

# 中国人群外周血 RABL6 基因甲基化与早期肺癌的关联性研究

黄海霞<sup>1</sup>, 乔荣<sup>2</sup>, 李梦夏<sup>1</sup>, 顾万建<sup>3</sup>, 韩宝惠<sup>2</sup>, 杨蓉西<sup>1</sup>

**摘要** 目的 基于病例对照研究,探索中国人群外周血 RABL6 基因甲基化水平与早期肺癌(LC)之间的相关性。方法 采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱定量检测 275 例 LC 患者(81.5% 为 I 期)和年龄、性别匹配的 185 例良性肺结节对照以及 267 例健康对照外周血 RABL6 中 7 个 CpG 位点的甲基化水平。采用无序多分类 Logistic 回归法分析 RABL6 甲基化水平与 LC 之间的相关性。应用 Mann-Whitney *U* 检验比较不同临床特征分组之间 RABL6 甲基化水平。结果 与健康对照比较, RABL6\_CpG\_17 甲基化水平与 LC 在女性中呈负相关(甲基化水平每减少 10%:  $OR = 2.47$ , 95%  $CI = 1.19 \sim 5.13$ ,  $P = 0.016$ ), 在男性中呈正相关(甲基化水平每减少 10%:  $OR = 0.52$ , 95%  $CI = 0.29 \sim 0.94$ ,  $P = 0.030$ )。此外,在年龄 >55 岁的人群中观察到了 RABL6\_CpG\_2 和 RABL6\_CpG\_5 位点的高甲基化与 LC 存在关联(甲基化水平每减少 10%:  $OR = 0.77$ , 95%  $CI = 0.60 \sim 0.99$ ,  $P = 0.038$ ;  $OR = 0.58$ , 95%  $CI = 0.34 \sim 0.97$ ,  $P = 0.038$ )。结论 外周血 RABL6 甲基化水平与早期 LC 之间存在关联,为开发基于外周血 DNA 甲基化来评估早期 LC 风险的潜在标志物提供了新的线索。

**关键词** 肺癌; DNA 甲基化; RABL6; 外周血; 生物标志物

**中图分类号** R 734.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)06-1030-07  
**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.026

2020 年全球癌症数据显示,肺癌(lung cancer, LC)死亡人数位居第一<sup>[1-2]</sup>。中国 LC 死亡人数占全球的 42%<sup>[3]</sup>。LC 治疗的结局和预后与其初始诊断分期密切相关。据报道<sup>[4]</sup>, I 期患者的 5 年生存率为 83%, IV 期仅为 6%。目前,低剂量计算机断层扫描(low-dose computed tomography, LDCT)筛查是降低 LC 死亡率的有效方式<sup>[5]</sup>。使用 LDCT 对高

危人群进行筛查可使特异性病死率降低 20%, 总病死率降低 3.2%<sup>[5]</sup>。然而,其存在假阳性过高、辐射伤害和成本效益低<sup>[5-6]</sup>等诸多不足。DNA 甲基化是最常见的表观遗传修饰<sup>[7]</sup>,也是癌症发展的早期事件和伴随事件,可应用于癌症早筛。早期 LC,在临床上通常是指 I 期,包括 IA 期和 IB 期。课题组前期研究<sup>[8-9]</sup>也表明,外周血中 PNPLA2 和 FYB 等甲基化的改变与早期 LC 相关。该研究旨在调查 RABL6 甲基化改变与早期 LC 之间的关系,评估其作为生物标志物的可能性,为开发基于外周血 DNA 甲基化来评估早期 LC 风险的潜在标志物提供新的线索。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 该研究收集了 2018—2019 年在上海胸科医院确诊的 LC 患者 275 例,年龄 29~80 (55.29 ± 10.62) 岁,其中男性 136 例(49.5%),女性 139 例(50.5%), I 期 224 例(81.5%)。病例纳入标准:经病理科和胸外科共同诊断为 LC、有完整的临床数据记录、尚未开始放疗或化疗、无其他癌症病史且无来自其他器官的癌症转移。收集 LC 患者临床信息,包括肿瘤类型、大小、长度、分期和淋巴结受累情况等。见表 1。

根据 LC 患者的年龄性别特征,在上海胸科医院筛选同期诊断为良性结节的患者 185 例,年龄 25~80 (54.77 ± 10.22) 岁,其中男性 84 例(45.4%),女性 101 例(54.6%)。良性对照纳入标准:经病理诊断为良性肺结节、有完整的临床数据记录且无其他癌症病史等。此外,在江苏省中医院体检中心筛选与 LC 患者年龄和性别相匹配的健康对照 267 例,年龄 23~80 (54.58 ± 10.89) 岁,男性 132 例(49.4%),女性 135 例(50.6%)。对照纳入标准:所有对照通过胸部 X 光片检查均为阴性并自述健康、无任何癌症病史或自身免疫性疾病等。该研究方案获得上海市胸科医院和江苏省中医院伦理委员会批准(编号:KS1407)。所有研究对象均签署书面知情同意书。

**1.2 样品采集与处理** 对于 LC 患者和良性肺结

2023-03-28 接收

基金项目:江苏省自然科学基金(编号: BK20180674)

作者单位:<sup>1</sup>南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系,南京 211166

<sup>2</sup>上海交通大学附属上海市胸科医院肺内科,上海 200030

<sup>3</sup>江苏省中医院检验科,南京 210029

作者简介:黄海霞,女,硕士研究生;

杨蓉西,女,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: rongxiy-ang@njmu.edu.cn

表1 LC 病例的基本临床特征

临床特征分组	n	百分比(%)
年龄(岁)		
≤55	146	53.1
>55	129	46.9
性别		
女	139	50.5
男	136	49.5
腺癌亚型		
非浸润性腺癌	111	40.4
浸润性腺癌	132	48.0
缺失数据	32	11.6
肿瘤浸润深度		
T1	211	76.7
T2~T4	51	18.6
缺失数据	13	4.7
肿瘤大小(cm)		
≤1.5	150	54.6
>1.5	112	40.7
缺失数据	13	4.7
淋巴结受累		
pN0	234	85.1
pN1~pN2	27	9.8
缺失数据	14	5.1
肿瘤分期		
I	224	81.4
II~IV	39	14.2
缺失数据	12	4.4

节对照,在进行手术和相关治疗前收集血液样本。使用含 EDTA 的采血管收集研究对象外周血,并保存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。应用南京腾辰生物科技有限公司的 DNA 提取试剂盒提取全基因组 DNA。

使用 DNA 甲基化检测样本前处理试剂盒,对 DNA 进行重亚硫酸氢盐处理。这一过程将未甲基化 CpG 位点的胞嘧啶转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶保持不变。

**1.3 基因甲基化水平测定** 使用 EpiDesigner 进行引物设计,引物扩增片段大小为 298 bp,位于 RABL6 的第二内含子区(Chr9: 139719815 - 139720112),共包含 17 个 CpG 位点,见图 1。引物序列上无 CpG 位点与已知的单核苷酸多态性重合。根据 Yang et al<sup>[10]</sup> 的描述,采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS 美国 Agena Bioscience 公司)对基因甲基化水平进行定量检测。对重亚硫酸氢盐处理后的 DNA 进行 PCR 扩增。采用虾碱性磷酸酶处理 PCR 产物,随后用 Rnase A 进行切割,并用树脂进一步清洗。通过 Nanodispenser 将产物转移到 384 Spectro-

CHIP 中进行检测。数据由 SpectroACQUIRE 3.3.1.3 软件收集,使用 MassArrayEpiTyper 1.2 进行可视化处理。由于亚硫酸氢盐处理后未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,因此甲基化和非甲基化 DNA 会产生不同的切割产物。MassArray 仪器能够定量检测甲基化与未甲基化 DNA 的比例。其中, RABL6\_CpG\_1、RABL6\_CpG\_6.7.8、RABL6\_CpG\_11.12.13 和 RABL6\_CpG\_14.15.16 位点因信号质量峰过低或过高无法检测而被排除。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析。根据 MALDI-TOF-MS 检测原理,该研究中测出来的甲基化值的范围是 0~1(即 0%~100%),多数学者采用每 10% 的变化来评估甲基化与结局事件的关联,如 Yang et al<sup>[10]</sup>,因此该研究也采用该方式评估 RABL6 基因甲基化水平每改变 10% 与早期 LC 的关联。所有样本使用随机数法排版,将 2 块 384 孔板分别编码为 1 和 2。使用无序多分类 Logistic 回归分析 DNA 甲基化水平与 LC 之间的关联,将 LC 患者设置为参照组,校正年龄、性别和实验批次后,计算 RABL6 甲基化水平每减少 10% 的 OR 和 95% CI。Mann-Whitney U 检验用于分析不同临床特征分组间的甲基化水平差异。所有统计分析均采用双侧检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 外周血 RABL6 甲基化与 LC 之间的相关性

在 275 例 LC 患者、185 例良性对照和 267 例健康对照中,本研究共检测了 RABL6 基因 7 个 CpG 位点的甲基化水平。经校正协变量(年龄、性别和实验批次)的无序多分类 Logistic 回归分析,在 LC 患者 vs 健康对照以及在 LC 患者 vs 良性对照中,均未观察到上述 RABL6 的 7 个 CpG 位点甲基化水平与 LC 之间存在关联( $P > 0.05$ )。见表 2。

**2.2 对患者按性别和年龄分层后分析 RABL6 甲基化与 LC 之间的相关性** 性别、年龄与基因的甲基化的改变有关。为此,本研究对受试者按照性别和年龄分层后,进一步观察 RABL6 甲基化水平与 LC 之间的相关性。性别分层后,LC 患者 vs 健康对照中, RABL6\_CpG\_17 甲基化的改变均与 LC 显著相关,在不同性别中呈现相反的趋势。在女性 LC 患者中, RABL6\_CpG\_17 的甲基化水平与 LC 呈负相关,即甲基化水平每减少 10%, LC 的风险增加 1.47 倍( $OR = 2.47, 95\% CI = 1.19 \sim 5.13, P =$

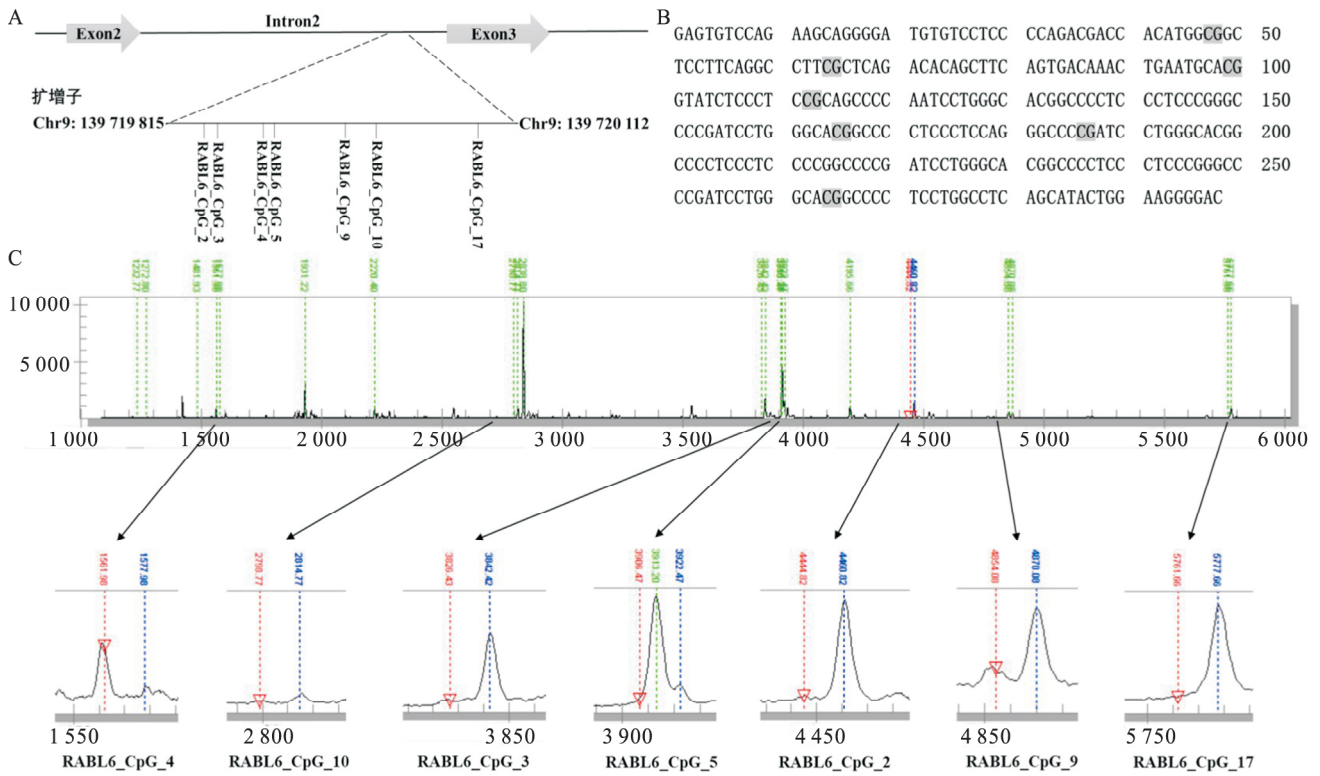


图1 RABL6 基因扩增片段示意图、序列和信号峰

A: 298 bp 扩增片段和 7 个可测量的 CpG 位点的位置; B: 使用 EpiTyper 分析检测的 RABL6 扩增片段的序列; C: MassARRAY 分析产生 7 个可区分的峰; 指向信号峰的向下红色箭头表示未甲基化的 CpG 位点; 信号峰上方的蓝色线表示甲基化的 CpG 位点; 底部表示信号峰值

表2 RABL6 甲基化与 LC 之间的关联

CpG 位点	健康对照组	良性对照组	LC 患者组	OR <sup>a</sup> (95% CI)	OR <sup>b</sup> (95% CI)		
	(n = 267)	(n = 185)	(n = 275)		P 值 <sup>a</sup>	P 值 <sup>b</sup>	
	median (IQR)	median (IQR)	median (IQR)	每减少 10% 甲基化		每减少 10% 甲基化	
RABL6_CpG_2	0.96 (0.93 ~ 0.98)	0.96 (0.93 ~ 0.99)	0.96 (0.94 ~ 0.98)	0.93 (0.80 ~ 1.08)	0.347	0.93 (0.79 ~ 1.10)	0.424
RABL6_CpG_3	0.96 (0.94 ~ 0.98)	0.97 (0.94 ~ 0.99)	0.96 (0.94 ~ 0.98)	0.83 (0.59 ~ 1.18)	0.306	0.80 (0.55 ~ 1.16)	0.241
RABL6_CpG_4	0.36 (0.25 ~ 0.52)	0.36 (0.18 ~ 0.54)	0.38 (0.24 ~ 0.54)	0.97 (0.90 ~ 1.05)	0.417	0.96 (0.89 ~ 1.05)	0.372
RABL6_CpG_5	0.93 (0.91 ~ 0.96)	0.93 (0.90 ~ 0.96)	0.94 (0.91 ~ 0.96)	0.86 (0.60 ~ 1.23)	0.407	0.74 (0.51 ~ 1.06)	0.104
RABL6_CpG_9	0.81 (0.78 ~ 0.84)	0.81 (0.79 ~ 0.84)	0.81 (0.79 ~ 0.83)	1.14 (0.80 ~ 1.61)	0.471	1.16 (0.79 ~ 1.70)	0.463
RABL6_CpG_10	0.85 (0.75 ~ 0.91)	0.84 (0.77 ~ 0.91)	0.84 (0.77 ~ 0.89)	0.96 (0.84 ~ 1.10)	0.568	1.05 (0.90 ~ 1.23)	0.522
RABL6_CpG_17	0.97 (0.94 ~ 0.99)	0.97 (0.94 ~ 0.99)	0.96 (0.94 ~ 0.98)	0.96 (0.63 ~ 1.46)	0.831	0.83 (0.53 ~ 1.31)	0.424

<sup>a</sup>: LC 患者与健康对照 RABL6 基因甲基化水平差异, 调整年龄、性别和不同实验批次; <sup>b</sup>: LC 患者与良性对照 RABL6 基因甲基化水平差异, 调整年龄、性别和不同实验批次

0.016) 提示 RABL6\_CpG\_17 的甲基化水平升高对于女性可能是保护性因素; 而在男性中, RABL6\_CpG\_17 的甲基化水平与 LC 呈正相关(甲基化水平每减少 10%  $OR = 0.52$  95%  $CI = 0.29 \sim 0.94$   $P = 0.030$ ) 提示 RABL6\_CpG\_17 的甲基化水平降低对于男性可能是保护性因素。其余 6 个 CpG 位点均未显示出与 LC 有关联 ( $P > 0.05$ )。而在 LC 患者 vs 良性对照中 7 个 CpG 位点的甲基化水平在性别分组中均未显示与 LC 相关 ( $P > 0.05$ )。对以上所有

$P$  值进行  $FDR$  校正后 统计学差异消失。见表 3。

随后, 以中位年龄 55 岁为界对研究对象进行年龄分层分析。在 LC 患者 vs 健康对照中, 年龄  $> 55$  岁患者中 RABL6\_CpG\_2 位点的高甲基化与 LC 相关, 即甲基化水平每减少 10% ( $OR = 0.77$  95%  $CI = 0.60 \sim 0.99$   $P = 0.038$ ); 而在年龄  $\leq 55$  岁的人群中, 未发现 RABL6 甲基化与 LC 的关联性 ( $P > 0.05$ )。LC 患者 vs 良性对照中, 同样在年龄  $> 55$  岁患者中观察到 RABL6\_CpG\_5 位点的甲基化与 LC

呈正相关,即甲基化水平每减少 10% ( $OR = 0.58$ ,  $95\% CI = 0.34 \sim 0.97$ ,  $P = 0.038$ )。在年龄  $\leq 55$  岁分组中未观察到其他 CpG 位点与 LC 相关 ( $P > 0.05$ )。对以上所有  $P$  值进行  $FDR$  校正后,差异无统计学意义。见表 4。

### 2.3 RABL6 甲基化与 LC 临床特征之间的相关性

为了解 RABL6 甲基化水平与 LC 临床特征之间的相关性,采用 Mann-Whitney  $U$  检验比较不同临床

特征分组之间 RABL6 甲基化水平差异。与肿瘤较小(肿瘤长度  $\leq 1.5$  cm)的患者比较,肿瘤长度  $> 1.5$  cm 的 LC 患者 RABL6\_CpG\_17 的甲基化水平更高(甲基化的中位数:  $0.96$  vs  $0.97$ ,  $P = 0.026$ ) ,表明 RABL6\_CpG\_17 的高甲基化可能与 LC 的进展有关。但是其余 CpG 位点并未显示出这一趋势。尚未发现 RABL6 甲基化水平与肿瘤类型、淋巴结转移以及肿瘤分期等存在关联 ( $P > 0.05$ )。见表 5。

表 3 性别分层分析 RABL6 甲基化与 LC 之间的关联

CpG 位点	健康对照组	良性对照组	LC 患者组	$OR^a(95\% CI)$ 每减少 10% 甲基化	$P$ 值 <sup>a</sup>	$FDR$ 值 <sup>a</sup>	$OR^b(95\% CI)$	$P$ 值 <sup>b</sup>	$FDR$ 值 <sup>b</sup>
	median ( IQR)	median ( IQR)	median ( IQR)				每减少 10% 甲基化		
女性									
RABL6_CpG_2	0.96(0.92~0.98)	0.95(0.93~0.98)	0.96(0.94~0.98)	0.94(0.76~1.16)	0.534	0.930	0.84(0.68~1.04)	0.111	0.388
RABL6_CpG_3	0.97(0.93~0.98)	0.96(0.94~0.98)	0.96(0.94~0.98)	0.94(0.57~1.55)	0.797	0.930	0.80(0.48~1.34)	0.406	0.577
RABL6_CpG_4	0.38(0.25~0.50)	0.41(0.25~0.56)	0.40(0.25~0.55)	0.93(0.84~1.04)	0.209	0.732	1.00(0.89~1.13)	0.950	0.950
RABL6_CpG_5	0.93(0.91~0.96)	0.93(0.89~0.96)	0.93(0.91~0.95)	1.02(0.59~1.76)	0.947	0.947	0.60(0.35~1.02)	0.059	0.388
RABL6_CpG_9	0.81(0.78~0.84)	0.82(0.78~0.85)	0.81(0.79~0.84)	1.10(0.68~1.77)	0.694	0.930	1.26(0.73~2.20)	0.412	0.577
RABL6_CpG_10	0.85(0.75~0.91)	0.83(0.75~0.90)	0.86(0.77~0.90)	0.96(0.78~1.18)	0.689	0.930	0.90(0.72~1.13)	0.366	0.577
RABL6_CpG_17	0.98(0.95~0.99)	0.97(0.93~0.99)	0.97(0.94~0.98)	2.47(1.19~5.13)	0.016	0.112	0.81(0.42~1.57)	0.538	0.628
男性									
RABL6_CpG_2	0.96(0.93~0.98)	0.96(0.94~0.99)	0.96(0.93~0.98)	0.93(0.74~1.15)	0.494	0.754	1.15(0.83~1.59)	0.395	0.691
RABL6_CpG_3	0.96(0.95~0.98)	0.97(0.95~0.99)	0.97(0.94~0.98)	0.74(0.44~1.24)	0.250	0.635	0.78(0.45~1.35)	0.372	0.691
RABL6_CpG_4	0.35(0.24~0.56)	0.34(0.16~0.48)	0.38(0.23~0.53)	1.00(0.90~1.11)	0.951	0.951	0.93(0.82~1.04)	0.191	0.668
RABL6_CpG_5	0.93(0.91~0.95)	0.94(0.91~0.96)	0.94(0.91~0.96)	0.76(0.47~1.24)	0.272	0.635	0.89(0.52~1.54)	0.682	0.796
RABL6_CpG_9	0.81(0.79~0.83)	0.81(0.79~0.84)	0.81(0.79~0.83)	1.16(0.70~1.94)	0.561	0.754	1.04(0.61~1.78)	0.885	0.885
RABL6_CpG_10	0.84(0.75~0.91)	0.85(0.79~0.92)	0.84(0.77~0.89)	0.96(0.79~1.16)	0.646	0.754	1.21(0.97~1.52)	0.096	0.668
RABL6_CpG_17	0.96(0.93~0.98)	0.97(0.95~0.99)	0.96(0.95~0.98)	0.52(0.29~0.94)	0.030	0.210	0.81(0.42~1.56)	0.523	0.732

<sup>a</sup>: LC 患者与健康对照 RABL6 基因甲基化水平差异,调整年龄和不同实验批次; <sup>b</sup>: LC 患者与良性对照 RABL6 基因甲基化水平差异,调整年龄和不同实验批次;  $FDR$ : 错误发现率

表 4 年龄分层分析 RABL6 甲基化与 LC 之间的关联

CpG 位点	健康对照组	良性对照组	LC 患者组	$OR^a(95\% CI)$ 每减少 10% 甲基化	$P$ 值 <sup>a</sup>	$FDR$ 值 <sup>a</sup>	$OR^b(95\% CI)$	$P$ 值 <sup>b</sup>	$FDR$ 值 <sup>b</sup>
	median ( IQR)	median ( IQR)	median ( IQR)				每减少 10% 甲基化		
年龄 $\leq 55$ 岁									
RABL6_CpG_2	0.96(0.93~0.98)	0.96(0.93~0.99)	0.96(0.94~0.98)	1.11(0.89~1.39)	0.347	0.612	1.08(0.84~1.39)	0.541	0.820
RABL6_CpG_3	0.96(0.93~0.98)	0.97(0.94~0.99)	0.96(0.94~0.98)	0.78(0.48~1.28)	0.320	0.612	0.80(0.46~1.39)	0.436	0.820
RABL6_CpG_4	0.37(0.23~0.54)	0.36(0.18~0.54)	0.38(0.24~0.53)	0.98(0.89~1.08)	0.672	0.936	0.97(0.87~1.08)	0.553	0.820
RABL6_CpG_5	0.94(0.92~0.96)	0.94(0.92~0.96)	0.94(0.92~0.96)	0.96(0.57~1.64)	0.890	0.936	1.14(0.61~2.13)	0.683	0.820
RABL6_CpG_9	0.82(0.79~0.84)	0.81(0.78~0.83)	0.81(0.79~0.83)	1.30(0.75~2.27)	0.350	0.612	0.81(0.44~1.51)	0.504	0.820
RABL6_CpG_10	0.86(0.73~0.92)	0.83(0.77~0.90)	0.85(0.77~0.89)	0.99(0.82~1.20)	0.936	0.936	0.96(0.78~1.19)	0.703	0.820
RABL6_CpG_17	0.97(0.95~0.99)	0.97(0.93~0.98)	0.96(0.94~0.98)	1.32(0.75~2.34)	0.334	0.612	1.03(0.56~1.89)	0.917	0.917
年龄 $> 55$ 岁									
RABL6_CpG_2	0.95(0.92~0.98)	0.96(0.94~0.98)	0.96(0.94~0.98)	0.77(0.60~0.99)	0.038	0.266	0.79(0.60~1.02)	0.074	0.259
RABL6_CpG_3	0.97(0.95~0.98)	0.97(0.95~0.99)	0.97(0.95~0.98)	0.89(0.54~1.48)	0.653	0.762	0.80(0.48~1.32)	0.373	0.435
RABL6_CpG_4	0.35(0.26~0.50)	0.36(0.19~0.55)	0.39(0.23~0.56)	0.95(0.84~1.07)	0.404	0.605	0.96(0.84~1.09)	0.503	0.503
RABL6_CpG_5	0.93(0.90~0.95)	0.93(0.90~0.96)	0.93(0.91~0.96)	0.75(0.44~1.27)	0.279	0.605	0.58(0.34~0.97)	0.038	0.259
RABL6_CpG_9	0.80(0.78~0.84)	0.82(0.79~0.85)	0.81(0.78~0.84)	1.03(0.66~1.59)	0.912	0.912	1.48(0.87~2.53)	0.149	0.278
RABL6_CpG_10	0.83(0.76~0.90)	0.85(0.78~0.92)	0.84(0.77~0.89)	0.92(0.75~1.13)	0.432	0.605	1.17(0.91~1.50)	0.213	0.298
RABL6_CpG_17	0.96(0.94~0.99)	0.97(0.94~0.99)	0.97(0.95~0.98)	0.61(0.31~1.19)	0.145	0.508	0.60(0.30~1.22)	0.159	0.278

<sup>a</sup>: LC 患者与健康对照 RABL6 基因甲基化水平差异,调整性别和不同实验批次; <sup>b</sup>: LC 患者与良性对照 RABL6 基因甲基化水平差异,调整性别和不同实验批次;  $FDR$ : 错误发现率

表5 RABL6 甲基化水平与不同临床特征之间的关联

临床特征分组	CpG 位点						
	RABL6_CpG_2	RABL6_CpG_3	RABL6_CpG_4	RABL6_CpG_5	RABL6_CpG_9	RABL6_CpG_10	RABL6_CpG_17
<b>腺癌亚型</b>							
非浸润性腺癌 (n = 111)	0.96(0.93 ~ 0.98)	0.97(0.94 ~ 0.98)	0.38(0.19 ~ 0.53)	0.93(0.91 ~ 0.96)	0.81(0.79 ~ 0.83)	0.85(0.77 ~ 0.90)	0.96(0.94 ~ 0.98)
浸润性腺癌 (n = 132)	0.96(0.94 ~ 0.98)	0.96(0.94 ~ 0.98)	0.42(0.26 ~ 0.54)	0.93(0.91 ~ 0.96)	0.81(0.79 ~ 0.83)	0.84(0.76 ~ 0.89)	0.97(0.95 ~ 0.98)
Z 值	-0.269	-0.621	-1.090	-0.075	-0.269	-0.764	-0.924
P 值 <sup>a</sup>	0.788	0.535	0.276	0.940	0.788	0.445	0.355
<b>肿瘤浸润深度</b>							
T1 (n = 211)	0.96(0.93 ~ 0.98)	0.96(0.94 ~ 0.98)	0.37(0.20 ~ 0.53)	0.93(0.92 ~ 0.95)	0.81(0.79 ~ 0.83)	0.85(0.77 ~ 0.90)	0.96(0.94 ~ 0.98)
T2 ~ T4 (n = 51)	0.97(0.95 ~ 0.99)	0.97(0.94 ~ 0.98)	0.44(0.32 ~ 0.58)	0.94(0.90 ~ 0.96)	0.81(0.78 ~ 0.83)	0.84(0.79 ~ 0.88)	0.97(0.95 ~ 0.99)
Z 值	-1.564	-0.111	-1.700	-0.212	-0.453	-0.555	-1.114
P 值 <sup>a</sup>	0.118	0.912	0.088	0.832	0.651	0.621	0.265
<b>肿瘤大小 (cm)</b>							
≤1.5 (n = 150)	0.96(0.93 ~ 0.98)	0.96(0.94 ~ 0.98)	0.38(0.20 ~ 0.53)	0.93(0.92 ~ 0.95)	0.81(0.79 ~ 0.84)	0.84(0.77 ~ 0.90)	0.96(0.94 ~ 0.98)
>1.5 (n = 112)	0.96(0.94 ~ 0.98)	0.96(0.94 ~ 0.98)	0.42(0.26 ~ 0.55)	0.94(0.91 ~ 0.96)	0.81(0.78 ~ 0.83)	0.85(0.78 ~ 0.89)	0.97(0.95 ~ 0.99)
Z 值	-0.004	-0.157	-1.148	-0.010	-0.017	-0.064	-2.234
P 值 <sup>a</sup>	0.997	0.875	0.251	0.992	0.986	0.949	0.026
<b>淋巴结受累</b>							
pN0 (n = 234)	0.96(0.94 ~ 0.98)	0.96(0.94 ~ 0.98)	0.38(0.23 ~ 0.55)	0.93(0.91 ~ 0.95)	0.81(0.79 ~ 0.83)	0.85(0.77 ~ 0.90)	0.96(0.94 ~ 0.98)
pN1 ~ N2 (n = 27)	0.97(0.95 ~ 0.99)	0.97(0.96 ~ 0.98)	0.38(0.31 ~ 0.53)	0.94(0.92 ~ 0.97)	0.81(0.78 ~ 0.84)	0.82(0.76 ~ 0.87)	0.97(0.94 ~ 0.99)
Z 值	-1.457	-1.258	-0.080	-1.451	-0.001	-1.007	-0.663
P 值 <sup>a</sup>	0.145	0.209	0.936	0.147	0.999	0.331	0.507
<b>肿瘤分期</b>							
I (n = 224)	0.96(0.94 ~ 0.98)	0.96(0.94 ~ 0.98)	0.39(0.23 ~ 0.55)	0.93(0.91 ~ 0.95)	0.81(0.79 ~ 0.83)	0.85(0.77 ~ 0.90)	0.96(0.94 ~ 0.98)
II ~ IV (n = 39)	0.97(0.95 ~ 0.99)	0.97(0.93 ~ 0.98)	0.38(0.27 ~ 0.53)	0.94(0.91 ~ 0.96)	0.81(0.78 ~ 0.84)	0.82(0.76 ~ 0.87)	0.97(0.94 ~ 0.99)
Z 值	-1.112	-0.420	-0.205	-0.815	-0.444	-1.350	-0.020
P 值 <sup>a</sup>	0.266	0.674	0.839	0.415	0.657	0.190	0.984

<sup>a</sup>: Mann-Whitney U 检验

### 3 讨论

RABL6(又名 PARF、RBEL1、C9orf86) 是 Ras 超家族中一种新型的 Rab 亚科成员<sup>[11]</sup>, 位于 9q34.3, 由小型 GTP 酶组成, 参与多种癌症的发生和发展。研究<sup>[11-12]</sup>表明, RABL6 促进食管鳞状细胞癌和胃癌等多种癌细胞的增殖、侵入和迁移, 且癌组织中 RABL6 的表达与食管鳞状细胞癌和非小细胞肺癌的总生存期和无病生存期相关<sup>[11, 13]</sup>。

在 RABL6 多个 CpG 位点中, 本研究仅观察到 RABL6\_CpG\_17 与 LC 存在显著关联, 这提示 DNA 甲基化具有精确调控的特点<sup>[14]</sup>。而且这一相关性在男性和女性中呈现出相反的趋势, 这可能与男性和女性中各自的性激素及其相关的调控途径以及生活方式(比如吸烟、饮酒)有关。研究表明, 不同性别的 LC 患者生存期存在差异, 女性与较长的 LC 生存期存在显著相关<sup>[15]</sup>, 在非吸烟 LC 患者中, 女性的比例远多于男性<sup>[16]</sup>, 提示男性和女性中独特的性激素及其相关调控通路的差异性作用。比如, 一些信号通路(如 cAMP 信号通路和卵巢类固醇生成)在非吸烟人群中特异性富集, 一些与雌激素功能和 MAPK/PI3K 信号相关的蛋白(如 KRT16、ERBB4 和

NTF4) 在不吸烟的男性和女性 LC 进展中表现出不同的影响<sup>[16]</sup>。也有研究<sup>[17]</sup>表明, 性类固醇可能参与非小细胞肺癌的发生和进展。此外, 相较于女性, 男性中更常见的吸烟、饮酒等与癌症等多种疾病的发生相关的生活方式影响甲基化, 进而影响癌症的发生发展, 也可能导致在男性和女性中 RABL6 的不同甲基化状态与 LC 相关。

癌症是一种与衰老相关的疾病。衰老和癌症具有相似的 DNA 甲基化改变, 包括基因启动子区域的高甲基化, 基因体的广泛低甲基化, 以及其他累积的表观遗传缺陷, 这可能是 DNA 甲基化介导的和衰老相关的癌症的潜在机制<sup>[18]</sup>。有研究<sup>[19]</sup>揭示了人类外周血中白细胞的 DNA 甲基化水平可能随年龄变化而变化。本研究仅在年龄 > 55 岁的研究对象中观察到 RABL6\_CpG\_2、RABL6\_CpG\_5 位点的高甲基化与 LC 之间存在关联, 这表明外周血中某些基因的 DNA 甲基化改变可能是老年人患 LC 的一种风险。

本研究基于 500 多例样本的分析, 结果显示 RABL6 基因甲基化在 LC 患者、良性结节对照和健康对照中存在差异, 这为开发基于外周血 DNA 甲基化评估早期 LC 风险的潜在标志物提供了新的线

索。目前外周血甲基化改变与 LC 早筛早诊的研究较多,多个基因 DNA 甲基化改变联合或结合现有诊断技术(如 LDCT)应用往往能获得更高的应用价值<sup>[20]</sup>。因此,随着研究内容的丰富,外周血 DNA 甲基化有望为早期 LC 筛查提供更准确可靠的预测价值。但本文是回顾性且单中心研究,样本的选择可能存在一定的偏倚,而且在收集样本信息时,缺失家族史等暴露信息,在后续的研究中,将通过前瞻性大样本多中心的研究,验证相关的结果,并通过功能实验进一步观察 RABL6 相关的分子机制。综上所述,该研究表明外周血 DNA 甲基化可以作为一种新的诊断方法,有望成为精确诊断 LC 的早期指标。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 焦安男, 吴欢, 朱洁, 等. 芪玉三龙汤通过 PD-1 信号通路增强 Th1 免疫反应抑制肺癌转移 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(11): 1718–24.
- [3] Cao W, Chen H D, Yu Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(7): 783–91.
- [4] Chansky K, Detterbeck F C, Nicholson A G, et al. The IASLC lung cancer staging project: external validation of the revision of the TNM stage groupings in the eighth edition of the TNM classification of lung cancer [J]. *J Thorac Oncol* 2017, 12(7): 1109–21.
- [5] National Lung Screening Trial Research Team, Aberle D R, Adams A M, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening [J]. *N Engl J Med* 2011, 365(5): 395–409.
- [6] Hoffman R M, Atallah R P, Struble R D, et al. Lung cancer screening with low-dose CT: a Meta-analysis [J]. *J Gen Intern Med*, 2020, 35(10): 3015–25.
- [7] Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease [J]. *Nat Biotechnol* 2010, 28(10): 1057–68.
- [8] Qiao R, Li M, Zhong R, et al. The association between PNPLA2 methylation in peripheral blood and early-stage lung cancer in a case-control study [J]. *Cancer Manag Res* 2021, 13: 7919–27.
- [9] Li M, Qiao R, Zhong R, et al. F.YB methylation in peripheral blood as a potential marker for the early-stage lung cancer: a case-control study in Chinese population [J]. *Biomarkers* 2022, 27(1): 79–85.
- [10] Yang R, Pflutze K, Zucknick M, et al. DNA methylation array analyses identified breast cancer-associated HYAL2 methylation in peripheral blood [J]. *Int J Cancer* 2015, 136(8): 1845–55.
- [11] Feng Y, Yan S, Huang Y, et al. High expression of RABL6 promotes cell proliferation and predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *BMC Cancer* 2020, 20(1): 602.
- [12] Xu P, Xu X, Wu X, et al. CircTMC5 promotes gastric cancer progression and metastasis by targeting miR-361-3p/RABL6 [J]. *Gastric Cancer* 2022, 25(1): 64–82.
- [13] Peng G L, Tao Y L, Wu Q N, et al. Positive expression of protein chromosome 9 open reading frame 86 (C9orf86) correlated with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients [J]. *J Thorac Dis* 2016, 8(7): 1449–59.
- [14] Sina A A, Carrascosa L G, Trau M. DNA methylation-based point-of-care cancer detection: challenges and possibilities [J]. *Trends Mol Med* 2019, 25(11): 955–66.
- [15] Pitz M W, Musto G, Navaratnam S. Sex as an independent prognostic factor in a population-based non-small cell lung cancer cohort [J]. *Can Respir J* 2013, 20(1): 30–4.
- [16] Xu L, Wang L, Cheng M. Identification of genes and pathways associated with sex in Non-smoking lung cancer population [J]. *Gene*, 2022, 831: 146566.
- [17] Asavasupreechar T, Chan M S M, Saito R, et al. Sex steroid metabolism and actions in non-small cell lung carcinoma [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019, 193: 105440.
- [18] Perez R F, Tejedor J R, Bayon G F, et al. Distinct chromatin signatures of DNA hypomethylation in aging and cancer [J]. *Aging Cell* 2018, 17(3): e12744.
- [19] Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, et al. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placenta: an HPLC-based study [J]. *Ann Hum Genet* 2004, 68(Pt 3): 196–204.
- [20] Wei B, Wu F, Xing W, et al. A panel of DNA methylation biomarkers for detection and improving diagnostic efficiency of lung cancer [J]. *Sci Rep* 2021, 11(1): 16782.

## The association between RABL6 gene methylation in peripheral blood and early lung cancer in Chinese population

Huang Haixia<sup>1</sup>, Qiao Rong<sup>2</sup>, Li Mengxia<sup>1</sup>, Gu Wanjian<sup>3</sup>, Han Baohui<sup>2</sup>, Yang Rongxi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166;  
<sup>2</sup>Dept of Pulmonary Medicine, Shanghai Chest Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030;  
<sup>3</sup>Dept of Clinical Laboratory, Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029)

**Abstract Objective** To explore the relationship between the methylation level of RABL6 in peripheral blood and early lung cancer (LC) with a case-control study in the Chinese population. **Methods** The methylation levels of 7 CpG sites in RABL6 gene in peripheral blood of samples from 275 LC patients (81.5% at stage I), and age- and gender-matched 185 benign lung nodule cases and 267 matched healthy controls were measured by matrix-assisted

## 105 例药物性胆汁淤积型肝损伤患者临床特征分析

陈茜楠 徐 琰 刘晓昌 梅 俏 张卫平 许建明

**摘要** 目的 探讨药物性胆汁淤积型肝损伤患者基本信息、临床特征、影像学表现及转归。方法 回顾性分析近 5 年来的住院患者中诊断为药物性胆汁淤积型肝损伤的病例资料,记录其临床数据,至少随访 6 个月。结果 共有 105 例药物性胆汁淤积型肝损伤患者,中位年龄 55 岁,男性占比 54.3%,多无特异性临床症状。所涉及的药物近 80 余种,前 3 位依次为中药(34.3%)、抗肿瘤药(22.9%)、抗生素(10.5%)。49 例行磁共振胰胆管成像患者中,有 7 例(14.3%)患者存在硬化性胆管炎样改变。105 例患者中治愈 53 例(50.5%),好转 41 例(39.0%),未愈 7 例(6.7%),死亡 4 例(3.8%),总有效率为 89.5%。结论 药物性胆汁淤积型肝损伤主要发生于老年患者,涉及药物种类较多,以中药最为多见。药物还可引起类似于硬化性胆管炎样改变,因此应将药物性胆汁淤积型肝损伤作为胆汁淤积和胆管造影异常患者的鉴别诊断之一。基础肝病对患者预后无影响。二元 Logistic 逐步回归分析示: Roussel Uclaf 因果关系评价法(RUCAM)评分低、血红蛋白水平低、住院时间短以及白细胞计数高是药物性胆汁淤积型肝损伤患者转归的独立危险因素。

**关键词** 药物性胆汁淤积型肝损伤; RUCAM 评分; 硬化性胆管炎; 危险因素

2023-04-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81700521, 81500403)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院消化内科, 合肥 230022

作者简介: 陈茜楠, 女, 硕士研究生;

刘晓昌, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

liuchenxiaochang@163.com

中图分类号 R 575.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-1036-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.027

药物性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)是在药物应用过程中由药物或其代谢物引起的肝脏疾病。一项关于中国 DILI 的多中心研究<sup>[1]</sup>显示,中国发病率高于西方国家。法国一项针对社会中 DILI 发病率的研究<sup>[2]</sup>显示 47% 的病例为胆汁淤积型或混合型,并且胆汁淤积型在老年人中比肝细胞型更为常见。大多数药物性胆汁淤积型肝损伤病例是轻微的,肝损害会随着致病药物的停止而逆转,但约 10% 的药物性胆汁淤积型肝损伤黄疸患者会出现肝功能衰竭,并且在少数情况下,可进展为胆管消失综合征和硬化性胆管炎<sup>[3]</sup>。由于缺乏特异性生物标志物,诊断较困难,该研究收集住院患者中诊断为药物性胆汁淤积型肝损伤的病例,记录其临床数据,总结其临床特征、常见致病药物及预后相关因素,为药物性胆汁淤积型肝损伤的防治提供理论依据。

### 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 采用双向性队列研究收集 2017 年 4 月—2022 年 6 月于安徽医科大学第一附属医院就诊的诊断 DILI,且碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)  $\geq 2$  倍正常值上限(upper limit of normal,

laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Multinomial Logistic regression adjusted for covariates was used to analyze the association between the RABL6 methylation and LC. Mann-Whitney *U* test was applied for the comparisons of RABL6 methylation levels between clinical characteristics subgroups of LC. **Results** Compared to the healthy controls, the methylation of RABL6\_CpG\_17 was inversely associated with LC in females (per -10% methylation: *OR* = 2.47, 95% *CI* = 1.19 - 5.13, *P* = 0.016), but positively associated with LC in males (per -10% methylation: *OR* = 0.52, 95% *CI* = 0.29 - 0.94, *P* = 0.030). In addition, hypermethylation of RABL6\_CpG\_2 and RABL6\_CpG\_5 was significantly associated with LC in the subjects older than 55 years (for RABL6\_CpG\_2: per -10% methylation: *OR* = 0.77, 95% *CI* = 0.60 - 0.99, *P* = 0.038; for RABL6\_CpG\_5: *OR* = 0.58, 95% *CI* = 0.34 - 0.97, *P* = 0.038). **Conclusion** The study reveals an association between peripheral blood-based RABL6 methylation levels and early LC, providing a new clue for developing peripheral blood-based DNA methylation as a potential marker for the evaluation of LC risk.

**Key words** lung cancer; DNA methylation; RABL6; peripheral blood; biomarker