

SFRP1、*LINE1* 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态 在肝细胞癌预后评估的价值*

黄元¹, 魏玲¹, 孙爱民², 赵荣策³, 张静⁴, 杨含腾³, 李波³,
孙成均⁴, 丁雪琴², 高波², 钟艳琴⁴, 覃扬^{1△}

1. 四川大学华西基础医学与法医学院 生物化学与分子生物学教研室(成都 610041);

2. 四川大学分析测试中心(成都 610064); 3. 四川大学华西医院 肝血管外科(成都 610041);

4. 四川大学公共卫生学院 卫生检验与检疫系(成都 610041)

【摘要】目的 探讨分泌型卷曲相关蛋白(*SFRP*)1、长散在核元件(*LINE*)1 基因启动子区 CpG 岛甲基化与人原发性肝癌(简称肝癌)临床病理参数的关系,及其在肝癌预后评估的意义。**方法** 收集 105 例肝癌患者血浆和 50 例对照健康人血浆 DNA,使用甲基化特异性 PCR(MSP)检测了 *SFRP*1 基因启动子区 CpG 岛高甲基化和 *LINE*1 基因启动子区 CpG 岛低甲基化的情况;分析两种基因启动子甲基化和肝癌患者临床病理参数之间的关系;通过 Kaplan-Meier 曲线、对数秩检验及 Cox 多因素分析,分析 *SFRP*1、*LINE*1 基因甲基化状态与肝癌患者总生存率及无病生存率之间的关系。**结果** 105 例肝癌患者血浆中 *SFRP*1 基因启动子区 CpG 岛高甲基化阳性率为 59.05% (62/105),*LINE*1 基因启动子区 CpG 岛低甲基化率为 66.67% (70/105),基因 *SFRP*1 高甲基化和 *LINE*1 低甲基化表达均阳性为 43.81% (46/105),正常对照组中未发现有这两种基因甲基化;*SFRP*1 高甲基化、*LINE*1 低甲基化均与 HBsAg 是否阳性及甲胎蛋白(AFP)值相关($P<0.05$);*SFRP*1、*LINE*1 基因启动子区域的甲基化状态与总生存率及无病生存率有关;*SFRP*1 高甲基化阴性+*LINE*1 低甲基化阴性组患者预后最好,而 *SFRP*1 高甲基化阳性+*LINE*1 低甲基化阳性组患者预后最差。**结论** *SFRP*1、*LINE*1 基因启动子区 CpG 岛甲基化与肝癌的发生、发展有一定联系,*SFRP*1 和 *LINE*1 基因甲基化状态可以作为潜在可靠的分子标记物对患者预后进行预测。

【关键词】 肝癌 血浆 *SFRP*1 基因 *LINE*1 基因 甲基化 预后

The Evaluation Value of Methylation Status of CpG Island of *SFRP*1 and *LINE*1 Gene Promoter Area in the Prognosis of Hepatocellular Carcinoma HUANG Yuan¹, WEI Ling¹, SUN Ai-min², ZHAO Rong-ce³, ZHANG Jing⁴, YANG Han-teng³, LI Bo³, SUN Cheng-jun⁴, DING Xue-qin², GAO Bo², ZHONG Yan-qin⁴, QIN Yang^{1△}. 1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Analytical and Testing Center, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 3. Department of Liver and Vascular Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Department of Laboratory Technology and Science of Public Health, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: qin_1@sina.com

【Abstract】Objective To investigate the relationship between aberrant promoter CpG islands methylation status of secreted frizzled related protein 1 (*SFRP*1) and long interspersed nuclear element 1 (*LINE*1) gene and clinicopathologic parameters to determine their prognosis value for hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** 105 cases of HCC and 50 cases of normal people plasma were collected, and then the promoter hypermethylation status of *SFRP*1 and hypomethylation status of *LINE*1 were examined by methylation specific PCR (MSP); The relationship between *SFRP*1/*LINE*1 methylation status and patients' clinicopathologic factors was analyzed; The association between *SFRP*1/*LINE*1 methylation status and disease-free survival and overall survival was analyzed by Kaplan-Meier curves, the log-rank test, and multivariate Cox regression. **Results** *SFRP*1 gene promoter CpG islands hypermethylation and *LINE*1 gene promoter CpG islands hypomethylation were found in 59.05% (62/105) and 66.67% (70/105) of 105 cancerous plasma cases, respectively, *SFRP*1 hypermethylation status and *LINE*1 hypomethylation status in plasma of HCC account for 43.81% (46/105) and no positive methylation cases were detected in normal cases; The hypermethylation status of *SFRP*1 and hypomethylation status of *LINE*1 gene were related with HBsAg and α -fetoprotein (AFP) level; There was statistically significant difference between CpG

* 四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2013SZ0048)资助

△ 通信作者, E-mail: qin_1@sina.com

islands hypermethylation of two genes and disease-free survival rate and overall survival rate; The group patients with *SFRP1* hypermethylation positive and *LINE1* hypomethylation positive demonstrated the worst prognosis while the group with *SFRP1* hypermethylation negative and *LINE1* hypomethylation negative had the best prognosis. **Conclusion** The promoter methylation of *SFRP1* and *LINE1* is correlated with the occurrence and development of HCC. *SFRP1* and *LINE1* might be potential and reliable biomarkers for predicting prognosis in HCC patients.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma *SFRP1* *LINE1* Methylation Prognosis

DNA 甲基化是一种由酶介导改变的化学修饰,通常发生在启动子区 CpG 岛^[1-2]。最近研究表明,异常的启动子甲基化能够参与包括肝细胞癌在内的许多肿瘤中基因的转录失活^[1,3]。因此,DNA 甲基化的相关分析对于肿瘤的诊断、预后判断等均具有重要价值^[4]。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生涉及到多基因的改变,但其确切的分子机制仍不明^[5]。最近研究发现,Wnt 信号通路的异常与肝癌发生有关^[6],Wnt 信号通路在胚胎发育、细胞分化和细胞增殖中起着重要的作用^[7]。作为 Wnt 信号转导的负调控者分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled related proteins, SFRPs)可能在肿瘤发生中有重要作用^[8-9]。已有研究证实,*SFRP1* 基因启动子区域高度甲基化在 HCC 中是个频发事件,且 *SFRP1* 基因是通过 Wnt 经典途径抑制肝肝癌细胞的增殖^[10]。基因组重复序列即长散在核元件(long interspersed nuclear elements, LINE)是一种分布在人类基因组内的内源性的逆转座子序列^[11],人类基因组包含大量的 *LINE1* 基因,大约占基因组的 5%~10%^[12]。低甲基化导致的 *LINE1* 反转录活性激活,使得肿瘤基因失活^[13]。本研究旨在通过分析 *SFRP1* 及 *LINE1* 基因启动子区 CpG 岛甲基化情况与肝癌患者临床病理特征的相关性,探讨其在肝癌预后诊断中的临床意义。

1 对象与方法

1.1 对象资料

选取 2014 年 3~11 月于四川大学华西医院肝脏外科住院的 105 例肝癌患者,所有患者均经过血液检查及影像学筛查初步确诊为肝癌。选取同期在四川大学华西第四医院体检的 50 例健康人作为对照,其中 23 例男性,27 例女性,年龄 17~60 岁。105 例肝癌患者,男性 89 例,女性 16 例,年龄 22~75 岁;血清甲胎蛋白(AFP) > 400 $\mu\text{g/L}$ 者 45 例;HBsAg 阳性者 97 例;门静脉癌栓阳性者 17 例;肝癌癌灶之外的肝组织有肝硬变发生者 60 例;术后 1 年半内复发者 24 例;术后一年内死亡者 15 例。

49 例患者行手术,保留有肿瘤大体标本。取血液标本保存于乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)抗凝管中,于 30 min 内离心,分离取上清液得到血浆标本。

1.2 试剂与仪器

TIAN amp Genomic DNA 试剂盒,北京天根生化科技有限公司;AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量制备试剂盒,杭州爱思进生化科技有限公司;RPMI1640、DMEM,美国 Gibco 公司;新生牛血清,兰州民海生物制品公司;2 $\times$ PCR master mix K0171, Fermentas 公司;所有引物由上海生物公司合成。其余试剂均为国产分析纯。MCO-15A 型 CO_2 培养箱,日本 SANYO;My25 型 PCR 仪,杭州 Long Gene;凝胶成像系统及 Smart Spec 紫外分光光度仪均来自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞株 HepG₂、K562 的培养 人肝癌细胞 HepG₂、人白血病细胞 K562 均购于中科院上海生物化学与细胞所。HepG₂ 已被证实 *SFRP1* 基因启动子区 CpG 岛高甲基化,K562 已被证实 *LINE1* 基因启动子区 CpG 岛低甲基化,它们作为甲基化特异性 PCR(MSP)检测实验的阳性对照细胞株。HepG₂ 细胞培养用 RPMI1640,而 K562 细胞用 DMEM 培养,均含 100 mL/L 小牛血清,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%的 CO_2 常规条件下消化传代培养。最终,取得生长良好的细胞作为实验材料。

1.3.2 细胞及血浆 DNA 的提取 患者血浆中的 DNA 用 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量制备试剂盒提取,操作按说明书条件优化后进行,即每份标本至少取 400 μL 用于提取,最终洗脱体积为 50 μL 的含 DNA 氨基丁三醇-乙二胺四乙酸缓冲液(Tris-EDTA,TE)。而 HepG₂、K562 细胞 DNA 提取则按照 TIAN amp Genomic DNA 试剂盒操作说明书进行,溶于 150 μL TE,经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.3 DNA 甲基化修饰 使用 EZ DNA Methylation-Gold Kit(ZYMO 公司)对提取的血浆和 HepG₂、K562 细胞 DNA 进行亚硫酸氢钠处理

和纯化。取 200~500 ng DNA 按说明书操作进行修饰后,用于 MSP。

1.3.4 MSP 检测 采用 MSP 检测血浆中 *SFRP1*、*LINE1* 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态,两种基因的甲基化引物与非甲基化引物序列参照文

献^[14-15],见表 1。取经 1.3.3 处理的材料,DNA 扩增条件如下:95 ℃ 5 min;95 ℃ 45 s,63 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 35 个循环;最终 72 ℃ 10 min。然后,取 PCR 产物进行 20 g/L 琼脂糖浆凝胶电泳,100 V 电泳 50 min,凝胶成像系统下照相。实验中采用经

表 1 *SFRP1*、*LINE1* 基因甲基化特异性 PCR 引物
Table 1 Methylation-specific PCR primer of *SFRP1* and *LINE1* genes

Gene	Gene sequence	Product length/bp	Anneal temperature/℃
<i>SFRP1</i> -UF	5'-GTTTTGTAGTTTTTGGAGTTAGTGTGTGT-3'	135	63
<i>SFRP1</i> -UR	5'-CTCAACCTACAATCAAAAACAACACAAACA-3'		
<i>SFRP1</i> -MF	5'-TGTAGTTTTTCGGAGTTAGTGTCTCGCGC-3'	126	63
<i>SFRP1</i> -MR	5'-CCTACGATCGAAAACGACGCGAACG-3'		
<i>LINE1</i> -UF	5'-TGTGTGTGAGTTGAAGTAGGGT-3'	116	63
<i>LINE1</i> -UR	5'-ACCCAATTTTCCAAATACAACCATCA-3'		
<i>LINE1</i> -MF	5'-CGCGAGTCGAAGTAGGGC-3'	111	63
<i>LINE1</i> -MR	5'-ACCCGATTTTCCAAATACGACCG-3'		

UF: Unmethylated forward primer; UR: Unmethylated reverse primer; MF: Methylated forward primer; MR: Unmethylated reverse primer

1.3.3 处理的 HepG₂、K562 细胞作阳性对照,水作空白对照。

1.3.5 生存期随访 利用电话对 105 例肝癌患者进行随访获知其生存情况。以月为单位计算,从术后第 1 d 起开始随访,以复发或死亡为截止时间,统计患者的总体生存率和无病生存率。

1.4 统计学方法

各组计数资料之间的比较采用 χ^2 检验,生存率计算则采用 Kaplan-Meier 法,相关分析采用 Pearson 相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌患者和健康人血浆中 *SFRP1*、*LINE1* 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态

见表 2、图 1。在肝癌组血浆与对照组血浆中,*SFRP1* 基因启动子区域的高甲基化阳性率分别为 59.05 % (62/105) 和 0 % (0/50),两者之间差异有统计学意义($P<0.05$)。肝癌组和对照组血浆中 *LINE1* 基因启动子区域的低甲基化阳性率分别为 66.67 % (70/105) 和 0 % (0/50),两者之间差异有统计学意义($P<0.05$)。肝癌组中 *SFRP1* 启动子区域的高甲基化和 *LINE1* 启动子区域的低甲基化同时阳性为 43.81 % (46/105),对照组为 0 % (0/50),两者之间差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 肝癌患者血浆中 *SFRP1*、*LINE1* 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态的相互关系

表 2 肝癌患者血浆与健康人血浆中 *SFRP1* 和 *LINE1* 基因启动子区域甲基化阳性率比较

Table 2 The comparison of methylation status of *SFRP1* and *LINE1* between plasma from HCC patients and healthy people

Group	<i>SFRP1</i> /case		<i>P</i>	<i>LINE1</i> /case		<i>P</i>	<i>SFRP1</i> - <i>LINE1</i> /case		<i>P</i>
	+	-		+	-		+	-	
HCC	62	43	0.000	70	35	0.000	46	59	0.000
Normal	0	50		0	50		0	50	

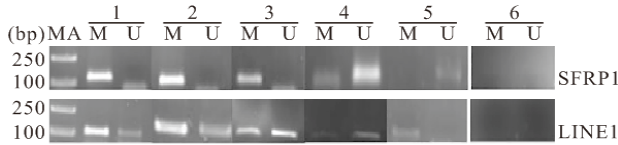


图 1 肝癌患者血浆和健康人血浆中 *SFRP1*、*LINE1* 基因甲基化特异性 PCR 分析结果

Fig 1 Methylation-specific PCR analysis of *SFRP1* and *LINE1* in plasma of HCC patients and healthy people

1: Positive control; 2-4: Cancerous plasma samples; 5: Plasma samples of healthy people; 6: Blank control; MA: DL2000; M: Methylated; U: Unmethylated

肝癌组血浆中 *SFRP1* 基因启动子区域高甲基化阳性和 *LINE1* 基因启动子区域低甲基化阳性均发生者占 43.81 % (46/105);只有 *SFRP1* 基因发生甲基化阳性的占 15.24 % (16/105);只有 *LINE1* 基因发生低甲基化阳性的占 22.86 % (24/105);*SFRP1* 基因启动子区域甲基化阴性和 *LINE1* 基因启动子区域低甲基化阴性均发生者占 18.1 % (19/105)。Pearson 相关分析结果发现,肝癌组的 *SFRP1* 高甲基化和 *LINE1* 低甲基化状态之间存

在正相关($r=0.192, P<0.05$)。

2.3 肝癌患者血浆中 *SFRP1*、*LINE1* 基因启动子区 CpG 岛甲基化与临床病理参数间的关系

由表 3 可见, *SFRP1* 基因启动子区域高甲基化阳性率、*LINE1* 基因启动子区域低甲基化阳性率与

患者的年龄、性别、细胞分化程度、是否伴有肝硬化、有无门静脉癌栓及淋巴结转移无关,但均与 HBsAg 是否阳性及 AFP 值水平相关($P<0.05$)。*LINE1* 基因启动子区域低甲基化阳性率还与肿瘤直径、纤维评分相关($P<0.05$)。

表 3 肝癌患者血浆中 *SFRP1*、*LINE1* 基因启动子区域甲基化与临床病理参数之间的关系

Table 3 Relationship between methylation status of *SFRP1* and *LINE1* in plasma of HCC patients and clinicopathologic parameters

Clinical characteristic	<i>n</i>	<i>SFRP1</i> /case (%)		<i>P</i>	<i>LINE1</i> /case (%)		<i>P</i>
		Methylated	Unmethylated		Methylated	Unmethylated	
Age/yr.				0.256			0.435
>45	77	48 (45.71)	29 (27.63)		53 (50.48)	24 (22.86)	
≤45	28	14 (13.33)	14 (13.33)		17 (16.18)	11 (10.48)	
Gender				0.291			0.349
Male	88	50 (47.62)	38 (36.19)		57 (54.29)	31 (29.52)	
Female	17	12 (11.43)	5 (4.76)		13 (12.38)	4 (3.81)	
HBsAg				0.005			0.009
+	97	61 (58.1)	36 (34.28)		68 (64.76)	29 (27.62)	
—	8	1 (0.95)	7 (6.67)		2 (1.91)	6 (5.71)	
AFP/(μg/L)				0.000			0.000
>400	45	38 (36.19)	7 (6.67)		39 (37.14)	6 (5.71)	
≤400	60	24 (22.87)	36 (34.29)		31 (29.53)	29 (27.62)	
Tumor diameter*/cm				0.109			0.001
≥5	23	15 (30.61)	8 (16.33)		22 (44.90)	1 (2.04)	
<5	26	11 (22.45)	15 (30.61)		14 (28.57)	12 (24.49)	
Degree of cell differentiation*				0.101			0.280
Moderately	39	23 (46.94)	16 (32.65)		30 (61.22)	9 (18.38)	
Poorly	10	3 (6.12)	7 (14.29)		6 (12.24)	4 (8.16)	
Fibrillation grade*				0.566			0.029
3-4	9	4 (8.16)	5 (10.21)		4 (8.16)	5 (10.21)	
5-6	40	22 (44.90)	18 (36.73)		32 (65.30)	8 (16.33)	
Porta vein tumor embolus				0.111			0.851
With	17	13 (12.38)	4 (3.81)		11 (10.48)	6 (5.71)	
Without	88	49 (46.67)	39 (37.14)		59 (56.19)	29 (27.62)	
Metastasis				0.391			0.442
With	16	11 (10.48)	5 (4.76)		12 (11.43)	4 (3.81)	
Without	89	51 (48.57)	38 (36.19)		58 (55.24)	31 (29.52)	
Cirrhosis				0.529			1.000
With	60	37 (35.24)	23 (21.90)		40 (38.10)	20 (19.05)	
Without	45	25 (23.81)	20 (19.05)		30 (28.57)	15 (14.28)	

* 49 patients underwent tumorectomy

2.4 *SFRP1* 和 *LINE1* 基因启动子区域甲基化阳性表达与生存期预后关系

随访时间截止为 2015 年 12 月,其中,随访时间最长为 18 月,其中有 34 例患者失访,最终共纳入 71 例进行统计。单因素分析显示,无论是总体生存率还是无病生存率, *SFRP1* 基因启动子区域低甲基化状态者均高于其高甲基化状态者, *LINE1* 基因启动子区域高甲基化状态者均高于其低甲基化状态者,差异均有统计学意义($P<0.01$),见图 2、图 3。

将患者按甲基化情况分为 4 组: *SFRP1* 高甲基化阳性+*LINE1* 低甲基化阳性组($n=35$)、*SFRP1* 高甲基化阳性+*LINE1* 低甲基化阴性组($n=20$)、*SFRP1* 高甲基化阴性+*LINE1* 低甲基化阳性($n=6$)、*SFRP1* 高甲基化阴性+*LINE1* 低甲基化阴性($n=10$),结果显示 *SFRP1* 高甲基化阴性+*LINE1* 低甲基化阴性组患者预后最好,而 *SFRP1* 高甲基化阳性+*LINE1* 低甲基化阳性组患者预后最差,见图 4。

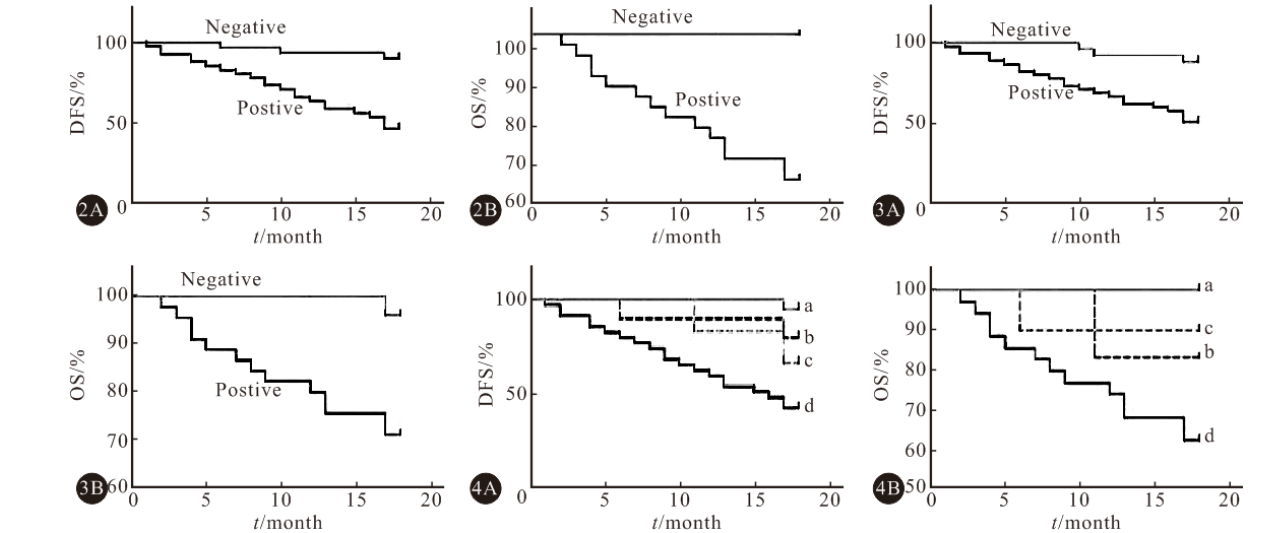


图 2 肝癌患者 *SFRP1* 基因启动子区域甲基化阳性表达与无病生存率(A)及总生存率(B)的关系 图 3 肝癌患者 *LINE1* 基因启动子区域甲基化阳性表达与无病生存率(A)及总生存率(B)的关系

图 4 4 组不同 *SFRP1*、*LINE1* 基因启动子区域甲基化状态肝癌患者的无病生存率(A)和总生存率(B)

Fig 2 The curves between the methylation status of *SFRP1* gene and disease-free survival (DFS) (A) and overall survival (OS) (B) in the HCC patients Fig 3 The curves between the methylation status of *LINE1* gene and DFS (A) and OS (B) in the HCC patients Fig 4 The combination of *SFRP1* and *LINE1* methylation status was found to enhance prognostic accuracy for HCC (A) and OS (B)

a: *SFRP1* hypermethylation negative and *LINE1* hypomethylation negative; b: *SFRP1* hypermethylation positive and *LINE1* hypomethylation negative; c: *SFRP1* hypermethylation negative and *LINE1* hypomethylation positive; d: *SFRP1* hypermethylation positive and *LINE1* hypomethylation positive

3 讨论

肝癌的发生是一个漫长的过程,其中基因组变化会逐渐地改变肝细胞表型从而产生细胞中间体,最后演变成肝癌^[16]。随着表观遗传学的进展,研究发现抑癌基因启动子区域的异常甲基化可以导致基因失活,造成肿瘤形成和发展。WNT/ β -catenin 信号转导通路在肿瘤发生和发展中起到了至关重要的作用^[17]。而作为 Wnt/frizzled 信号的胞外调节物, *SFRP1* 通过与 Wnt 反应或者 frizzled 反应,从而调节 Wnt 信号的传导,抑制肿瘤的发生。 *LINE1* 的甲基化状态作为判定基因组是否稳定和癌基因是否活跃的标志之一,它的启动子低甲基化会限制逆转座子的激活及转录。本研究选取此两种基因,研究其在肝癌患者血浆中启动子区域甲基化状态,探讨其对诊断及预后预测的价值。

本研究结果发现,50 例健康人血浆中 *SFRP1*、*LINE1* 两基因启动子区域甲基化状态均无阳性结果,而在肝癌患者血浆中, *SFRP1* 高甲基化检出阳性率为 59.05 %, *LINE1* 低甲基化率为 66.67%, *SFRP1* 高甲基化和 *LINE1* 低甲基化同时表达阳性率为 43.81%,这表明它们的异常甲基化可能发生在人原发性肝癌中发生频繁。而在以往对 *SFRP1* 和

LINE1 两基因启动子区域甲基化的研究中,SHIH 等^[18]发现在肝癌中 *SFRP1* 表达降低,而 CHALITCHAGORN 等^[19]发现 *LINE1* 表达增加,这说明 *SFRP1* 可能是抑癌基因,而 *LINE1* 是癌基因,因此,我们进一步对这两种基因启动子区域甲基化之间是否存在相关性进行了分析,结果发现, *SFRP1* 高甲基化和 *LINE1* 低甲基化之间存在着关联性,我们推测这可能是由于 Wnt 信号通路的激活导致了 *LINE1* 的低甲基化状态。

在 *SFRP1*、*LINE1* 基因启动子区域甲基化与临床资料关系分析的研究中,我们发现两个基因甲基化都与 HBsAg 感染及血清 AFP 水平值有关,在 HBsAg 阳性的患者中, *SFRP1* 高甲基化、*LINE1* 低甲基化的阳性率高于阴性患者,由此表明,在与 HBV 有关的 HCC 发生过程中, *SFRP1* 基因异常甲基化可能发生比较频繁,与苏倩等^[20]的研究结果一致,而对于 *LINE1* 的低甲基化状态来说,HBV 感染可能会导致肝癌中基因组整体甲基化水平降低,这也说明了 HBsAg 阳性容易导致 HCC 发生,这有可能与基因异常甲基化相关^[19]。另外,已有研究报道,肝癌患者血清中 AFP 水平值与 CpG 岛甲基化表型 (CpG island methylator phenotype, CIMP)联系紧密^[21],这与本研究中 *SFRP1*、*LINE1*

基因启动子区域甲基化与 AFP 水平值相关的结果一致。

有关基因甲基化与患者生存预后之间是否存在关系仍具有争议。本研究亦分析了 *SFRP1* 和 *LINE1* 基因启动子区域的甲基化状态与患者的总体生存率及无病生存率的关系,结果显示这两个基因的甲基化与肝癌患者的生存率有关($P < 0.05$),说明 *SFRP1* 和 *LINE1* 的甲基化状态可能会影响肝癌患者生存预后。研究发现,生物标志物的多种组合可能会对肝癌患者的预后判断更加准确^[22],因此,我们将 *SFRP1* 和 *LINE1* 基因启动子区域的甲基化状态结合起来与患者的总体生存率及无病生存率进行了分析,结果显示,相较于一个生物指标,两个指标的结果对于患者的预后判断更加准确。例如,*SFRP1* 高甲基化阴性+*LINE1* 低甲基化阴性组患者预后最好,而 *SFRP1* 高甲基化阳性+*LINE1* 低甲基化阳性组患者预后最差。

综上所述,作为肝癌发生早期的重要分子事件,抑癌基因 *SFRP1* 及癌基因 *LINE1* 的异常甲基化,可能与肝癌的发生发展有一定的关联。本研究检测了肝癌患者血浆中 *SFRP1*、*LINE1* 基因启动子 CpG 岛甲基化状态,分析了它们与患者的临床病理资料及生存预后的关系,结果显示同时检测 *SFRP1*、*LINE1* 基因启动子 CpG 岛甲基化状态对患者的预后判断更加准确。

参 考 文 献

- [1] LIU JB, ZHANG YX, ZHOU SH, *et al.* CpG island methylator phenotype in plasma is associated with hepatocellular carcinoma prognosis. *World J Gastroenterol*, 2011,17(42):4718-4724.
- [2] LIU YH, WU JZ, HU XQ, *et al.* Diagnosis of hepatocellular carcinoma by using methylation specific-PCR. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 2007,12(3): 558-562.
- [3] LEE HC, KIM M, WANDS JR. Wnt/Frizzled signaling in hepatocellular carcinoma. *Front Biosci*, 2006(11):1901-1915.
- [4] 王 丰,华 东,吴玉玉,等. 血浆 *GSTP1* 和 *SFRP1* 基因甲基化分析在肝细胞癌早期诊断中的价值. *中国癌症杂志*, 2011,21(1):12-16.
- [5] 吴 龙,钱叶本,朱立新,等. 肝细胞癌中 *SFRP1* 和 *APC* 基因启动子甲基化与其 mRNA 的表达. *中国普通外科杂志*, 2008,17(1):29-32.
- [6] SHIH YL, SHYU RY, HSIEH CB, *et al.* Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene *SFRP1* is frequent in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2006, 107(3):579-590.
- [7] CADIQAN KM, NUSSE R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, 1997,11(24):3286-3305.
- [8] ZONG Y, STANGER BZ. Molecular mechanisms of bile duct development. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011,43(2):257-264.
- [9] 郑枫芸,李继承. Wnt 信号通路抑制因子 *SFRP1* 在肿瘤中的研究进展. *细胞生物学杂志*, 2007(29):805-808.
- [10] 苏 倩,郜玉峰,解俊侠,等. 乙型肝炎病毒相关性肝细胞癌中分泌型卷曲相关蛋白基因甲基化分析. *中华传染病杂志*, 2009,27(4):203-206.
- [11] LAVIE L, MALDENER E, BROUHA B, *et al.* The human L1 promoter: variable transcription initiation sites and a major impact of upstream flanking sequence on promoter activity. *Genome Res*, 2004,14(11):2253-2260.
- [12] ALVES G, TATRO A, FANNING T. Differential methylation of human *LINE-1* retrotransposons in malignant cells. *Gene*, 1996,176(1/2):39-44.
- [13] TAKAHARA T, OHSUMI T, KUROMITSU J, *et al.* Dysfunction of the Orleans reeler gene arising from exon skipping due to transposition of a full-length copy of an active L1 sequence into the skipped exon. *Hum Mol Genet*, 1996, 5(7):989-993.
- [14] TAKADA T, YAGI Y, MAEKITA T, *et al.* Methylation-associated silencing of the Wnt antagonist *SFRP1* gene in human ovarian cancers. *Cancer Sci*, 2004,95(9):741-744.
- [15] WANG GS, GAO J, HUANG HL, *et al.* Expression of a *LINE-1* endonuclease variant in gastric cancer: its association with clinicopathological parameters. *BMC Cancer*, 2013, 13(265):1471-2407.
- [16] THORGEIRSSON SS, GRISHAM JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 2002,31(4):339-346.
- [17] 范海燕,张慧景,郭占军,等. 肝细胞癌患者癌组织中 *RASSF1A* 和 *WIF-1* 基因甲基化的临床意义. *山东大学学报(医学版)*, 2013,51(5):89-104.
- [18] SHIH YL, SHYU RY, HSIEH CB, *et al.* Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene *SFRP1* is frequent in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2006,107(3):579-590.
- [19] CHALITCHAGORN K, SHUANGSHOTI S, HOURPAI N, *et al.* Distinctive pattern of *LINE-1* methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene*, 2004,23(54):8841-8846.
- [20] 苏 倩,郜玉峰,解俊侠,等. 乙型肝炎病毒相关性肝细胞癌中分泌型卷曲相关蛋白基因甲基化分析. *中华传染病杂志*, 2009,27(4):203-206.
- [21] 吴建军,丛顾俊,刘继斌. 肝癌中拮抗 Wnt 信号通路的 CpG 岛甲基化表型与临床病理特征之间的关系. *现代检验医学杂志*, 2012,27(6):34-35.
- [22] JI F, FU SJ, SHEN SL, *et al.* The prognostic value of combined TGF- β 1 and ELF in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 2015(15): 116 [2015-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4359586/>. doi: 10.1186/s12885-015-1127-y.

(2016-02-17 收稿,2016-07-03 修回)

编辑 汤 洁