

## 胰腺占位性病灶细针穿刺活检标本中 ppENK 和 TFPI-2 基因甲基化检测的可行性及其应用

齐 灿, 黄 强, 刘臣海, 吕向微, 刘 振, 汪 超

**摘要** 目的 检测胰腺组织 ppENK 和 TFPI-2 基因甲基化状态, 探讨胰腺占位性病灶细针穿刺活检标本中 ppENK 和 TFPI-2 基因甲基化检测的可行性及其应用。方法 采用重亚硫酸盐测序 PCR(BSP) 法检测 86 例胰腺占位性病变组织中 ppENK 和 TFPI-2 基因启动子区 CPG 岛的甲基化状态, 采用单因素及多因素回归 Logistic 回归分析 ppENK 基因和 TFPI 基因甲基化检测的诊断价值, 以及 EUS-FNA 联合基因甲基化检测在胰腺占位性病变中的诊断意义。结果 本研究 86 例病例中, 甲基化成功率为 91.9% (79/86), TFPI-2 和 ppENK 基因的甲基化检测率分别为 95.9% (75/79) 和 91.1% (72/79)。肿瘤组与炎症组以及肿瘤组和对照组的甲基化率差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而炎症组与对照组甲基化率差异无统计学意义。受试者工作特征曲线结果显示: TFPI-2 基因、ppENK 基因甲基化水平诊断胰腺癌的敏感度分别为 83.6%、74.6%, 特异度分别为 81.8%、86.4%, 诊断率分别为 89.7%、81.2%, 以 TFPI-2 基因或 ppENK 基因甲基化水平诊断胰腺癌的敏感度为 92.5%, 特异度为 79.8%, 而以基因 TFPI-2 和 ppENK 甲基化水平进行诊断, 其敏感度为 74.6%, 特异度为 91.7%。结论 TFPI-2 和 ppENK 基因在胰腺肿瘤组织中具有高甲基化水平, 且具有良好的敏感性和特异性, 是胰腺癌的有利诊断指标, 结合 EUS-FNA, 能够有效提高胰腺占位性病变的术前诊断。

**关键词** 胰腺肿瘤; 胰腺癌; 前脑啡肽原基因; 组织因子途径抑制物-2 基因; 甲基化; 超声内镜

**中图分类号** R 446.8

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0086-07  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.019

胰腺疾病中, 胰腺占位性病变占大多数, 而手术切除是治愈胰腺占位性病变的唯一方法, 但由于胰腺占位性病变本身存在的高风险和巨创性, 因此, 选择胰腺手术之前均需要慎重权衡。尽管随着外科技术的发展, 但胰腺手术的并发症仍保持在 30% ~

50% 不等, 死亡率约 3% ~ 5%<sup>[1-2]</sup>。超声内镜下细针穿刺活检(endoscopic ultrasonography guided fine needle aspiration, EUS-FNA) 能够微创地获取胰腺病灶细胞或组织样本, 理论上可以获得术前的病理诊断, 但其诊断准确度受诸多因素的影响, 如取材的质量与数量、病灶位置大小、操作者技术水平以及有无病理医师在场<sup>[3]</sup>。一些抑癌基因启动子区的高甲基化被认为是在肿瘤发生发展的早期阶段导致其失活的重要因素, 而早期检测这些抑癌基因的甲基化状态就可以作为检测有无组织癌变的重要指标<sup>[4-5]</sup>。该研究通过检测 70 例病例的胰腺癌组织及癌旁组织, 16 例病例的慢性胰腺炎组织的抑癌基因前脑啡肽原基因(preproenkephalin, ppENK) 与组织因子途径抑制物-2 基因(tissue factor pathway inhibitor 2, TFPI-2) 基因启动子区甲基化状态, 探讨 ppENK 和 TFPI-2 基因甲基化水平检测对胰腺占位性病变临床诊断的意义, 并提出 EUS-FNA 联合胰腺肿瘤相关基因甲基化水平检测的新方案, 以提高胰腺占位性病变的早期诊断率。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源** 选取 2011 年 1 月 ~ 2015 年 5 月于安徽省立医院胆胰外科就诊, 行超声内镜引导下 EUS-FNA 并成功获得组织标本的胰腺癌患者 70 例, 慢性胰腺炎患者 16 例, 所有 86 例病例进行手术并获得术后病理并有完整资料。86 例获得组织标本的病例均进行病理学检测, 其中明确诊断的为 69 例(80.2%), 其中明确给出病理学诊断的为 52 例(60.5%), 提示标本中可见异形细胞的 17 例(19.8%), 无法给出诊断的有 17 例(19.8%), 进行基因组 DNA 纯化和甲基化处理后的 PCR 扩增和测序, 其中有 79 例标本能够获得基因甲基化测序图, 进行基因甲基化检测的成功率达到 91.9% (79/86), 其中肿瘤组 67 例, 炎症组 12 例, 另取 10 例癌旁正常组织作为对照组, 所有诊断结果获得手术后病理证实。

2017-10-30 接收

基金项目: 安徽省科技计划项目(编号: 1301042205)

作者单位: 安徽医科大学附属安徽省立医院普外科, 合肥 230001

作者简介: 齐 灿, 男, 硕士研究生;

黄 强, 男, 教授, 博士生导师, 主任医师, 责任作者, E-mail: lemontree2020@163.com

**1.1.2 主要试剂及仪器** 96#PCR 扩增仪购自杭州博日科技有限公司; 紫外分析仪和稳压稳流电泳仪购自上海天能科技有限公司; 3730 测序仪购自美国 ABI 公司; 台式高速离心机购自上海医疗器械有限公司; 微型电泳槽购自上海精益有机玻璃制品仪器厂; 微型旋涡混合仪购自江苏省海门市美林贝尔有限公司; 数显恒温水浴锅购自芜湖金瑞特计量检测仪器有限公司; 2 × Master Mix 购自美国 Thermo Scientific 公司; DNA 抽提试剂盒、克隆试剂盒和 DNA Marker 购自北京天根生化科技有限公司; 甲基化处理试剂盒购自德国 Qiagen 公司; 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒和核酸染料购自上海生工生物工程股份有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因组 DNA 的重亚硫酸盐处理和纯化

**1.2.1.1 甲基化处理** 将标本分为肿瘤组、炎症组及对照组, 按照以下步骤处理: ① 分别提取 TFPI-2、ppENK 基因的 DNA 1 000 ng, 置入 95 °C 恒温水浴锅中 5 min; ② 分别加入 DNA protect Buffer 35 μl, 置入 60 °C 恒温水浴锅中 15 min; ③ 分别加入 Bisulfite Solution 85 μl, 置入 95 °C 恒温水浴锅中 5 min; ④ 分别加入除 RNA 酶的水补足到 140 μl, 置入 60 °C 恒温水浴锅中 15 min; ⑤ 再置入 30 °C 恒温水浴锅中 10 min。

**1.2.1.2 纯化** ① 处理后液体直接转入 1.5 ml EP 管中, 加入 310 μl 的 BL 液, 再加入 250 μl 的无水乙醇; ② 震荡 15 s 混匀, 转入吸附柱, 静置 5 min, 13 000 r/min 离心 1 min; ③ 加入 500 μl BW 液,

13 000 r/min 离心 1 min, 弃废液; ④ 加入 500 μl BD 液, 室温静置 15 min, 13 000 r/min 离心 1 min, 弃废液; ⑤ 加入 500 μl BW 液, 13 000 r/min 离心 1 min, 弃废液; ⑥ 重复步骤⑤; ⑦ 加入 250 μl 无水乙醇, 13 000 r/min 离心 1 min, 弃废液; ⑧ 换新收集管, 13 000 r/min 离心 2 min; ⑨ 将吸附柱放入 1.5 ml EP 管中, 开盖, 60 °C 干浴 5 min; ⑩ 在吸附柱膜上悬空滴加 15 μl EB, 静置 5 min, 13 000 r/min 离心 2 min 收集 DNA。处理后 DNA, -20 °C 保存。

### 1.2.2 PCR 扩增

**1.2.2.1 引物设计** ppENK F: 5'-TTTGTT-TAGAGG GTAATGTTGG-3', R: 5'-CACCTTTCCATC-TATAACCAT-3', 扩增产物: 481 bp, PCR 反应条件: 54 °C。ppENK 有 26 个 CpG 位点。TFPI-2 F: 5'-TAGGAGAAAGTTTGGGAGGTAGG-3', R: 5'-TTTC-TATCCTCCAACAAACATCAT-3', 扩增产物: 363 bp, PCR 反应条件: 59 °C。TFPI-2 有 26 个 CpG 位点。

**1.2.2.2 PCR 反应体系** ① 将纯化处理后的 DNA 加入 2 × Master Mix 25 μl, 置入 95 °C 升温水浴锅中 10 min; ② 加入 Mg<sup>2+</sup> 4 μl, 置入 95 °C 升温水浴锅中 30 s; ③ 加入 PCR 特异引物 F (10 μmol/L) 1 μl, 置入 72 °C 恒温水浴锅中 30 s; ④ 加入 PCR 特异引物 R (10 μmol/L) 1 μl 置入 72 °C 恒温水浴锅中 30 s; ⑤ 加入 ddH<sub>2</sub>O 至总体积为 50 μl, 置入 72 °C 恒温水浴锅中 10 min; ⑥ 4 °C 保存。

**1.2.2.3 电泳检测及回收** 1.5% 糖凝胶电泳观察结果(部分), 电泳图见图 1、2。

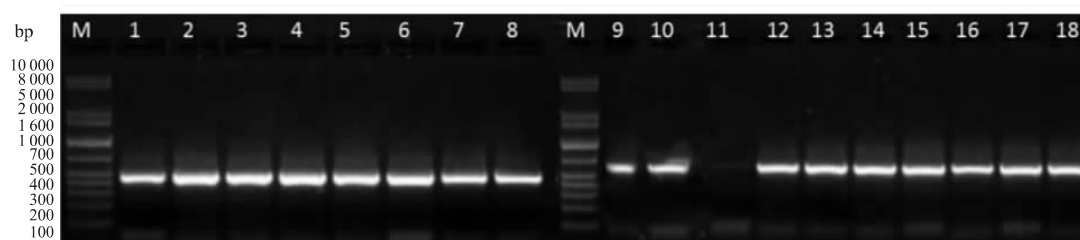


图1 ppENK 电泳检测图

M: Marker; 1: 对照组; 2~8: 肿瘤组; 9~18: 炎症组 ppENK 基因 nPCR 扩增片段 DNA 表达

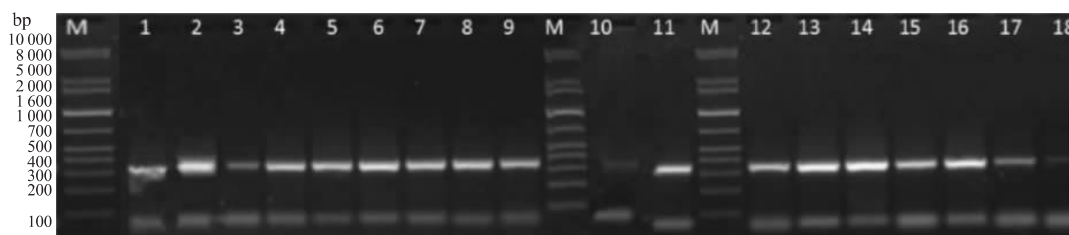


图2 TFPI-2 电泳检测图

M: Marker; 1: 对照组; 2~8: 肿瘤组; 9~18: 炎症组 TFPI-2 基因 nPCR 扩增片段 DNA 表达

### 1.2.3 PCR 纯化产物连接到 pGM-T 载

1.2.3.1 连接反应体系 取  $2 \times$  RapiLigation Mix  $5 \mu\text{l}$ , 加入 pGM-T Fast Vector  $1 \mu\text{l}$ , 再加入 PCR Product  $50 \text{ ng}$ , 最后加入 ddH<sub>2</sub>O 补足到  $10 \mu\text{l}$  ( $16^\circ\text{C}$  连接过夜)。

1.2.3.2 连接产物转化 ①  $100 \mu\text{l}$  感受态细胞, 置于冰上, 完全解冻后轻轻将细胞均匀悬浮; ② 加入  $10 \mu\text{l}$  连接液, 轻轻混匀。冰上放置  $30 \text{ min}$ ; ③  $42^\circ\text{C}$  水浴热激  $90 \text{ s}$ 。冰上放置  $2 \sim 3 \text{ min}$ ; ④ 加  $500 \mu\text{l}$  LB 培养基(无抗性),  $180 \text{ r/min}$ ,  $37^\circ\text{C}$  振荡培养  $1 \text{ h}$ ; ⑤ 室温下  $6000 \text{ r/min}$  离心  $2 \text{ min}$ , 用枪头吸掉  $400 \mu\text{l}$  上清液, 用剩余的培养基将细胞悬浮; ⑥ 将细菌涂布在预热的氨苄青霉素 LB 培养基平板(含抗性)上,  $37^\circ\text{C}$  倒置培养  $12 \sim 16 \text{ h}$ 。

1.2.4 阳性克隆鉴定和质粒提取与测定 (sanger B518188) ① 用牙签将长出的菌落挑至 LB 液体培养基(含抗性),  $200 \text{ r/min}$ ,  $37^\circ\text{C}$  振荡培养  $12 \sim 16 \text{ h}$ ; ② 将目的片段 TA 克隆的菌液 PCR 鉴定( $1.5\%$  糖凝胶电泳检测); ③ 将鉴定为阳性克隆的菌液进行质粒抽提; ④ 按图谱对质粒 M13 + /引物测序。

1.2.5 甲基化率的计算方式 BSP 产物为启动子区的 CpG 岛部位, 包含了 26 个 CpG 位点, 采取克隆测序每一个 CpG 位点的甲基化状态进行分析, 每个样本测 10 个克隆, 计算其 CpG 位的甲基化率。甲基化率计算为所有甲基化的 CG 位点在所有 CG 位点中的百分比。即甲基化 CG 位点个数/(甲基化

CG 位点个数 + 非甲基化位点个数)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析, 对肿瘤组与炎症组及正常组的比较行  $\chi^2$  检验。用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC) 分析 TFPI-2 基因、ppENK 基因的敏感度、特异度和曲线下面积(area under curve, AUC)。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 穿刺获得的少量组织条进行基因甲基化水平检测的可行性 86 例获得组织标本的病例中, 进行基因组 DNA 纯化和甲基化处理后的 PCR 扩增和测序, 其中有 79 例标本能够获得基因甲基化测序图, 进行基因甲基化检测的成功率达到  $91.9\%$  ( $79/86$ )。BSP 法检测基因甲基化水平的示意图见图 3。

2.2 胰腺癌组织、慢性胰腺炎组织、癌旁组织中 TFPI-2 和 ppENK 基因甲基化检测结果 本研究 79 例成功获得基因甲基化测序图的标本中, 肿瘤组为 67 例, 炎症组 12 例, 另取 10 例癌旁正常组织作为对照组。本研究对 79 例穿刺标本的 TFPI-2 和 ppENK 基因进行了甲基化检测, 结果显示: TFPI-2 和 ppENK 基因的甲基化检测率分别为  $95.9\%$  ( $75/79$ ) 和  $91.1\%$  ( $72/79$ ), 同时通过对该基因组 DNA 测序显示, 该两个基因 CpG 岛中有 26 个 CpG 位点。肿瘤组中 TFPI-2 基因甲基化率为  $(6.97 \pm 4.15)\%$ , ppENK 基因甲基化率为  $(5.25 \pm 2.97)\%$ , 炎症组中

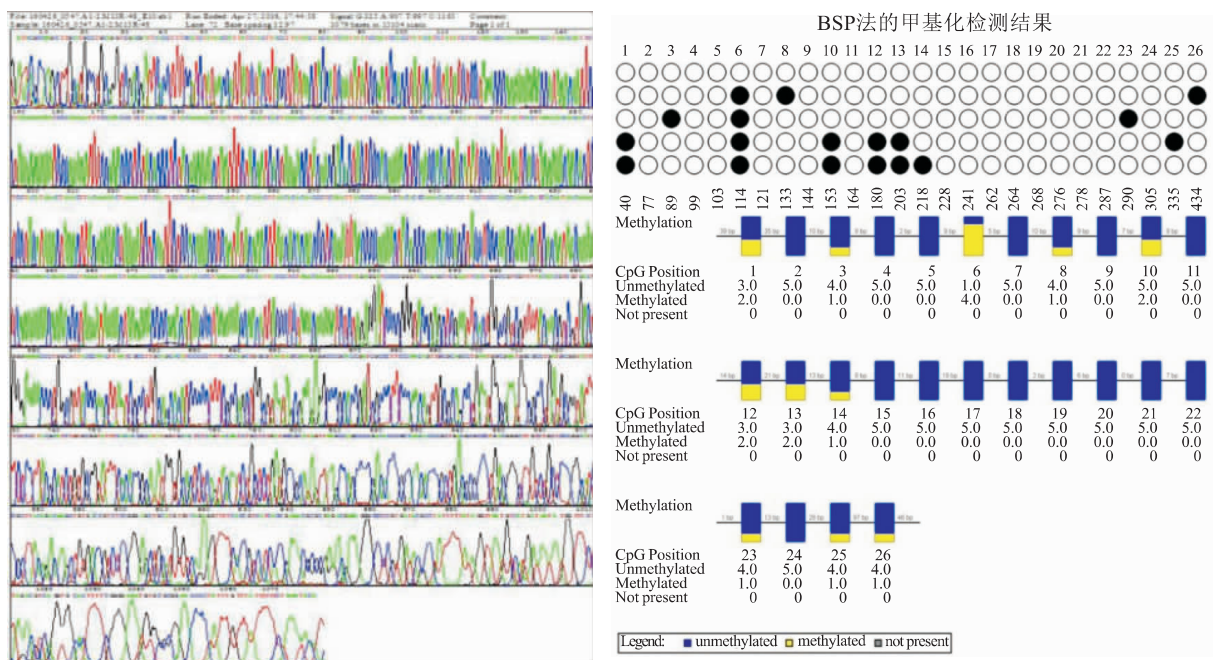


图3 BSP 法检测基因甲基化水平的示意图

TFPI-2 基因甲基化率(  $2.49 \pm 1.96$  ) % , ppENK 基因甲基化率(  $2.87 \pm 2.81$  ) % ,而对照组中,TFPI-2 基因甲基化(  $1.25 \pm 1.21$  ) % , ppENK 基因甲基化率(  $1.55 \pm 1.39$  ) % ,肿瘤组与炎症组 and 对照组差异均有统计学意义(  $P < 0.05$  ) ,而炎症组与对照组差异无统计学意义。见表 1 ~ 3。

表 1 基因 TFPI-2、ppENK 的甲基化水平 (  $n = 79$  )

项目	肿瘤 ( $n = 67$ )	炎症 ( $n = 12$ )	对照 ( $n = 10$ )	肿瘤 vs 炎症		炎症 vs 正常	
				$\chi^2$ 值	$P$ 值	$\chi^2$ 值	$P$ 值
TFPI-2 甲基化水平							
<3.3%	12	8	10	12.796	0.003 47	4.074	0.143
$\geq 3.3\%$	55	4	0				
ppENK 甲基化水平							
<3.52%	14	10	9	18.759	0.001 45	0.007	0.364
$\geq 3.52\%$	53	2	1				
TFPI-2 或 ppENK	62	5	1	—	—	—	—
TFPI-2 和 ppENK	50	2	0	—	—	—	—

表 2 各组中基因 TFPI-2、ppENK 的甲基化水平及其比较

项目	$n$	平均数	标准偏差	标准错误	95% $CI$	最小值	最大值
TFPI							
肿瘤组	67	6.966 4	4.146 73	0.506 00	5.955 0 ~ 7.977 9	0.00	17.25
炎症组	12	2.490 0	1.960 27	0.565 88	1.244 5 ~ 3.735 5	0.00	6.58
对照组	10	1.248 0	1.214 11	0.383 94	0.379 5 ~ 2.116 5	0.00	3.24
总计	89	5.720 3	4.290 18	0.454 76	4.816 6 ~ 6.624 1	0.00	17.25
ppENK							
肿瘤组	67	5.251 3	2.973 13	0.363 23	4.526 1 ~ 5.976 5	0.00	13.57
炎症组	12	2.865 0	2.810 56	0.811 37	1.079 2 ~ 4.650 8	0.00	10.50
对照组	10	1.549 0	1.385 48	0.438 13	0.557 9 ~ 2.540 1	0.00	4.25
总计	89	4.513 6	3.097 93	0.328 38	3.861 0 ~ 5.166 2	0.00	13.57

表 3 多重比较

因变数	(I) 组别	(J) 组别	平均差异(I-J)	标准错误	显著性	95% $CI$
TFPI-2 LSD	肿瘤	炎症	4.476 42	1.166 24	0.000	2.158 0 ~ 6.794 8
		对照组	5.718 42	1.261 28	0.000	3.211 1 ~ 8.225 8
	炎症	肿瘤	-4.476 42	1.166 24	0.000	-6.794 8 ~ -2.158 0
		对照组	1.242 00	1.593 03	0.438	-1.924 8 ~ 4.408 8
	对照组	肿瘤	-5.718 42	1.261 28	0.000	-8.225 8 ~ -3.211 1
		炎症	-1.242 00	1.593 03	0.438	-4.408 8 ~ 1.924 8
	Dunnett T3	炎症	4.476 42	0.759 52	0.000	2.568 1 ~ 6.384 8
		对照组	5.718 42	0.635 65	0.000	4.147 9 ~ 7.289 0
ppENK LSD	肿瘤	炎症	-4.476 42	0.759 52	0.000	-6.384 8 ~ -2.568 1
		对照组	1.242 00	0.683 83	0.228	-0.543 0 ~ 3.027 0
	炎症	肿瘤	-5.718 42	0.635 65	0.000	-7.289 0 ~ -4.147 9
		炎症	-1.242 00	0.683 83	0.228	-3.027 0 ~ 0.543 0
	对照组	肿瘤	2.386 34	0.886 34	0.009	0.624 4 ~ 4.148 3
		对照组	3.702 34	0.958 56	0.000	1.796 8 ~ 5.607 9
	Dunnett T3	炎症	-2.386 34	0.886 34	0.009	-4.148 3 ~ -0.624 4
		对照组	1.316 00	1.210 69	0.280	-1.090 8 ~ 3.722 8
TFPI-2 LSD	肿瘤	炎症	-3.702 34	0.958 56	0.000	-5.607 9 ~ -1.796 8
		炎症	-1.316 00	1.210 69	0.280	-3.722 8 ~ 1.090 8
	炎症	肿瘤	2.386 34	0.888 96	0.047	0.026 5 ~ 4.746 2
		对照组	3.702 34	0.569 11	0.000	2.246 9 ~ 5.157 7
	对照组	炎症	-2.386 34	0.888 96	0.047	-4.746 2 ~ -0.026 5
		对照组	1.316 00	0.922 10	0.419	-1.117 8 ~ 3.749 8
	Dunnett T3	肿瘤	-3.702 34	0.569 11	0.000	-5.157 7 ~ -2.246 9
		炎症	-1.316 00	0.922 10	0.419	-3.749 8 ~ 1.117 8



**2.3 TFPI-2 基因、ppENK 基因甲基化水平诊断胰腺癌的敏感度与特异度分析结果** ROC 曲线结果显示: TFPI-2 基因、ppENK 基因甲基化水平诊断胰腺癌的敏感度分别为 83.6%、74.6%, 特异度分别为 81.8%、86.4%, 诊断率分别为 89.7%、81.2%, 以 TFPI-2 基因或 ppENK 基因甲基化水平诊断胰腺癌的敏感度为 92.5%, 特异度为 79.8%, 而以基因 TFPI-2 和 ppENK 甲基化水平进行诊断, 其敏感度为 74.6%, 特异度为 91.7%。见图 4、表 4。

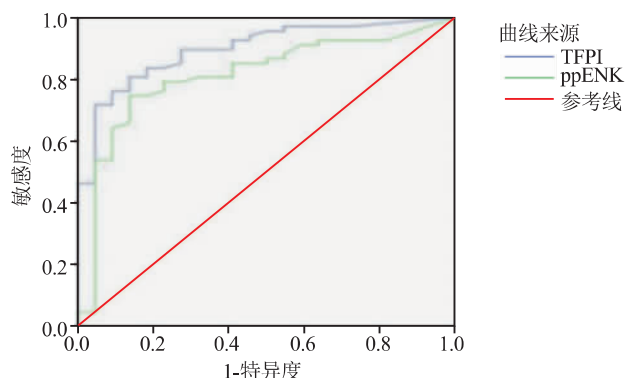


图 4 TFPI-2 和 ppENK 基因甲基化水平的 ROC 曲线

**2.4 评价 TFPI-2 和 ppENK 基因甲基化水平对 EUS-FNA 诊断失败病例中的诊断价值** 将 17 例穿刺无法获得明确病理诊断的病例单独分析, 结果显示有 2 例无法获得满意的基因测序图, 予以剔除, 15

例完成 TFPI-2 和 ppENK 基因甲基化的检测, 其中肿瘤 11 例, 4 例慢性胰腺炎, 肿瘤组中, TFPI-2 甲基化率大约 >3.3% 的为 8 例 (72.7%), ppENK 甲基化率大约 >3.52% 的为 5 例 (45.5%), 而慢性炎症组中 TFPI-2 甲基化率大约 >3.3% 的为 0 例, ppENK 甲基化率大约 >3.52% 的为 1 例 (25%), TFPI-2 基因甲基化对胰腺肿瘤的诊断敏感度为 72.7%, 特异度为 100.0%, 而 ppENK 甲基化对胰腺肿瘤的诊断敏感度为 45.5%, 特异度为 75.0%。将两者结合进行统计结果显示, 肿瘤组中 TFPI-2 或 ppENK 基因高甲基化水平的高达 10 例 (90.9%), TFPI-2 和 ppENK 基因高甲基化水平仅为 6 例 (54.5%), 而炎症组中 TFPI-2 或 ppENK 基因高甲基化水平有 1 例, 而 TFPI-2 和 ppENK 基因高甲基化水平为 0 例。见表 5。

**2.5 EUS-FNA 联合 TFPI-2 和 ppENK 基因甲基化检测对胰腺占位性病变的临床诊断价值** 联合 EUS-FNA 和基因甲基化水平测定, 结果显示联合检测的诊断率高达 93.0%, 较单独检测高 ( $P < 0.05$ ), 但是如果检测 TFPI-2 和 ppENK 基因甲基化均阳性作为诊断标准, 则其与单纯检测差异无统计学意义。见表 6。

### 3 讨论

胰腺癌是消化道常见的恶性肿瘤, 其发生发展

表 4 曲线下的区间

测试结果变数	区域图	标准错误	渐进显著性	95% CI
TFPI-2	0.897	0.035	0.000	0.828 ~ 0.966
ppENK	0.812	0.053	0.000	0.708 ~ 0.915

表 5 TFPI-2 和 ppENK 基因在穿刺无法明确病理的病例中的甲基化水平 ( $n = 15$ )

项目	$n$	TFPI-2 甲基化水平		ppENK 甲基化水平		TFPI-2 或 ppENK	TFPI-2 和 ppENK
		<3.3%	≥3.3%	<3.52%	≥3.52%		
肿瘤	11	3	8	6	5	10	6
炎症	4	4	0	3	1	1	0
$\chi^2$ 值	—	6.234		0.511		—	—
$P$ 值	—	0.013		0.475		—	—

表 6 EUS-FNA 联合 TFPI-2 和 ppENK 基因甲基化检测在胰腺占位性病变的临床诊断价值 ( $n = 86$ )

项目	EUS-FNA	TFPI-2 或 ppENK 甲基化水平	TFPI-2 和 ppENK 甲基化水平	EUS-FNA + (TFPI-2 或 ppENK)	EUS-FNA + (TFPI-2 和 ppENK)
已诊断	69 (80.2%)	67 (77.9%)	52 (60.5%)	80 (93%)	75 (87.2%)
未诊断	17	23	32	6	11
$\chi^2$ 值	—	—	—	6.073	1.536
$P$ 值	—	—	—	0.014	0.215

涉及到多种抑癌基因的异常沉默或失活。

EUS-FNA 通过其优势将活检的准确性提高了很多,但由于其收集的组织标本较少,仍然存在较高的假阴性率,出现假阴性率的原因分析包括获取的组织标本少、病理科医师技术水平和穿刺的准确性等。据报道,EUS-FNA 的诊断敏感度和准确度随着各个胰腺中心的穿刺经验和病理科诊断水平的不同而不同,从 75% ~ 95% 不等<sup>[5-6]</sup>。随着分子生物学技术的发展及深入研究,表观遗传修饰的异常导致的基因突变或缺失被认为是肿瘤发生的主要原因,由此出现了表观遗传修饰异常标志物在诊断肿瘤中的应用,微阵列技术先后应用于乳腺癌、肺癌和胰腺癌等肿瘤 CpG 岛甲基化研究,获得的 CpG 岛甲基化谱不仅可作为早期诊断指标,还与肿瘤的病理分型、药物治疗敏感性和预后判断相关<sup>[7]</sup>。本研究通过采用 BSP 法检测 EUS-FNA 获得的胰腺病灶组织条中 ppENK 和 TFPI-2 基因启动子区 CPG 岛的甲基化状态,结果提示穿刺获得的组织条完全能够满足基因甲基化水平的检测。

ppENK 基因位于 8 号染色体,所编码的阿片类生长因子在延迟细胞周期进程,抑制癌细胞增长的过程中起重要作用<sup>[8-9]</sup>。据报道,超过 90% 的胰腺癌 ppENK 基因甲基化异常<sup>[10]</sup>。TFPI-2 又称胎盘蛋白-5,是由位于 7q22 染色体上的 TFPI-2 基因所编码的一种丝氨酸蛋白酶抑制物<sup>[11]</sup>。可以通过负调节纤维蛋白酶和胰蛋白酶的活性抑制肿瘤的侵袭和转移,激活金属蛋白酶和细胞外基质的降解<sup>[12-13]</sup>,另外,还可以抑制内皮细胞的增殖,促进平滑肌细胞凋亡<sup>[14]</sup>。肿瘤组、炎症组及正常对照组的甲基化率结果提示肿瘤组患者的 TFPI-2 和 ppENK 基因甲基化率明显高于炎症组及正常对照组患者。这表明甲基化水平是影响抑癌基因( TFPI-2 基因与 ppENK 基因)表达的重要因素,胰腺癌患者抑癌基因处于高表达状态,而非胰腺癌患者处于未表达状态。ROC 曲线结果提示 TFPI-2 基因和 ppENK 基因的甲基化水平对于诊断胰腺癌具有较高的灵敏度与特异度。此外,根据对于 TFPI-2 和 ppENK 基因甲基化水平对 EUS-FNA 诊断失败病例中的诊断价值的分析可以发现联合 TFPI-2 或 ppENK 基因甲基化检测可以明显提高胰腺占位性病变的肿瘤诊断率。

综上所述,胰腺癌患者的 TFPI-2 基因和 ppENK 基因处于高甲基化水平,其与 EUS-FNA 联合检测能

提高诊断率,对于诊断胰腺癌有重要作用,可作为临床胰腺癌术前诊断的重要指标。但该方法需要超声内镜引导下 EUS-FNA 取得胰腺癌的标本,EUS-FNA 穿刺的准确性将决定本研究方法的可行性。此外,本研究尚缺乏 TFPI-2 和 ppENK 基因启动子甲基化是否与基因表达相关,其具体作用机制有待后续实验进一步探讨。

## 参考文献

- [1] Hidalgo M. Pancreatic cancer [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(17): 1605-17.
- [2] Bassi C, Dervenis C, Butturini G, et al. Postoperative pancreatic fistula: An international study group (ISGPF) definition [J]. *Surgery*, 2005, 138(1): 8-13.
- [3] Levy M J, Oberg T N, Campion M B, et al. Comparison of methods to detect neoplasia in patients undergoing endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(5): 1112-21.
- [4] Sun F K, Sun Q, Fan Y C, et al. Methylation of tissue factor pathway inhibitor 2 as a prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after hepatectomy [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 31(2): 484-92.
- [5] Buscail L, Faure P, Bournet B, et al. Interventional endoscopic ultrasound in pancreatic diseases [J]. *Pancreatology*, 2006, 6(1-2): 7-16.
- [6] Al-Haddad M, Eloubeidi M A. Interventional EUS for the diagnosis and treatment of locally advanced pancreatic cancer [J]. *JOP*, 2010, 11(1): 1-7.
- [7] Issa J P. CpG island methylator phenotype in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(12): 988-93.
- [8] Ohtsubo K, Watanabe H, Yao F, et al. Preproenkephalin hypermethylation in the pure pancreatic juice compared with p53 mutation in the diagnosis of pancreatic carcinoma [J]. *J Gastroenterol*, 2006, 41(8): 791-7.
- [9] Jiao L, Zhu J, Hassan M M, et al. K-ras mutation and p16 and preproenkephalin promoter hypermethylation in plasma DNA of pancreatic cancer patients: in relation to cigarette smoking [J]. *Pancreas*, 2007, 34(1): 55-62.
- [10] Ueki T, Toyota M, Skinner H, et al. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(23): 8540-6.
- [11] Rollin J, Iochmann S, Bléchet C, et al. Expression and methylation status of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in non-small-cell lung cancer [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(4): 775-83.
- [12] Gerecke C, Scholtka B, Löwenstein Y, et al. Hypermethylation of ITGA4, TFPI2 and VIMENTIN promoters is increased in inflamed colon tissue: putative risk markers for colitis-associated cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(12): 2097-107.

- [13] Hubé F, Reverdiau P, Iochmann S, et al. Transcriptional silencing of the TFPI-2 gene by promoter hypermethylation in choriocarcinoma cells [J]. *Biol Chem*, 2003, 384(7): 1029–34.
- [14] Yu J, Liu R L, Luo X P, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 gene polymorphisms associate with coronary atherosclerosis in Chinese population [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(42): 1675.

## The feasibility and application of the methylation status detection of ppENK gene and TFPI-2 gene in the pancreatic space occupying lesions tissue strip obtained by EUS-FNA

Qi Can, Huang Qiang, Liu Chenhai, et al

(Dept of General Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract** *Objective* To detect the methylation status of ppENK gene and TFPI-2 gene in pancreatic tissue, and to explore the feasibility and application of the methylation status detection of ppENK gene and TFPI-2 gene in the pancreatic space occupying lesions obtained by EUS-FNA. *Methods* The methylation status of CPG islands in the promoter region of ppENK gene and TFPI-2 gene in 86 cases pancreatic cancer tissues and adjacent tissues were detected by bisulfite genomic sequencing PCR (BSP), and the clinical pathological characteristics between pancreatic cancer and adjacent tissues were analyzed by Logistic. *Results* In this study of 86 cases, the success rate of methylation was 91.9% (79/86). The detection rates of methylation of TFPI-2 gene and ppENK gene were 95.9% (75/79) and 91.1% (72/79), respectively. There were significant statistical differences between the tumor group and the normal control group ( $P < 0.05$ ), while there was no significant difference between the inflammatory group and the normal control group. The results of receiver operating characteristic curve showed that the sensitivity of TFPI-2 gene and ppENK gene methylation level in the diagnosis of pancreatic space occupying lesions were 83.6% and 74.6%, respectively, and the specificity was 81.8% and 86.4% respectively, diagnosis rate was 89.7% and 81.2% respectively. The diagnosis of pancreatic space occupying lesions sensitivity of the methylation level of TFPI-2 gene or ppENK gene was 92.5%, the specificity was 79.8%, and the sensitivity of the TFPI-2 gene and ppENK gene methylation level of diagnosis of pancreatic space occupying lesions was 74.6%, the specificity was 91.7%. *Conclusion* TFPI-2 and ppENK genes have high methylation level in pancreatic neoplasms and have good sensitivity and specificity. It is a useful diagnostic index for pancreatic cancer. Combined with EUS-FNA, it can effectively improve the preoperative diagnosis.

**Key words** pancreatic neoplasms; pancreatic cancer; ppENK; TFPI-2; methylation; EUS-FNA