

GNB4 和 Riplet 基因甲基化检测在原发性肝癌诊断中的价值研究

杨玉萍,徐恩君,汪轩轩,唐宜桂,郑美娟,王悦,储梦真,徐家丹,王中新

摘要 目的 探讨 GNB4 和 Riplet 基因甲基化单独和联合检测在原发性肝癌诊断中的诊断效能和临床价值。方法 选取 313 例患者,原发性肝癌患者 78 例,其他消化系统肿瘤患者 41 例,非消化系统肿瘤患者 17 例,肝癌术后 20 例,肝良性疾病患者 157 例。采用甲基化荧光定量 PCR (qMSP) 法检测所有患者血浆中 GNB4 和 Riplet 基因甲基化水平,直接化学发光法检测血清甲胎蛋白 (AFP) 水平。结果 AFP 检测诊断灵敏度和特异度为 51.3%、94.3%;GNB4 基因甲基化检测诊断灵敏度和特异度为 83.3%、99.4%;Riplet 基因甲基化检测诊断灵敏度和特异度为 73.1%、99.4%。GNB4 和 Riplet 基因甲基化联合检测诊断的灵敏度和特异度为 92.3%、98.7%;AFP、GNB4 和 Riplet 基因甲基化 3 项指标联合检测诊断的灵敏度和特异度为 92.3%、98.7%,纳入年龄和性别后的联合诊断的灵敏度和特异度为 93.6%、97.5%。结论 对于原发性肝癌的诊断,AFP 灵敏度和特异度存在局限性,而 GNB4 和 Riplet 基因甲基化水平较高,两者联合检测的灵敏度和特异度均高于 AFP 的诊断效能。AFP、GNB4 和 Riplet 基因甲基化联合检测诊断的灵敏度和特异度显著高于 AFP、GNB4 和 Riplet 基因甲基化单独检测。

关键词 原发性肝癌;甲胎蛋白;基因甲基化;GNB4 基因;Riplet 基因

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0357-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.028

原发性肝癌是全球常见的恶性肿瘤之一,是慢性肝脏疾病患者最常见的死因,病死率居恶性肿瘤第三位^[1]。诊断原发性肝癌目前已经确认的一些血清蛋白质标志物的敏感度和特异度有限,如一些肝脏良性疾病、生殖腺胚胎源性肿瘤和转移性肝癌等也表现出甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP) 升高,部分肝癌患者 AFP 浓度始终保持低水平状态^[2]。有研究^[3-4]表明在癌症患者外周血的循环游

离 DNA (circulating cell-free DNA, cfDNA) 中可以找到由各种类型癌症引起的 DNA 碎裂产物,是一种可以通过检查人体血浆中的 cfDNA 来鉴别正常人还是潜在危险人群的方法。肿瘤相关基因发生甲基化修饰是导致肿瘤发生的早期事件^[5],GNB4 即鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 $\beta 4$ 亚基,是异源三聚体 G 蛋白的关键亚基,在许多种类的恶性肿瘤的发生和发展中发挥着重要的作用,如尿路上皮癌、食管鳞状细胞癌、乳腺癌、胃癌等^[6-9],研究^[10]报道证实该基因的甲基化与肝癌的发生高度相关。Riplet 是一个泛素连接酶,研究^[11]表明 Riplet 促进维甲酸诱导基因 I 介导的干扰素 β 启动子激活,抑制负链 RNA 病毒的增殖,该基因的甲基化作为诊断肝细胞癌的分子标志物也有相关报道^[12-13]。该研究通过对人外周血浆 cfDNA 中 GNB4 和 Riplet 基因甲基化以及血清 AFP 的检测,探讨 AFP、GNB4 和 Riplet 基因甲基化单独和联合检测在原发性肝癌诊断中的诊断效能和临床价值。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2022 年 12 月至 2023 年 8 月在安徽医科大学第一附属医院就诊的 313 例患者作为研究对象。78 例原发性肝癌患者,其中男性 62 例,女性 16 例,年龄 19~84 (61.47 ± 12.24) 岁。157 例良性疾病患者,其中男性 89 例,女性 68 例,年龄 20~78 (43.96 ± 12.21) 岁,包含肝硬化 30 例,乙型肝炎 87 例,丙型肝炎 4 例,自身免疫性肝炎 2 例,胆汁淤积性肝炎 1 例,脂肪肝 7 例,其他良性疾病 (肝血管瘤、肝囊肿等) 26 例。41 例其他消化系统肿瘤患者,其中男性 27 例,女性 14 例,年龄 37~86 (66.10 ± 10.83) 岁,包含胃部恶性肿瘤 19 例,结直肠恶性肿瘤 14 例,胰腺恶性肿瘤 4 例,胆管恶性肿瘤 4 例。17 例非消化系统肿瘤患者,其中男性 13 例,女性 4 例,年龄 42~82 (67.53 ± 12.10) 岁,包含肾恶性肿瘤 8 例,前列腺恶性肿瘤 8 例,尿路上皮癌 1 例。20 例原发性肝癌术后患者。采用甲基化荧光定量 PCR (quantitative methylation-specific PCR,

2023-12-08 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目(编号:2023AH020048)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院检验科 合肥 230022

作者简介:杨玉萍,女,检验技师,硕士研究生;

王中新,男,主任技师,硕士生导师,责任作者,E-mail: ay-wzhx87@163.com

qMSP)法检测所有患者血浆中 *GNB4* 和 *Riplet* 基因甲基化水平,直接化学发光法(双抗体夹心法)检测血清 AFP 水平。本研究已通过安徽医科大学第一附属医院伦理委员会的审核与授权(YJ2022-09-06),所有参与者均签署了知情同意书。

1.1.1 入选标准 ①符合《原发性肝癌诊疗指南(2022年版)》^[14]临床诊断标准的原发性肝癌患者。②干扰患者:良性肝脏疾病患者,包括肝硬化、肝炎、脂肪肝、肝腺瘤、肝囊肿等;未经治疗的其他消化系统肿瘤患者,包括食管癌、胰腺癌、结直肠癌、胆囊/管癌、胃癌等;未经治疗的非消化系统肿瘤患者,包括肺癌、甲状腺癌、乳腺癌、前列腺癌、尿路上皮癌、宫颈癌等。③行肝切除、移植的肝癌术后患者且有术前评价试剂检测。

1.1.2 排除标准 ①无术前评价试剂检测的肝癌术后患者和已接受放/化疗等治疗患者;②肝癌合并患有其他恶性肿瘤;③未按要求保存或溶血的样本;④术前术后对照研究有远处转移的肝癌术后患者。

1.2 方法

1.2.1 样本的采集、制备和保存 用含 EDTA 抗凝剂的采血管采集不少于 10 ml 的全血,颠倒 8~10 次混匀后立刻分离成血浆。不应放置在室温超过 3 h 或在 2~8 °C 超过 8 h,不可冷冻全血。以离心力 3 500 r/min 离心 10 min 后提取血浆,放入 15 ml 的离心管内再次离心 10 min(3 500 r/min),将血浆转入新的 15 ml 离心管内。血浆样本可被储存在 2~8 °C 最多 18 h,在 -25~-15 °C 可稳定 28 d,在 (-80±5) °C 可储存 12 个月。选择无抗凝剂的干燥管采集 2~3 ml 全血,离心 5 min(转速 3 500 r/min)获取血清检测 AFP。室温可储存 8 h,2~8 °C 可保存 48 h,若 48 h 不能完成检测则将标本冷冻于 -20 °C。

1.2.2 样本的处理 ①核酸提取:取 2 ml 血浆,使用核酸提取试剂进行核酸提取,获取 cfDNA。②亚硫酸氢盐转化及纯化:取获得的核酸提取液 35 μl,使用核酸纯化试剂进行快速亚硫酸氢盐转化,并将转化液进行纯化。获得的纯化液即可用于 *GNB4* 和 *Riplet* 基因甲基化检测。③PCR 扩增:根据需扩增的样本数量配置 PCR 反应液并按 10 μl/管分装至反应管中/板中,然后依次加入处理好的阴性对照、样本核酸转化液和阳性对照各 40 μl。加样并盖好管盖或封膜,短暂离心 30 s(2500 r/min)后,立即进行 PCR 扩增反应。

1.2.3 实验结果的读取 利用 ABI 7500 实时荧光

定量 PCR 分析仪获取数据。通过 Atellica IM 全自动化学发光免疫分析仪对血清中的 AFP 进行精确测量。

1.3 诊断标准 本实验使用 *GNB4* 和 *Riplet* 基因甲基化联合检测试剂盒(荧光 PCR 法),由武汉艾米森生命科技有限公司提供。该试剂盒能够在体外对人的外周血血浆 cfDNA 中的 *GNB4* 和 *Riplet* 基因进行甲基化定性分析。根据说明书,待测样本内控基因 ACTB Ct 值 ≤35(VIC 通道)则样本有效,否则判定样本无效。阴性对照应符合 ACTB(VIC 通道)、*GNB4*(FAM 通道)、*Riplet*(ROX 通道)Ct 值 >43 或 Unde(无扩增);阳性对照应符合 ACTB(VIC 通道)、*GNB4*(FAM 通道)、*Riplet*(ROX 通道)Ct 值 ≤33。阴阳性对照和内控合格后,对检测结果进行判定:Ct 值 ≤43(FAM 通道),且呈 S 型扩增曲线趋势,*GNB4* 甲基化阳性;Ct 值 ≤43(ROX 通道),且呈 S 型扩增曲线,*Riplet* 甲基化阳性;Ct 值 >43 或 Unde(无扩增)为阴性。联合检测采用平行联合诊断法,当有一个检测结果判定为阳性则诊断为阳性。

根据目前国际上普遍接受的临界值 20 ng/ml,AFP <20 ng/ml 为 AFP 阴性组,而 20 ≤ AFP <200 ng/ml 为 AFP 低水平组,若 AFP ≥200 ng/ml 为 AFP 高水平组。

1.4 统计学处理 使用 SPASS 22.0 软件进行数据处理。采用 χ^2 检验,方差检验,二元 logistics 回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各分组基因甲基化检测结果 不同分组基因甲基化的检测结果见表 1,*GNB4* 和 *Riplet* 基因的甲基化阳性率在原发性肝癌组中显著超过了其他各个分组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 各分组年龄、性别、AFP 结果的分布情况 肿瘤组患者的平均年龄高于肝良性疾病组,且男性患者比例也高于肝良性疾病组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。78 例肝癌患者中 AFP <20 ng/ml 有 33 例(42.31%),而在 157 例肝良性疾病中 AFP ≥200 ng/ml 有 3 例(1.91%),在 17 例非消化系统肿瘤患者中 AFP ≥200 ng/ml 有 1 例(5.88%),各组具体分布情况见表 2。

2.3 *GNB4* 和 *Riplet* 基因甲基化水平在不同 AFP 浓度中的表达情况 78 例原发性肝癌患者 *GNB4* 和 *Riplet* 基因甲基化的表达水平在不同血清 AFP 浓度的情况,见表 3。*GNB4* 和 *Riplet* 基因甲基化联合

表1 GNB4和Riplet在不同分组阳性率的比较

| 分组 | n | GNB4 基因甲基化 | | Riplet 基因甲基化 | | GNB4 和 Riplet 基因甲基化联合检测 | |
|------------|-----|------------|--------|--------------|--------|-------------------------|--------|
| | | 阳性例数 | 阳性率(%) | 阳性例数 | 阳性率(%) | 阳性例数 | 阳性率(%) |
| 原发性肝癌 | 78 | 64 | 82.05 | 56 | 71.79 | 72 | 92.31 |
| 肝良性疾病 | 157 | 1 | 0.63 | 0 | 0 | 1 | 0.63 |
| 其他消化系统肿瘤 | 41 | 13 | 31.71 | 1 | 2.44 | 13 | 31.71 |
| 非消化系统肿瘤 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 肝癌术后 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 合计 | 313 | - | - | - | - | - | - |
| χ^2 值 | - | 198.80 | | 191.80 | | 235.7 | |
| P 值 | - | <0.001 | | <0.001 | | <0.001 | |

表2 不同分组年龄、性别、AFP结果分布的比较

| 项目 | 原发性肝癌组 (n=78) | 肝良性疾病组 (n=157) | 其他消化系统肿瘤组 (n=41) | 非消化系统肿瘤组 (n=17) | 肝癌术后组(n=20) | F/ χ^2 值 | P 值 |
|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|---------------|-------|
| 年龄(岁, $\bar{x} \pm s$) | 19~84(61.47 ± 12.24) | 20~78(43.96 ± 12.21) | 37~86(66.10 ± 10.83) | 42~82(67.53 ± 12.10) | 47~79(63.1 ± 8.55) | 54.597 | 0.001 |
| 男性[n(%)] | 62(79.49) | 89(56.69) | 27(65.85) | 13(76.47) | 15(75.00) | 13.901 | 0.007 |
| AFP < 20 ng/ml[n(%)] | 33(42.31) | 138(87.90) | 38(92.68) | 15(88.24) | 15(75.00) | - | - |
| 20 ≤ AFP < 200 ng/ml[n(%)] | 20(25.64) | 16(10.19) | 3(7.32) | 1(5.88) | 4(20.00) | - | - |
| AFP ≥ 200 ng/ml[n(%)] | 25(32.05) | 3(1.91) | 0(0.00) | 1(5.88) | 1(5.00) | - | - |

表3 GNB4和Riplet基因甲基化水平在不同AFP浓度分组中表达情况

| 分组 | n | GNB4 基因甲基化 | | Riplet 基因甲基化 | | GNB4 和 Riplet 基因甲基化联合检测 | |
|------------|----|------------|--------|--------------|--------|-------------------------|--------|
| | | 阳性例数 | 阳性率(%) | 阳性例数 | 阳性率(%) | 阳性例数 | 阳性率(%) |
| AFP 阴性 | 45 | 33 | 73.33 | 25 | 55.56 | 39 | 86.67 |
| AFP 低水平 | 8 | 7 | 87.5 | 8 | 100 | 8 | 100 |
| AFP 高水平 | 25 | 24 | 96 | 23 | 92 | 25 | 100 |
| χ^2 值 | - | 8.897 | | 14.513 | | 3.768 | |
| P 值 | - | 0.009 | | 0.001 | | 0.103 | |

检测时在3个分组中差异无统计学意义(P=0.103 > 0.05)。

2.4 AFP、GNB4基因甲基化、Riplet基因甲基化单独和联合检测在原发性肝癌中的诊断效能评价

2.4.1 通过多元回归分析来纠正混淆因子并选择独立变量。将肝良性疾病组设为对照组,把肝癌患者划入研究对象。即肝癌组有78例,良性病症组有157例。由于两组的研究参与者的年龄和性别存在显著的统计学差别,为了避免这些影响因素造成误差,在进行数据分析时使用了多因素线性回归方法筛选肝癌的独立危险因素,采用二元logistics回归分析来调整并评估他们的年龄、性别、GNB4基因甲基化以及Riplet基因甲基化的作用。通过设置变量X1代表年龄,X2表示性别,X3是GNB4基因甲基化,X4则是Riplet基因甲基化,从而得到了肝癌的相关回归模型公式: $\hat{Y} = 1/[1 + \text{EXP}(-0.091 \times X1 + 2.314 \times X2 - 0.017 \times X3 - 0.160 \times X4)]$ 。根据方程中变量年龄、性别、GNB4基因甲基化、Riplet基因甲基化P值均小于0.05,见表4,显示年龄、性

别、GNB4基因甲基化、Riplet基因甲基化均与肝癌的发生显著相关。

表4 各指标诊断肝癌多因素回归分析结果

| 项目 | 回归系数 | 标准误差 | 瓦尔德 | P 值 | OR(95% CI) |
|--------------|--------|-------|--------|--------|----------------------|
| 年龄 | -0.091 | 0.033 | 7.508 | 0.006 | 0.913(0.855~0.974) |
| 性别 | 2.314 | 1.073 | 4.647 | 0.031 | 10.113(1.234~82.894) |
| GNB4 基因甲基化 | -0.170 | 0.038 | 20.447 | <0.001 | 0.844(0.784~0.908) |
| Riplet 基因甲基化 | -0.160 | 0.042 | 14.644 | <0.001 | 0.852(0.785~0.925) |

2.4.2 构建原发性肝癌的诊断模型并绘制ROC曲线。根据GNB4基因甲基化水平、Riplet基因甲基化水平、性别、年龄及血清AFP这些指标创建6个诊断模型,见表5,且绘制ROC曲线,见图1。其中AFP诊断模型曲线下面积AUC为0.775(95%CI 0.706~0.844),灵敏度为51.3%,特异度为94.3%。GNB4基因甲基化诊断模型ROC曲线下面积AUC为0.912(95%CI 0.862~0.962),灵敏度为83.3%,特异度为99.4%。Riplet基因甲基化诊断模型曲线下面积AUC为0.860(95%CI 0.799~

表5 不同诊断模式对原发性肝癌的诊断效能评价

| 诊断方法 | AUC | P 值 | 95% CI | 约登指数 | 灵敏度(%) | 特异度(%) |
|---|-------|--------|---------------|-------|--------|--------|
| AFP | 0.775 | <0.001 | 0.706 ~ 0.844 | 0.456 | 51.3 | 94.3 |
| <i>GNB4</i> 基因甲基化 | 0.912 | <0.001 | 0.862 ~ 0.962 | 0.827 | 83.3 | 99.4 |
| <i>Riplet</i> 基因甲基化 | 0.860 | <0.001 | 0.799 ~ 0.921 | 0.725 | 73.1 | 99.4 |
| <i>GNB4</i> 基因甲基化 + <i>Riplet</i> 基因甲基化 | 0.958 | <0.001 | 0.923 ~ 0.998 | 0.91 | 92.3 | 98.7 |
| AFP + <i>GNB4</i> 基因甲基化 + <i>Riplet</i> 基因甲基化 | 0.956 | <0.001 | 0.917 ~ 0.994 | 0.910 | 92.3 | 98.7 |
| AFP + <i>GNB4</i> 基因甲基化 + <i>Riplet</i> 基因甲基化 + 年龄 + 性别 | 0.989 | <0.001 | 0.979 ~ 1.000 | 0.911 | 93.6 | 97.5 |

0.921),灵敏度为73.1%,特异度为99.4%。*GNB4*和*Riplet*基因甲基化联合诊断模型曲线下面积AUC为0.958(95%CI 0.923 ~ 0.998),灵敏度为92.3%,特异度为98.7%。AFP、*GNB4*和*Riplet*基因甲基化三者联合诊断模型曲线下面积AUC为0.956(95%CI 0.917 ~ 0.994),灵敏度为92.3%,特异度为98.7%,当加入年龄与性别这两个因素后的联合诊断模型AUC为0.989(95%CI 0.979 ~ 1.000),灵敏度为93.6%,特异度为97.5%。各模型曲线下面积结果差异有统计学意义($P < 0.05$)。

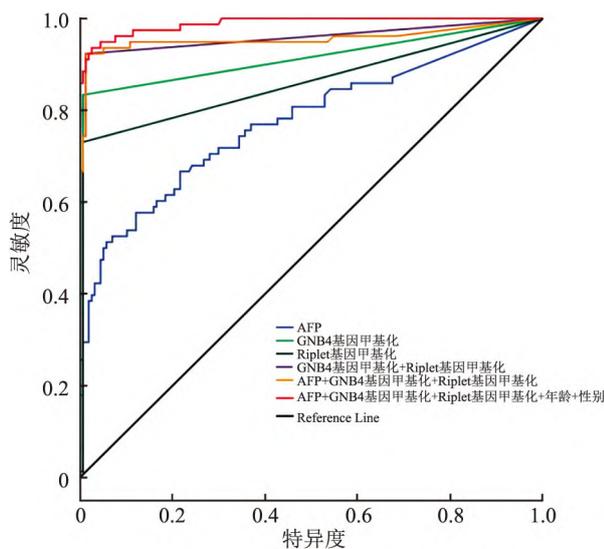


图1 不同诊断模式ROC曲线分析

3 讨论

*GNB4*基因编码异源三聚体鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G蛋白)的β亚基,其在信号转导中起着至关重要的作用^[9],*Riplet*基因又称RNFI35基因,作为E3泛素连接酶的作用,通过调节T细胞中的Th1和CTLs来抑制抗肿瘤免疫反应^[11],两者甲基化均可导致肿瘤的发生。本研究中原发性肝癌*GNB4*基因甲基化阳性率为82.05%,明显高于肝良性疾病组的0.63%、其他消化系统肿瘤组的31.71%、其余组别的0%,同时肝癌组*Riplet*基因甲基化阳性率为

71.79%,明显高于其他消化系统肿瘤组的2.44%和其他分组的0%,显示相比于肝良性疾病和其他肿瘤患者,肝癌患者外周血液中有*GNB4*基因甲基化和*Riplet*基因甲基化的存在且水平明显较高,与相关研究^[15]相符,将*GNB4*和*Riplet*基因甲基化联合检测,在原发性肝癌组的阳性率达到92.31%,高于*GNB4*基因甲基化和*Riplet*基因甲基化单独检测,提高了对肝癌患者的诊断效能。

血清AFP是诊断肝癌与疗效监测常用且重要的肿瘤标志物,但其敏感度较低,在部分肝癌中呈现低水平,尤其在肿瘤直径小于2cm的早期微小肝癌患者中。分析本研究中各分组AFP水平,在原发性肝癌组中AFP < 20 ng/ml占42.31%,20 ≤ AFP < 200 ng/ml占25.64%,而在肝良性疾病中20 ≤ AFP < 200 ng/ml有10.19%,AFP ≥ 200 ng/ml有1.91%,显示在原发性肝癌中仍有相当一部分患者血清AFP呈现低水平,甚至阴性,一些良性肝病、其他恶性肿瘤中也表现出AFP升高,AFP灵敏度和特异度存在局限性,与相关研究^[2]基本一致。当前研究将其它不同的肿瘤指标与AFP联合检测以提高诊断的敏感度。

为进一步探讨*GNB4*基因甲基化和*Riplet*基因甲基化在肝癌诊断中的应用,将78例原发性肝癌患者作为实验组,157例肝良性疾病患者作为对照组,以进行更深层次的分析。对两组年龄和性别进行比较,肝癌患者的平均年龄大于肝良性疾病患者,肝癌患者男性占比高于肝良性疾病患者,与文献^[2]报道一致,这可能与男性性激素和x相关的遗传因素有关^[2]。通过多因素回归分析,年龄、性别、*GNB4*基因甲基化、*Riplet*基因甲基化均与肝癌的发生显著相关。关于*GNB4*和*Riplet*基因甲基化水平在不同AFP浓度中的表达情况的分析显示:*GNB4*和*Riplet*基因甲基化联合检测在不同AFP浓度中的表达结果差异无统计学意义($P = 0.103$),显示在AFP低水平和AFP阴性的肝癌患者中仍有较好的诊断效能,同时该结果也证实了无论血清AFP的表达情况如

何,都可以采用 *GNB4* 和 *Riplet* 基因甲基化联合检测对原发性肝癌进行筛查,这为肝癌的诊断提供了更多的参考指标。最后,本研究将 *GNB4* 基因甲基化水平、*Riplet* 基因甲基化水平、年龄、性别以及血清 AFP 指标建立 6 个诊断模型绘制了 ROC 曲线。结果显示,对于原发性肝癌的诊断,*GNB4* 和 *Riplet* 基因甲基化联合检测诊断的灵敏度显著高于单独 AFP,也高于 *GNB4* 和 *Riplet* 基因甲基化单独诊断的灵敏度;同时,*GNB4* 基因甲基化诊断的灵敏度较 *Riplet* 基因甲基化高。联合年龄、性别、AFP、*GNB4* 和 *Riplet* 基因甲基化的诊断灵敏度最高,达到 93.6%。各检测指标及组合诊断模型中,AFP 的特异度 94.3% 相对稍低一点,其余特异度均较高,且基本无差异。

本研究因时间有限,纳入研究的原发性肝癌患者数量不够多,其他纳入研究的恶性肿瘤种类及患者数量均有限,存在一定局限,后续可扩大样本量进一步验证。对于原发性肝癌术后患者,本研究在手术 3 d 后采集患者血液,未能做到术后连续监测 AFP、*GNB4* 和 *Riplet* 基因甲基化水平的变化,且因样本量较少未做更多研究和探讨,后续可进一步做补充实验。

参考文献

- [1] 王延峰,韩嘉奇,张静. MBL2 作为男性肝癌患者预后标志物的分析与验证[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(5): 787-93.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.
- [3] Thierry A R, El Messaoudi S, Gahan P B, et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology[J]. Cancer Metastasis Rev, 2016, 35(3): 347-76.
- [4] Sun K, Jiang P, Chan K C, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(40): E5503-12.
- [5] Xu R H, Wei W, Krawczyk M, et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Nat Mater, 2017, 16(11): 1155-61.
- [6] Riemann K, Struwe H, Eisenhardt A, et al. Characterization of intron-1 haplotypes of the G protein beta 4 subunit gene-association with survival and progression in patients with urothelial bladder carcinoma[J]. Pharmacogenet Genomics, 2008, 18(11): 999-1008.
- [7] Wang J, Yu P, Luo J, et al. Transcriptomic and microRNA expression profiles identify biomarkers for predicting neo-chemoradiotherapy response in esophageal squamous cell carcinomas (ESCC) [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 626972.
- [8] Wang B, Li D, Rodriguez-Juarez R, et al. A suppressive role of guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4 inhibited by DNA methylation in the growth of anti-estrogen resistant breast cancer cells[J]. BMC Cancer. 2018, 18(1): 817.
- [9] Gao J, Pan H, Zhu Z, et al. Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4 promotes gastric cancer progression via activating Erk1/2[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2020, 52(9): 975-87.
- [10] Liang Y, Ma B, Jiang P, et al. Identification of methylation-regulated differentially expressed genes and related pathways in hepatocellular carcinoma: a study based on TCGA database and bioinformatics analysis[J]. Front Oncol, 2021, 11: 636093.
- [11] Oshiumi H, Matsumoto M, Hatakeyama S, et al. Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection[J]. J Biol Chem, 2009, 284(2): 807-17.
- [12] Jung N, Won J K, Kim B H, et al. Pharmacological unmasking microarray approach-based discovery of novel DNA methylation markers for hepatocellular carcinoma [J]. J Korean Med Sci, 2012, 27(6): 594-604.
- [13] Wu H C, Shen J, Yang H I, et al. Blood DNA methylation markers in prospectively identified hepatocellular carcinoma cases and controls from Taiwan[J]. World J Hepatol, 2016, 8(5): 301-6.
- [14] 国家卫生健康委办公厅. 原发性肝癌诊疗指南(2022年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(2): 288-303.
- [15] Liang W, Xu Z, Kong F, et al. Circulating tumour cell combined with DNA methylation for early detection of hepatocellular carcinoma[J]. Front Genet, 2022, 13: 1065693.

The value of *GNB4* and *Riplet* gene methylation detection in the diagnosis of primary liver cancer

Yang Yuping, Xu Enjun, Wang Xuanxuan, Tang Yigui, Zheng Meijuan, Wang Yue, Chu Mengzhen, Xu Jiadan, Wang Zhongxin

(Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the diagnostic efficacy and clinical value of *GNB4* and *Riplet* gene methylation

IL-1Ra 基因多态性与无症状细菌性阴道病自然转归关系的研究

张 瑞,高佳惠子,董翰宇,李 昶,尹海旭

摘要 目的 研究白细胞介素 1 受体 a(IL-1Ra) 基因多态性与无症状细菌性阴道病(aBV) 患者不同转归的关系,以期对 aBV 患者进行分组管理。方法 对 aBV 患者进行自然转归的研究,在入组时,所有患者均留取了一份静脉血标本和阴道灌洗液的标本单独冻存。4 个月后,临床研究结束时,根据临床结局,将完成研究的患者分为 3 组:自愈、进展和无改变。再检测所有患者 IL-1Ra 基因多态性以及阴道微环境中 IL-1 β 和 IL-1Ra 浓度,并比对上述指标在 3 组不同结局的患者间的差别。结果 共有 1 014 例中国汉族女性患者入组,984 例完成临床随访并获得临床结局数据。其中 13 例患者的冻存标本在检测时无法使用,共有 971 分标本完成检测。所有患者均检测到 IL-1Ra 基因,有 A₁/A₁、A₁/A₂ 和 A₂/A₂ 3 种基因型,主流人群的基因型为 A₁/A₁,最少见的基因型为 A₂/A₂,未发现少见类型的基因型女性。病情进展组的 A₂ 等位基因的频率明显高于自愈组($P < 0.05$)。在所有患者的阴道灌洗液标本中均能检测到 IL-1 β 和 IL-1Ra 存在。与进展组比较,自愈组的 IL-1 β 水平明显偏低($P < 0.05$)。当

携带 A₂ 等位基因时,进展组 IL-1 β 水平相对偏低,而 IL-1Ra 水平相对升高,无变化组的数值介于进展组和自愈组之间。结论 aBV 患者中的 IL-1Ra 基因多态性特征与阴道分泌物中的 IL-1Ra 含量有关。携带等位基因 A₂ 与 IL-1Ra 含量升高、IL-1 β 含量降低有密切相关性。携带等位基因 A₂ 可能通过与 IL-1Ra 和 IL-1 β 有关的机制影响了 aBV 的临床转归。关键词 IL-1Ra 基因;基因多态性;无症状细菌性阴道病;IL-1 β ;细菌性阴道病

中图分类号 R 711.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)02-0362-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.029

无症状性细菌性阴道病(asymptomatic bacterial vaginosis, aBV) 是临床最常见的一种阴道微生态失衡状态,其微生态学特征与细菌性阴道病相同^[1-2]。研究^[2]表明,aBV 与多种不良结局密切相关,然而临床治疗面临的最大困境是高复发率,缺乏获得长久疗效的策略。前期研究^[1]的结果提示,应该深入研究影响 aBV 结局的影响因素,探索根据不同特征将 aBV 患者进行分组管理和干预以获得良好临床转归的可能性。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 是免疫应答和炎症反应过程中的关键物质^[3]。IL-1

2024-01-07 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81471420);教育部博士点新教师基金项目(编号:20130001120051)

作者单位:北京大学第一医院妇产科,北京 100034

作者简介:张 瑞,男,博士,主治医师,责任作者,E-mail:zuniverse@163.com

alone and in combination in the diagnosis of primary liver cancer. **Methods** A total of 313 patients were selected, including 78 patients with primary liver cancer, 41 patients with other digestive system tumors, 17 patients with non-digestive system tumors, 20 patients with postoperative liver cancer, and 157 patients with benign liver diseases. The levels of *GNB4* and *Riplet* gene methylation in plasma were detected using quantitative methylation-specific PCR (qMSP). Serum alpha-fetoprotein (AFP) levels were measured by direct chemiluminescence. **Results** The sensitivity and specificity of AFP in diagnosis were 51.3% and 94.3%, respectively; the sensitivity and specificity of *GNB4* gene methylation in diagnosis were 83.3% and 99.4%, respectively; the sensitivity and specificity of *Riplet* gene methylation in diagnosis were 73.1% and 99.4%, respectively. The sensitivity and specificity of *GNB4* and *Riplet* gene methylation combined diagnosis were 92.3% and 98.7%, respectively; the sensitivity and specificity of AFP, *GNB4* and *Riplet* gene methylation combined diagnosis were 92.3% and 98.7%, respectively; the sensitivity and specificity of combined diagnosis including age and gender were 93.6% and 97.5%, respectively. **Conclusion** The sensitivity and specificity of AFP in the diagnosis of primary liver cancer are limited, while the methylation levels of *GNB4* and *Riplet* genes are higher, and the sensitivity and specificity of their combined detection are higher than those of AFP. The sensitivity and specificity of AFP, *GNB4* and *Riplet* gene methylation combined diagnosis are significantly higher than those of AFP, *GNB4* and *Riplet* gene methylation alone.

Key words primary liver cancer; alpha-fetoprotein; gene methylation; *GNB4* gene; *Riplet* gene