

两种方法检测胃癌患者 CHFR 基因启动子区甲基化的状态

程昭栋¹, 胡世莲¹, 孙玉蓓², 徐维平³, 沈干⁴, 孔祥勇¹

Promoter methylation of CHFR gene in gastric carcinoma tissues detected using two methods

Zhao-Dong Cheng¹, Shi-Lian Hu¹, Yu-Bei Sun², Wei-Ping Xu³, Gan Shen⁴, Xiang-Yong Kong¹

1. 安徽医科大学附属省立医院老年医学科, 安徽 合肥 230001
2. 安徽医科大学附属省立医院肿瘤内科, 安徽 合肥 230001
3. 安徽省循证医学中心, 安徽 合肥 230001
4. 安徽省委机关医院干部病房, 安徽 合肥 230001

1. Department of Gerontology, Province Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230001, P. R. China

2. Anhui Province Hospital, Department of Oncology, Hefei, Anhui 230001, P. R. China

3. Anhui Evidence-based Medicine Center, Hefei, Anhui 230001, P. R. China

4. Cadre's Ward of Anhui Provincial Party Committees Hospital, Hefei, Anhui 230001, P. R. China

通讯作者: 胡世莲

Correspondence to: Shi-Lian Hu
Tel.: 86.551.2283589
Email: hushilian78@163.com

基金项目: 国家自然科学基金项目
(No. 30672383)

Grant: National Natural Science Foundation of China (No. 30672383)

收稿日期: 2009-06-16

接受日期: 2009-09-19

[Abstract] Background and Objective: Transcriptional silencing induced by CpG island methylation is believed to be one of the important mechanisms of carcinogenesis. Checkpoint with fork head-associated and ring finger (CHFR) governs the transition from prophase to prometaphase in response to mitotic stress. This study was to analyze the relationship between the methylation of CHFR gene and the clinicopathologic features of gastric cancer, and the difference of results between methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) and combined bisulfite restriction analysis (COBRA) in detecting aberrant methylation of CHFR gene in gastric cancer. **Methods:** Both MSP and COBRA methods were used to detect the promoter methylation of CHFR gene in gastric cancer specimens from 64 patients. The relationship between methylation status of CHFR gene and the clinicopathologic features of gastric cancer were analyzed using SPSS16.0. **Results:** The methylation rates of CHFR gene promoter were significantly higher in gastric cancer samples than in the corresponding paracancer normal gastric mucosa by MSP (51.6% vs. 18.8%, $P < 0.001$). However, there was no significant correlation between methylation status of CHFR gene and the clinicopathologic parameters of gastric cancer, including age, gender, tumor size, clinical stage, Borrmann type, tumor invasion depth, differentiation, and lymph node metastasis ($P > 0.05$). Aberrant methylation of the CHFR gene was detected in 27 (42.2%) of the 64 specimens of gastric cancer using COBRA, which did not significantly differ from that using MSP ($P > 0.05$). **Conclusions:** Aberrant methylation of the CHFR gene is a frequent event in the carcinogenesis of gastric cancer. Detecting the methylation of CHFR gene in gastric mucosa may conduce to the diagnosis of gastric cancer. No difference was found between MSP and COBRA in detecting promoter methylation of CHFR gene in gastric cancer.

Key words: CHFR gene, methylation, gastric neoplasm, methylation-specific polymerase chain reaction (MSP), combined bisulfite restriction analysis (COBRA)

【摘要】 背景与目的: 目前认为 CpG 岛甲基化导致转录抑制是恶性肿瘤发生的重要机制之一。微管抑制剂诱发有丝分裂应激时, CHFR 基因能够控制细胞分裂的进行。本研究检测胃癌中 CHFR 基因启动子区甲基化状态, 探讨该基因甲基化状态与胃癌临床病理特征的关系; 并比较甲基化特异性 PCR 方法 (methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) 和结合重亚硫酸盐的限制性内切酶法 (combined bisulfite restriction analysis, COBRA) 在检测胃癌组织 CHFR 基因甲基化状态的差异性。方法: 首先采用 MSP 方法检测 64 例胃癌患者胃癌组织和相

对应的癌旁正常组织中 CHFR 基因启动子区的甲基化状态,然后采用 COBRA 方法检测 64 例胃癌患者胃癌组织中 CHFR 基因启动子区的甲基化状态,并将检测结果结合各病例的临床特征进行分析。结果:MSP 方法检测结果显示,51.6%的胃癌组织和 18.8%的癌旁正常组织中存在 CHFR 基因异常甲基化,两者之间的差异有统计学意义 ($P<0.001$);CHFR 基因启动子区异常甲基化状态在不同临床病理学特征(包括年龄、性别、肿瘤大小、病理分期、Borrmann 分型、肿瘤浸润深度、组织分化程度和淋巴转移程度)的胃癌组织和癌旁组织中的差异无统计学意义(P 值均 >0.05)。COBRA 方法检测结果显示,肿瘤组织 CHFR 甲基化阳性率为 42.2%(27/64),与 MSP 方法检测结果的差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:CHFR 基因异常甲基化是胃癌发生过程中的频发事件,检测胃黏膜组织中 CHFR 基因异常甲基化状态可能有助于胃癌的诊断。对于胃癌组织 CHFR 基因启动子区甲基化的检测,MSP 与 COBRA 两种方法没有明显差异。

关键词:CHFR 基因;甲基化;胃肿瘤;甲基化特异性 PCR;结合重亚硫酸盐的限制性内切酶法

中图分类号:R735.2 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2010)02-0171-05

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发生发展与多种抑癌基因的失活有关。CHFR 是 2000 年 Scolnick 等^[1]发现的一种能够检测细胞分裂情况及控制分裂进行的基因,同时也是一种抑癌基因。研究发现,CHFR 基因在人正常胃组织中普遍表达,而在人胃癌组织中表达缺失^[2,3]。CHFR 的异常甲基化是导致其转录沉默的主要原因,这与肿瘤的发生和发展具有相关性^[4,5]。国内外有研究^[6,7]分别采用甲基化特异性 PCR 法(methylation-specific polymerase chain reaction,MSP)和结合重亚硫酸盐的限制性内切酶法(combined bisulfite restriction analysis,COBRA)检测胃癌患者 CHFR 基因启动子区甲基化状态。本研究中,我们采用 MSP 法和 COBRA 法两种方法检测标本中 CHFR 基因的甲基化状态,并分析其在胃癌发生中可能的作用及其与胃癌患者临床病理学特征的关系,以及两种方法在检测胃癌组织 CHFR 基因甲基化阳性率中是否具有差异。

1 资料与方法

1.1 标本来源

选取 2007 年 2 月至 2008 年 3 月在安徽省立医院经病理检查确诊并入院行手术治疗的原发性胃癌病例 64 例,其中男性 46 例,女性 18 例;患者

年龄 33~107 岁,中位年龄 60 岁。术中取新鲜肿瘤组织及癌旁正常组织,标本离体后即置液氮休克 10 min,存放于 -80°C 冰箱待 DNA 提取。所有患者入院前均未进行放疗或化疗。取材之前患者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及材料 DNA 提取试剂盒 TIANamp Genomic DNA Kit 购自北京天根公司。低温超速离心机和紫外分光光度计购自美国 Beckman 公司。一步法甲基化修饰试剂盒购自美国 Epigentek 公司。PCR 扩增仪购自德国 Biometra 公司。PCR 反应体系成分均购自上海生工生物工程技术服务有限公司。甲基化酶 *Sss* I 与限制性内切酶 *Bst*U I 购自美国纽英伦公司。DNA 纯化试剂盒 e.Z.N.A.Cycle-Pure Kit 购自美国 Omega 公司。

1.2.2 DNA 的提取 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行,提取之后用紫外分光光度仪测定 DNA 浓度, -20°C 暂存。

1.2.3 DNA 的亚硫酸氢盐修饰 采用一步法甲基化修饰试剂盒进行修饰,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。修饰后的 DNA 通过乙醇沉淀回收并重悬于去离子水中,用于甲基化特异性 PCR 和 COBRA 检测。

1.2.4 MSP 检测 针对 CHFR 基因启动子调控区域,参照文献设计 PCR 引物^[8],引物序列及退火温度见表 1。MSP 反应体系为 25 μL ,包括 10 $\times$ PCR 缓冲液,1.5 mmol/L MgCl_2 ,10 mmol/L dNTP,0.5 mmol/L 的上下游引物,1 U *Taq* DNA 聚合酶。甲基化阳性对照和非甲基化阳性对照所用 DNA 模板分别来源于甲基化酶 *Sss* I 修饰和未修饰的正常人外周血 DNA,用水代替模板作空白对照。PCR 完成之后取产物 10 μL 混合于 6 $\times$ 上样缓冲液,加入浓度为 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,溴乙锭(EB)染色。运用图像采集与分析系统,记录并分析电泳结果。甲基化特异性引物扩增的条带标本记为甲基化(M),非甲基化特异性引物扩增的条带标本记为非甲基化(U)。

1.2.5 COBRA 检测 将经 MSP 方法检测阳性的标本用 COBRA 方法检测,具体操作步骤参考文献^[9],CHFR 基因的 COBRA 的扩增引物设计参考文献^[7],引物序列、反应条件及退火温度见表 1。PCR 反应体系及各种反应成分同 MSP 方法。用

表 1 甲基化特异性 PCR 及 COBRA 方法 PCR 引物序列和退火温度

Table 1 The primers and annealing temperatures used in methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) and combined bisulfite restriction analysis (COBRA) for checkpoint with fork head-associated and ring finger (CHFR) gene amplification

Primer	Type	Primer sequence	Product (bp)	Tm (cycles)
CHFR (MSP)	M	F: TTTCGTGATTTCGTAGGCGAC	155	57℃
		R: GCGATTAAC TAACGACGACG		
CHFR (COBRA)	U	F: TTTTGTGATTGTAGGTGAT	155	51℃
		R: ACAATTAAC TAACAACAACA		
	F	YGT TTATTAAGAGYGGTAGTTAAAG	197	55℃ (3), 53℃ (4), 51℃ (5), 49℃ (26)
	R	AAAATCCTTAAAAC TTCCAATCC		

M, methylated specific primers; U, unmethylated specific primers; F, forward primer; R, reverse primer.

DNA纯化试剂盒纯化 PCR 产物, 具体操作步骤严格按照说明书进行。纯化之后的 PCR 产物用限制性内切酶 *Bst*U I 进行酶切, 水浴条件为 60℃ 6 h。阳性对照所用 DNA 模板来源于甲基化酶 *Sss* I 修饰的正常人外周血 DNA。水浴结束之后取产物 10 μL 混合于 6×上样缓冲液, 加入浓度为 3% 的琼脂糖凝胶, 电泳, EB 染色。运用图像采集与分析系统, 记录并分析电泳结果。

1.3 统计学方法

应用 SPSS16.0 软件包对 CHFR 基因的甲基化频率进行统计分析, 数据比较分析采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 CHFR 基因启动子甲基化状态

用 CHFR 基因 MSP 特异性引物扩增甲基化阳性对照和非甲基化阳性对照, 均扩增出相对应的条带, 大小正确且无其他条带出现, 空白对照无条带出现 (图 1), 说明实验技术及所用引物和试剂正确, 实验结果可信。胃癌组织和癌旁组织中 CHFR 基因的异常甲基化阳性率分别为 51.6% (33/64) 和 18.8% (12/64), 其差异有统计学意义 ($P<0.001$)。

2.2 CHFR 基因启动子区甲基化状态与胃癌临床特征的关系

CHFR 基因启动子区异常甲基化与胃癌组织临床病理学特征的关系见表 2。患者年龄、性别、肿瘤大小、病理分期、Borrman 分型、肿瘤浸润深度、组织分化程度和淋巴转移程度不同的胃癌组织中, CHFR 基因启动子区异常甲基化状态的差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

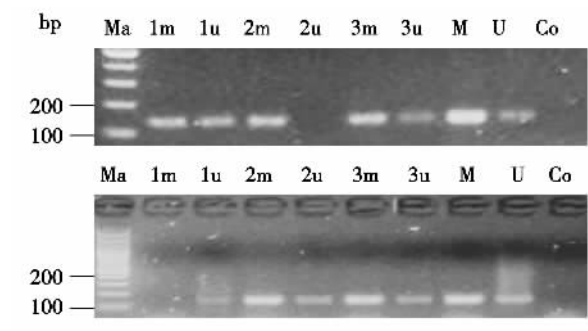


图 1 CHFR 基因 MSP 电泳结果
Figure 1 Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) gel electrophoresis of checkpoint with fork head-associated and ring finger (CHFR) gene
A, gastric carcinoma specimens; B, adjacent normal tissues.
Ma, marker; 1, 2, 3, tumor samples; M, methylation-positive control; U, unmethylation-positive control; Co, blank control.

2.3 MSP 方法检测结果与 COBRA 方法验证结果的关系

经 MSP 方法检测的 64 例胃癌组织标本再经 COBRA 方法检测, 结果显示胃癌组织 CHFR 甲基化阳性率为 42.2% (27/64), 与 MSP 检测结果 [51.6% (33/64)] 之间的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。33 例经 MSP 方法检测结果为甲基化阳性的胃癌组织标本, 经 COBRA 方法检测, 27 例呈阳性, 另 6 例为阴性 (即为假阳性)。31 例经 MSP 方法检测为甲基化阴性的胃癌组织标本, 经 COBRA 方法验证即全部为甲基化阴性。27 例经 COBRA 方法检测为阳性的胃癌组织, MSP 检测全部为阳性。经 COBRA 方法检测, 结果为阴性的胃癌组织标本 37 例, 经 MSP 方法检测, 31 例呈甲基化阴性 (部分检测结果见图 2、图 3)。

表 2 CHFR 基因启动子区甲基化状态与胃癌患者临床特征的关系

Table 2 The relationship between aberrant methylation of CHFR gene and clinicopathologic characteristics of gastric cancer patients

Characteristic	Patient No.	Methylation of CHFR [patient No. (%)]	P
Age (years)			0.902
≤ 50	11	5(45.4)	
50-60	23	12(52.2)	
> 60	30	16(53.3)	
Gender			0.339
Male	46	22(47.8)	
Female	18	11(61.1)	
Clinical stage			0.479
I + II	22	10(45.5)	
III + IV	42	23(54.8)	
Borrmann type			0.823
I + II	7	4(57.1)	
III	43	21(48.8)	
IV	14	8(57.1)	
Differentiation degree			0.696
G1	18	9(50.0)	
G2	14	6(42.9)	
G3	32	18(56.3)	
Invasive depth			0.306
T1 + T2	15	6(40.0)	
T3 + T4	49	27(55.1)	
Tumor size (diameter)			0.730
≥ 5 cm	42	21(50.0)	
< 5 cm	22	12(54.5)	
Lymph node metastasis			0.130
N0 + N1	46	21(45.7)	
N2 + N3	18	12(66.7)	

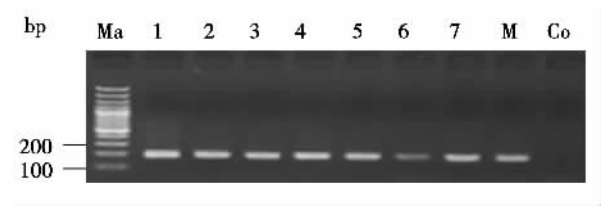


图 2 CHFR 基因 COBRA 方法 *Bst*U I 酶切前电泳结果
Figure 2 Combined bisulfite restriction analysis (COBRA) gel electrophoresis of CHFR gene before digested by *Bst*U I
Ma, marker; 1-7, tumor samples; M, methylation-positive control; Co, blank control.

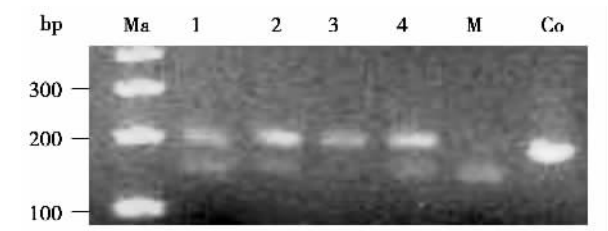


图 3 CHFR 基因 COBRA 方法 *Bst*U I 酶切后电泳结果
Figure 3 COBRA gel electrophoresis of CHFR gene after digested by *Bst*U I
Ma, marker; 1-4, tumor samples; M, methylation-positive control; Co, blank control (undigested).

3 讨 论

抑癌基因高甲基化是肿瘤重要致病因素之一,在许多肿瘤的发生过程中是一个频发的早期事件。胃癌的发生发展是一个多因素、多阶段、多基因异常的累积过程,目前已检测出胃癌中多个抑癌基因发生异常甲基化^[10,11]。同时亦有报道发现 CHFR 基因因为其启动子区异常甲基化而表达沉默。Morioka 等^[3]研究发现在 53 例原发性胃癌中有 16 例(30%)出现异常甲基化现象。Koga 等^[12]研究发现,胃癌组织 CHFR 基因启动子区异常甲基化比例为 52%(24/46)。Gao 等^[6]的研究显示在 20 例胃癌中有 9 例(45%)发生 CHFR 甲基化,在与之相匹配的 20 例非肿瘤组织中没有发现 CHFR 基因的甲基化 ($P<0.001$);并且 CHFR 甲基化的程度与胃癌的分化程度相关。另外 Homma 等^[13]研究得出 CHFR 甲基化状态与胃癌的恶性程度相关的结论。以上研究结果表明 CHFR 甲基化在胃癌中是频发事件,并且可能与胃癌的临床病理特点相关。另有文献报道^[7,14],由于高甲基化而导致的 CHFR 基因表达的缺失可以经某些化学药物(如 5-氮-2'-脱氧胞苷)处理之后恢复表达,部分检查点的功能得到恢复,重新激活甲基化沉默基因,提示检测 CHFR 基因启动子区的甲基化状态可能有助于判断胃癌的治疗效果,监测预后。

我们的研究发现,胃癌组织中 CHFR 基因异常甲基化阳性率显著高于癌旁组织甲基化阳性率,提示 CHFR 基因异常甲基化可能参与胃癌的发生和发展;但临床病理学特征包括患者年龄、性别、肿瘤大小、病理分期、Borrmann 分型、肿瘤浸润深度、组织分化程度和淋巴转移程度不同的胃癌组织中,CHFR

基因启动子区异常甲基化状态的差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究检测的胃癌组织 CHFR 基因甲基化阳性率与文献^[12]的检测结果相似。与文献^[3,6]报道的 CHFR 甲基化阳性率不同的原因,一方面是研究中所采用的甲基化特异性引物的不同造成的;另一方面,由于 CHFR 基因启动子区的 CpG 位点的甲基化状态不均一或者甲基化程度不完全,从而导致有不同的检测结果出现。

本研究联合应用甲基化特异性 PCR 法和结合重亚硫酸盐的限制性内切酶法两种方法检测胃癌组织中 CHFR 基因的甲基化状态,综合了 MSP 方法的高灵敏度和 COBRA 方法的高特异度的优点,保证了研究的科学性和实验结果的准确性。本实验比较了两种方法在检测胃癌组织中 CHFR 基因启动子区甲基化阳性率是否有差异,其检测结果的差异无统计学意义;但 COBRA 方法检测甲基化特异度相对更高,可以检测出 MSP 方法中的假阳性结果。因此,对于大批量标本的甲基化检测,可以尝试首先应用 MSP 方法检测,然后利用 COBRA 方法检测相同标本,排除 MSP 方法检测的假阳性标本。本研究中未出现 COBRA 方法检测结果呈阳性而 MSP 为阴性的情况,可能与检测标本数量较少有关。增加标本数量可能会得出更全面的结论。

总之,本研究结果显示 CHFR 基因异常甲基化是胃癌发生发展过程中的频发事件。检测胃癌组织中 CHFR 基因启动子区的甲基化状态可能有助于胃癌的诊断。另外,联合 MSP 与 COBRA 两种方法检测胃癌患者 CHFR 基因甲基化的状态,可能有助于提高检测结果的准确性。

[参 考 文 献]

- [1] Scolnick DM, Halazonetis TD. CHFR defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase [J]. Nature, 2000,406(27):430-435.
- [2] Kang HC, Kim IJ, Park JH, et al. Promoter hypermethylation and silencing of CHFR mitotic stress checkpoint gene in

- human gastric cancers [J]. Oncol Rep, 2004,12(1):129-133.
- [3] Morioka Y, Hibi K, Sakai M, et al. Aberrant methylation of the CHFR gene in digestive tract cancer [J]. Anticancer Res, 2006,26(3A):1791-1795.
- [4] Corn PG, Heath EI, Heitmiller R, et al. Frequent hypermethylation of the 5' CpG island of E-cadherin in esophageal adenocarcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2001,7(9):2765-2769.
- [5] Toyota M, Sasaki Y, Satoh A, et al. Epigenetic inactivation of CHFR in human tumors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(13):7818-7823.
- [6] Gao YJ, Xin Y, Zhang JJ, et al. Mechanism and pathobiologic implications of CHFR promoter methylation in gastric carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2008,14(32): 5000-5007.
- [7] Satoh A, Toyota M, Itoh F, et al. Epigenetic inactivation of CHFR and sensitivity to microtubule inhibitors in gastric cancer [J]. Cancer Res, 2003,63(24):8606-8613.
- [8] Shibata Y, Haruki N, Kuwabara Y, et al. CHFR expression is downregulated by CpG island hypermethylation in esophageal cancer [J]. Carcinogenesis, 2002,23(10):1695-1699.
- [9] Xiong, Z, Laird, PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay [J]. Nucleic Acids Res, 1997,25(12):2532-2534.
- [10] Oue N, Shigeishi H, Kuniyasu H, et al. Promoter hypermethylation of MGMT is associated with protein loss in gastric carcinoma [J]. Int J Cancer, 2001,93(6):805-809.
- [11] Li QL, Ito K, Sakakura C, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer [J]. Cell, 2002,109(1):113-124.
- [12] Koga Y, Kitajima Y, Miyoshi A, et al. The significance of aberrant CHFR methylation for clinical response to microtubule inhibitors in gastric cancer [J]. J Gastroenterol, 2006,41(2): 133-139.
- [13] Homma N, Tamura G, Honda T, et al. Hypermethylation of CHFR and hMLH1 in gastric noninvasive and early invasive neoplasias [J]. Virchows Arch, 2005,446(2):120-126.
- [14] Honda T, Tamura G, Waki T, et al. Promoter hypermethylation of the CHFR gene in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia [J]. Br J Cancer, 2004,90(10):2013-2016.

[编辑:甘可建;校对:张 菊]