

JAM3基因DNA甲基化在宫颈高级别上皮内瘤变及术后复发预测的临床研究

娄琰琰¹, 刘元涛², 赵淑婷¹, 陈青³, 曹佃霞¹, 公维涛¹, 郝长宏^{1*}

¹临沂市中心医院妇科, 山东 临沂

²临沂市中心医院疼痛科, 山东 临沂

³临沂市中心医院病理科, 山东 临沂

收稿日期: 2024年6月25日; 录用日期: 2024年7月19日; 发布日期: 2024年7月25日

摘要

目的: 探讨JAM3 (junctional adhesion molecules 3) 基因DNA甲基化水平在高级别上皮内瘤变中的诊断效能, 实现宫颈癌精准筛查, 协助高级别上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN) II~III级分级管理, 预测术后复发风险, 规范宫颈上皮内瘤变治疗。研究方法: 选择2020年1月至2023年1月就诊于临沂市中心医院需行宫颈活检术的200例病例, 分别行HPV检查、液基细胞学检查、病理标本DNA甲基化检测。检测期间由一名固定医生取样。所有研究对象均通过阴道镜检查并进行宫颈组织病理学确诊后分组。根据病理学检查结果分为正常组、CIN I级组、CIN II级组、CIN III级组, 各50例进行数据统计和临床分析。结果: 正常组、CIN I级组、CIN II级组、CIN III级组JAM3基因甲基化者分别为4%、10%、38%、54%。随着宫颈病变程度的加重, JAM3基因的甲基化水平呈逐渐升高趋势。JAM3基因在正常组、CIN I组、CIN II组、CIN III组任意两组之间均存在显著差异($P < 0.01$)。联合JAM3基因甲基化检测可弥补HPV低特异性及TCT低敏感性的缺陷, 复发患者甲基化水平明显高于治愈者, 差异具有统计学意义。结论: JAM3甲基化检测可显著提高宫颈高级别上皮内瘤变检出率, 可为阴道镜检查不满意的LSIL患者分流管理提供参考; 协助CIN II~III级分级管理, 提高病理诊断一致性; JAM3甲基化可作为高级别上皮内瘤变术后复发预测标志物。

关键词

宫颈高级别上皮内瘤变, JAM3基因, DNA甲基化, 预测

*通讯作者。

A Clinical Study of DNA Methylation of JAM3 Gene in Predicting Cervical High-Grade Intraepithelial Neoplasia and Postoperative Recurrence

Yanyan Lou¹, Yuantao Liu², Shuting Zhao¹, Qing Chen³, Dianxia Cao¹, Weitao Gong¹, Changhong Hao^{1*}

¹Department of Gynecology, Linyi Central Hospital, Linyi Shandong

²Department of Pain, Linyi Central Hospital, Linyi Shandong

³Department of Pathology, Linyi Central Hospital, Linyi Shandong

Received: Jun. 25th, 2024; accepted: Jul. 19th, 2024; published: Jul. 25th, 2024

Abstract

Objective: To explore the diagnostic efficacy of DNA methylation level of JAM3 (junctional adhesion molecules 3) gene in high-grade intraepithelial neoplasia, and to achieve accurate screening of cervical cancer. To assist grade II~III management of high-grade intraepithelial neoplasia (CIN), predict the risk of postoperative recurrence, and standardize the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. **Methods:** A total of 200 cases requiring cervical biopsy were selected from Linyi Central Hospital from January 2020 to January 2023. HPV examination, liquid-based cytology examination and DNA methylation detection of pathological specimens were performed respectively. Samples are taken by a regular doctor during testing. All subjects were grouped by colposcopy and confirmed by cervical histopathology. According to the pathological examination results, the patients were divided into normal group, CIN Grade I group, CIN grade II group and CIN grade III group, with 50 cases in each group for statistical and clinical analysis. **Results:** The methylation rate of JAM3 gene in normal group, CIN I group, CIN II group and CIN III group was 4%, 10%, 38% and 54%, respectively. With the aggravation of cervical lesions, the methylation level of JAM3 gene increased gradually. There were significant differences in JAM3 gene between normal group, CIN I group, CIN II group and CIN III group ($P < 0.01$). The combination of JAM3 gene methylation detection can make up for the defects of low specificity of HPV and low sensitivity of TCT. The methylation level of relapsed patients is significantly higher than that of cured patients, and the difference is statistically significant. **Conclusion:** JAM3 methylation detection can significantly improve the detection rate of high-grade cervical intraepithelial neoplasia, and can provide reference for shunt management of LSIL patients with unsatisfactory colposcopy. Assist CIN-II~III grading management to improve the consistency of pathological diagnosis; JAM3 methylation can be used as a predictor of recurrence after high-grade intraepithelial neoplasia.

Keywords

High-Grade Intraepithelial Neoplasia of Cervix, JAM3 Gene, DNA Methylation, Forecast

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

宫颈恶性肿瘤虽在全球范围内的发病率及死亡率呈整体下降趋势,但仍严重影响对女性健康及生活质量[1]。其病因相对明确:人乳头瘤病毒感染、多个性伴侣、不良性行为、初次性生活过早、分娩次数多以及吸烟等,而宫颈上皮内瘤变是宫颈恶性肿瘤发展的重要环节,提早干预与治疗可以预防宫颈癌的发生。2020年世界卫生组织(WHO)根据鳞状上皮内病变程度可将其分为低级别(LISL,即 CIN I)和高级别(HISL,即 CIN II 及 CIN III)两类[2]。对宫颈上皮内瘤变患者实行规范化分级管理可遏制疾病进展为宫颈癌。宫颈癌目前多采用人乳头瘤病毒检测与液基薄层细胞学检查相结合的方式,但两者均存在不足:HPV 高敏感性但特异性低;TCT 高特异性但敏感性低,结果易受多重因素影响,存在差异性。随着肿瘤基因学研究的不断深入,其检测的精准度及稳定性逐渐被重视。表观遗传学在肿瘤发生发展中扮演重要角色,其中 DNA 甲基化是目前较为清楚的表观遗传修饰方式之一[3]。研究指出,JAM3 在宫颈癌和上皮内瘤变中均发生高甲基化,且甲基化可作为 CIN 预后的标志物[4] [5]。本研究旨在探讨 JAM3 基因 DNA 甲基化在高级别上皮内瘤变(CIN II, CIN III)患者中的诊断效能,分别比较 DNA 甲基化检测与 HPV 及 TCT 检测的灵敏度及特异度差异。探讨对高级别上皮内瘤变患者术后复发预测的临床意义。

2. 资料与方法

2.1. 研究对象

回顾性收集 2020 年 1 月至 2023 年 1 月,就诊于临沂市中心医院行阴道镜下宫颈活检的 200 例患者,病理证实为宫颈无病变者、CIN I 级、CIN II 级、CIN III 级者各 50 例。所有患者均签署知情同意书,研究获得临沂市中心医院伦理委员会批准。

纳入标准:1) 患者临床资料完整并知情同意;2) 按宫颈癌筛查流程,均行 HPV、TCT 及阴道镜检查者;3) 宫颈活检病理标本经病理诊断明确;排除标准包括:1) 有生殖道恶性肿瘤或其他肿瘤史;2) 有自身免疫性疾病史或正在使用免疫抑制剂;3) 处于妊娠期或哺乳期;4) 接种过宫颈癌疫苗。

2.2. 材料与实验方法

2.2.1. 材料

本实验采用研究者宫颈病理组织,均经 3.7%中性甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,4 μ m 厚切片和 HE 染色。

2.2.2. 实验方法

使用 TSINGKE 动物 DNA 提取试剂盒(TSP201-200),提取的 DNA 进行电泳检测及分光光度计检测浓度。使用凯杰生物的 EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (59824)对提取的 DNA 进行转化。转化用 DNA 量根据 DNA 浓度取 300 ng。使用 Methyl Primer Express v1.0 软件设计引物,扩增目的区域 CG 岛片段。上游引物的标识: -F (forward primer),下游引物的标识: -R (reverse primer),M 为甲基化引物,U 为非甲基化引物,引物序列(5'-3')H-JAM4(M)-F: GGAATTTTTATTTTTCGGATTTAAGC,引物序列(5'-3')H-JAM4(M)-R: AAACATAAAATAAACAAATCACAAAATCG,片段长度(bp)178,引物序列(5'-3')H-JAM4(U)-F: TGGAATTTTTATTTTGGATTTAAGT,引物序列(5'-3')H-JAM4(U)-R: AAAACTAAAATAAACAAATCACAAAATCA,片段长度(bp)180。用合成的引物,以擎科生物 2 $\times$ mavin Taq PVR Mix 进行巢式扩增,形成扩增体系。

PCR 扩增

取 0.2 ml PCR 管,配制如下反应体系。

2×Taq PCR Master Mix	25 μL	
Forward Primer (10 μM)	1.5 μL	
Reverse Primer (10 μM)	1.5 μL	
甲基化回收产物	2.0 μL	
Water Nuclease-Free	Add to 50 μL	
预变性	95℃, 5min	
变性	95℃, 30s	←┐ 40×循环 └─┘
退火	55℃, 30s	
延伸	72℃, 30s	
末段延伸	72℃, 5min	
降温	16℃, 2min	

将扩增好的 PCR 产物进行琼脂凝胶电泳(1 × TAE, 2.0% agarose, 4 V/cm), 紫外线成像(图 1)。结果用 BiQAnalyzer 软件进行数据分析, 统计甲基化情况。

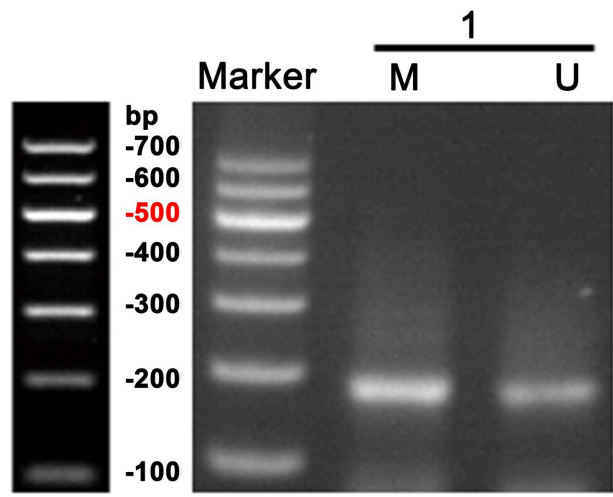


Figure 1. Methylation gene image
图 1. 甲基化基因图像

3. 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。本研究计量资料采用方差分析。首先进行方差齐性和正态分布检验, 对于方差齐且呈正态分布的资料, t 检验应用于两组间比较, 单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)应用于多组间比较; 根据研究数据制作受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线并且确定曲线下面积(area under the curve, AUC)。通过 ROC 曲线确定 CIN2/3 术后复发的预测阈(cut-off value, Ct)值, 计算预测 CIN2/3 术后复发的特异性和敏感性。以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

4. 结果

JAM3-4 在正常组、CIN I 级组、CIN II 级组、CIN III 级组中甲基化阳性率分别为 4%、10%、38%、54%。JAM3 基因的甲基化水平随着宫颈病变程度的加重而升高。JAM3 基因在正常组、CIN I 组、CIN II 组、CIN III 组任意两组之间均存在显著差异($P < 0.01$) (图 2)。

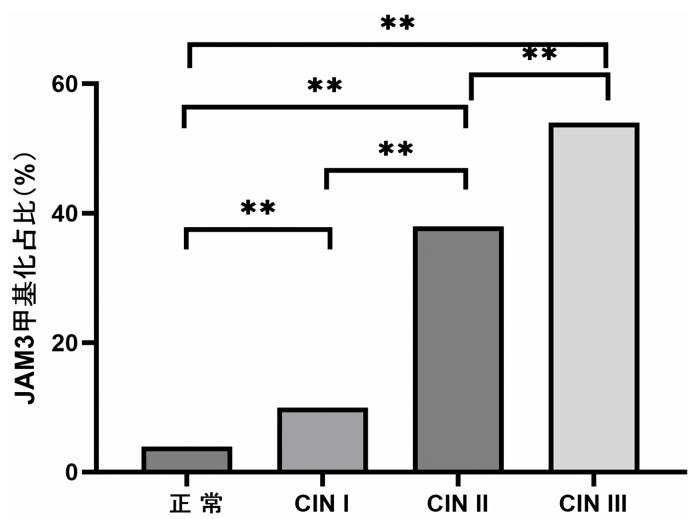


Figure 2. Methylation levels of JAM3 in each group, with “**” indicating $P < 0.01$
图 2. JAM3 在各组中的甲基化水平, “**” 表示 $P < 0.01$

高级别上皮内瘤变患者分别于术后 6 个月、12 个月随访, 包括 HPV 及 TCT 检查。其中 9 人术后失访, 3 人妊娠, 治愈者 85 人(96.6%), 复发者 3 人(3.4%), 2 例 CIN I 级, 1 例 CIN II 级。所有阴道镜活组织检查病理均由两位高级别病理科医师统一审核。复发者的 JAM3 甲基化水平高于治愈者(表 1、图 3)。根据高级别上皮内瘤变治疗后不同预后情况 JAM3 基因的甲基化水平取最佳临界值时计算敏感性、特异性(见表 2)。分别为 91%和 93%。两组 JAM3 基因甲基化水平差异有统计学意义($P < 0.01$)。

Table 1. Postoperative JAM3 methylation levels in high-grade intraepithelial neoplasia (CIN II~III) group
表 1. 高级别上皮内瘤变(CIN II~III 级)组术后 JAM3 甲基化水平

分组	n	JAM3%
治愈	85	13.20 ± 4.61
复发	3	21.05 ± 9.01

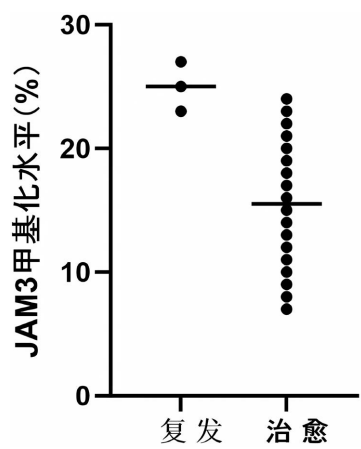


Figure 3. Scatter plot of JAM3 methylation level in high-grade intraepithelial neoplasia (CIN II~III) group after surgery (Note: The horizontal line level is critical value)
图 3. 高级别上皮内瘤变(CIN II~III 级)组术后 JAM3 甲基化水平散点图(注: 横线水平为临界值)

Table 2. Efficacy of JAM3 methylation in predicting postoperative recurrence of high-grade intraepithelial neoplasia (CIN II~III grade)

表 2. JAM3 甲基化对高级别上皮内瘤变(CIN II~III 级)术后复发预测效能

基因	AUC(95%CI)	p	敏感性	特异性	Ct (%)
JAM3	0.971 (92.8%~100%)	<0.001	91%	93%	14.92

5. 讨论

宫颈高级别上皮内瘤变患者中，CIN II 自然消退比率为约 40%，40%左右的患者呈持续状态；CIN III 若不加干预约 12%~22%进展为宫颈癌。因此早期治疗宫颈癌前病变，尽早采取临床干预，可有效的减少宫颈癌的发生。传统宫颈癌筛查手段均存在临床局限性。高危 HPV 感染为宫颈上皮内瘤变及宫颈癌发病较明确因素，但大多数女性感染呈“一过性”，特异性低。液基薄层细胞学检测结果受判读医师的主观影响较大，敏感性低。目前需寻找稳定性较高的标志物，提高高级别上皮内瘤变检出的准确性。Boers 等[6] [7]研究发现，在合并有高危 HPV 感染的宫颈上皮内瘤变 II 级及以上病变患者中，应用定量的方法检测了 JAM3 基因甲基化敏感度为 68%，特异度为 94%。JAM3 高敏感性 & 特异性可为宫颈癌精准筛查提供依据。

连接粘附分子(junctional adhesion molecules, JAM)是属于免疫球蛋白超家族，是一种特殊类型的含有两个细胞外免疫球蛋白样结构域、一个跨膜片段和一个长度可变的细胞质尾部的糖蛋白[8]，此结构与上皮细胞、内皮细胞的连接具有相关性。JAM 主要分布在白细胞、血小板和红细胞表面。有研究指出，JAM 蛋白在细胞过程中起到重要作用，分布于白细胞表面影响白细胞迁移，位于血小板表面可激活血小板，还可参与血管生成和病毒的结合[9]。HIF-1 α 是一种缺氧反应因子，它通过激活许多基因转录的主调控因子来影响缺氧，并参与细胞能量的调控，进而调节带代谢、血管生成、增殖和凋亡，VEGFA 是 HIF-1 的下游因子，参与肿瘤血管生成[10]。有研究指出，JAM3 通过激活 HIF-1 α /VEGFA 通路，参与肿瘤转移、白细胞游走、血管形成等过程[11]。在骨髓内造血干细胞和祖细胞的归巢和动员中亦发挥作用[12]。JAM3 在宫颈癌和上皮内瘤变中均呈高甲基化状态，且甲基化可作为 CIN 预后的标志物[4] [5]。与本研究相符。

当前，肿瘤的发生主要是由于肿瘤抑制基因启动子区域的 DNA 甲基化，包括宫颈癌在内的多种肿瘤的发生、发展等各个阶段均有特异性的改变模式[13] [14]。

DNA 甲基化是指通过将 S-腺苷甲硫氨酸添加到 DNA 分子碱基上来调控基因表达。这种调控机制包括：1) 广泛低甲基化：导致染色体不稳定性增加。2) 特定区域和特定基因过度甲基化[15] [16]。基因启动子高甲基化主要在 CpG 岛及其周围区域发生，调控多种基因的表达水平，从而引起异常的表现遗传变化[17] [18]。当与肿瘤相关的基因或抑制基因的启动子区 CpG 岛过度甲基化时，该基因转录失活，影响蛋白质翻译表达；同时也干扰了肿瘤细胞信号通路，累积效应使肿瘤抑制基因进一步失去功能，表现肿瘤特性。在宫颈癌方面的表现遗传学研究中，高度甲基化被认为可能成为宫颈癌分子诊断新方法之一[19]。

综上，JAM3 基因甲基化联合 HPV 及 TCT 检查可提高宫颈病变诊断特异性及阳性预测值；JAM3 基因甲基化可为阴道镜检查不满意的 LSIL 患者分流管理提供参考；结合免疫组化 P16 染色，评估 JAM3 基因甲基化协助病理 CIN II~III 分级可行性，提高诊断一致性。JAM3 的高甲基化与治疗后 CN2/3 的转归相关，并且复发者明显高于消退者，但基于研究样本数量有限，需增加样本量提高研究结论权威性；JAM3 的高甲基化有望成为高级别上皮内瘤变的术后复发预测标志物。

基金项目

临沂市重点研发计划(医学类)。项目名称：JAM3 基因 DNA 甲基化在宫颈高级别上皮内瘤变及术后复发预测的临床研究。项目编号：2023YX0051。

参考文献

- [1] 李道娟, 师金, 靳晶, 等. 宫颈癌的流行病学趋势[J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43(9): 912-916.
- [2] 中国抗癌协会妇科肿瘤专业委员会. 子宫锥切术后高危型人乳头瘤病毒阳性者规范化管理的专家共识[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(6): 650-653.
- [3] 殷爱军. DNA 甲基化检测在宫颈癌筛查中的应用[D]: [博士学位论文]. 济南: 山东大学, 2016.
- [4] Guo, Z., Hu, Y., Yuan, L., Li, N. and Wang, T. (2018) A Prospective Study on the Predictive Value of DNA Methylation in Cervical Intraepithelial Neoplasia Prognosis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, **298**, 589-596. <https://doi.org/10.1007/s00404-018-4796-3>
- [5] Li, N., Hu, Y., Zhang, X., Liu, Y., He, Y., van der Zee, A.G.J., et al. (2020) DNA Methylation Markers as Triage Test for the Early Identification of Cervical Lesions in a Chinese Population. *International Journal of Cancer*, **148**, 1768-1777. <https://doi.org/10.1002/ijc.33430>
- [6] Boers, A., Wang, R., van Leeuwen, R.W., Klip, H.G., de Bock, G.H., Hollema, H., et al. (2016) Discovery of New Methylation Markers to Improve Screening for Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2/3. *Clinical Epigenetics*, **8**, Article No. 29. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0196-3>
- [7] Boers, A., Bosgraaf, R.P., van Leeuwen, R.W., Schuur, E., Heideman, D.A.M., Massuger, L.F.A.G., et al. (2014) DNA Methylation Analysis in Self-Sampled Brush Material as a Triage Test in hrHPV-Positive Women. *British Journal of Cancer*, **111**, 1095-1101. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.392>
- [8] Williams, A.F. and Barclay, A.N. (1988) The Immunoglobulin Superfamily—Domains for Cell Surface Recognition. *Annual Review of Immunology*, **6**, 381-405. <https://doi.org/10.1146/annurev.iv.06.040188.002121>
- [9] Mandell, K. and Parkos, C. (2005) The JAM Family of Proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**, 857-867. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.005>
- [10] Liu, H., Tang, T., Hu, X., Tan, W., Zhou, P., Zhang, H., et al. (2022) miR-138-5p Inhibits Vascular Mimicry by Targeting the HIF-1 α /VEGFA Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Immunology Research*, **2022**, Article ID: 7318950. <https://doi.org/10.1155/2022/7318950>
- [11] Yin, A., Zhang, Q., Kong, X., Jia, L., Yang, Z., Meng, L., et al. (2015) JAM3 Methylation Status as a Biomarker for Diagnosis of Preneoplastic and Neoplastic Lesions of the Cervix. *Oncotarget*, **6**, 44373-44387. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6250>
- [12] Arcangeli, M., Bardin, F., Frontera, V., Bidaut, G., Obrados, E., Adams, R.H., et al. (2014) Function of Jam-B/Jam-C Interaction in Homing and Mobilization of Human and Mouse Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells*, **32**, 1043-1054. <https://doi.org/10.1002/stem.1624>
- [13] Saavedra, K.P., Brebi, P.M. and Roa, J.C.S. (2012) Epigenetic Alterations in Preneoplastic and Neoplastic Lesions of the Cervix. *Clinical Epigenetics*, **4**, Article No. 13. <https://doi.org/10.1186/1868-7083-4-13>
- [14] Szalmás, A. and Kónya, J. (2009) Epigenetic Alterations in Cervical Carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, **19**, 144-152. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.02.011>
- [15] Jones, P.A. and Baylin, S.B. (2007) The Epigenomics of Cancer. *Cell*, **128**, 683-692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>
- [16] Laird, P.W. (2005) Cancer Epigenetics. *Human Molecular Genetics*, **14**, R65-R76. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi113>
- [17] 霍会蚕, 王如意, 李艳云, 等. 高危型 HPV 感染及 CALCA 基因启动子甲基化在宫颈病变检测中的临床价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(17): 2628-2632.
- [18] Nishiyama, A. and Nakanishi, M. (2021) Navigating the DNA Methylation Landscape of Cancer. *Trends in Genetics*, **37**, 1012-1027. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.05.002>
- [19] Zhang, L., Tan, W., Yang, H., Zhang, S. and Dai, Y. (2022) Detection of Host Cell Gene/HPV DNA Methylation Markers: A Promising Triage Approach for Cervical Cancer. *Frontiers in Oncology*, **12**, Article 831949. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.831949>