	31
合计	28	13	41

2.3 mSFRP2 在上消化道肿瘤大小、分期和分化中的阳性率

根据第八版外科学教材中的临床分期标准, 将收集到的癌症标本进行分类统计, 其中I期10例, II期12例, III期13例, IV期6例, mSFRP2的阳性率分别为40.0%, 75.0%, 69.2%和100.0%(图2)。根据患者肿瘤的大小, 将标本分为<3 cm, 3~6 cm和>6 cm三组, mSFRP2的阳性率分别为50.0%, 66.7%和92.9%。根据病理报告中的组织学特征, 将标本分为高分化、高-中分化、中分化、中-低分化、低分化5组, mSFRP2的阳性率分别为25.0%, 60.0%, 70.0%, 72.7%和81.8%。

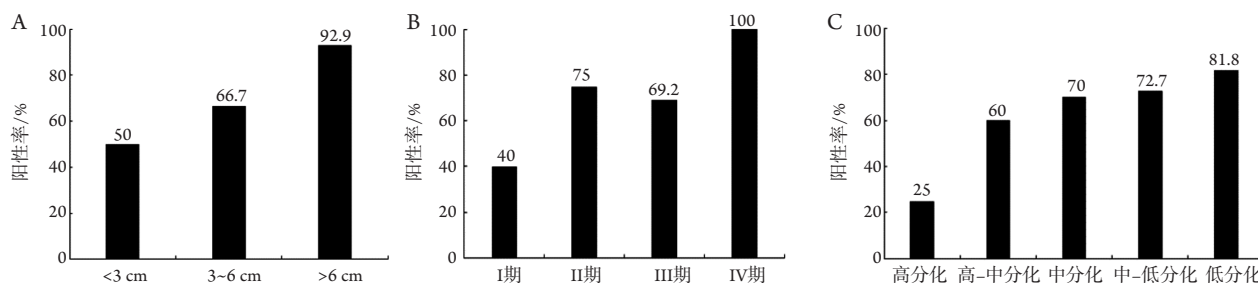


图2 mSFRP2在上消化道肿瘤大小、分期和分化中的阳性率

Figure 2 Positive rates of tumor's sizes, stages and differentiations

(A)mSFRP2在不同肿瘤大小中的阳性率; (B)mSFRP2在不同肿瘤分期中的阳性率; (C)mSFRP2在不同肿瘤分化中的阳性率。

(A) Positive rates of mSFRP2 in tumor's sizes; (B) Positive rates of mSFRP2 in tumor's stages; (C) Positive rates of mSFRP2 in tumor's differentiations.

3 讨论

近年来, 上消化道肿瘤不断增长的发病率和病死率让医务工作者意识到肿瘤早期筛查的重要性^[2]。甲基化生物标志物具有灵敏度高、特异性强和非侵入性等优点, 已成为临床检测方法(主要包括内镜检查和糖蛋白肿瘤生物标志物)最有应用前景的替代检测手段。目前, 粪便和外周血中SFRP2启动子异常甲基化的检测已被用于CRC的筛查。Zhang等^[11]曾经使用血浆样本对CRC患者的SFRP2启动子甲基化进行了检测, 发现mSFRP2在肿瘤患者中的阳性率为54.39%。Yang等^[12]实验测得CRC患者粪便中的SFRP2甲基化率为71%。Mohammadi等^[13]比较了粪便mSFRP2和血液mSFRP2在CRC检测中的效果, 证实了这两种标本类型存在显著差异(粪便mSFRP2的灵敏度比血液mSFRP2灵敏度约高20%)。大部分研究中也多使用粪便mSFRP2对CRC进行筛查, 并得出了较好的检测灵敏度。但在临床工作中, 样本类型的选择必须考虑到实际情况。与结直肠不同, 上消化道器官和大肠(粪便形成的主要部位)之间还有十二指肠、空肠和回肠的长距离间隔。由肿瘤释放出的游离DNA片段可能在抵达大肠之前就已经被破坏, 这意味着粪便中可测量的甲基化DNA将在很大程度上减少。因此, 即使有研究^[14]表明甲基化阳性检出率从组织到粪便再到血液会逐渐降低, 血液循环中的DNA检测仍然是上消化道癌症非侵入性筛查的最佳选择, 这也是我们选择血清作为样本类型的主要原因。

Guilleret等^[15]曾在实验中将mSFRP2用于食管癌的检测, 但SFRP2只是32个候选筛查基因中的一个, 实验中并没有对mSFRP2和食管癌的联系进行

深入探讨。此外, 目前其他使用mSFRP2检测上消化道肿瘤的相关文献还很少, 该基因甲基化检测在上消化道肿瘤诊断中的应用价值有待挖掘。在我们的探索性实验中, 使用1/2阳性率评判标准^[16], 结果显示: mSFRP2在上消化道肿瘤检测中的灵敏度为68.3%, 特异性为77.8%。从ROC曲线图中可以看出, 曲线下面积为0.801, 提示mSFRP2对上消化道肿瘤有一定的诊断价值。Yousuf等^[17]曾对常见的胃癌甲基化标志物mMGMT进行了研究, 发现胃癌样本中MGMT基因启动子高甲基化率为52.44%。从两种基因甲基化阳性率的对比可以看出, SFRP2具有成为的上消化道肿瘤标志物的潜力。此外, Yousuf等^[17]还指出: 较高的甲基化阳性率与较差的病理分化(中/低分化)和较差的肿瘤分期(III/IV期)之间存在显著的正相关性, 这些结果与本实验的结果一致。

宋毓飞等^[18]对胃癌患者血浆样本中SFRP2和RNF180两种基因进行了甲基化特异性PCR的检测, 发现两种基因在胃癌患者中的甲基化阳性率分别为67.2%和53.7%, 且两种基因的联合诊断阳性率(77.6%)更优。本研究结果显示mSFRP2在胃癌中的检测灵敏度为71.0%, 与宋毓飞等^[18]的结果相似, 但稍优于其结果。虽然本研究中的样本例数有限, 但在正确的统计学方法分析下, mSFRP2检测在胃癌诊断中具有一定的价值。

另外, mSFRP2在食管癌中的检测灵敏度为60.0%。但是由于样本例数过少, 该数据不能说明mSFRP2在食管癌诊断中是否有价值。因此, mSFRP2在食管癌诊断中是否具有价值, 其诊断价值和胃癌相比是否更优仍有待进一步探索。

一直以来, 上消化道癌症的筛查都缺乏行之有效的最佳方法。目前临床上应用的检测方法主

要有内镜检查和血清肿瘤标志物的检查。内镜检查结合病理活检已被视为目前上消化道肿瘤诊断的金标准^[19]。然而,此种检查在国内多是患者在有了明显症状到医院就诊时由医生开出,虽说有着极高的诊断准确率,但其侵入性的操作总是患者带来很多痛苦,加上医嘱的检查前准备让患者依从性较差,因此,目前在国内,内镜检查还没有列入到健康体检群体的常规筛查项目中^[20]。目前在临床上用于健康体检者消化道肿瘤筛查的项目为血清中糖蛋白肿瘤标志物的检测。与内镜检查相比,肿瘤标志物的检测是一种非侵入性方法,在患者中的可接受度高。CEA, CA199, CA125和 CA72-4是目前临床上最常使用的上消化道肿瘤筛查标志物组合^[21-22]。但这些肿瘤标志物检测的特异性很低,即使是几种标志物的联合检测也不足以单一地成为一种可靠的诊断依据,所以目前肿瘤标志物的检测也只是作为内镜检查的一种辅助诊断依据。

血清中甲基化标志物的检测弥补了上述两种方法的缺点,它既是一种非侵入性的、可接受度高的血液检测手段,又具有良好的检测灵敏度和特异性。本研究对mSFRP2在上消化道肿瘤检测的应用价值进行探索,发现mSFRP2在胃癌筛查中具有一定的检测灵敏度(71.0%)和特异性(77.8%)。经过比较分析,这种CRC常用的甲基化标志基因和目前研究较多的胃癌甲基化标志基因的检测结果相当,甚至更优。因此,血清mSFRP2检测在胃癌的筛查中具有很大的检测潜力。此外,与目前临床采用的多个糖蛋白肿瘤标志物联合检测相同,多个甲基化标志基因的联合检测也会提高检测方法的灵敏度和特异性,使得mSFRP2在胃癌的筛查中具有更大的应用前景。当然,本研究中样本例数偏少,对于mSFRP2在食管癌中检测效果的可信度、mSFRP2在整个上消化道肿瘤筛查中的表现及多个基因联合检测的实际效果仍待进一步探究。

参考文献

- Napier KJ, Scheerer M, Misra S. Esophageal cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2014, 6(5): 112-120.
- Pierce BA. CA: a cancer journal for clinicians[J]. *Biomedical Market Newsletter*, 2012, 21: 1.
- Stevens GA, Singh GM, Lu Y, et al. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences[J]. *Popul Health Metr*, 2012, 10(1): 22.
- 聂爱英, 梁丽娟, 雷超, 等. 饮食和生活习惯与胃癌的相关性研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(3): 578-581.
NIE Aiyong, LIANG Lijuan, LEI Chao, et al. The advances in research on the relationship between diet and living habits and gastric cancer[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2017, 17(3): 578-581.
- Shi Y, Zhou Y. The role of surgery in the treatment of gastric cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2010, 101(8): 687-692.
- Daura-Oller E, Cabre M, Montero MA, et al. Specific gene hypomethylation and cancer: new insights into coding region feature trends[J]. *Bioinformatics*, 2009; 3(8): 340-343.
- Xin Y, Ge Y, Haghighi FG. Methyl-analyzer—whole genome DNA methylation profiling[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(16): 2296-2297.
- Tóth K, Sipos F, Kalmár A, et al. Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46000.
- Oberwalder M, Zitt M, Wöntner C, et al. SFRP2, methylation in fecal DNA—a marker for colorectal polyps[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2008, 23(1): 15-19.
- Jin RU, Mills JC. Are Gastric and esophageal metaplasia relatives? The case for barrett's stemming from SPEM[J]. *Dig Dis Sci*, 2018, 63(8): 2028-2041.
- Zhang X, Song YF, Lu HN, et al. Combined detection of plasma GATA5 and SFRP2 methylation is a valid noninvasive biomarker for colorectal cancer and adenomas[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(9): 2629-2637.
- Yang Q, Huang T, Ye G, et al. Methylation of SFRP2 gene as a promising noninvasive biomarker using feces in colorectal cancer diagnosis: a systematic meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33339.
- Mohammadi M, Jafari SM, Mohaghegh MA, et al. Comparison of SFRP2 promoter methylation in stool sample and cfDNA regarding patients with colorectal cancer[J]. *Comp Clin Path*, 2017; (4): 1-5.
- Sui C, Ma J, Chen Q, et al. The variation trends of SFRP2 methylation of tissue, feces, and blood detection in colorectal cancer development[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2016, 25(4): 288-298.
- Guilleret I, Losi L, Chelbi ST, et al. DNA methylation profiling of esophageal adenocarcinoma using methylation ligation-dependent microarray (MLM)[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479(2): 231-237.
- Song L, Peng X, Li Y, et al. The SEPT9 gene methylation assay is capable of detecting colorectal adenoma in opportunistic screening[J]. *Epigenomics*, 2017, 9(5): 599-610.
- Yousuf A, Bhat MY, Pandith AA, et al. MGMT, gene silencing by promoter hypermethylation in gastric cancer in a high incidence area[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2014, 37(4): 245-252.
- 宋毓飞, 张谢, 孙蓓蓓, 等. 联合检测血浆SFRP2、RNF180基因甲

- 基化在胃癌临床诊断中的价值[J]. 胃肠病学, 2015, 20(1): 19-23.
- SONG Yufei, ZHANG Xie, SUN Beilei, et al. Value of combined detection of plasma SFRP2 and RNF180 gene methylation in clinical diagnosis of gastric cancer[J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2015, 20(1): 19-23.
19. ASGE Standards of Practice Committee, Fisher DA, Maple JT, et al. Complications of colonoscopy[J]. Gastrointest Endosc, 2011, 74(4): 745-752.
20. Eftang LL, Klajic J, Kristensen VN, et al. GFRA3 promoter methylation may be associated with decreased postoperative survival in gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2016, 16: 225.
21. Xu MX, Cui HJ, Yao TL, et al. Clinical value of combined tests for tumor markers for gastric cancer[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2018, 32(2): 263-268.
22. Feng F, Tian YZ, Xu GH, et al. Diagnostic and prognostic value of CEA, CA19-9, AFP and CA125 for early gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 737.

本文引用: 王真真, 赵国栋, 陈莹, 马萍, 顾兵, 李洪春. 血清甲基化SFRP2在上消化道肿瘤诊断中的可行性[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(5): 933-938. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.004

Cite this article as: WANG Zhenzhen, ZHAO Guodong, CHEN Ying, MA Ping, GU Bing LI Hongchun. Feasibility of methylated SFRP2 in serum for diagnosis of upper gastrointestinal tract cancers[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2019, 39(5): 933-938. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.004