

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.04.010

· 临床研究

## 利用微滴数字 PCR 进行 CpG 岛甲基化表型结直肠癌分子分型

洪永刚<sup>1</sup>, 颜宏利<sup>2</sup>, 田兆峰<sup>2</sup>, 吴康<sup>2</sup>, 郝立强<sup>1△</sup> (1. 上海第二军医大学附属长海医院 肛肠外科, 上海 200433; 2. 上海第二军医大学附属长海医院 实验诊断科, 上海 200336)

[摘要] **目的:** 利用微滴数字 PCR (droplet digital PCR, DD-PCR) 技术进行 CpG 岛甲基化表型 (CpG island methylation phenotype, CIMP) 结直肠癌分型, 并探讨以血浆游离 DNA 进行 CIMP 分型的可行性。 **方法:** 收集 2008 到 2012 年在长海医院行结直肠癌手术的患者 216 例, 抽取肿瘤组织 DNA 和血浆游离 DNA, 重亚硫酸盐处理后, 利用 DD-PCR 进行 CIMP 分型。 CIMP 分型选用 *CACNA1G*、*IGF2*、*NEUROG1*、*RUNX3*、*SOCS1* 五个基因的甲基化位点, 利用免疫组织化学技术 (IHC) 检测 *P53* 突变情况, 以巢式 PCR 测序方法检测 *K-RAS* 和 *BRAF* 突变。 **结果:** 216 例肿瘤中 17 例 (7.9%) 存在 *BRAF* 突变, 96 例 (44.4%) 存在 *K-RAS* 突变和 112 例 (51.9%) *P53*-IHC (+)。 31.5% (68/216) 的结直肠癌为 CIMP (+) (5 个基因位点中高甲基化位点数目  $\geq 3$ ), 82.3% (14/17) 的 *BRAF* 突变属于 CIMP (+), 而只有 9.4% (9/96) 的 *K-RAS* 突变和 7.1% (8/112) 的 *P53* 突变属于 CIMP (+)。 除了 *K-RAS*、*BRAF* 和 *P53* 突变外, 同 CIMP (-) 结直肠癌相比, CIMP (+) 肿瘤还具有独特的临床病理特征: 肿瘤更易发生在结直肠的近端位置, 黏液性癌比例偏高, 分化程度较高, CIMP (+) 患者生存时间显著短于 CIMP (-) 患者。 利用血浆游离 DNA 进行分型和利用肿瘤组织进行分型的一致性为 93.4%、灵敏度为 87.2%、特异性为 100%。 **结论:** CIMP (+) 结直肠癌具有独特的临床病理特征, 且预后较差; 在缺乏肿瘤组织的情况下, 利用 DD-PCR 对血浆游离 DNA 进行 CIMP 分型是可行的。

[关键词] 微滴数字 PCR; CpG 岛甲基化表型; 结直肠癌; 血浆游离 DNA

[中图分类号] R735.3; R781; R466.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)04-0465-07

## Molecular profiling of colorectal cancer with CpG island methylation phenotype (CIMP) by using droplet digital PCR

Hong Yonggang<sup>1</sup>, Yan Hongli<sup>2</sup>, Tian Zhaofeng<sup>2</sup>, Wu Kang<sup>2</sup>, Hao Liqiang<sup>1△</sup> (1. Department of Anorectal Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the clinicopathologic features of colorectal cancers with CpG island methylation phenotype (CIMP) by using droplet digital PCR, and to evaluate the feasibility of determining the CIMP status using plasma free DNA. **Methods:** Two hundred sixteen tumor and paired plasma samples were collected from patients with colorectal cancer enrolled into Changhai Hospital from 2008 to 2012. DNA was extracted from tumor tissues and plasmas and underwent bisulfate conversion. CIMP was determined by using digital PCR for the five genes *CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3* and *SOCS1*. *P53* mutation was detected by immunohistochemical analysis. *K-RAS* and *BRAF* mutations were assessed by nest PCR. **Results:** Among the 216 colorectal cancers, 17 (7.9%) had *BRAF* mutations, 96 (44.4%) contained *K-RAS* mutations, 112 (51.9%) were *P53*-IHC (+), and 68 (31.5%) were CIMP positive ( $\geq 3$  gene loci were hypermethylated). Most of the cancers with *BRAF* mutation (82.3%, 14/17) were CIMP (+), whereas only 9.4% (9/96) of the cancer with *K-RAS* mutations and 7.1% (8/112) of cancers harboring *P53* mutations (+) were CIMP (+). Compared to CIMP (-) tumors, the unique clinical pathological features of the CIMP (+) tumors included:

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81471605)。 Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81472770, 81272280)

[作者简介] 洪永刚 (1983 -), 男, 上海市人, 硕士, 主要从事肛肠癌疾病的基础与临床研究, E-mail: hyg810@126.com

[通信作者] 颜宏利 (Yan Hongli, corresponding author), E-mail: hongliyan@smmu.edu.cn; 郝立强 (Hao Liqiang, co-corresponding author), E-mail: 13918125628@139.com。 △为共同通信作者

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20150728.1358.014.html>

(1) more likely to happen in the proximal locations; (2) more likely to be mucinous carcinoma; (3) higher degree of differentiation. The overall survival period of colorectal patients with CIMP(+) was significantly shorter than that with CIMP(-). When plasma free DNA from these patients was used for CIMP analysis, the consistency, sensitivity and specificity were 93.4%, 87.2% and 100% respectively compared with the assay using tumor DNA. **Conclusion:** Patients with CIMP(+) colorectal cancer have unique clinical pathological characteristics and poor prognosis. When tumor tissues are not available, CIMP analysis with plasma free DNA using digital PCR is a feasible alternative.

[ **Key words** ] droplet digital PCR; CpG island methylation phenotype( CIMP ); colorectal cancer; plasma free DNA

[ Chin J Cancer Biother, 2015, 22(4): 465-471 ]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是最常见的恶性肿瘤之一,2012 年全球新增结直肠癌病例 140 万<sup>[1]</sup>。上海结直肠癌的发病率已经升至第 2 位。随着诊疗技术的不断改进,结直肠癌的预后有了很大的改善,但结直肠癌的 5 年生存率仍然没有明显改善,只有 31% 左右。传统的临床病理分期,即 TNM 分期或 Dukes 分期为预测结直肠癌患者的预后及指导治疗提供了较好的依据,但他们的局限性在于都是以肿瘤在肠壁中的浸润深度、淋巴结转移、远处转移为基础,并没有考虑结直肠肿瘤本身所存在的异质性:临床病理诊断为同一分期的患者,采用相同方案治疗的效果不同和预后不同。因此结直肠癌的分子分型将使得治疗方案更符合肿瘤的生物行为和发展规律,改变以往的肿瘤治疗策略,从而改善患者的预后。

CpG 岛甲基化表型(CpG island methylation phenotype, CIMP)结直肠癌最早由日本学者在 1999 年提出,主要是指一类 CpG 岛异常甲基化的结直肠癌<sup>[2]</sup>。CIMP 肿瘤具有独特的临床和分子病理特征,例如预后较差,对化疗药物 5-FU 和西妥昔单抗不敏感等<sup>[2,4]</sup>。目前主要是通过手术后检测肿瘤组织 DNA 的甲基化状态进行 CIMP 分型,而事实上,有 20%~30% 的结直肠癌患者需要通过新辅助化疗等方式将肿瘤缩小后再手术,这时因为没有肿瘤组织,如果能利用血液游离 DNA 进行分子分型将会具有比较大的临床意义。但是,由于血液游离 DNA 含量较低,如何能够在复杂的背景下进行准确分析是一个巨大的挑战。

微滴数字 PCR(droplet digital PCR, DD-PCR),又称为第三代 PCR 技术,是通过将微量样品作大倍数稀释和分液(partitioning),直至每个样品中所含有的待测分子数不会超过 1 个,再将所有样品在相同条件下进行 PCR 扩增,并对发生了扩增反应的样品逐个进行计数的一种技术。DD-PCR 是一个敏感的检测突变或甲基化 DNA 分子方法,甚至可检测出低至 0.02% 到 0.1% 水平的甲基化。DD-PCR 由于其高灵

敏度和多元分析的能力为临床诊断提供独特的分析优势<sup>[7,9]</sup>。本研究旨在利用微滴数字 PCR 技术,探讨利用血浆游离 DNA 进行 CIMP 分型的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料收集

2008 年至 2012 年在上海长海医院确诊为结肠癌并手术切除患者 216 例的肿瘤组织及癌旁正常组织,所有患者术前均未接受任何抗肿瘤治疗,以及未患有其他肿瘤疾病。男 112 例、女 104 例,中位年龄 56 岁。同时收集其中 20 例患者的术前和术后 14 d 血浆样本,以及 40 例健康人的血浆样本,所有参与本研究的结直肠癌患者或其家属均签署授权进行基因检测的知情同意书。

### 1.2 主要仪器与试剂

微滴数字 PCR 仪为 QX100™ Droplet Digital PCR 系统(Bio-Rad, 美国,包括微滴生成仪和微滴读取仪)。组织抽提所用匀浆机购自上海净信有限公司。Veriti 型 PCR 仪仪器购自美国 ABI 公司。组织抽提试剂盒采用 Wizard Genomic DNA Purification Kit 购自美国 Promega 公司。血浆游离 DNA 采用 Qiampl DNA Mini Kit 购自德国 Qiagen 公司。P53 鼠抗人 mAb 购自美国 Santa Cruz Biochemistry 公司; ABC 试剂盒和 DAB 底物试剂盒购自美国 Vector 公司; 小牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自美国 Sigma 公司。

### 1.3 组织和血浆游离 DNA 提取

手术切除肿瘤后标本立即转移至 -80 °C 低温冰箱中保存。病理检查肿瘤细胞 >70% 的标本方进行基因组抽提。组织 DNA 提取按 Wizard Genomic DNA Purification Kit 说明书操作。抽提 DNA 测  $D_{260}/D_{280}$  和琼脂糖凝胶进行质量鉴定。血浆游离 DNA 提取按 Qiampl DNA Mini Kit 说明书操作。

### 1.4 CIMP 分型

提取的组织和血浆基因组 DNA 用 Zymo EZ DNA Methylation Gold 试剂盒进行亚硫酸氢盐处理。

CIMP 分型采用文献[10]提供的 5 个 CIMP 分型标志: *CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3*, *SOCS1*。甲基化探针利用 FAM 进行标记,非甲基化探针利用 Hex 进行标记,引物序列详见表 1。

微滴数字 PCR 反应包括配置体系、生成微滴、扩增循环和信号读取 4 个步骤<sup>[11]</sup>。微滴数字 PCR 体系为 20  $\mu\text{l}$ , 包含 10  $\mu\text{l}$  2  $\times$  dd PCR Master Mix, 10  $\mu\text{mol/L}$  正向引物和反向引物各 0.8  $\mu\text{l}$ 、探针 0.4  $\mu\text{l}$ , DNA 模板 2  $\mu\text{l}$ 。生成微滴需要使用专门的微滴生成卡和微滴生成仪,将 40  $\mu\text{l}$  PCR 体系和 70  $\mu\text{l}$  微滴生成油加入微滴生成卡,覆盖专用胶垫后置入微滴生成仪,生成微滴。

微滴数字 PCR 扩增使用两步法,设置程序如下:95  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min 预变性;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火, 60 s, 扩增结束后进行 98  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min 热失活。每个模板重复 3 个平行检测。扩增结束后,将 96 孔板置入微滴读取仪中读取信号,并使用软件 QuantaSoft V1.3.2.0 分析实验数据,获得绝对定量结果。

微滴生成时 ddPCR 的关键步骤,只有微滴数大于 10 000 时, DNA 分子的分布才能符合泊松分布的统计学原理,系统才能对阳性和阴性微滴进行计数<sup>[12]</sup>。本研究中 10 个基因的微滴数均大于 10 000, RSD 在 2.6% ~ 12% 之间,符合检测的要求。甲基化和非甲基化的 DNA (CpGenome universal methylated/unmethylated DNA from Millipore, Billerica, MA, USA) 作为阳性和阴性对照。重复序列 Alu (ALU-C4) 作为亚硫酸盐处理的内参<sup>[13]</sup>。甲基化指数 (MI) 的判定:

$$\text{MI} = \frac{\text{样品 (Gene: Alu)}}{\text{对照 (Gene: Alu)}}$$
, 当  $\text{MI} \geq 10\%$  则认为甲基化<sup>[10]</sup>。

### 1.5 *K-RAS*, *BRAF* 和 *P53* 分析

所有病例的病理特征包括肿瘤分化、黏液性特性或印戒细胞等均由病理医生确诊。

*P53* 突变的免疫组化检测采用 ABC 法,按 ABC 试剂盒和 DAB 底物试剂盒说明书操作,结果以每高倍视野 ( $\times 400$  倍) 出现  $\geq 10\%$  细胞胞核呈棕黄色而胞质不着色为阳性反应。采用生产第二抗体的正常动物血清封闭非特异性免疫球蛋白反应,采用省略第一抗体作为阴性对照,已知的阳性切片作为阳性对照。

*K-RAS* 基因突变采用巢式 PCR 检测。采用 Primer 3 程序进行引物设计,所有引物均由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

第 1 步是外侧引物 PCR 扩增。外侧引物序列: 正向引物 5'-GTCGATGGAGGAGTTTGTAATGAAGT-3', 反向引物 5'-TTCAGATAACTTTCAG-

CATAATTATCTTG-3', 扩增片段大小为 465 bp。PCR 反应体系共 10  $\mu\text{l}$ , 包括 1  $\times$  PCR Buffer, 2.5 mmol/L dNTP, 上下游引物各 5 pmol、Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{l}$  以及约 10 ng 模板 DNA。PCR 循环条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 先循环 10 次; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 再循环 30 次。

第 2 步是内侧引物 PCR 扩增。内侧引物序列: 5'-GTCACCTTTTCATTATTTTTATTATAAGG-3', 反向引物 5'-TTTACCTCTATTGTTGGATCATATTC-3', 扩增片段大小为 155 bp。PCR 反应体系共 50  $\mu\text{l}$ , 包括 1  $\times$  PCR Buffer, 2.5 mmol/L dNTP, 上下游引物各 5 pmol、Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{l}$  以及约 10 ng 模板 DNA。PCR 循环条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 先循环 10 次; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 再循环 30 次。

第 3 步是纯化产物并测序。由上海迈浦生物科技有限公司对 PCR 产物进行纯化并作 DNA 序列分析,判断 *K-RAS* 基因突变状态。

*BRAF* 突变的检测 (1) 外侧 PCR 扩增: 正向引物: 5'-C-CTAAACTTCATAATGCTTGC-3', 反向引物: 3'-CCTGAGATGCTGCTGAGTTAC-5', 扩增产物大小为 254 bp。10  $\mu\text{l}$  扩增体系包括 1  $\times$  PCR buffer, 0.5  $\mu\text{mol/L}$  上、下游引物, 0.25 mmol/L dNTP, 0.5 U Taq 酶, 20 ng DNA 模板。PCR 扩增程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 57  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 32 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。(2) 内侧 PCR 扩增: 正向引物: 5'-TCATAATGCTTGTCTGATAGGA-3', 反向引物: 3'-TCCACTGATTAAATTTTTGGCC-5', 扩增产物大小为 224 bp。50  $\mu\text{l}$  PCR 扩增体系包括 1  $\times$  PCR buffer, 0.5  $\mu\text{mol/L}$  上、下游引物, 0.25 mmol/L dNTP, 0.5 U Taq 酶, 约 20 ng DNA 模板。PCR 扩增程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 57  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。PCR 产物纯化及测序由上海迈浦生物科技有限公司完成。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件包分析, GraphPad Prism 5 软件绘图。 $\chi^2$  检验及 Fish 确切概率法分析 CIMP 表型与结肠癌患者临床病理因素的关系, 生存分析采用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 中国人 CIMP 结直肠癌临床病理特征

图 1 为 *K-RAS* 和 *BRAF* 的典型测序结果, 含有突变位点的峰(箭头所示)杂合度很高, 表明利用巢式

PCR 进行突变检测具有较高的灵敏度和特异性。如表 1 所示, 在 216 例的肿瘤中, 17 例 (7.9%) 存在 *BRAF* 突变, 96 例存在 (44.4%) *K-RAS* 突变和 112 例 (51.9%) *P53*-IHC(+)。31.5% (68/216) 结直肠癌为 CIMP 阳性 (5 个基因位点中高甲基化位点数目  $\geq 3$ )。82.3% (14/17) *BRAF* 突变属于 CIMP (+), 而只有 9.4% (9/96) 的 *K-RAS* 突变和 7.1% (8/112) *P53* 突变属于 CIMP (+) 组 (图 2)。

除了 *K-RAS*, *BRAF* 和 *P53* 突变外, 同 CIMP (-) 结直肠癌相比, CIMP 肿瘤还具有独特的临床病理特征 (表 2): 更容易发生在近端结肠, 黏液性癌比例偏高, 分化程度较高。尤为重要的是, CIMP (+) 生存时间显著低于 CIMP (-) 组 ( $P < 0.05$ , 图 3)。

### 2.2 利用血浆游离 DNA 进行 CIMP 分型的灵敏度和特异性

为验证能否利用血浆游离 DNA 进行 CIMP 分型, 我们随机选择了 80 例结直肠癌患者 [包括 39 例 CIMP (+) 和 41 例 CIMP (-)], 抽提血浆游离 DNA, 检测了血浆游离 DNA 的 DNA 甲基化情况。为了确定甲基化的 Cut off 值, 首先检测了 40 例正常人群 (取自生殖中心健康人群) 的游离 DNA 中 5 个基因

的甲基化情况, 发现 5 个基因的甲基化在 0 ~ 0.4% 之间, 因此把 Cut off 值设定在 0.4%。

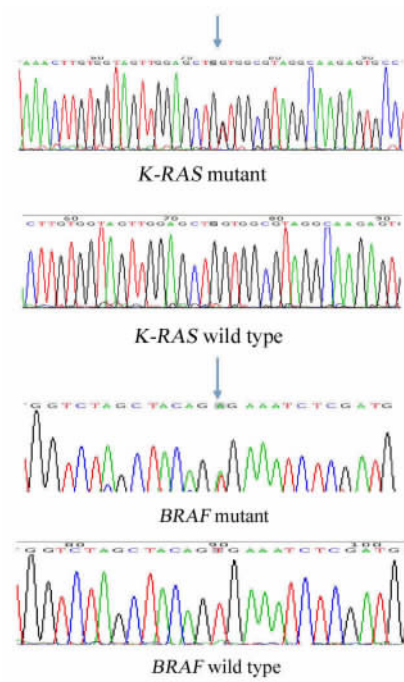


图 1 *BRAF* 和 *K-RAS* 突变测序检测结果

Fig. 1 Sequencing results of *BRAF* and *K-RAS* mutation

表 1 数字 PCR 检测甲基化的引物和探针序列

Tab. 1 Primers and probes used for analysis of DNA methylation by DD-PCR

Gene ID	Primers and probes for ddPCR analysis			
	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Methylated probe (FAM)	Unmethylated probe (HEX)
<i>CACNA1G</i>	TTTTTTCGTTTCGCGTTIAGGT	CTCGAAACGACTTCGCGG	AAATAACGTCGAATTCGATAATCGA	AAATAATGTGAATTTGATAAATTGA
<i>IGF2</i>	GAGCGGTTTCGGTGTCTGTTA	CCAACTCGATTTAAACC GACG	TTTTCTATCGTCGCGAATTCGA	TTTTCTATTGTTGTGAAATTGA
<i>NeuroG1</i>	CGTGTAGCGTTCGGGTATTGTGA	CGATAATTACGAACACACTCCGAAT	CGATAACGATTTTTCGCGAATATAAA	TGATAATGAATTTTGTGGAATATAAA
<i>RUNX3</i>	CGTTCGATGGTGGACGTGT	GACGAACAACGCTTATTACAACGC	CGTACGAATTCGTTTACGTAAATTCG	TGATGAAATTTGTTTATGTAATTTG
<i>SOCS1</i>	GCGTCGAGTTCGTGGGTATTT	CCGAAACCATCTTCACGCTAA	ATAATTTCGTTAACGATTATCGCGTA	ATAATTTCGTTAACGATTATTTGTTGA

\* Forward and reverse primers were designed to bind sequences flanking known methylation sites in the indicated gene's promoter. A FAM-labeled probe was designed to bind methylated and a HEX-labeled probe to bind unmethylated CpG sites. CpG methylation sites are shown in red. Blue font indicates cytosines that were changed to uracil/thymidine by bisulfate treatment

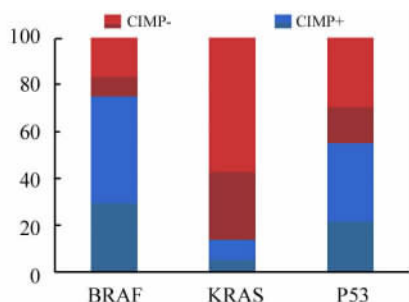


图 2 CIMP (-) 和 CIMP (+) 肿瘤 *BRAF*, *K-RAS*, *P53* 的突变情况

Fig. 2 *BRAF*, *K-RAS* and *P53* mutations in CIMP (-) and CIMP (+) tumors

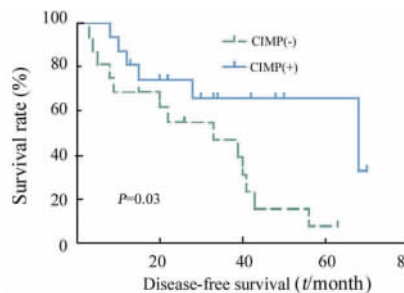


图 3 CIMP (+) 肿瘤生存时间比 CIMP (-) 显著缩短

Fig. 3 Survival time of patients with CIMP+ tumor are shorter than that of patients with CIMP- tumor

图 4 为 *NEUROG1* 基因的典型甲基化检测示意图。32#患者肿瘤组织中甲基化度为 48.7%, 大于 Cut off 值 10%, 判断为甲基化(+); 血浆中甲基化度为 3.68%, 大于 Cut off 值 0.4%, 也判断为甲基化(+)。而 36#患者肿瘤组织中甲基化度为 0.3%, 判断为甲基化(-); 血浆中甲基化度为 0.16%, 也判断为甲基化(-)。在 80 例检测的病例中, 39 例肿瘤组织检测为 CIMP(+ )的病例, 其中 34 例血浆

检测也为阳性; 而在 41 例肿瘤组织中检测为 CIMP(- )病例中, 全部血浆检测为 CIMP(- ), 二者的一致性为 93.4%。利用血浆 DNA 进行 CIMP 分型的灵敏度为 87.2%, 特异性为 100%。结果提示, 在无法获得肿瘤组织的情况下利用血浆游离 DNA 进行 CIMP 分型是可行的(表 3)。当然, 本研究样本量尚不够大, 该结论还需扩大样本量进一步验证。

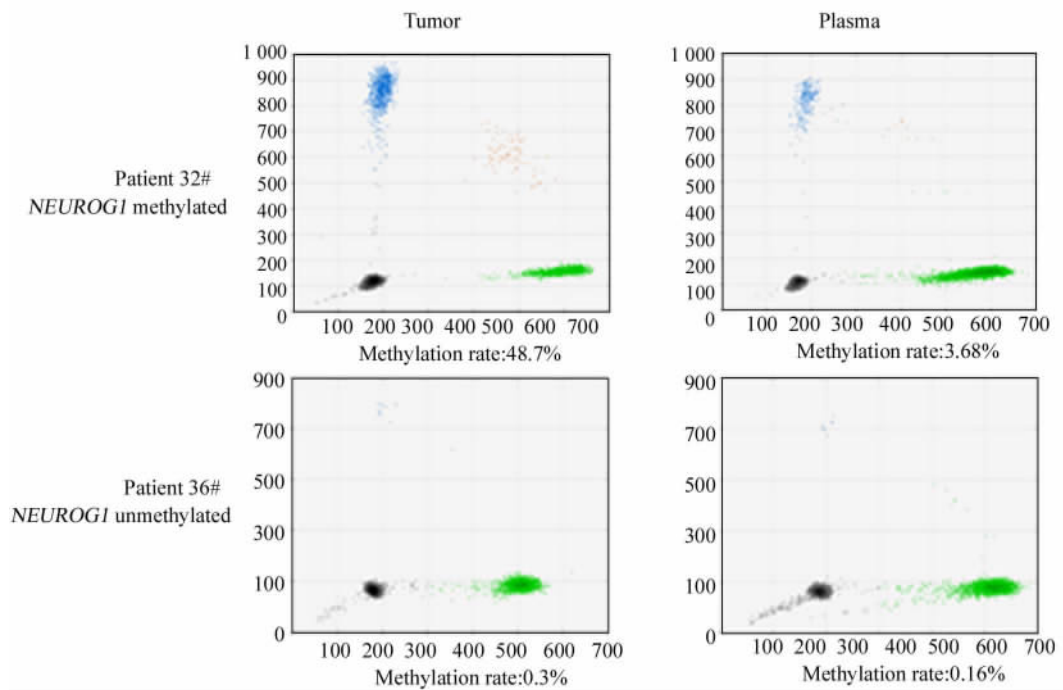


图 4 肿瘤组织 DNA 和血浆游离 DNA 的甲基化程度一致

Fig. 4 Methylation status of DNA in tumor tissues are consistent with that in plasma

### 3 讨论

从遗传的角度, 可以认为结直肠癌的发生发展是遗传学改变(基因突变/染色体畸变)和表观遗传改变共同作用的结果。对于结直肠癌发生的遗传学改变, 如 *K-RAS*、*P53*、*APC* 等基因突变已经研究得非常深入, 有学者<sup>[14]</sup>提出的“腺瘤-癌”的多步骤发生学说也得到了广泛的支持和认可。但是, 对于表观遗传改变在结直肠癌中的作用还存在很多“enigma”(难解之谜)。虽然 Toyota 早在 1999 年就提出 CIMP 的结直肠癌是一种特殊类型的结直肠癌, 比如常发生在右半结肠、女性发病率较高、黏液性癌发生率高、与吸烟相关、*BRAF* 突变率高等等, 但目前对 CIMP 的临床病理特征一直存在争议, 其主要原因在于, 研究人群的选择不同、CIMP 分型的基因标志物不同、甲基化检测的方法不同<sup>[15-17]</sup>。

现在, CIMP 已经被公认为一种特殊的结直肠癌亚型, 但相关研究主要在欧美和日本等国家中开展, 中国人群 CIMP 的研究较少, 临床病理特征尚不清楚。基于此, 本研究选择了 216 例在本院手术的患者开展研究。目前 CIMP 的基因标志物有几类: 早期的研究一般选择 *hMLH1*、*p16*、*MINT1*、*MINT2* 和 *MINT21* 等 5 个基因的 CpG 岛进行甲基化分析, 如果 5 个 CpG 岛有 3 个或 3 个以上高甲基化, 就认为是 CIMP 肿瘤<sup>[17-18]</sup>; 后面的研究<sup>[9]</sup>陆续加入了 *CACNA1G*、*GRABP1*、*IGF2*、*NEUROG1*、*RUNX3*、*SOCS1*、*HIC1*、*IGFBP3*、*WRN* 等基因。Weisenberger 等<sup>[6]</sup>系统研究了 295 个结直肠癌的甲基化谱, 提出了 5 个基因(*CACNA1G*、*IGF2*、*NEUROG1*、*RUNX3*、*SOCS1*)的启动子甲基化可以作为 CIMP 分型的标志, 并逐渐被广泛应用。本研究也是用这 5 个基因作为分型标志。

目前常用的 DNA 甲基化的检测方法有甲基化特异性 PCR( MSP )<sup>[19]</sup>, PyroSequencing<sup>[20]</sup>, MALDI-TOF<sup>[21]</sup> 和 Real-time PCR ( MethyLight )<sup>[22]</sup> 等。DD-PCR 由于其高灵敏度和多元分析的能力为临床诊断提供独特的分析优势。因此,本研究选择 DD-PCR 作为甲基化检测的方法。结果显示,中国人群的 CIMP 肿瘤也存在 *BRAF* 突变率高,*K-RAS* 和 *P53* 突变率低的特点。不仅如此,CIMP 常发生在右半结肠,黏液性癌发生率高,生存时间也显著比非 CIMP

患者的短。因此,从结直肠癌患者中筛选出 CIMP 肿瘤,对于正确判断预后、有针对性地进行个体化治疗具有重要的意义。传统意义上的结直肠癌是把结肠癌和直肠癌放在一起,但结肠和直肠由于解剖位置的不同,发病机制具有很大的差异,因此有学者提出结直肠癌不是一种病,而是两种不同的疾病。由于 CIMP 常发生在右半结肠,因此对结肠癌进行 CIMP 分型的意义更大。

表 2 CIMP 状态与临床病理特征的关联[ n( % ) ]

Tab.2 Relationship between the CIMP status and the clinicopathological features of patients with colon cancers ( n[ % ] )

Feature	N	CIMP status		
		CIMP( + )	CIMP( - )	P
Total number	216	68	148	
Gender				
Male	112	24( 11.11 )	88( 40.74 )	0.0010
Female	104	44( 20.37 )	60( 27.78 )	
Age ( t/a )				
$\bar{x} \pm s$	54.8 ± 8.6	62.6 ± 6.8	52.4 ± 7.4	
Duke stage				
A + B	64	20( 9.26 )	44( 20.37 )	0.9621
C + D	152	48( 22.22 )	104( 48.15 )	
Tumor location				
Proximal	88	43( 19.91 )	45( 20.83 )	<0.0001
Distal	128	25( 11.57 )	103( 47.69 )	
Mucinous				
+	46	33( 15.28 )	13( 6.02 )	<0.0001
-	170	35( 16.20 )	135( 62.50 )	
Differentiation				
Well	72	22( 10.19 )	50( 23.15 )	0.0354
Middle	101	25( 11.57 )	76( 35.18 )	
Poor	43	20( 9.26 )	23( 10.65 )	
Lymph node metastasis				
+	102	32( 14.81 )	70( 32.41 )	0.9740
-	114	36( 16.67 )	78( 36.11 )	
<i>BRAF</i> mutation				
+	17	11( 5.09 )	6( 2.78 )	0.0021
-	199	57( 26.39 )	142( 65.74 )	
<i>K-RAS</i> mutation				
+	96	6( 2.7 )	106( 49.1 )	<0.0001
-	120	62( 28.7 )	42( 19.4 )	
P53-IHC				
+	112	8( 3.70 )	104( 48.15 )	<0.0001
-	104	60( 27.78 )	44( 20.37 )	

表 3 利用 DD-PCR 从血浆和肿瘤组织进行 CIMP 分型的灵敏度和特异性比较(  $N=80$  )

Tab. 3 Comparison of the sensitivity and specificity of CIMP analysis by using tumor tissue and plasma ctDNA (  $N=80$  )

Tissue CIMP	Plasma CIMP		
	Positive	Negative	Total
Positive	34	5	39
Negative	0	41	41
Total	34	46	80

Concordance:  $75/80 = 93.4\%$ ; Sensitivity:  $34/39 = 87.2\%$ ; Specificity:  $41/41 = 100\%$ ; PPV:  $34/34 = 100\%$ ; NPV:  $41/46 = 89.1\%$ . ctDNA: Circulation tumor DNA; PPV: Positive predictive value; NPV: Negative predictive value

DD-PCR 的灵敏度比定量 PCR 高  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  倍, 适合于检测稀有的突变<sup>[23-24]</sup>, 但利用血浆游离 DNA 进行 CIMP 的分型少有报道。本研究利用 DD-PCR 探索了利用血浆游离 DNA 进行 CIMP 分型的可行性, 结果发现, 肿瘤组织和血浆检测的一致性达 93.4%, 提示在新辅助化疗或无法获得肿瘤组织的情况下, 利用血浆游离 DNA 进行分子分型是可行的。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [ J ]. CA Cancer J Clin, 2015, 65( 2 ): 87-108.
- [ 2 ] Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96( 15 ): 8681-8686.
- [ 3 ] Wodarz D, Boland CR, Goel A, et al. Methylation kinetics and CpG-island methylator phenotype status in colorectal cancer cell lines [ J ]. Biol Direct, 2013, 8: 14.
- [ 4 ] Hughes LA, Melotte V, de Schrijver J, et al. The CpG island methylator phenotype: What's in a name? [ J ]. Cancer Res, 2013, 73( 19 ): 5858-5868.
- [ 5 ] Dighe S, Swift I, Magill L, et al. Accuracy of radiological staging in identifying high-risk colon cancer patients suitable for neoadjuvant chemotherapy: A multicentre experience [ J ]. Colorectal Dis, 2012, 14( 4 ): 438-444.
- [ 6 ] Arredondo J, González I, Baixauli J, et al. Tumor response assessment in locally advanced colon cancer after neoadjuvant chemotherapy [ J ]. J Gastrointest Oncol, 2014, 5( 2 ): 104-111.
- [ 7 ] Sedlak RH, Cook L, Huang ML, et al. Identification of chromosomally integrated human herpesvirus 6 by droplet digital PCR [ J ]. Clin Chem, 2014, 60( 5 ): 765-772.
- [ 8 ] Zhang BO, Xu CW, Shao Y, et al. Comparison of droplet digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring gene mutation [ J ]. Exp Ther Med, 2015, 9( 4 ): 1383-1388.
- [ 9 ] Yang R, Paparini A, Monis P, et al. Comparison of next-generation droplet digital PCR ( ddPCR ) with quantitative PCR ( qPCR ) for enumeration of Cryptosporidium oocysts in faecal samples [ J ]. Int J Parasitol, 2014, 44( 14 ): 1105-1113.
- [ 10 ] Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer [ J ]. Nat Genet, 2006, 38( 7 ): 787-793.
- [ 11 ] Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification [ J ]. Anal Chem, 2012, 84( 2 ): 1003-1011.
- [ 12 ] Morisset D, Štebih D, Milavec M, et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [ J ]. PLoS ONE, 2013, 8( 5 ): e62583.
- [ 13 ] Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, et al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight [ J ]. Nucleic Acids Res, 2005, 33( 21 ): 6823-6836.
- [ 14 ] Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence [ J ]. Cancer, 1992, 70( Suppl 6 ): 1727-1731.
- [ 15 ] Hawkins N, Norrie M, Cheong K, et al. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability [ J ]. Gastroenterology, 2002, 122( 5 ): 1376-1387.
- [ 16 ] Barault L, Charon-Barra C, Jooste V, et al. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: Study on a population-based series of 582 cases [ J ]. Cancer Res, 2008, 68( 20 ): 8541-8546.
- [ 17 ] Ogino S, Cantor M, Kawasaki T, et al. CpG island methylator phenotype ( CIMP ) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies [ J ]. Gut, 2006, 55( 7 ): 1000-1006.
- [ 18 ] Ward RL, Cheong K, Ku SL, et al. Adverse prognostic effect of methylation in colorectal cancer is reversed by microsatellite instability [ J ]. J Clin Oncol, 2003, 21( 20 ): 3729-3736.
- [ 19 ] Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, et al. Methylation - specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93( 18 ): 9821-9826.
- [ 20 ] Colella S, Shen L, Baggerly KA, et al. Sensitive and quantitative universal pyrosequencing methylation analysis of CpG sites [ J ]. Biotechniques, 2003, 35( 1 ): 146-150.
- [ 21 ] Schatz P, Dietrich D, Schuster M. Rapid analysis of CpG methylation patterns using RNase T1 cleavage and MALDI-TOF [ J ]. Nucleic Acids Res, 2004, 32( 21 ): e167.
- [ 22 ] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: A high-throughput assay to measure DNA methylation [ J ]. Nucleic Acids Res, 2000, 28( 8 ): e32.
- [ 23 ] Azuara D, Ginesta MM, Gausachs M, et al. Nanofluidic digital PCR for KRAS mutation detection and quantification in gastrointestinal cancer [ J ]. Clin Chem, 2012, 58( 9 ): 1332-1341.
- [ 24 ] Bizouarn F. Clinical applications using digital PCR [ J ]. Methods Mol Biol, 2014, 1160: 189 - 214.

[ 收稿日期 ] 2015 - 03 - 23

[ 修回日期 ] 2015 - 07 - 12

[ 本文编辑 ] 黄静怡