

SALL3 基因启动子区域异常高甲基化 肝癌患者预后不良

倪唯益¹, 夏卫¹, 顾峻², 赵仰星², 张红宇², 费琦², 余坚²

1. 上海市静安区石门二路街道社区卫生服务中心, 上海 200041;

2. 上海交通大学肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室肿瘤表观遗传学组

摘要: **目的** 研究 SALL3 启动子高甲基化与原发性肝细胞癌(HCC)患者临床病理特征的关系。 **方法** 应用甲基化特异性 PCR(MSP)技术分析 283 对 HCC 及其相邻非肿瘤组织中 SALL3 的甲基化状态,评估 SALL3 启动子甲基化与临床特征的相关性。 **结果** 肝细胞癌中 SALL3 启动子区甲基化率(38.87%)高于相邻癌旁组织(9.89%),差异有统计学意义($\chi^2=64.43, P<0.0001$)。单因素分析显示,不同年龄、性别、HBV 病毒感染状况、肿瘤大小的肝癌患者 SALL3 基因甲基化率差异无统计学意义($P>0.05$),但不同肝癌细胞分化程度($\chi^2=3.046, P=0.0189$)、临床分期($\chi^2=4.684, P=0.0304$)、门静脉瘤栓侵犯($\chi^2=14.930, P=0.0001$)的肝癌患者 SALL3 基因甲基化率差异有统计学意义。单因素 Cox 回归分析显示 SALL3 基因甲基化($OR=1.73, 95\%CI:1.28\sim2.33, P=0.0026$)、肝硬化($OR=1.56, 95\%CI:1.11\sim2.18, P=0.0096$)、临床分期($OR=1.63, 95\%CI:1.36\sim1.94, P=0.0000$)是患者 5 年生存的影响因素。多因素 Cox 回归分析证实 SALL3 基因甲基化($OR=1.41, 95\%CI:1.02\sim1.94, P=0.0357$)、临床分期($OR=1.73, 95\%CI:1.39\sim2.01, P=0.0000$)是影响 HCC 患者术后生存期的独立危险因素。SALL3 启动子甲基化的 HCC 患者术后生存时间明显短于非甲基化 HCC 患者[(20.37±3.5)月 vs. (30.77±5.5)月, $P=0.0024$]。 **结论** SALL3 基因启动子区甲基化状态是检测原发性肝细胞癌和预后不良的潜在生物标志物。

关键词: 原发性肝癌; SALL3; DNA 甲基化; 预后不良; 肿瘤标志物

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1006-3110(2018)07-0780-04 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2018.07.004

Hypermethylation in promoter region of spalt-like transcription factor 3 (SALL3) gene is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma

NI Wei-yi*, XIA Wei, GU Jun, ZHAO Yang-xing, ZHANG Hong-yu, FEI Qi, YU Jian

* No.2 Shimen Street Community Health Service Center of Jing'an District, Shanghai 200041, China

Corresponding author: YU Jian, E-mail: yujian@shsci.org

Abstract: **Objective** To study the relationship between hypermethylation in SALL3 promoter and clinicopathological features in patients with primary hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Methylation statuses of SALL3 promoter in 283 pairs of HCC and its adjacent non-tumor tissues were analyzed by methylation specific PCR (MSP) technique, and the correlation between SALL3 promoter methylation and clinical characteristics was evaluated. **Results** The methylation rate of SALL3 promoter region

基金项目:国家自然科学基金(81372368)

作者简介:倪唯益(1971-),女,上海崇明人,本科学历,中级检验师,主要从事临床生化临床免疫工作。

通信作者:余坚, E-mail: yujian@shsci.org。

[4] 赵嘉咏,张白帆,申晓靖,等. 河南省 2008-2014 年 5 岁以下腹泻儿童 A 组轮状病毒病原学及流行病学特征研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(10): 934-938.

[5] 赵雪琴,寿钧,张睿. 2012-2013 年杭州地区婴幼儿病毒性腹泻监测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(22): 3301-3303.

[6] 陈玲霞,姬莉莉,孙建飞. 2013-2015 年北京市怀柔区病毒性腹泻病原及流行病学分析[J]. 实用预防医学, 2016, 23(5): 603-605.

[7] 杨素华,王宏,刘娜,等. 2006-2007 我国五岁以下住院儿童轮状病毒流行病学研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(3):

168-170.

[8] 方肇寅,张丽杰,唐景裕,等. 中国河北省卢龙县儿童轮状病毒腹泻研究[J]. 病毒学报, 2005, 21(1): 21-25.

[9] 秦萌,董晓根,张东彦,等. 2013 年 11 月北京丰台区轮状病毒腹泻流行的实验室分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2014, 28(6): 404-406.

[10] 王鹏,原新慧,林谦,等. 南京 2011-2013 年婴幼儿腹泻轮状病毒分子流行病学研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2015, 29(3): 207-209.

收稿日期: 2017-07-19

was higher in HCC than in adjacent paracancerous tissues (38.87% vs. 9.89%), showing a statistically significant difference ($\chi^2 = 64.43$, $P < 0.000, 1$). Univariate analysis revealed that the methylation rate of *SALL3* gene showed no statistically significant difference among HCC patients with different ages, genders, hepatitis B virus infectious statuses and tumor sizes ($P > 0.05$), but showed statistically significant differences among HCC patients with different conditions of differentiation of HCC cells ($\chi^2 = 3.046$, $P = 0.018, 9$), clinical stages ($\chi^2 = 4.684$, $P = 0.030, 4$) and portal vein thrombosis ($\chi^2 = 14.930$, $P = 0.000, 1$). Univariate COX regression analysis indicated that *SALL3* gene methylation ($OR = 1.73$, 95% CI: 1.28–2.33, $P = 0.002, 6$), cirrhosis ($OR = 1.56$, 95% CI: 1.11–2.18, $P = 0.009, 6$) and clinical stage ($OR = 1.63$, 95% CI: 1.36–1.94, $P = 0.000, 0$) were the factors influencing the patients' 5-year survival. Multivariate COX regression analysis confirmed that *SALL3* gene methylation ($OR = 1.41$, 95% CI: 1.02–1.94, $P = 0.035, 7$) and clinical stage ($OR = 1.73$, 95% CI: 1.39–2.01, $P = 0.000, 0$) were the independent risk factors affecting the HCC patients' postoperative survival time. The postoperative survival time was significantly shorter in HCC patients with methylated *SALL3* promoter than those with unmethylated *SALL3* promoter ((20.37±3.5) months vs. (30.77±5.5) months, $P = 0.002, 4$). **Conclusions** The methylation status of promoter region of *SALL3* gene is a potential biomarker for detecting primary HCC and poor prognosis.

Key words: primary hepatocellular carcinoma; *SALL3*; DNA methylation; poor prognosis; tumor biomarker

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)简称肝癌,在世界范围内常见的恶性肿瘤中排名第五,也是全球癌症死亡的第三大主因。肝癌由于侵略性的肿瘤的转移和复发,其 5 年生存率大约 12%^[1]。对其发病机制及早期预警的研究具有重要的现实意义。研究表明,在 HCC 的发生发展过程中,不仅有某些癌基因或抑癌基因发生突变而引起的遗传学改变,更多的是 DNA 甲基化和组蛋白修饰以及 miRNA 等表观遗传异常导致的基因表达广泛紊乱^[2]。近年 DNA 甲基化研究表明,由于特定 DNA 区域的 CpG 甲基化状态改变,经调控基因或非编码 RNA 的表达和诱导突变等方式,影响细胞的正常生理功能,伴随着重复序列的转录/转座子活化^[3],形成基因组高度不稳定和原癌基因转录增强,导致肿瘤发生发展^[4]。

SALL3(spalt-like transcription factor 3)基因是编码具有 4 个双锌指结构域的转录因子,人 *SALL3* 基因(h*SALL3*),定位于 18q23 染色体^[5]。肿瘤中观察到 *SALL3* 的 DNA 启动子区域存在异常甲基化修饰(后文简称 *SALL3* 甲基化),例如在肝癌中存在显著的 *SALL3* 异常甲基化^[6]。*SALL3* 通过双锌指(double zinc finger, DZF)结构域和 DNA 甲基转移酶 3A(DNA methyltransferase 3alpha, DNMT3A)的 PWWP domain 相互作用而抑制后者对 CpG 岛的甲基化能力;在 HCC 中由于 *SALL3* 异常甲基化导致其表达降低,减少了对 DNMT3A 的抑制,导致 DNMT3A 甲基化转移活力增强,进而造成 HCC 中异常甲基化现象增加^[7]。但迄今为止 *SALL3* 基因甲基化状态与肝癌临床特征和预后的关联性研究尚未见报道。基于前期工作在小样本(30 例)肝癌中发现 *SALL3* 启动子区域存在异常高甲基化^[8],现在对 283 例来自于中国广西地区肝癌患者肝癌和匹

配癌旁组织中 *SALL3* 的甲基化状况及其与临床特征、随访信息的关联性进行统计分析。

1 材料与方法

1.1 临床样品和资料收集 所有临床肝癌组织标本来自广西医科大学附属肿瘤医院,标本收集期为 2004–2006 年,共采集 283 名选择手术治疗的 HCC 病人,所有患者手术前均未接受过化疗或放疗,分别采集肝癌患者手术切除肿瘤组织和临近 2 cm 的癌旁组织,并经病理学检查确认,标签区分后液氮速冻后零下 80℃ 保存。肿瘤淋巴结转移(tumor node metastasis, TNM)临床分期按 2002 年国际抗癌联合会(UICC)的 HCC TMN 分期标准^[9],HCC 病理分级按 Edmondson 标准^[10]。其中男性 245 例,女性 38 例;年龄 14~76 岁,平均(45.78±11.43)岁。临床样品收集符合医学伦理规范,所有病人签署临床样品科研应用告知书,并按照医学伦理审查委员会的要求进行。对 283 例病人进行术后持续随访,信息采集自 2004–2009 年,死亡 166 人,存活 106 人,失访 11 人。

1.2 DNA 提取、亚硫酸盐转化及 PCR 检测基因甲基化 肿瘤和癌旁组织的基因组 DNA 提取采用酚氯仿法,DNA 的亚硫酸盐转化以及甲基化特异性 PCR(MSP)检测参考文献^[11]。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件和 GraphPad Prism 5 完成统计学分析。率差异分析采用卡方检验;术后生存用 Cox 回归分析;生存曲线分析用 Kaplan-Meier 法完成,其差异显著性用 log-rank 检测。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原发性肝癌中 *SALL3* 基因启动子区呈现高频率甲基化 首先用 MSP 检测 *SALL3* 启动子区-123~+93 区域甲基化状况,结果显示在 283 对肝癌和配对癌旁组织中,在肝癌组织中有高频率甲基化(38.87%,110/283),显著高于相邻癌旁组织中(9.89%,28/283),差异有统计学意义($\chi^2=64.43,P<0.0001$)。

2.2 *SALL3* 基因甲基化与原发性肝癌临床分期和预后的关系 不同特征的肝癌患者中 *SALL3* 甲基化差异分析显示,年龄、性别、HBV 病毒感染状况、肿瘤大小不同的肝癌患者 *SALL3* 基因甲基化率差异无统计学意义($P>0.05$);但不同肝癌细胞分化程度($P=0.0189$)、临床分期($P=0.0304$)、门静脉瘤栓侵犯($P=0.0001$)的肝癌患者 *SALL3* 基因甲基化率差异有统计学意义,分化评级越差、临床分期越晚、存在门静脉瘤栓的肝癌患者组中 *SALL3* 基因甲基化频率越高,提示 *SALL3* 甲基化与肝癌的恶性程度密切相关,见表 1。

表 1 不同特征肝癌患者 *SALL3* 甲基化差异分析

特征	例数	甲基化例数	甲基化频率(%)	χ^2 值	P 值
性别					
女	38	11	28.95	1.819	0.2259
男	245	99	40.41		
年龄(岁)					
<41	110	44	40.00	0.198	0.7512
41~	137	51	37.23		
60~	36	14	38.89		
HBV 侵袭					
阳性	228	85	37.28	0.453	0.5008
阴性	52	22	42.31		
其他	3				
AFP(ng/ml)					
≤400	165	65	39.39	0.237	0.1432
>400	115	42	36.52		
其他	3				
肿瘤直径(cm)					
≤5	58	21	36.21	0.125	0.3116
>5	222	86	38.74		
其他	3				
肝硬化					
阳性	177	67	37.85	0.174	0.7238
阴性	99	40	40.40		
其他	6				

续表 1					
特征	例数	甲基化例数	甲基化频率(%)	χ^2 值	P 值
门静脉侵犯					
阳性	62	37	59.68	14.930	0.0001
阴性	215	70	32.56		
其他	6				
病理分级					
良好	59	17	27.78	3.046	0.0189
中+差	165+53	75+15	44.55		
其他	6				
临床分期					
T1+T2	3+175	1+58	33.71	4.684	0.0304
T3+T4	49+48	17+28	46.39		
其他	8				

注:其他:临床信息不清。

2.3 *SALL3* 基因甲基化是 HCC 生存期的影响因素 用单因素 Cox 回归分析 *SALL3* 基因甲基化和其他临床因素对 HCC 生存期的影响,显示 *SALL3* 基因甲基化($P=0.0026$)、肝硬化($P=0.0096$)、临床分期($P=0.0000$)均是患者 5 年生存的影响因素。多因素 Cox 回归分析也证实了 *SALL3* 基因甲基化、临床分期是影响 HCC 患者术后生存期的独立危险因素,见表 2。

表 2 *SALL3* 基因甲基化和其它临床指标对 HCC 生存期影响的 Cox-rank 分析

特征	Cox-ranked 单因素				Cox-ranked 多因素			
	<i>P</i> 值	<i>OR</i> 值	<i>OR</i> 95% <i>CI</i>		<i>P</i> 值	<i>OR</i> 值	<i>OR</i> 95% <i>CI</i>	
			下限	上限			下限	上限
<i>SALL3</i> 甲基化	0.0026	1.73	1.28	2.33	0.0357	1.41	1.02	1.94
性别	0.6269	0.90	0.57	1.40	0.4630	0.84	0.52	1.34
年龄	0.3720	0.91	0.73	1.12	0.3998	0.91	0.72	1.14
HBV 侵袭	0.3611	0.83	0.55	1.24	0.4875	0.86	0.55	1.33
AFP	0.1594	0.80	0.59	1.09	0.7483	0.95	0.69	1.31
肝硬化	0.0096	1.56	1.11	2.18	0.0741	1.34	0.97	1.84
临床分期	0.0000	1.63	1.36	1.94	0.0000	1.67	1.39	2.01
病理分级	0.1136	1.21	0.96	1.53	0.1464	1.20	0.94	1.53

对 272 例患者的随访信息使用 Log rank 模型分析并建立 Kaplan-Mrier 生存曲线,结果显示 *SALL3* 基因甲基化肝癌患者组共 106 人,死亡 81 人,5 年中位生存期为 20.37 月;未甲基化肝癌患者组共 166 人,死亡 95 人,5 年中位生存期为 30.77 月,上述二组之间差异有统计学意义($P=0.0024$),见图 1。

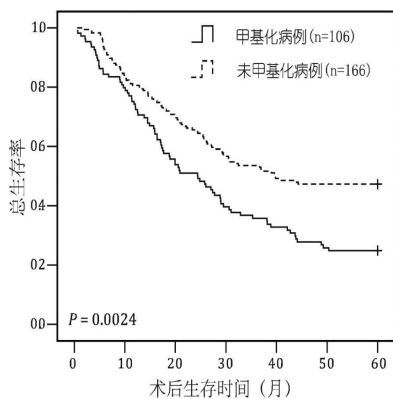


图1 *SALL3* 基因甲基化对原发性肝癌患者术后总生存时间的影响

3 讨论

以前研究表明,在肿瘤细胞中,某些在正常细胞中低甲基化的基因发生高甲基化并转录抑制,涉及基因包括抑癌基因、DNA 修复基因、细胞周期控制基因和抗凋亡基因等,由此促进了肿瘤的发生发展^[12]。DNA 甲基化的研究不仅可以从新的角度使人们进一步了解肿瘤的发生发展机制,肿瘤细胞 DNA 呈现出的异常甲基化谱式已经成为一个新的肿瘤生物标志物的研究领域。同时相比于传统的遗传改变如突变、杂合缺失等,由于 DNA 甲基化修饰的可逆性,使其具有成为分子治疗靶点的可能。

SALL3 的研究较少,多数工作聚焦在胚胎、视觉发育^[13-14],在肿瘤研究中研究更少,迄今仅在 Burkitt 淋巴瘤中被发现突变^[15],在肝癌和膀胱癌中被发现异常高甲基化^[11]。本组前期工作在 30 例肝癌患者的肿瘤组织以及对照非肿瘤组织标本中,检测了 *SALL3* 的甲基化状态,发现在肝癌组织中 *SALL3* 有异常甲基化现象存在^[8]。在本项研究中将肝癌样本扩大到 283 例,肝癌组织与其配对癌旁肝组织相比呈现极其显著的异常高甲基化,且肝癌组织中甲基化率与肝癌临床分期和门静脉侵犯相关。该统计结果说明,*SALL3* 的甲基化伴随着肝癌病情的发展而加重,该基因的甲基化可以作为肝癌病情恶化的一个标志物。

对肝癌患者随访结果分析,*SALL3* 基因甲基化的肝癌患者组的术后生存期显著低于未甲基化的肝癌患者组,进一步经 Cox 单因素多因素分析 *SALL3* 基因甲基化和临床分期一样均为单独的不良预后危险因素。对各临床分期中的 *SALL3* 基因甲基化患者组和非甲基化患者组的 Kaplan-Meier 分析也得到了同样的结果,在 *SALL3* 基因甲基化的肝癌患者组的术后生存期显著低于未甲基化的肝癌患者组。以上这些结果提示

SALL3 启动子区域甲基化现象可能是肝癌发生发展的常发多发事件,随着肝癌的进程而甲基化加剧,并协同其他因素促进了肝癌恶性程度,导致预后不良。

综上所述,*SALL3* 启动子区域异常甲基化,可以作为肝癌患者恶性程度和不良预后的分子标志物,对肝癌患者术后生存风险作出前瞻性评估,对危险度高的患者定期筛查,加强随访,使其得到较长的有效治疗时间窗口,将会有巨大的医疗意义和社会意义。

参考文献

- [1] Kanwal F, El-Serag HB, Ross D. Surveillance for hepatocellular carcinoma; can we focus on the mission [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015, 13: 805-807.
- [2] Folkman J, Hahnfeldt P, Hlatky L. Cancer: looking outside the genome [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000, 1(1): 76-79.
- [3] Rakyan VK, Hildmann T, Novik KL, et al. DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project [J]. PLoS Biol, 2004, 2(12): e405.
- [4] Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation [J]. Science, 2003, 300(5618): 489-492.
- [5] Kohlhaase J, Hausmann S, Stojmenovic G, et al. *SALL3*, A new member of the human spalt-like gene family, maps to 18q23 [J]. Genomics, 1999, 62(2): 216-222.
- [6] Yang XX, Sun JZ, Li FX, et al. Aberrant methylation and downregulation of *SALL3* in human hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(21): 2719-2726.
- [7] Shikauchi Y, Saiura A, Kubo T, et al. *SALL3* interacts with DNMT3A and shows the ability to inhibit CpG island methylation in hepatocellular carcinoma [J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(7): 1944-1958.
- [8] 夏卫,倪唯益,费琦,等. 肝癌中 *SALL3* 基因甲基化的研究 [J]. 诊断学理论与实践, 2010, 9(5): 491-494.
- [9] Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies [J]. Cancer, 1954, 7: 462-503.
- [10] Sobin LH, Wittekind Ch. TNM classification of malignant tumors [M]. 6th ed. New York: Wiley-Liss, Inc, 2002: 51-54.
- [11] Yu J, Zhu T, Wang Z, et al. A novel set of DNA methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(24): 7296-7304.
- [12] Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The cancer epigenome—components and functional correlates [J]. Genes Dev, 2006, 20(23): 3215-3231.
- [13] Yang J, Gao C, Chai L, et al. A novel *SALL4*/OCT4 transcriptional feedback network for pluripotency of embryonic stem cells [J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10766.
- [14] de Melo J, Peng GH, Chen S, et al. The Spalt family transcription factor *SALL3* regulates the development of cone photoreceptors and retinal horizontal interneurons [J]. Development, 2011, 138(11): 2325-2336.
- [15] Love CI, Sun Z, Jima D, et al. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma [J]. Nat Genet, 2012, 44(12): 1321-1325.

收稿日期: 2017-04-19