

· 论著 ·

GRHL2与MLH1的表达与非小细胞肺癌临床特征的相关性研究

张杰*

天津市滨海新区大港中医医院呼吸内科 (天津 300270)

【摘要】目的 探究粒状头样2 (grainyhead like 2, GRHL2) 表达、Mutl homolog 1 (MLH1) 甲基化与非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者临床特征的相关性。**方法** 回顾整理2016年1月至2021年4月在天津市滨海新区大港中医医院就诊, 经手术并治疗确诊的NSCLC患者486例; 整理所有患者临床资料, 分析所有患者GRHL2、MLH1的表达情况、肿瘤分类、临床分期、预后等情况。**结果** 486例NSCLC患者, 在年龄>40、肿瘤大小>3cm、临床分期为II~III期、淋巴结发生转移、组织类型为鳞癌的患者较多, 且差异较为明显 ($P < 0.01$)。GRHL2在癌组织中379例呈现高表达, 107例低表达, 而在癌旁组织中187例呈现高表达, 299例呈现低表达, GRHL2在癌组织中呈现高表达趋势, 在癌旁组织中, 呈低表达趋势; GRHL2在癌组织与癌旁组织的表达具有明显差异 ($P < 0.01$)。在NSCLC中MLH1基因甲基化占比为46.84%, 其中部分甲基化为34.29%; 完全甲基化为12.55%。在癌旁组织中甲基化占比为24.61%, 其中部分甲基化为5.52%; 完全甲基化为19.09%。NSCLC中MLH1基因甲基化程度明显高于癌旁组织 ($P < 0.01$)。Spearman分析显示, GRHL2的表达与肿瘤大小, 临床分期, 淋巴结转移均存在显著相关 ($P < 0.01$), 与组织类型明显相关 ($P < 0.05$), 但与年龄, 性别无明显相关性 ($P > 0.05$)。MLH1甲基化、GRHL2高表达与NSCLC患者生存时间成反比 ($P < 0.01$)。**结论** MLH1甲基化、GRHL2差异表达与NSCLC患者肿瘤大小, 临床分期, 淋巴结转移情况密切相关, 同时与患者预后具有明显相关性, 在NSCLC的治疗过程中具有重要的参考价值。

【关键词】GRHL2、MLH1、非小细胞肺癌、临床特征

【中图分类号】R563

【文献标识码】A

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.07.012

Correlation between The Expression of GRHL2 and MLH1 and The Clinical Features of Non-small Cell Lung Cancer

ZHANG Jie*

Department of Respiratory Medicine, Dagang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Binhai New Area, Tianjin 300270, China

Abstract: Objective To explore the correlation between GRHL2 expression, MLH1 methylation and clinical features of patients with non-small cell lung cancer. **Methods** From January 2016 to April 2021, 486 patients with non-small cell lung cancer were treated in Tianjin Binhai New Area Dagang Hospital of Traditional Chinese Medicine. The expression of GRHL2 and MLH1, tumor classification, clinical stage and prognosis were analyzed. **Results** In 486 patients with non-small cell lung cancer, there were more patients with age >40, tumor size >3cm, clinical stage II-III, lymph node metastasis, tissue type squamous cell carcinoma, and the difference was more obvious ($P < 0.01$). GRHL2 was highly expressed in 379 cases of cancer tissue, low in 107 cases, high in 187 cases of adjacent tissues and low in 299 cases; GRHL2 showed a high expression trend in cancer tissues and a low expression trend in adjacent tissues. The expression of GRHL2 was significantly different in cancer tissues and adjacent tissues. In non-small cell lung cancer (NSCLC), the proportion of methylation of MLH1 gene was 46.84%, of which partial methylation was 34.29% and total methylation was 12.55%. The proportion of methylation in paracancerous tissues was 24.61%, of which partial methylation was 5.52%; total methylation was 19.09%. The methylation of MLH1 gene in non-small cell lung cancer was significantly higher than that in paracancerous tissue ($P < 0.01$). Spearman analysis showed that the expression of GRHL2 was significantly correlated with tumor size, clinical stage, and lymph node metastasis ($P < 0.01$), but not with age and sex ($P > 0.05$). The high expression of MLH1 methylation and GRHL2 was inversely proportional to the survival time of non-small cell lung cancer ($P < 0.01$). **Conclusion** The differential expression of MLH1 methylation and GRHL2 is closely related to tumor size, clinical stage and lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer, and at the same time has a significant correlation with the prognosis of patients, which has important reference value in the treatment of non-small cell lung cancer.

Keywords: Grainyhead Like 2; Mutl homolog 1; Non-small Cell Lung Cancer; Clinical Features

肺癌是源于支气管黏膜上皮、支气管腺体、肺泡的恶性肿瘤。数据显示, 全球新发癌症发病率(11.6%)及死亡率(18.4%)最高的癌症为肺癌^[1-2]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌的一种, 占有肺癌的80%以上; 主要包括腺癌、鳞癌(鳞状细胞癌)、大细胞癌^[3]。研究显示, NSCLC的癌细胞生长较慢, 发生扩散转移时间与小细胞肺癌相比较晚^[4]。在肿瘤的发生发展过程中, 基因起到了至关重要的作用。粒状头样2 (grainyhead like 2, GRHL2) 基因是GRHL家族成员之一, 在21世纪初被发现, 后被认为是新的转录因子, 参与了细胞分化、胚胎发育、表皮损伤修复等过程。大量研究显示, GRHL2的异常表达与疾病的发生发展密切相关, 在乳腺癌、肝癌、鳞状细胞癌患者的组织中有GRHL2的异常表达^[5]。Mutl homolog 1 (MLH1) 基因, 是一种错配修复蛋白, 可通过纠正错配变异的DNA 恢复基因的正常功能而发挥抑癌基因的作用, 研究发现MLH1 基因的变异或异常甲基化与癌症的发生发展密切相关^[6]。本研究分析了GRHL2与MLH1的表达与NSCLC临床特征的相关性研究。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取2016年1月至2021年4月, 在天津市滨海新区大港中医医院接受治疗并经过手术确诊的486例NSCLC患者, 其中腺癌105例、鳞癌310、大细胞癌71例, 男309例, 女177例; 患者年龄为27~83岁, 平均年龄为(57.39±7.41)岁。临床分期为I期

101例, II~III期385期, 所有患者均行手术治疗前未接受任何药物治疗或辅助治疗, 手术中癌组织切除后, 立即采集标本进行保存备注。排除病历资料不全者、失访者, 合并严重疾病患者, 手术治疗前接受化疗、免疫治疗、靶向治疗等患者。

1.2 方法 GRHL2基因表达检测: 将术后保存的样本, 通过实时荧光定量PCR和Western blot检测GRHL2的表达。采用Trizol法提取NSCLC样本中RNA, 使用逆转录试剂盒, 逆转录为cDNA; 通过qRT-PCR法检测GRHL2的表达情况。在所有标本中, 采用Western 印迹法检测NSCLC和癌旁组织中GRHL2蛋白表达情况, Western blot法参照全应军等^[9]在结直肠癌中检测GRHL2表达。

MLH1甲基化检测: 采用甲基化特异性PCR (MSP) 法, 从保存的样本组织中提取DNA, 采用Intergen公司的CPGenome TMDNA Modification Kit对DNA进行亚硫酸氢盐修饰, 已修饰的DNA作为模板, 利用甲基化和非甲基化特异性引物进行PCR扩增MLH1甲基化和非甲基化的PCR扩增条件为(95°C 5min, 95°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s), 循环42次, 最后延伸72°C 5min。之后利用琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.3 观察指标 整理患者临床资料, 统计整理患者GRHL2的表达情况、MLH1甲基化情况, 按照临床特征分类, 分析GRHL2的表达、MLH1甲基化与临床特征的相关性。

1.4 统计分析 应用SPSS22.0统计软件进行数据统计分析。计数资料用[n(%)]表示, 组间比较用 χ^2 检验; GRHL2、MLH1的表达情况与临床特

【第一作者】张杰, 女, 副主任医师, 主要研究方向: 呼吸内科、支气管哮喘、慢阻肺临床诊疗。E-mail: zhangjie_kxy@163.com

【通讯作者】张杰

征的相关性分析,采用Spearman相关分析;生存分析采用生存分析。

2 结果

2.1 患者临床特征 486例NSCLC患者,在年龄>40、肿瘤大小>3cm、临床分期为II~III期、淋巴结发生转移、组织类型为鳞癌的患者较多,且差异较为明显($P<0.05$)。

表1 患者临床特征

临床参数	分类	n	χ^2	P
年龄(岁)	≤40	91	380.313	<0.001
	>40	395		
性别	男	309	71.704	<0.001
	女	177		
肿瘤大小(cm)	≤3	114	273.926	<0.001
	>3	372		
临床分期	I期	101	331.98	<0.001
	II~III期	385		
淋巴结转移	是	293	13.688	<0.001
	否	233		
组织类型	鳞癌	310	73.893	<0.001
	腺癌或其他	176		

2.2 GRHL2在NSCLC中的表达 GRHL2在癌组织中379例呈现高表达,107例低表达,而在癌旁组织中187例呈现高表达,299例呈现低表达,GRHL2在癌组织中呈现高表达趋势,在癌旁组织中,呈低表达趋势;GRHL2在癌组织与癌旁组织的表达具有明显差异($P<0.05$)。

表2 GRHL2的表达情况

组织类型	GRHL2	
	低表达	高表达
癌组织	107	379
癌旁组织	299	187
χ^2	155.929	
P	<0.001	

2.3 NSCLC患者MLH1甲基化情况 在NSCLC中MLH1基因甲基化占比为46.84%,其中部分甲基化为34.29%;完全甲基化为12.55%。在癌旁组织中甲基化占比为24.61%,其中部分甲基化为5.52%;完全甲基化为19.09%。NSCLC中MLH1基因甲基化程度明显高于癌旁组织($P<0.05$)。

表3 NSCLC患者MLH1甲基化情况

组织类型	MLH1		
	部分甲基化	完全甲基化	未甲基化
癌组织	34.29%	12.55%	53.16%
癌旁组织	19.09%	5.52%	75.39%
χ^2	10.605		
P	0.005		

2.4 NSCLC患者GRHL2与临床特征相关性分析 Spearman分析显示,GRHL2的表达与肿瘤大小,临床分期,淋巴结转移均存在显著相关性($P<0.01$),与组织类型明显相关($P<0.05$),但与年龄,性别无明显相关性($P>0.05$)。

表4 NSCLC患者GRHL2与临床特征相关性分析

临床参数	分类	n	GRHL2		χ^2	P	r
			低表达	高表达			
			(n=107)	(n=379)			
年龄(岁)	≤40	91	25	66	1.941	0.164	0.063
	>40	395	82	313			
性别	男	309	64	245	0.841	0.359	0.042
	女	177	43	134			
肿瘤大小(cm)	≤3	114	48	66	35.007	0.000	0.268
	>3	372	59	313			
临床分期	I期	101	42	59	28.433	0.000	0.242
	II~III期	385	65	320			
淋巴结转移	否	193	67	126	30.067	0.000	0.249
	是	293	40	253			
组织类型	鳞癌	310	79	231	5.994	0.014	0.111
	腺癌或其他	176	28	148			

2.5 GRHL2表达和MLH1甲基化与患者预后相关性 MLH1甲基化、GRHL2高表达与NSCLC患者生存时间呈负相关($P<0.01$)。

表5 GRHL2表达和MLH1甲基化与患者预后相关性

生存时间	MLH1		GRHL2表达	
	甲基化	非甲基化	低表达	高表达
<6个月(83)	31	52	12	71
6~12个月(216)	88	128	39	177
12~18个月(98)	72	26	29	69
>18个月(89)	67	22	27	62
χ^2	55.425		11.600	
P	0.000		0.009	
r	-0.312		-0.148	

3 讨论

hMLH1基因位于3号染色体p21区。是人体重要的DNA错配修复蛋白基因,该基因的突变或甲基化异常,可引起细胞错配修复功能缺陷,导致肿瘤的发生。DNA错配修复基因一类肿瘤相关基因,其非癌基因,也非抑癌基因,但在肿瘤发病的分子机制方面起到重要作用。主要包括hMSH2、hMLH1、hMSH3、hMSH6、hPMSH1和hPMSH2等基因。hMLH1基因的异常甲基化可引起微卫星DNA,影响错配修复蛋白相互配合完成DNA损伤的修复过程^[7]。本研究结果显示,NSCLC中MLH1基因甲基化占比为46.84%,癌旁组织中甲基化占比为24.61%,NSCLC中MLH1基因甲基化程度明显高于癌旁组织。表明MLH1基因甲基化异常,与癌细胞恶性转化和肿瘤进展相关,另外,经过Spearman相关性分析发现MLH1甲基化与患者生存时间呈现明显负相关。这一结论,与王延宁等人在NSCLC的相关研究中结果相似。

经整理分析发现486例NSCLC患者中,年龄>40岁,男性患者较多,这与国家癌症中心最新发布的2019年癌症数据报告内容一致,其中男性肿瘤发病率位居的首位为肺癌,其高发年龄段为55岁以上。另外,本研究中肿瘤大小>3cm、临床分期为II~III期、淋巴结发生转移、组织类型为鳞癌的患者较多,这与目前医疗技术水平和人们健康意识相关。往往肺癌在发现确诊时均处于中晚期,不利于患者治疗及预后,这也是我国肺癌生存率较低的主要原因^[8]。

GRHL2基因可以促进细胞增殖,诱导细胞凋亡,其异常表达也与多种肿瘤的发生发展密切相关^[9]。本研究发现,GRHL2在NSCLC组织中呈现高表达趋势,在癌旁组织中,呈低表达趋势;并具有明显差异($P<0.01$)。经过相关性分析发现,GRHL2的表达与肿瘤大小,临床分期,淋巴结转移均存在显著相关($P<0.01$),与组织类型明显相关($P<0.05$)。表明GRHL2基因可能参与NSCLC的发展过程,同时,GRHL2基因在鳞癌中存在高表达状态,可能与其生理功能相关。我们还发现,MLH1甲基化、GRHL2高表达与NSCLC患者生存时间呈负相关,同时大量临床数据显示GRHL2基因的高表达与乳腺癌患者的无复发的生存时间负性相关,并且可以增加患者的转移风险^[10],这一结论与本研究结论一致。

综上所述,MLH1甲基化、GRHL2差异表达与NSCLC患者肿瘤大小,临床分期,淋巴结转移情况密切相关,同时与患者生存时间呈负相关,在NSCLC的治疗过程中具有重要的参考价值。

参考文献

- [1] Shi Y, Yang S, Sun Y. Glance back of China's cancer control and treatment in 2016[J]. 2017, 35(1): 96-99.
- [2] 陈全敏,周峰,刘阳,等. MSCT联合血清HE4、CEA及Cyfra21-1因子检测对肺癌中的诊断价值[J]. 中国CT和MRI杂志, 2021, 19(10): 43-45.
- [3] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28.
- [4] 孙可欣,郑荣寿,曾红梅,等. 2014年中国肺癌发病和死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(11): 805.
- [5] 向吉峰. Grhl2抑制胃癌生物学特性及其分子机制的研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
- [6] 刘焱,杨重庆,李文举,等. 老年结直肠癌患者MLH1和PMS2错配修复基因表达情况和临床病理特征分析[J]. 中华老年医学杂志, 2020, 39(8): 927-930.
- [7] 袁凯涛,马晋平. 错配修复基因突变与林奇综合征肿瘤患者发病年龄的关系: 分层监控策略的应用[J]. 中华胃肠外科杂志, 2017, 20(11): 1235-1235.
- [8] 王梅,王梅玉,姬宏莉,等. 非小细胞肺癌患者凝血功能指标与肿瘤恶性程度的相关性[J]. 罕少疾病杂志, 2022, 29(1): 36-38.
- [9] 唐冠楠,颜宏利,王玉招,等. 粒状头样2 (GRHL2) 与肿瘤[J]. 第二军医大学学报, 2013, 34(11): 1243-1247.
- [10] 王飞,卫美辰,杨璐,等. 转录因子粒状头样2在乳腺癌组织中的表达及其与患者临床病理特征和预后的关系[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(12): 1371-1376.

(收稿日期: 2022-09-26)

(校对编辑: 谢诗婷)