

## • 论著 •

胶质瘤 MGMT 启动子甲基化定量检测的  
MS-HRM 方法建立及评估袁国强<sup>1</sup>, 潘亚文<sup>1,2</sup>, 王晓清<sup>1</sup>, 周旺宁<sup>2\*</sup>

1. 兰州大学第二医院神经病学研究所, 甘肃 兰州 730030

2. 兰州大学第二医院神经外科, 甘肃 兰州 730030

**摘要:** 目的 建立甲基化特异高分辨率溶解曲线 (Methylation sensitive high resolution melting curve, MS-HRM) 定量检测胶质瘤 MGMT 基因启动子甲基化的方法, 用于指导胶质瘤患者术后化疗及预后判断。方法 从标本库随机选取胶质瘤组织 37 例, 提取 DNA 进行甲基化修饰, 应用 MS-HRM 方法和甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 进行 MGMT 基因启动子区甲基化检测。结果 MSP 方法检测显示部分甲基化标本 29 例 (78.4%), 较甲基化 (13.5%) 和未甲基化 (8.1%) 差异显著。MS-HRM 发现 MGMT 基因启动子甲基化水平在 10% ~ 25% 和 25% ~ 50% 的标本分别有 14 例 (37.8%) 和 17 例 (49.5%)。结论 成功建立 MS-HRM 检测胶质瘤 MGMT 启动子甲基化的方法, 该方法特异性高、灵敏度强和可重复性, 有望应用于临床胶质瘤 MGMT 启动子甲基化高通量定量检测, 以指导个体化治疗。

**关键词:** 甲基化特异高分辨率溶解曲线技术; 胶质瘤; O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶; 启动子甲基化

Establishment and assessment of methylation-sensitive high-resolution melting approach for quantitative determination of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in gliomas

YUAN Guo-qiang<sup>1</sup>, Pan Ya-wen<sup>1,2</sup>, WANG Xiao-qing<sup>1</sup>, ZHOU Wang-ning<sup>2\*</sup> 1. Neurology Institute, The Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou, Gan su 730030; 2. Department of Neurosurgery, The Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou, Gan su 730030

**Abstract: Objective** To establish a method for quantitative determination of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in gliomas using methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM) curve, which is used as a guide to postoperative chemotherapy and prognostic prediction in patients with gliomas. **Methods** Glioma tissues from 37 patients were randomly selected from the specimen bank. DNA was extracted and modified by methylation. The MGMT promoter methylation level was determined by MS-HRM and methylation-specific PCR (MSP). **Results** According to the results of MSP, the number of specimen with partial methylation reached 29 (78.4%), which was significantly larger than that of specimen with full methylation (13.5%) or no methylation (8.1%). The results of MS-HRM analysis demonstrated that 14 specimen (37.8%) had their MGMT promoter methylation levels ranging between 10% and 25%, and 17 specimen (49.5%) between 25% and 50%. **Conclusions** This study successfully establishes a method for determination of MGMT promoter methylation in gliomas using MS-HRM. This method is highly specific, sensitive, and repeatable, which holds promise for clinical high-throughput quantitative determination of MGMT promoter methylation and a guide to personalized medication.

**Key words:** Methylation-sensitive high-resolution melting curve; Gliomas; O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase; Promoter methylation

胶质瘤是发病率最高的原发性脑肿瘤, 包括多种组织类型和不同恶性程度。分子神经肿瘤学的发展促使脑肿瘤的神经病理学诊断不再局限于提供肿瘤组织学类型和恶性级别的信息, 取而代之

的是临床相关的分子检测。O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase, MGMT) 位于 10 号染色体 q26, 编码 DNA 修复酶, 该酶可以移除鸟嘌呤 O<sup>6</sup> 基团的烷基<sup>[1]</sup>。由于鸟嘌呤

基金项目: 中国抗癌协会神经肿瘤研究项目, 项目编号: CSNO-2013-MS008; 兰州市科技计划项目, 项目编号: 2013-3-27; 甘肃卫生行业科研计划项目, GSWSKY-2015-58。

收稿日期: 2015-09-09; 修回日期: 2015-11-17

作者简介: 袁国强 (1979-), 男, 助理研究员, 博士, 主要从事脑肿瘤发病机制研究。

通讯作者: 周旺宁 (1946-), 男, 主任医师, 博士, 主要从事胶质瘤临床治疗及发病机制研究。

岭 O<sup>6</sup> 烷基化导致的双链分解和错配,进而诱导细胞凋亡。约 35%~45% 的恶性胶质瘤( WHO III 级和 IV 级) 和 80% WHO II 级胶质瘤存在 MGMT 启动子甲基化现象。生存期较长的胶质母细胞瘤患者,易发生 MGMT 启动子甲基化<sup>[2,3]</sup>。MGMT 启动子甲基化状态可预测服用烷化剂药物的胶质母细胞瘤患者生存期的独立因子<sup>[4,5]</sup>。

本研究拟通过 MS-HRM 定量检测 MGMT 基因启动子甲基化,以期建立一种高效、准确和便捷检测胶质瘤 MGMT 基因启动子甲基化的方法,为胶质瘤患者个体化疗提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 样本来源

随机从兰州大学第二医院神经病学研究所标本库中选取胶质瘤石蜡标本 37 例,所选标本均经过临床诊断和病理科证实。

### 1.2 仪器与试剂

QIAamp-DNA-FFPE-Tissue-Kit( QIAGEN,德国), Bisulfite-Kit( QIAGEN,德国), PCR-Control-DNA-Human( QIAGEN,德国), HRM-PCR-Kit( QIAGEN,德国), Nanodrop 2 000( Thermo,美国), Roto-gene 6 000( Corbett,澳大利亚)。

### 1.3 方法

1.3.1 石蜡组织 DNA 提取 使用 QIAamp-DNA-FFPE-Tissue-Kit 试剂盒从石蜡包埋组织提取 DNA。采用 Nanodrop 2000 测定 DNA 浓度,并定量至 5 ng/μl,至于 -20℃ 冰箱待用。

1.3.2 亚硫酸钠进行基因组 DNA 甲基化修饰 取上述 DNA 样本 1 μg 使用 CpGenome 甲基化试剂盒,按照 Bisulfite-Kit 试剂盒说明书进行甲基化修饰,之后用 Nanodrop 2000 定量至 5 ng/μl。

1.3.3 引物设计 使用 MethyPrimer 软件设计 MGMT 基因启动子区引物(表 1),并由生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 MGMT 基因启动子区引物序列

引物名称	序列(5'-3')	T <sub>m</sub> (℃)	产物长度 (bp)
MSP			
MGMT unm F	TTTGTTGTTTGTGTTTGTAGGTTTGT	57	93
MGMT unm R	AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAACA		
MGMT met F	TTTCGACGTTCTGAGGTTTTCGC	60	81
MGMT met R	GCACTCTTCCGAAAACGAAACG		
MS HRM			
MGMT met F	TGTTAGTTTGTATAGAAAAGGGGAG	60	144
MGMT met R	TATATCCCTTAAAAAACCAAAATC		

1.3.4 MSP 反应条件: 95℃ 预变性 15 min; 95℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 45 s, 40 个循环。PCR 结束后,取反应产物 8 μl 行琼脂糖凝胶电泳,之后在凝胶成像系统下扫描成像。甲基化与否的评价标准: 若基因启动子发生了甲基化,则用甲基化特异性引物可扩增出相应大小的条带;若未发生甲基化,则用非甲基化特异性引物可扩增出相应大小的条带;若基因启动子同时发生甲基化和未发生甲基化,则用甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物可同时扩增出相应大小的条带。

1.3.5 标准品的配制和 HRM 的建立 PCR 反应体系为: 总反应体积为 25 μl, 2 × HRM PCR Master Mix 12.5 μl, 上、下游引物各 1.9 μl, DNA 模板 2 μl, 灭菌水补足 25 μl。反应程序: 预变性 95℃ 5 min; 扩增 95℃ 10 s, 60℃ 15 s, 72℃ 25 s, 共 50 个循环; 熔解 95℃ 1 min, 40℃ 1 min, 65℃ 1 s。HRM 条件为: 95℃ 2 min, 40℃ 预处理 2 min 后, T<sub>m</sub> 72℃~90℃, 每升高 0.1℃ 采集 1 次数据。以 Cp Genome universal methylated 作为 100% 甲基化的标准品,以 100% 非甲基化的健康人组织 DNA 作为稀释剂,将两者浓度调至相同水平,按不同比例分别配成甲基化程度为 100%、50%、25%、10%、5% 和 0% 系列浓度的标准曲线。用 HRM 方法检测 0~100% 标准品得到的荧光信号的强度。据此建立标准曲线。同时以修饰后标本的 DNA 为模板,用上述相同方法检测,根据待测标本在标准曲线上的位置判定其甲基化程度。每份标本重复检测 3 次,最后结果为其平均甲基化程度。

1.3.6 统计学分析 用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,两组间比较 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MSP 法检测胶质瘤 MGMT 基因启动子甲基化水平

结果显示在 37 例标本中,发现甲基化标本 5 例(13.5%),未甲基化标本 3 例(8.1%),而部分甲基化标本 29 例(78.4%)(图 1 和表 2)。

### 2.2 MS-HRM 法检测胶质瘤 MGMT 基因启动子甲基化水平

成功建立了甲基化标准品 HRM 曲线(图 2),待测样本在标准曲线上的位置表示其 MGMT 基因启动子甲基化程度(图 3)。MSP 检测的 3 例未甲基化标本,经 MS-HRM 检测发现 MGMT 基因启动

子甲基化水平在 0% ~ 5% 和 5% ~ 10% 分别有 2 例和 1 例。在所检测的标本中 MGMT 基因启动子甲基化水平在 10% ~ 25% 和 25% ~ 50% 的分别有 14 和 17 例(表 3)。



图 1 MSP 检测胶质瘤标本 MGMT 启动子甲基化。标本 G31、G127、G47 和 G72 甲基化和未甲基化条带同时出现,属部分甲基化,而 G82 和 G75 只出现甲基化条带,属完全甲基化。“M”表示甲基化,“U”表示未甲基化。

表 2 37 例胶质瘤标本 MSP 方法检测的甲基化情况

甲基化情况	例数	比率
甲基化	5	13.5%
未甲基化	3	8.1%
部分甲基化	29	78.4% **

\*\*  $P < 0.01$

表 3 37 例胶质瘤标本 MS-HRM 方法检测的甲基化情况

甲基化情况	例数	比率
0% ~ 5%	2	5.4%
5% ~ 10%	1	2.7%
10% ~ 25%	14	37.8% **
25% ~ 50%	17	45.9% **
50% ~ 100%	3	8.1%

\*\*  $P < 0.01$

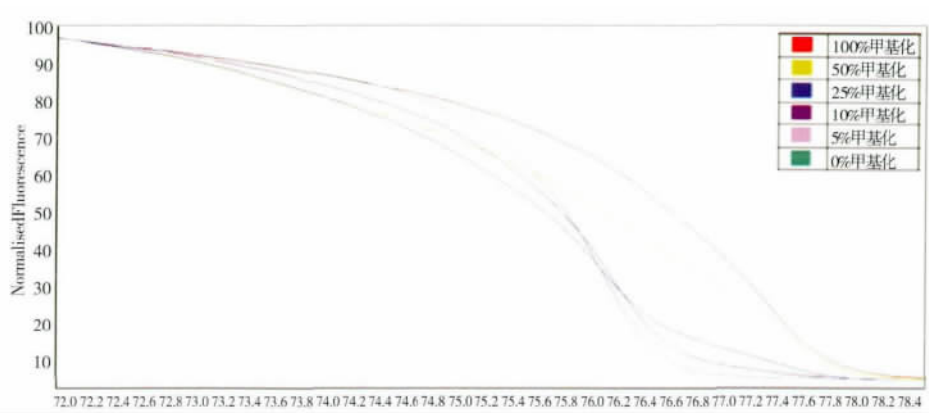


图 2 甲基化标准品高分辨率熔解曲线图。从左至右依次为 0%、5%、10%、25%、50% 和 100% 甲基化。

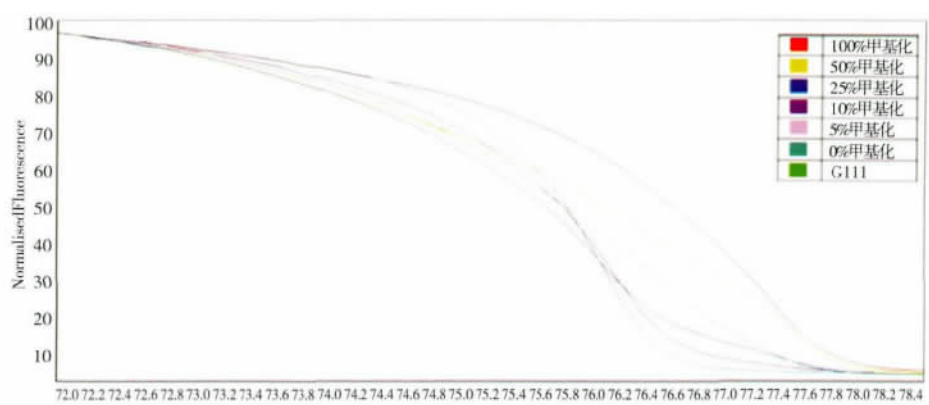


图 3 G111 号标本 MGMT 基因启动子甲基化标准品高分辨率熔解曲线图。G111 启动子甲基化水平在 25% ~ 50% 区域。

### 3 讨论

MGMT 基因启动子区 CpG 岛甲基化导致该基因失活,这涉及表观遗传学基因沉默<sup>[6]</sup>。接受 TMZ/RT 治疗且 MGMT 启动子区甲基化的患者,中位生存期和两年生存率分别是 22 个月和 46%。

而接受同样治疗方法 MGMT 启动子区未甲基化的患者中位生存期和两年生存率分别是 13 个月和 14%。MGMT 启动子甲基化的老年患者(>65 岁)服用 TMZ 总生存期有所延长,而未甲基化的患者单独放疗效果更明显。对老年患者来说,MGMT 启

动子甲基化状态是用于个体治疗的重要生物标记<sup>[7,8]</sup>。因此, MGMT 启动子区甲基化与胶质瘤患者生存期和生存率密切相关, 有必要建立一种高效检测胶质瘤 MGMT 启动子甲基化的方法, 以指导患者进行个体化治疗。

本研究发现胶质瘤组织中有 3 例标本采用 MSP 方法未能检测到 MGMT 基因甲基化。用 MS-HRM 方法进一步检测发现, 这 3 例标本甲基化水平在 0% ~ 5% 和 10% ~ 25% 区域的标本分别有 2 例和 1 例。该结果表明这 3 例标本中 MGMT 启动子甲基化水平很低, MS-HRM 法比 MSP 法有更高的灵敏度。MSP 需两对已知的关键性 CpG 位点设计上、下游引物, 并且这些位点必须完全甲基化或完全不甲基化, 满足该条件的基因数目不多, 具有明显的基因“选择性”。同时, MSP 检测灵敏度约为 10%, 只能粗略定量基因启动子甲基化程度, 临床诊断的意义较低, 结果重现性差。与 MSP 方法相比, MS-HRM 分析引物侧翼序列上所有甲基化位点, 简单、准确和快速地实现定量分析。MS-HRM 检测低达 0.1% 的基因启动子甲基化和分析出 1 bp 的差异<sup>[9,10]</sup>。

MS-HRM 对 PCR 产物没有破坏性, 还能进行测序等后续分析<sup>[11]</sup>。此外, MS-HRM 建立标志曲线后, 可以进行高通量分析基因启动子甲基化, 效率提高, 费用降低, 适合于临床检测。而其他检测基因启动子甲基化的方法如测序和质谱存在设备要求高、操作繁琐和成本高等弊端。

本研究建立的 MS-HRM 定量检测 MGMT 启动子甲基化的方法, 适用于临床高通量检测胶质瘤 MGMT 启动子甲基化水平, 有利于指导胶质瘤患者合理选择用药。

#### 参 考 文 献

- [1] Pegg AE. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res*, 2000, 462(2-3): 83-100.
- [2] Baur M, Preusser M, Piribauer M, et al. Frequent MGMT (O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase) hypermethylation in longterm survivors of glioblastoma: a single institution experience. *Radiol Oncol*, 2010, 44(2): 113-120.
- [3] Chen C, Wang F, Cheng Y et al. Predictive value of MGMT promoter methylation status in Asian and Caucasian patients with malignant gliomas: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4): 6553-6562.
- [4] Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*, 2000, 343(19): 1350-1354.
- [5] Bienkowski M1, Berghoff AS, Marosi C et al. Clinical Neuropathology practice guide 5 - 2015: MGMT methylation pyrosequencing in glioblastoma: unresolved issues and open questions. *Clin Neuropathol*, 2015, 34(5): 250-257.
- [6] Tanaka K, Sasayama T, Mizukawa K, et al. Combined IDH1 mutation and MGMT methylation status on long-term survival of patients with cerebral low-grade glioma. *Clin Neurol Neurosurg*, 2015, 138: 37-44.
- [7] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Eng J Med*, 2005, 352(10): 997-1003.
- [8] Chang-Halpenny CN, Yeh J, Lien WW. Elderly patients with glioblastoma multiforme treated with concurrent temozolomide and standard-versus abbreviated-course radiotherapy. *Perm J*, 2015, 19(1): 15-20.
- [9] 闫瑾, 方旭前, 任长庆, 等. MSP-DHPLC 技术检测 MGMT 基因甲基化的应用评价. *分子诊断与治疗杂志*, 2011, 3(1): 6-9.
- [10] Wojdacz TK, Dobrovic A, Algar EM. Rapid detection of methylation change at H19 in human imprinting disorders using methylation-sensitive high-resolution melting. *Human Mutation*, 2008, 29(10): 1-6.
- [11] Wu W, Zhang J, Yang H et al. Examination of AKAP12 promoter methylation in skin cancer using Methylation-sensitive high-resolution melting analysis. *Clin Exp Dermatol*, 2011, 36(4): 381-385.