

钙粘蛋白基因高甲基化与胃癌发生、发展的关系

刘文天¹, 焦焕利¹, 杨玉龙¹, 王 栋², 张维铭²

Correlation of E-cadherin Hypermethylation to Tumorigenesis and Development of Gastric Cancer

LIU Wen-Tian¹, JIAO Huan-Li¹, YANG Yu-Long¹, WANG Dong², ZHANG Wei-Ming²

1. 天津医科大学总医院

消化科,

天津 300052

2. 天津医科大学实验中心,

天津 300070

1. Department of Gastroenterology,

General Hospital,

Tianjin Medical University,

Tianjin, 300052,

P. R. China

2. Central Laboratory,

Tianjin Medical University,

Tianjin, 300070,

P. R. China

通讯作者: 刘文天

Correspondent to: LIU Wen-Tian

Tel: 86-22-60363615

E-mail: lwentian@sohu.com

基金项目: 天津医科大学科研基

金 (No. 2003ky55)

Grant: Scientific Research

Foundation of Tianjin Medical

University (No. 2003ky55)

收稿日期: 2006-12-27

修回日期: 2007-03-12

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: CpG island hypermethylation in promoter region of E-cadherin (E-cad) gene plays an important role in tumorigenesis of many tumors. This study was to explore the correlation of E-cadherin hypermethylation to tumorigenesis and development of gastric cancer. **METHODS:** Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was used to detect the methylation of E-cad gene in 41 specimens of gastric cancer, 40 specimens of premalignant gastric lesions and 38 specimens of normal gastric tissues. The expression of E-cad protein was detected by SP immunohistochemistry. **RESULTS:** The positive rate of E-cad gene methylation was significantly higher in gastric cancer than in premalignant lesions and normal tissues (19.5% vs. 2.5% and 0.0%, $P<0.05$). The positive rate of E-cad protein was significantly lower in gastric cancer tissues than in premalignant lesions and normal tissues (70.7% vs. 97.5% and 100.0%, $P<0.05$). The positive rate of E-cad gene methylation was significantly higher in poorly differentiated cancer tissues than in well differentiated cancer tissues (43.8% vs. 4.0%, $P<0.05$), significantly higher in gastric cancer tissues with lymph node metastasis than in those without lymph node metastasis (33.3% vs. 5.0%, $P<0.05$), and significantly higher in gastric cancer tissues with serosa invasion than in those without serosa invasion (35.0% vs. 4.8%, $P<0.05$). The positive rate of E-cad protein was significantly lower in gastric cancer tissues with E-cad gene methylation than in those without E-cad gene methylation (0.0% vs. 87.9%, $P<0.05$). **CONCLUSION:** CpG island hypermethylation of E-cad gene exists in gastric cancer, which down-regulates E-cad expression and might be involved in tumorigenesis and development of gastric cancer.

KEYWORDS: Gastric neoplasm/etiology; Premalignant lesions; DNA methylation; E-cadherin

【摘 要】 背景与目的: 有研究报道基因启动子区 CpG 岛甲基化引起的钙粘蛋白(E-cadherin, E-cad)基因失活可能在胃癌的发生发展中起重要作用。本研究拟通过检测胃癌组织、癌前病变组织和正常对照组织中 E-cad 基因启动子区 CpG 岛甲基化水平及其表达, 结合临床病理资料, 分析其与胃癌发生、发展的关系。方法: 用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific PCR, MSP)检测 41 例胃癌组织、40 例癌前病变组织和 38 例正常对照组织中 E-cad 基因启动子 5' CpG 岛甲基化, 将 PCR 扩增产物克隆并测序。应用免疫组化检测基因的蛋白表达。结果: 胃癌组织中 E-cad 基因甲基化阳性率为 19.5%(8/41), 癌前病变组织为 2.5%(1/40), 而正常对照组织为 0.0%(0/38), 前组与后两组之间的差异均有统计学意义($P<0.05$)。胃癌组织中 E-cad 蛋白阳性率为 70.7%(29/41), 癌前病变组织为 97.5%(39/40), 正常对照组织为 100.0%(38/38), 前组与后两组之间的差异均有统计学意义($P<0.05$)。低分化型胃癌组织的 E-cad 基因甲基化阳性率明显高于高

分化型(43.8% vs. 4.0%)($P<0.05$)。有淋巴结转移的胃癌组织中 E-cad 基因甲基化阳性率与无转移组的差异有统计学意义(33.3% vs. 5.0%)($P<0.05$)。浸润深达浆膜层的胃癌组织中甲基化阳性率与未达浆膜层组的差异有统计学意义(35.0% vs. 4.8%)($P<0.05$)。胃癌组织中, E-cad 基因甲基化阳性组的蛋白阳性率显著低于甲基化阴性组(0.0% vs. 87.9%)($P<0.05$)。结论:胃癌组织中存在 E-cad 基因启动子 5'CpG 岛高甲基化;从胃癌前病变、低度恶性到高度恶性的胃癌, E-cad 基因的高甲基化水平呈不断增加的趋势。

关键词:胃肿瘤/病因学;癌前病变;DNA 甲基化;钙粘蛋白基因

中图分类号:R573 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2007)11-1199-05

现认为胃癌的发病是许多基因异常表达的结果。基因的表达异常是包括基因序列即遗传学(genetics)改变和基因表型遗传学(epigenetics)改变^[1],而表型遗传学是研究在 DNA 序列没有改变的情况下所发生的遗传性基因表达的改变。这种基因表达的改变可通过 DNA 甲基化来实现。钙粘蛋白(E-cadherin, E-cad)基因是一种肿瘤转移抑制基因,其表达的 E-cad 蛋白是一种依赖钙的粘附分子,在上皮细胞之间起着介导同质性粘附及维持组织结构完整性的作用。E-cad 编码基因启动子区域 CpG 岛发生甲基化是导致 E-cad 失活的重要机制之一。它引起的 E-cad 基因失活,使细胞间接触抑制减弱以及细胞生长失控,因此可能在胃癌的发生、发展过程中起重要作用^[2]。目前对这些肿瘤相关基因高甲基化与胃癌发病关系的研究还很少。本实验采用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific PCR, MSP)及免疫组织化学方法研究胃癌组织及癌前病变组织中 E-cad 基因启动子区甲基化状况及其蛋白表达,旨在了解胃癌中 E-cad 基因启动子区域甲基化与蛋白表达的关系,以及甲基化与胃癌临床病理指标之间的关系,以认识 E-cad 基因高甲基化与胃癌发生、发展的关系。

1 资料与方法

1.1 病例资料

标本取自天津医科大学总医院 2004 年 11 月至 2005 年 3 月的胃镜活检标本。胃癌 41 例,男性 23 例,女性 18 例,中位年龄 54 岁(年龄范围 38~72 岁);高分化型(乳头状腺癌、管状腺癌)25 例,低分化型(粘液腺癌、印戒细胞癌)16 例。癌前病变

40 例中慢性萎缩性胃炎伴中-重度肠上皮化生 28 例,慢性萎缩性胃炎伴中-重度不典型增生 24 例,慢性萎缩性胃炎伴中-重度肠上皮化生及中-重度不典型增生 12 例;其中男性 22 例,女性 18 例,中位年龄 53 岁(年龄范围 38~64 岁);对照组(正常胃粘膜及慢性浅表性胃炎)38 例,男性 21 例,女性 17 例,中位年龄 53 岁(年龄范围 44~68 岁)。将组织标本一部分立即置液氮,然后放入-70℃的低温冰箱中保存,以做 MSP 检测甲基化。另一部分标本用 10% 甲醛固定,做常规病理及免疫组化检测。

1.2 方法

1.2.1 试剂来源 氯仿-异戊醇为上海生物工程有限公司产品,氢醌和亚硫酸氢钠为天津市化学试剂二厂产品, Wizard Resin 为 Promega 公司产品, dNTP、Taq buffer 和 Taq DNA 聚合酶为天为时代公司产品。羊抗兔 IgG 购自北京中山生物技术有限公司, DAB 显色液购自武汉博士德生物有限公司。

1.2.2 DNA 的提取及 DNA 亚硫酸氢盐修饰和纯化 用氯仿-异戊醇提取组织 DNA, 将抽提好的 DNA 置于-20℃冰箱中保存。1 μg DNA 加入 50 μl 总体积中, 加 2 mol/L NaOH 使其终浓度为 0.2 mol/L, 37℃ 变性处理 10 min, 加新鲜配制 10 mmol/L 氢醌(A 液)及 3 mol/L 亚硫酸氢钠(B 液), 并调 pH 值为 5.0, 向变性后的样品中加入 20 μl A 液, 溶液颜色变黄后, 加入 520 μl B 液, 混匀离心后, 上盖矿物油于 50℃水浴 16 h。用 Wizard Resin 提纯。

1.2.3 MSP E-cad 基因甲基化(M)和非甲基化(U)序列的特异性引物由上海生物工程有限公司合成,其序列如下:E-cad(M) FP 为 5'GGTGAATTT TTAGTTAATTAGCGGTAC, RP 为 3'CATAACTAACC GAAAACGCCG, 扩增片段长度为 204 bp; E-cad(U) FP 为 5'GGTAGGTGAATTTTTAGTTAATTAGTG GTA, RP 为 3'ACCCATAACTAACC AAAAACACCA, 扩增片段长度为 211 bp。

PCR 反应体系为二甲基亚砜(DMSO) 0.7 μl, dNTP 混合物 2.0 μl (终浓度 200 μmol/L), 10×Taq buffer 2.5 μl, Taq DNA 聚合酶 0.6 μl (1.2 U), 引物 0.7 μl, DNA 1.0 μl (0.2 μg), 加纯水至 25 μl。循环条件:94℃ 5 min, (94℃ 30 s, 54℃ 30 s) 30 个循环, 72℃ 7 min。琼脂糖凝胶电泳判定 PCR 产物。随机选取甲基化特异和非甲基化特异 PCR 扩增产物进行克隆测序,以验证 PCR 扩增的准确性。由天

津华生公司采用 CEQ800 测序仪对克隆质粒进行双向测序,测序结果与 GenBank 比对。若 DNA 序列 CG 中的 C 未发生甲基化,经亚硫酸盐修饰后,则 CG→UG;若已发生甲基化,则经亚硫酸盐修饰后 CG→CG。

1.2.4 免疫组化法检测 采用链霉素-抗生物素蛋白过氧化物酶连接法 (SP 法)。切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0),微波炉加热,使之在 92~98℃维持 15 min,室温冷却 20 min,0.1 mol/L PBS 洗 2 次。滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,加 1:50 稀释的一抗,以正常山羊血清代替一抗做阴性对照,37℃孵育 2 h 后,室温恢复 20 min,置 4℃冰箱中过夜。取出切片,室温恢复 20 min,0.1 mol/L PBS 洗 2 min×3 次,加生物素化羊抗兔 IgG,37℃孵育 0.5 h,0.1 mol/L PBS 洗 2 min×3 次。滴加 SP 试剂,37℃孵育 0.5 h,0.1 mol/L PBS 洗 5 min×3 次。滴加 DAB 显色液,室温下显色,镜下控制显色时间,蒸馏水洗。苏木精复染,脱水,透明,中性树胶封片,镜下观察结果。E-cad 蛋白在粘膜上皮细胞膜着色呈棕黄色,胞质也有很弱的着色,为阳性表达。取 5 个高倍视野计算阳性细胞占总细胞数的百分率作为阳性比例。

1.3 统计学分析方法

用 SPSS 10.0 统计软件处理,各组间率的比较

采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 E-cad 基因甲基化检测结果

由胃癌组织、癌前病变组织和正常对照组织中 E-cad 基因 MSP 扩增结果可见,胃癌与癌前病变组织中用甲基化特异性引物扩增出 204 bp 的片段,而正常对照组织中用非甲基化特异性引物扩增出 211 bp 的片段(图 1)。非甲基化或甲基化 E-cad PCR 产物克隆测序结果与 GenBank 比对,与目的片段相吻合(图 2)。

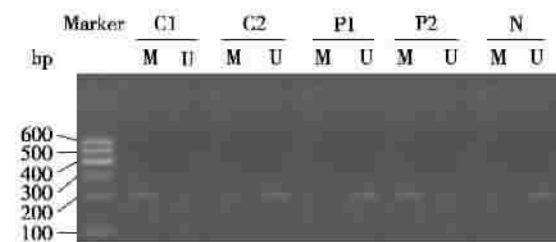


图 1 胃癌组织、癌前病变组织和正常胃组织中 E-cad 的 MSP 扩增结果

Figure 1 E-cadherin CpG methylation status in gastric tissues detected by methylation-specific PCR

M: methylation; U: unmethylation; C: gastric cancer; P: premalignant gastric lesion; N: normal gastric tissue.

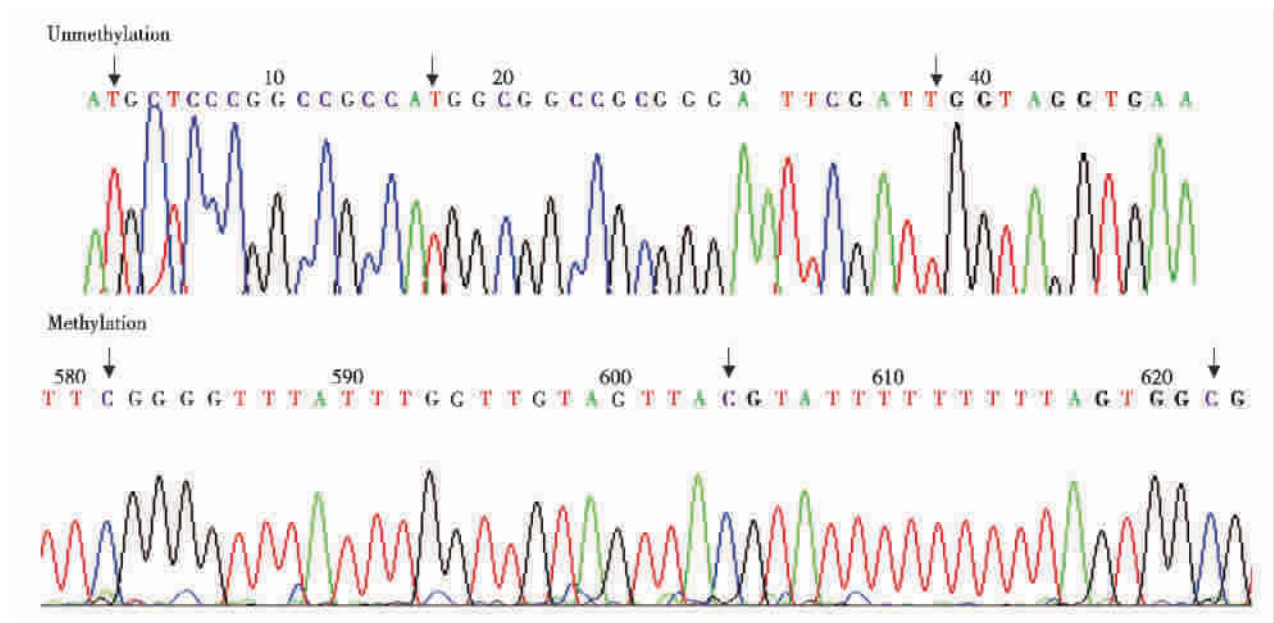


图 2 E-cad 基因启动子区 CpG 岛序列

Figure 2 CpG sequence of the promoter of E-cadherin gene

胃癌组织、癌前病变组织和正常对照组织中 E-cad 甲基化阳性率分别为 19.5%、2.5%及 0.0%,胃癌组与正常对照组及癌前病变组比较甲基化阳性率差异有统计学意义 ($P<0.05$),癌前病变组与正常对照组比较甲基化阳性率差异无统计学意义 ($P>0.05$)(表 1)。

低分化型胃癌甲基化阳性率(43.8%)较高分化型(4%)增高,且两组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。伴淋巴结转移的胃癌甲基化阳性率 33.3%,与不伴淋巴结转移的甲基化阳性率 5.0%比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。浸润深达浆膜层的胃癌甲基化阳性率为 35.0%,与未达浆膜层的甲基化阳性率 4.8%比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)(表 1)。

2.2 E-cad 基因的蛋白表达

胃癌组、癌前病变组及正常对照组 E-cad 基因的蛋白表达见图 3,其阳性率分别为 70.7%、97.5%和 100%。胃癌组与正常对照组及癌前病变组比较 E-cad 蛋白阳性率差异有统计学意义 ($P<0.05$),癌前病变组与正常对照组比较 E-cad 蛋白阳性率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。胃癌中 E-cad

基因甲基化阳性组的 E-cad 蛋白阳性率为 0.0%,E-cad 基因甲基化阴性组 E-cad 蛋白阳性率 87.9%,两组间比较差异有统计学意义(表 1)。

表 1 E-cadherin 基因高甲基化及蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系

Table 1 Correlation of E-cadherin hypermethylation and expression to clinicopathologic features of gastric cancer

Group	Cases	E-cadherin [cases (%)]	
		Methylation	Expression
Normal gastric tissues	38	0 (0.0)	38 (100.0)
Premalignant gastric lesions	40	1 (2.5)	39 (97.5)
Gastric cancer	41	8 (19.5) ^a	29 (70.7) ^a
Differentiation			
Well	25	1 (4.0)	20 (80.0)
Poor	16	7 (43.8) ^b	9 (56.3)
Lymph node metastasis			
Positive	21	7 (33.3)	14 (66.7)
Negative	20	1 (5.0) ^b	15 (75.0)
Serosa invasion			
Present	20	7 (35.0)	13 (65.0)
Absent	21	1 (4.8) ^b	16 (76.2)

^a $P<0.05$, vs. premalignant gastric lesions and normal tissues;

^b $P<0.05$, comparisons between relative subgroups.

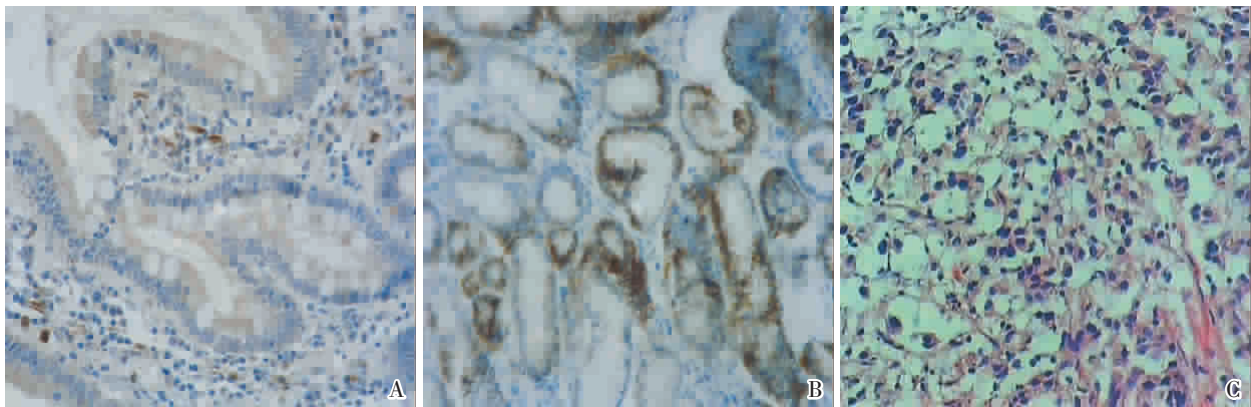


图 3 胃粘膜组织中的 E-cad 基因表达(SP ×200)

Figure 3 Expression of E-cadherin protein in gastric tissues (SP ×200)

A: E-cadherin is strongly expressed (in brown) in cytoplasm in normal gastric tissue.

B: E-cadherin is strongly expressed (in brown) in cytoplasm in premalignant lesion.

C: E-cadherin is weakly expressed (in brown) in cytoplasm in gastric cancer tissue.

3 讨 论

胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一,多种癌基因的活化和/或多种抑癌基因的失活及多种外源致癌物的刺激因素的作用导致了胃癌的发生^[3]。基因的表达不仅仅取决于 DNA 上碱基排列

顺序的改变,还受 DNA 序列以外的机制所调节。DNA 甲基化主要是由 DNA 甲基转移酶 (DMT)催化,S-腺苷蛋氨酸(SAM)提供甲基给胞嘧啶,形成 5-甲基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶是真核细胞中唯一存在的天然修饰方式,占整个胞嘧啶的 3%~4%。启动子区富含 CpG 序列,故易发生甲基化。基因启动

子区甲基化可以在转录水平抑制基因表达。在正常细胞中抑癌基因启动子区保持非甲基化状态,基因可以正常转录、表达,而在肿瘤细胞中,抑癌基因启动子区甲基化,转录受到抑制,基因不能表达。在肿瘤组织中常常有与 DNA 损伤修复、细胞周期等有关的肿瘤抑制基因失活,从而导致恶性肿瘤的发生和发展。迄今已发现许多恶性肿瘤存在一个或多个肿瘤抑制基因 CpG 岛甲基化。肿瘤抑制基因 CpG 岛甲基化是当今肿瘤分子生物学研究的热点^[4-6]。

1998 年 Guilford 等^[7]在新西兰发现 3 个伴有 E-cad 基因生殖系突变的胃癌家系,引起了许多胃癌研究者的注意,但研究者发现在散发性胃癌中 E-cad 基因突变率并不很高,认为散发性胃癌与 E-cad 甲基化的关系更为密切。E-cad 作为上皮细胞极性形成及相互联结的分子基础,在正常上皮组织中表达良好。来源于粘膜上皮的癌细胞在发生、发展过程中,E-cad 的表达常下降或消失。Shino 等^[8]用免疫组化技术分析了 121 例胃癌组织的 E-cad 表达,发现非肿瘤胃粘膜无一例外地均阳性表达,而胃癌组织有 32.2% 不能正常表达(28 例表达下调和 11 例表达缺失)。本研究的结果发现 E-cad 表达阳性率仅 70.7%,即有 29.3% 未正常表达,与文献^[8]结果基本一致。Tamura 等^[9]研究显示 E-cad 基因启动子的甲基化可导致其表达降低,而且发生于胃癌的早期。因此探讨 E-cad 表达异常与基因甲基化关系,对于明确 E-cad 基因在胃癌发病中的作用具有十分重要的意义。本研究通过对 E-cad 基因甲基化的检测发现,胃癌中 E-cad 启动子区 5' CpG 岛甲基化阳性率为 19.51%,较胃癌前病变及正常对照明显增高。此外,E-cad 基因甲基化的阳性率与胃癌的临床病理分期有密切的关系,在低分化、伴有淋巴结转移和浸润达浆膜的胃癌中 E-cad 启动子区 5' CpG 岛高甲基化阳性率明显增高,因此提示 E-cad 甲基化水平对于预示肿瘤恶性程度具有重要的意义。在同时对 E-cad 表达的检测发现,胃癌中 E-cad 表达较癌前病变组和正常对照组明显降低,胃癌的 E-

cad 高甲基化组的 E-cad 蛋白阳性率为 0%,说明 E-cad 启动子区甲基化与其蛋白阳性率缺失有密切关系,E-cad 启动子区 CpG 岛发生甲基化,引起的 E-cad 基因失活,使细胞间接触抑制减弱以及细胞生长失控,因此可能在胃癌的发生、发展过程中起重要作用。本研究中胃癌前病变的 E-cad 基因甲基化水平及基因表达的水平有异常转化的趋势,但与正常对照相比没有显著的改变。因此,以 CpG 岛高甲基化作为肿瘤标志物动态的监测胃癌前病变的患者,在胃癌早期预防和治疗上均有重要的应用价值。

参考文献

- [1] Baylin S B, Herman J G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics [J]. *Trend Genet*, 2000,16(4):168-174.
- [2] Frixen U H, Behrens J, Sachs M, et al. E-CD mediated cell-cell adhesion prevents invasions of human cancer cells [J]. *J Cell Biol*, 1991,113(1):173.
- [3] 张维铭,刘文天,徐 焱,等. 应用荧光差异显示法对胃癌及癌前病变相关基因的研究 [J]. *癌症*, 2004,23(3):264-268.
- [4] Esteller M, Corn P G, Baylin S B, et al. A gene hypermethylation profile of human cancer [J]. *Cancer Res*, 2001,61(8):3225-3229.
- [5] Leung W K, Yu J, Ng E K, et al. Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues [J]. *Cancer*, 2001,91(12):2294-2301.
- [6] Rountree M R, Bachman K E, Herman J G, et al. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer [J]. *Oncogene*, 2001,20(24):3156-3165.
- [7] Guilford P, Hopkins J, Harraway J, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer [J]. *Nature*, 1998,392(6674):402-405.
- [8] Shino Y, Watanabe A, Yamada Y, et al. Clinicopathologic evaluation of immunohistochemical E-cadherin expression in human gastric carcinomas [J]. *Cancer*, 1995,76(11):2193-2201.
- [9] Tamura G, Yin J, Wang S, et al. E-cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000,92(7):569-573.

[编辑及校对:甘可建]