

DNA启动子甲基化致ADAMTS9蛋白 下调促进大肠癌病程进展

王凤¹, 王睿², 王衍晶¹

1. 大连医科大学附属第一医院检验科, 辽宁 大连 116011;
2. 沈阳医学院附属中心医院检验科, 辽宁 沈阳 110024

[摘要] **背景与目的:** 大肠癌的发病率逐年递增。该研究旨在考察ADAMTS9蛋白水平及其启动子甲基化水平在大肠癌发病及病程进展中的意义。**方法:** 采用甲基化特异性PCR法, 检测162例大肠癌患者外周血来源DNA样本中ADAMTS9基因启动子甲基化水平; 并应用酶联免疫吸附试验法检测162例大肠癌患者和150例健康体检者血浆ADAMTS9蛋白水平。**结果:** 与健康人相比, 大肠癌患者血浆中ADAMTS9蛋白水平明显降低 $[(65.25 \pm 9.70) \mu\text{g vs } (50.28 \pm 9.66) \mu\text{g}, P < 0.001]$; 162例大肠癌患者中有66例ADAMTS9基因启动子存在甲基化(40.7%); 甲基化患者的血浆ADAMTS9蛋白水平显著降低($P < 0.001$), 而ADAMTS9蛋白低表达患者的血浆ADAMTS9基因甲基化水平显著升高($P = 0.007$); ADAMTS9甲基化与肿瘤大小($P = 0.017$)和肿瘤分化程度($P = 0.029$)密切相关, 而ADAMTS9蛋白低表达与浸润深度($P = 0.020$)、淋巴结转移($P = 0.019$)和Dukes分期($P = 0.002$)密切相关。**结论:** 在大肠癌中, 由DNA启动子甲基化引起的ADAMTS9蛋白表达下调可能参与大肠癌的发病、侵袭转移、并促进病程进展。

[关键词] 大肠癌; ADAMTS9; 甲基化; 血浆

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.06.007

中图分类号: R735.3⁺4 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)06-0446-06

ADAMTS9 protein downregulation induced by DNA promoter methylation could promote the progression of colorectal cancer WANG Feng¹, WANG Rui², WANG Yanjing¹ (1. Department of Clinical laboratory, the First Hospital of Dalian Medical University, Dalian Liaoning 116011, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Central Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang Liaoning 110024, China)

Correspondence to: WANG Yanjing E-mail: 15541192550@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** The morbidity of colorectal cancer in China increased year by year. This study aimed to explore the significance of ADAMTS9 protein levels and promoter methylation in colorectal cancer onset and progression. **Methods:** ADAMTS9 promoter methylation status was detected by methylation specific PCR method in 162 colorectal cancer patients' peripheral blood DNA samples; Plasmatic ADAMTS9 protein levels was detected by enzyme-linked immunosorbent assay method in 162 colorectal cancer patients and 150 healthy subjects. **Results:** Compared with healthy people, patients with colorectal cancer had a significant lower ADAMTS9 protein level in plasma $[(65.25 \pm 9.70) \mu\text{g vs } (50.28 \pm 9.66) \mu\text{g}, P < 0.001]$; ADAMTS9 gene promoter methylation was observed in 66 among 162 colorectal cancer patients (40.7%); The plasma level of ADAMTS9 protein in patients with methylated ADAMTS9 gene had significantly reduced ($P < 0.001$), while the plasma level of ADAMTS9 protein in patients with low ADAMTS9 protein had significantly increased ($P = 0.007$); ADAMTS9 methylation is closely related to tumor size (larger, $P = 0.017$) and tumor differentiation degree ($P = 0.029$), ADAMTS9 protein low expression is closely related to invasion depth ($P = 0.020$), lymph node metastasis ($P = 0.019$) and Dukes staging ($P = 0.002$). **Conclusion:** ADAMTS9 protein downregulation induced by DNA promoter methylation may be involved in the pathogenesis, invasion and metastasis, and promote the progression in colorectal cancer.

[Key words] Colorectal cancer; ADAMTS9; Methylation; Plasma

大肠癌严重危害人类健康,在我国大肠癌的发病率逐年递增,在恶性肿瘤中已位居前列,如何提高其诊治疗效是临床研究的热点^[1-2]。含TSP结构的去整合素金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS)是一类具有金属蛋白酶的特性的蛋白家族,近年来发现,该家族成员ADAMTS9表现出抑癌基因的特性,在一些恶性肿瘤中其表达降低或缺失,并且与基因启动子甲基化有关^[3-7]。本研究检测大肠癌患者和健康对照人群外周血中ADAMTS9基因启动子甲基化及蛋白水平,以考察其在大肠癌发病及病程进展中的意义。

1 材料和方法

1.1 病例血样标本

本研究所用病例血浆样本均来自于大连医科大学附属第一医院,为2012年1月—2014年12月确诊的大肠癌住院患者入院前留存化验血样共162例,以及体检中心留存的体检报告结论健康的体检者化验血样150例。每例血样标本留存6~8 mL,并加入肝素钠30 U/mL抗凝。新鲜收集的的血样保存于-80℃深度冷冻冰箱。162例大肠癌患者中,男性123例,女性39例。年龄25~77岁。患者病例资料收集过程中部分缺失,其中有可用资料记录的病例情况如下。肿瘤大小(132例):≤5 cm 86例,>5 cm 46例;浸润深度(104例):浆膜内77例,浆膜外27例;分化程度(156例):高分化94例,中、低分化62例;淋巴结转移41例;Dukes分期(157例):A、B期86例,C、D期71例。大肠癌患者住院手术前未接受放疗或化疗。

1.2 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

取-80℃保存的血样,解冻后离心收集血浆。应用ADAMTS9 ELISA试剂盒(E-EL-H5481c, Elabscience Biotechnology Co. Ltd, 武汉)检测血浆中ADAMTS9蛋白水平,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行,标准品质控曲线相关系数 $R^2=0.9992$ 。

1.3 甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific PCR, MSP)检测

取-80℃保存的大肠癌患者血样,解冻后应用酚-氯仿法提取血样中总DNA,并进行亚硫酸氢盐修饰^[8]。PCR反应条件为:95℃预变性10 min;94℃变性30 s,57℃(甲基化)或59℃(非甲基化)退火45 s,72℃延伸1 min,共35个循环;最后72℃延伸7 min,并快速冷却至4℃。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,具体序列见表1。*Sss* I甲基转移酶(M0226L, NEB, 美国)修饰的健康人外周血DNA样本作为甲基化位点的阳性对照,健康人外周血来源DNA样本作为非甲基化位点的阳性对照,以水替代DNA模板作为阴性对照。反应产物应用3%琼脂糖凝胶进行电泳,并用凝胶成像图像分析系统进行图像采集分析。电泳结果中,只要出现甲基化条带,即判定DNA样本存在甲基化;只有不出现甲基化条带时,方可判定DNA样本为非甲基化。

1.4 统计学处理

采用SPSS 16.0软件包进行下述统计学分析。采用ELISA方法检测ADAMTS9蛋白水平,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示;采用ROC曲线分析法判定变量诊断疾病的界值;采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行计量资料的组间比较;采用

表1 MSP检测用引物序列

Tab. 1 Primers sequence used in MSP analysis

Primer	Sequence(5'-3')	Product size/bp	Annealing temperature/℃
Methylated			
Forward	TTGTTTCGTTTCGTTGGGTATTATGCG	183	57
Reverse	CCAACCTTTAACTTTAAAAATCGCT		
Unmethylated			
Forward	TGTTTGTGTTGGGTATTATGTTGG	183	59
Reverse	CCAACCTTTAACTTTAAAAATCACT		

Pearson卡方检验(χ^2 test)或Fisher确切概率法进行计数资料之间的相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大肠癌患者血浆ADAMTS9蛋白水平

采用ELISA方法检测162例大肠癌患者和150例健康人血浆中ADAMTS9蛋白水平结果。与健康人 $[(65.25 \pm 9.70) \mu\text{g}, n=150]$ 相比, 大肠癌患者 $[(50.28 \pm 9.66) \mu\text{g}, n=162]$ 血浆中ADAMTS9蛋白水平明显降低($P < 0.001$, 图1A)。

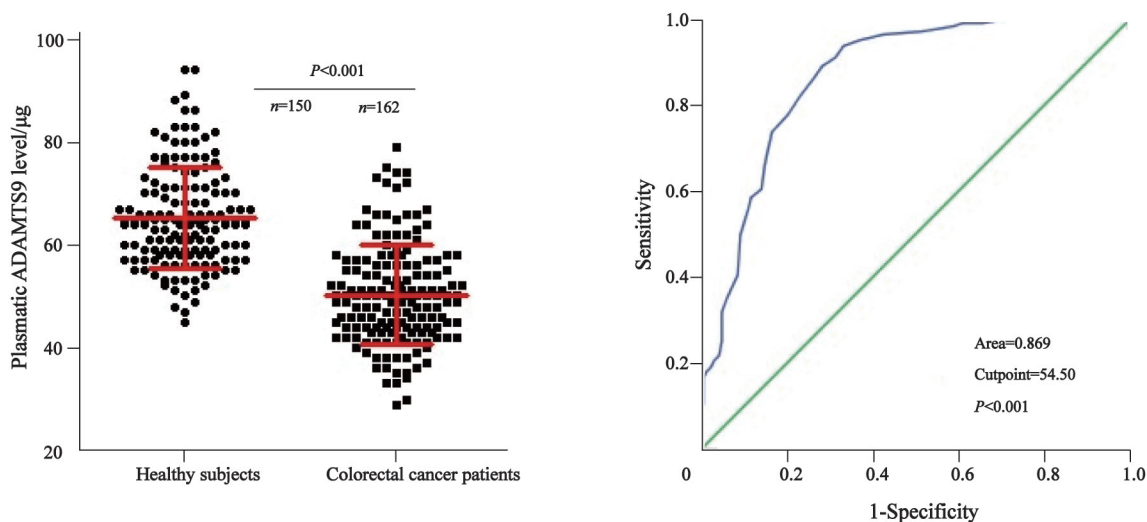


图1 大肠癌患者和健康人血浆中ADAMTS9蛋白水平比较

Fig. 1 Comparison of ADAMTS9 protein level between colorectal cancer patients and healthy subjects

A: Compared with healthy subjects, plasmatic ADAMTS9 protein level of colorectal cancer patients was decreased significantly ($\bar{x} \pm s$; One-way ANOVA); B: ROC curve analysis for the diagnosis cutpoint of plasmatic ADAMTS9 protein level to colorectal cancer.

2.2 大肠癌患者外周血ADAMTS9基因启动子甲基化水平

采用MSP法检测162例大肠癌患者血样中ADAMTS9基因启动子甲基化水平。结果发现, 66例样本ADAMTS9基因启动子存在甲基化, 大肠癌患者人群中ADAMTS9基因甲基化率为40.7%(图2)。

2.3 大肠癌患者血浆ADAMTS9蛋白水平与甲基化水平的相关性

比较ADAMTS9基因甲基化与非甲基化的大肠癌患者血浆ADAMTS9蛋白水平结果发现, 与ADAMTS9非甲基化者 $[(54.32 \pm 9.22) \mu\text{g}, n=96]$ 相比, ADAMTS9基因甲基化患者

采用ROC曲线分析法, 依据检测值的诊断灵敏度与特异度之和最大时, 设定为血浆ADAMTS9蛋白水平诊断大肠癌的界值。结果发现ADAMTS9蛋白水平 $\leq 54.50 \mu\text{g}$ 时有患大肠癌的趋势(图1B)。故定义ADAMTS9蛋白水平 $\leq 54.50 \mu\text{g}$ 为低表达, $> 54.50 \mu\text{g}$ 为高表达。在大肠癌患者中ADAMTS9低表达者116例(71.6%), 高表达者46例(28.4%), 健康体检者中ADAMTS9低表达者16例(10.7%), 高表达者134例(89.3%)。与健康体检者相比, 大肠癌患者ADAMTS9低表达率显著增加($P < 0.001$)。

$[(44.41 \pm 6.90) \mu\text{g}, n=66]$ 的血浆ADAMTS9蛋白水平显著降低($P < 0.001$)。同时比较ADAMTS9蛋白低表达和蛋白高表达的患者血样ADAMTS9基因启动子甲基化水平发现, 与ADAMTS9蛋白高表达者(30/94, 31.9%)相比, ADAMTS9蛋白低表达患者(36/68, 52.9%)的血样ADAMTS9基因甲基化水平显著升高($P = 0.007$, 图3)。

2.4 血浆ADAMTS9蛋白水平和基因甲基化水平与大肠癌患者临床病理参数的相关性

应用Pearson χ^2 检验或Fisher确切概率法分析血浆ADAMTS9基因甲基化水平和蛋白水平与大肠癌患者临床病理参数的相关性。结果发现, 与较小肿瘤相比, 肿瘤较大者ADAMTS9基因

甲基化率显著增高($P=0.017$); 与高分化肿瘤相比, 中、低分化的肿瘤ADAMTS9基因甲基化率显著增高($P=0.029$); 与未侵及浆膜者相比, 侵及浆膜外的肿瘤ADAMTS9蛋白低表达率显著增高($P=0.020$); 与未发生淋巴结转移者相比, 发生淋巴结转移的肿瘤ADAMTS9蛋白低表达率显著增高($P=0.019$); 与Dukes分期A、B者相比, Dukes分期C、D的肿瘤ADAMTS9蛋白低表达率显著增高($P=0.002$, 表2)。

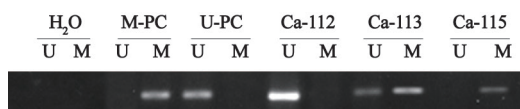


图2 大肠癌患者外周血中ADAMTS9基因启动子甲基化检测

Fig. 2 ADAMTS9 gene methylation analysis in peripheral blood of colorectal cancer patients

H₂O: Negative control; M-PC: Positive control for methylated alleles; U-PC: Positive control for unmethylated alleles; Ca-112: No.112 patient, unmethylated; Ca-113: No.113 patient, methylated; Ca-115: No.115 patient, methylated.

表2 血浆ADAMTS9蛋白水平和甲基化水平与大肠癌患者临床病理参数的相关性

Tab. 2 The association of plasmatic ADAMTS9 protein level and methylation level with clinical pathological parameters in colorectal cancer patients

Item	ADAMTS9 DNA methylation	P value	ADAMTS9 protein low expression	P value
Age/year		0.057		0.194
≤65	32(34.4)		35(37.6)	
>65	34(49.3)		33(47.8)	
Gender		0.156		0.074
Male	54(43.9)		55(44.7)	
Female	12(30.8)		11(28.2)	
Tumor size/cm		0.017		0.772
≤5.0	30(34.9)		37(43.0)	
>5.0	26(56.5)		21(45.7)	
Invasion depth		0.184		0.020
Serosa inside	26(33.8)		26(33.8)	
Serosa outside	13(48.1)		16(59.3)	
Differentiated degree		0.029		0.056
High	32(34.0)		34(36.2)	
Medium+low	32(51.6)		32(51.6)	
Lymph node metastasis		0.122		0.019
No	43(37.4)		43(37.4)	
Yes	21(51.2)		24(58.5)	
Dukes stage		0.626		0.002
A+B	36(41.9)		26(30.2)	
C+D	27(38.0)		39(54.9)	

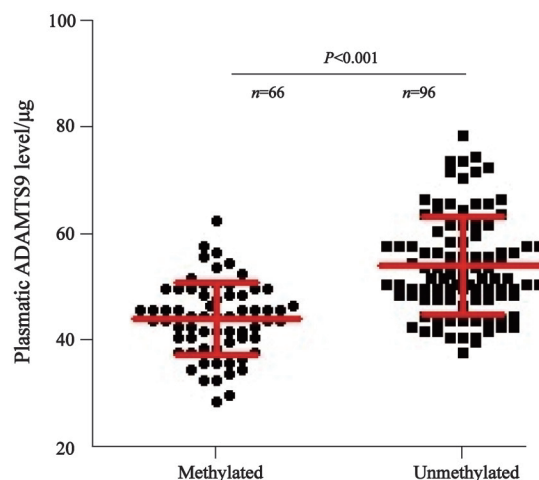


图3 不同ADAMTS9基因甲基化水平的大肠癌患者血浆ADAMTS9蛋白水平比较

Fig. 3 Comparison of plasmatic ADAMTS9 protein level between different ADAMTS9 gene methylation levels in colorectal cancer patients

P value obtained from One-way ANOVA.

3 讨 论

外周血DNA样本的抑癌基因异常甲基化是肿瘤发生过程中常见的基因改变^[9-10], 因此, 检测外周血抑癌基因DNA甲基化水平可有助于恶性肿瘤的早期筛查及诊断。本研究首次检测了大肠癌患者外周血ADAMTS9蛋白水平, 结果发现, 与健康人相比, 大肠癌患者血浆ADAMTS9蛋白水平降低。在许多其他恶性肿瘤中也有类似的发现, 如Lo等^[11]在鼻咽癌患者中也发现ADAMTS9基因表达缺失。这说明ADAMTS9的表达下调可能也参与到大肠癌的发病。

本研究还首次检测了大肠癌患者外周血DNA样本中ADAMTS9基因启动子甲基化水平, 与许多已有的报道一样^[5-6,12], 本研究也检测到ADAMTS9基因启动子甲基化处于一个较高水平。而Zhang等^[7]的研究也发现在大肠癌病理组织中存在高于癌旁组织的ADAMTS9基因甲基化水平。本研究分析了大肠癌患者外周血ADAMTS9蛋白水平与ADAMTS9基因启动子甲基化水平的相关性, 结果发现ADAMTS9基因启动子甲基化与ADAMTS9蛋白低表达密切相关。DNA甲基化是基因沉默最常见的表遗传学修饰之一。这说明可能存在一个由DNA启动子甲基化引起的ADAMTS9蛋白表达下调从而参与大肠癌发病的机制。

本文进一步分析ADAMTS9蛋白水平和ADAMTS9基因启动子甲基化水平与大肠癌患者临床病理参数的相关性, 本研究发现ADAMTS9基因甲基化与肿瘤大小(较大者)和肿瘤分化程度(较低者)密切相关, 而ADAMTS9蛋白低表达与浸润深度(较深者)、淋巴结转移(转移者)和Dukes分期(较高者C、D)密切相关。Lo等^[11]在对鼻咽癌中发现ADAMTS9表达缺失伴随着淋巴结转移, Ocak等^[13]上调ADAMTS9的表达有助于防止乳腺癌侵袭转移。这说明ADAMTS9基因甲基化及ADAMTS9蛋白低表达都可能参与了大肠癌的侵袭转移、促进病程进展。但同时也发

现ADAMTS9基因甲基化水平和蛋白水平与临床病理参数相关性不一致, 这可能是由于DNA甲基化并非调节蛋白表达的唯一方式, 细胞中影响蛋白表达水平的机制很多, 如DNA突变、组蛋白去乙酰化等。因此, ADAMTS9基因甲基化并不能完全意义上代表ADAMTS9蛋白低表达状态。

现有的研究表明ADAMTS9是1个独立的血管生成抑制因子, 从而发挥其抑癌作用^[14]。王乐等^[12]的研究发现ADAMTS9基因甲基化可能参与肝癌的形成, 认为ADAMTS9基因甲基化可用以预测患者的预后。Ocak等^[13]认为, 以ADAMTS9为靶点可以实现抗肿瘤之目的。Peng等^[6]认为, 基于因甲基化引起ADAMTS9基因沉默的特征, 可应用去甲基化的方法进行多发性骨髓瘤的治疗。本研究发现大肠癌中存在由DNA启动子甲基化引起的ADAMTS9蛋白表达下调的机制, 这可能参与大肠癌的发病、侵袭转移、并促进病程进展。因此, 结合前述已有的研究报道, 本研究认为ADAMTS9基因甲基化有望成为大肠癌治疗的新靶点。

[参 考 文 献]

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, XU J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5):277-300.
- [2] 卫文. 不良生活习惯导致大肠癌高发 [J]. 家庭医学, 2012, 2(8): 32-33.
- [3] APTE S S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms [J]. J Biol Chem, 2009, 284(46): 31493-31497.
- [4] VILORIA C G, OBAYA A J, MONCADA-PAZOS A, et al. Genetic inactivation of ADAMTS15 metalloprotease in human colorectal cancer [J]. Cancer Res, 2009, 69(11): 4926-4934.
- [5] DU W, WANG S, ZHOU Q, et al. ADAMTS9 is a functional tumor suppressor through inhibiting AKT/mTOR pathway and associated with poor survival in gastric cancer [J]. Oncogene, 2013, 32(28): 3319-3328.
- [6] PENG L, YANG Z, TAN C, et al. Epigenetic inactivation of ADAMTS9 via promoter methylation in multiple myeloma [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(3): 1055-1061.
- [7] ZHANG C, SHAO Y, ZHANG W, et al. High-resolution melting analysis of ADAMTS9 methylation levels in gastric, colorectal, and pancreatic cancers [J]. Cancer Genet

- Cytogenet, 2010, 196(1): 38-44.
- [8] ZHAO L, WANG L, JIN F, et al. Silencing of estrogen receptor alpha (ERalpha) gene by promoter hypermethylation is a frequent event in Chinese women with sporadic breast cancer [J] . Breast Cancer Res Treat, 2009, 117(2): 253-259.
- [9] QU Y, DANG S, HOU P. Gene methylation in gastric cancer [J] . Clin Chim Acta, 2013, 424: 53-65.
- [10] FACKLER M J, LOPEZ BUJANDA Z, UMBRICH C, et al. Novel methylated biomarkers and a robust assay to detect circulating tumor DNA in metastatic breast cancer [J] . Cancer Res, 2014, 74(8): 2160-2170.
- [11] LO P H, LUNG H L, CHEUNG A K, et al. Extracellular protease ADAMTS9 suppresses esophageal and nasopharyngeal carcinoma tumor formation by inhibiting angiogenesis [J] . Cancer Res, 2010, 70(13): 5567-5576.
- [12] 王乐, 李胜棉. ADAMTS9基因甲基化检测对预测肝细胞癌发生及判断预后的价值 [J] . 肿瘤, 2014, 34(3): 238-244.
- [13] OCAK Z, ACAR M, GUNDUZ E, et al. Effect of hypericin on the ADAMTS-9 and ADAMTS-8 gene expression in MCF7 breast cancer cells [J] . Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(9): 1185-1190.
- [14] KOO B H, COE D M, DIXON L J, et al. ADAMTS9 is a cell-autonomously acting, anti-angiogenic metalloprotease expressed by microvascular endothelial cells [J] . Am J Pathol, 2010, 176(3): 1494-1504.
- (收稿日期: 2014-12-08 修回日期: 2015-05-10)

“复旦大学附属肿瘤医院内镜平台成立大会 暨首届肿瘤外科内镜技术论坛”邀请函

尊敬的各位专家、同仁:

由上海市抗癌协会、复旦大学附属肿瘤医院、《中国癌症杂志》杂志社联合主办的“复旦大学附属肿瘤医院内镜平台成立大会暨首届肿瘤外科内镜技术论坛”将于2015年8月1日在上海举办。

本次会议以“肿瘤外科微创治疗”为主题,为业内同仁们提供一个启迪思维、交流经验、分享信息、提高水平、加强合作的平台。鉴于您在该领域的突出成就和学术地位,我们诚挚地邀请您参加本次会议,让我们共同分享精彩的专题讲座,帮助中青年医生全面、及时、准确地掌握内镜微创领域最新前沿及进展讯息。

因为有了您的支持与信赖,认可与坚持,我们才能一起携手并进,共同引领微创外科肿瘤治疗事业的发展与进步,为广大患者带去美好生活的希望。

热情地欢迎您与我们相聚在这海纳百川的上海大都市,共度一个愉快而又有收获的周末。

主办单位: 上海市抗癌协会
复旦大学附属肿瘤医院
《中国癌症杂志》杂志社

大会主席: 吴 旻 叶定伟

执行主席: 李心翔 王 宇

报到时间: 2015年7月31日(周五) 13:00-23:00

报到地点: 上海利园国际大酒店(上海市东安路255号)

会议地点: 复旦大学附属肿瘤医院3号楼3楼大报告厅(上海市东安路270号)

会议时间: 2015年8月1日(周六) 8:00-18:00