

# 胃癌组织及相关淋巴结中端粒酶逆转录酶基因启动子区域甲基化检测的临床意义

王亚东<sup>1</sup>, 白军伟<sup>2</sup>, 尹家俊<sup>1</sup>

(1.大连大学附属中山医院, 辽宁 大连 116001; 2.河南省人民医院, 河南 郑州 450003)

**摘要:** [目的] 检测胃癌患者肿瘤组织及其相应的癌旁组织和淋巴结组织中端粒酶逆转录酶(hTERT)基因启动子区域甲基化状态,并探讨其甲基化状态的改变与临床病理特征的关系。[方法] 运用甲基化特异性PCR(MSP)方法,检测52例手术切除胃癌组织、癌旁组织及相关淋巴结中hTERT基因启动子区域甲基化状态,以同一标本正常组织作为阴性对照。[结果] 正常胃黏膜组织未检测出hTERT表达,胃癌组织及癌旁组织、转移淋巴结中均检测出hTERT表达。转移淋巴结、胃癌组织中hTERT基因的甲基化阳性率分别为81.6%(31/38)、71.1%(37/52),明显高于癌旁组织的29.5%(13/52)( $P<0.01$ )。胃癌组织hTERT基因甲基化阳性率与胃癌的临床分期、组织分化程度、肿瘤大小有相关性( $P<0.05$ )。癌旁组织hTERT基因甲基化阳性率和胃癌的临床分期、肿瘤大小、组织分化程度、淋巴结转移具有相关性( $P<0.05$ )。转移淋巴结hTERT基因甲基化阳性率则与临床及病理特征无关。[结论] 胃癌组织及转移淋巴结中存在hTERT基因启动子区域的异常甲基化调控,可能参与了胃癌的发生与发展。

**关键词:** 胃肿瘤;淋巴结;端粒酶逆转录酶;启动子;DNA甲基化

**中图分类号:** R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)06-0461-05

## Clinical Effect of DNA Methylation Promoter Region of the Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene in Gastric Cancer Tissue and Lymph Node

WANG Ya-dong<sup>1</sup>, BAI Jun-wei<sup>2</sup>, YIN Jia-jun<sup>1</sup>

(1. Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, China;

2. Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China)

**Abstract:** [Purpose] To detect level of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter methylation in gastric cancer and lymph nodes and to examine the association of methylation level with clinical and pathological characteristics. [Methods] Methylation specific polymerase chain reaction (MSP) was introduced to detect hTERT promoter methylation in tumor tissue, lymph node and tumor adjacent tissues from 52 patients with gastric cancer and in normal gastric tissues from same patients. [Results] Promoter methylation of hTERT gene were found in 81.6%(31/38) of metastatic lymph node and 71.1%(37/52) of the gastric carcinoma tissues, 29.5%(13/52) of carcinoma adjacent tissues, but 0/52 of normal control. Furthermore, methylation levels in both metastatic lymph node and the gastric carcinoma tissues was significantly higher than that in carcinoma adjacent tissues ( $P<0.01$ ). The positive rate of hTERT gene methylation was significantly related to clinical stage, tissue differentiation and tumor size of ( $P<0.05$ ). The positive rate of hTERT gene methylation in carcinoma adjacent tissues was significantly related to clinical stage, lymph node metastasis, tissue differentiation of carcinoma and tumor size ( $P<0.05$ ). However, methylation in metastatic lymph node was unrelated to the clinical and pathological characteristics. [Conclusion] Aberrant methylation of the promoter of hTERT gene in gastric carcinoma tissues and carcinoma adjacent tissues is common. It indicates that methylation of hTERT gene takes part in the development of gastric cancer.

**Key words:** gastric neoplasms; lymph node; human telomerase reverse transcriptase; promoter; DNA methylation

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,研究发现

有多种肿瘤抑制基因的失活与其发生、发展密切相关<sup>[1]</sup>。端粒酶(telomerase)通过弥补复制造成的端粒缩短和与端粒延长无关的功能,促进肿瘤的发生与发展<sup>[2]</sup>。人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse

收稿日期:2012-03-23;修回日期:2012-04-16

基金项目:辽宁省教育厅项目资助(05L025),大连市科技局项目资助(2005J22JH052)

通讯作者:尹家俊, E-mail: jiajunyin1106@yahoo.com.cn

transcriptase, hTERT)为端粒酶的限速酶,与端粒酶的活性高度一致,其已成为肿瘤诊断和治疗的重要靶点<sup>[3]</sup>。DNA甲基化是人类表观遗传机制之一,在基因突变、基因印记、衰老、免疫等诸多方面起着重要作用,与肿瘤发生和演进有着密切的联系<sup>[4]</sup>。前期研究表明,胃癌细胞中存在hTERT基因启动子区域甲基化,而针对人胃癌组织、癌旁组织及淋巴结中基因甲基化率及其意义却鲜有研究。本实验应用甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MSP)方法检测胃癌组织、癌旁组织和转移淋巴结中的hTERT基因启动子区域甲基化状态,分析hTERT基因甲基化与胃癌发生、发展及临床病理特征的关系,以期为以hTERT为靶点的肿瘤基因临床治疗提供一个新思路。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取2009年9月至2010年9月大连大学附属中山医院普通外科手术切除的胃癌组织以及相应的癌旁组织、淋巴结各52例(男性30例,女性22例),以正常胃黏膜作为阴性对照。胃癌组织取自肿块中央非坏死部分,癌旁组织取自距癌灶边缘5cm以内的黏膜组织。正常组织取自距肿块6cm以上的正常黏膜组织。所有标本均经本院两位高年资病理科医生证实。病例临床资料完整,术前均未进行任何抗肿瘤治疗,平均年龄62岁;行胃癌根治术42例,姑息性胃大部切除术或全胃切除术10例。根据美国癌症联合委员会(AJCC)胃癌TNM分期(2010年第七版)标准,Ⅰ期8例,Ⅱ期14例,Ⅲ期20例,Ⅳ期10例。病理类型: BorrmannⅠ型(结节或息肉型)5例,高分化腺癌3例,中分化腺癌2例; BorrmannⅡ型(局部溃疡型)19例,中分化腺癌14例,高分化腺癌5例; BorrmannⅢ型(浸润溃疡型)17例,中分化腺癌9例,低分化腺癌7例,黏液腺癌1例; BorrmannⅣ型(弥

漫浸润型)11例,印戒细胞癌3例,黏液腺癌3例,低分化腺癌5例。52例患者中存在淋巴结转移38例,其中>7枚淋巴结转移20例。肝转移3例。

### 1.2 主要试剂及仪器

对苯二酚、氢氧化钠、亚硫酸氢钠等购自大连宜昌化工有限公司。DNA快速回收/纯化试剂盒购自北京鼎国生物技术有限公司。TaRaKa TaqDNA聚合酶、TaRaKa LATaqDNA聚合酶、2×GC PCR buffer等购自宝生物(大连)有限公司。PCR仪、低温高速离心机(Eppendorf公司, Germany)等。

### 1.3 实验方法

引物设计参照文献<sup>[5]</sup>设计甲基化特异性PCR引物,引物均由宝生物(大连)有限公司合成。见表1。

采取改进高盐法提取基因组DNA,尽量剪碎。取正常胃组织、胃癌组织、癌旁组织、淋巴结各约0.1g(约0.5cm<sup>3</sup>)置于玻璃匀浆器中,加入1ml细胞裂解缓冲液匀浆至不见组织块,转入1.5ml离心管中,20mg/ml蛋白酶K消化,6mol/L饱和氯化钠盐析,氯仿/异戊醇24:1精制,异丙醇沉淀,70%乙醇洗涤2次,室温干燥,TE缓冲液溶解。基因组DNA于紫外分光光度计确定核酸纯度、浓度。-80℃超低温冰箱保存备用。

PCR反应体系总体积50μl: DNA 0.5μg、1×GC PCR缓冲液,0.25mmol/L的dNTP,0.2μmol/L上、下游引物0.05μL LATaqDNA聚合酶,反应条件: 95℃预变性3min、94℃30s、57℃30s、72℃30s,共30个循环,72℃延伸5min。

甲基化特异性PCR(MSP)的方法参照文献<sup>[5]</sup>并加以改进,基因组DNA的亚硫酸化修饰: 取约1~2μg基因组DNA,0.3mol/L氢氧化钠37℃水浴15~30min变性,终浓度3.3mol/L亚硫酸氢钠及0.2mmol/L氢醌,避光55℃水浴8~12h进行硫化、脱氨反应,DNA快速纯化/回收试剂盒回收DNA,0.3mol/L氢氧化钠脱硫,3mol/L醋酸铵中和,三倍体积冷无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤2次,30μl灭菌蒸

表1 甲基化特异性PCR引物

| 引物      | 正向序列                     | 反向序列                  | 扩增片段长度(bp) | 退火温度(℃) |
|---------|--------------------------|-----------------------|------------|---------|
| hTERT W | CCTGCCCTTCACCTTCCA       | GGCTGCCTGAAACTCGC     | 159        | 57      |
| hTERT M | GGGTATAGACGTTTAGGATCGC   | CGTACGCAACAAAACGCAACG | 240        | 60      |
| hTERT U | GTGGGTATAGATGTTTAGGATTGT | CCACATACACAAAACACAACA | 245        | 60      |

W:野生型引物,M:甲基化引物,U:非甲基化引物

馏水溶解-20℃保存。MSP反应体系 50μl: 修饰DNA 0.5μg1×PCR缓冲液,0.25mmol/L的dNTP,0.2μmol/L上下游引物,0.05U TaqDNA聚合酶。反应条件:95℃预变性5min后加入TaqDNA聚合酶,95℃30s、70℃30s(每循环退火温度降低1℃)、72℃30s共10个循环,95℃30s、60℃30s、72℃30s,共30个循环,72℃延伸10min。

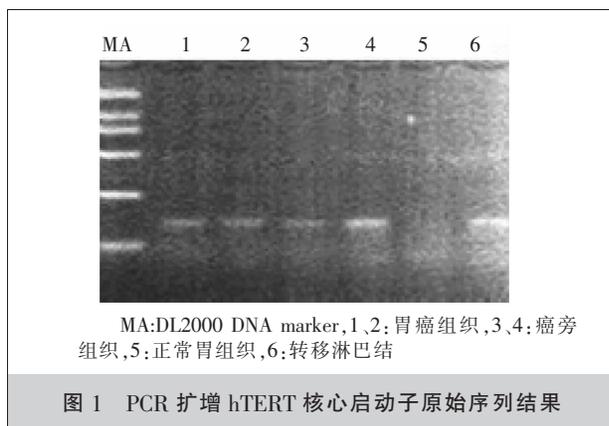
#### 1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

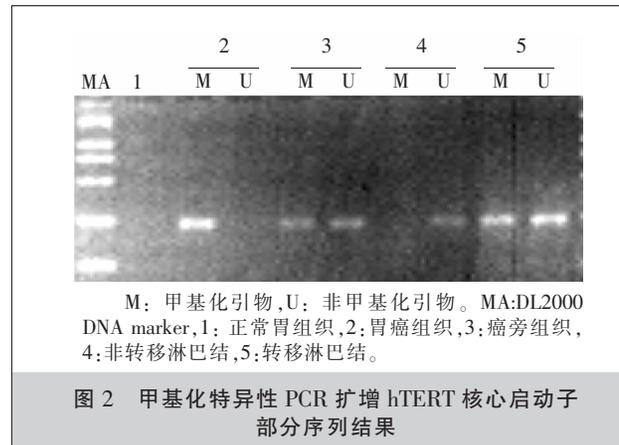
## 2 结果

### 2.1 PCR扩增胃癌组织、癌旁组织及转移淋巴结中hTERT核心启动子原始序列及部分序列结果

PCR扩增未经修饰hTERT核心启动子原始序列,产物经2%琼脂糖凝胶电泳结果显示:正常胃组织未检出hTERT核心启动子序列,胃癌组织、癌旁组织、转移淋巴结中均存在hTERT核心启动子序列。见图1。



用hTERT甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物扩增的甲基化阳性对照和非甲基化阳性对照时,分别只有M引物和U引物出现预期大小的扩增片段(图2),提示实验技术和所用的引物、试剂正确,实验结果可信。部分甲基化特异性PCR检测产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳结果显示:甲基化特异性PCR扩增hTERT启动子部分序列,胃癌组织、部分癌旁组织、转移淋巴结中hTERT启动子区存在甲基化。非转移淋巴结未发现该区域存在甲基化(图2)。



### 2.2 各组织中hTERT基因甲基化阳性率与胃癌临床病理特征的关系

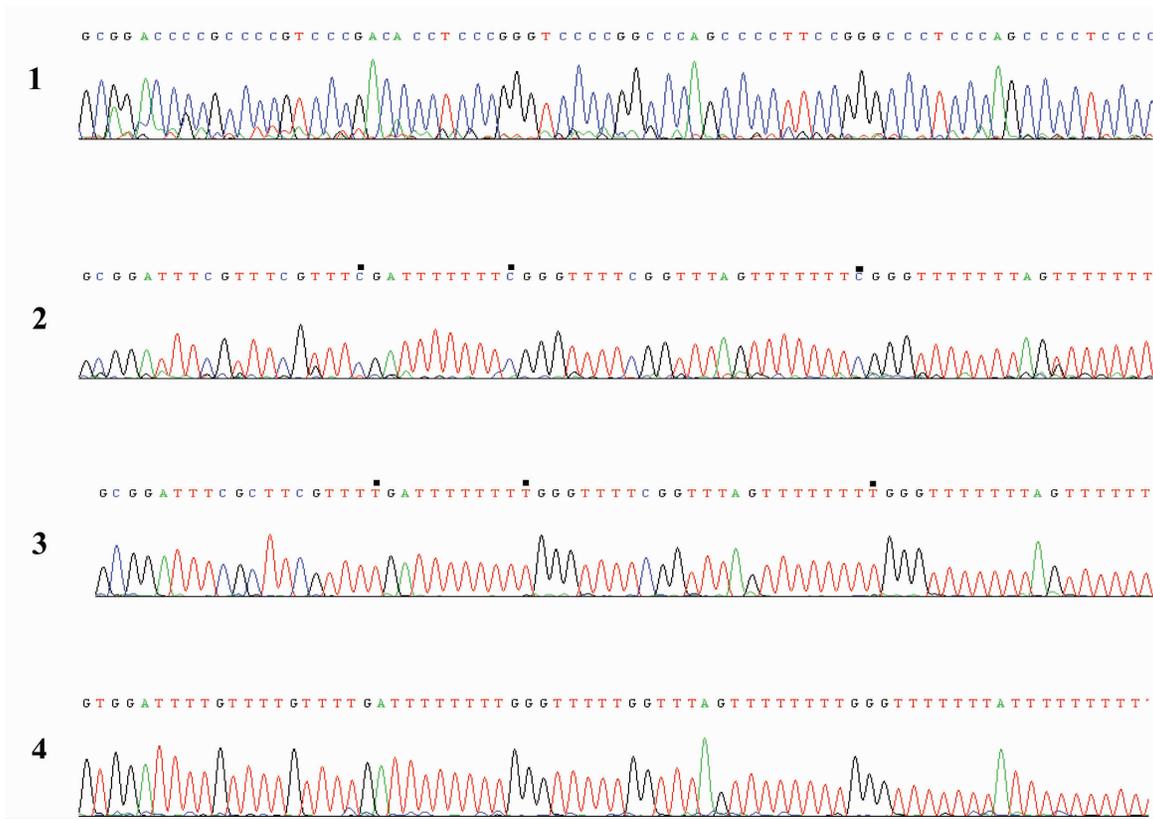
转移淋巴结、胃癌组织中hTERT基因的甲基化阳性率分别为81.6%(31/38)、71.2%(37/52),明显高于癌旁组织的25.0%(13/52)( $P<0.01$ )。胃癌组织中hTERT基因甲基化阳性率与胃癌的临床分期、组织分化程度、肿瘤大小具有相关性( $P<0.05$ )。癌旁组织hTERT基因甲基化阳性率与胃癌的临床分期、肿瘤大小、组织分化程度、淋巴结转移具有相关性( $P<0.05$ )。转移淋巴结hTERT基因甲基化阳性率则与胃癌各临床病理特征无关。见表2。

### 2.3 测序结果分析

经过亚硫酸化修饰后的DNA中胞嘧啶(C)转变为胸腺嘧啶(T),但是存在甲基化的CpG二核苷酸中的C未转变为T,而无甲基化的CpG二核苷酸则发生这种转变,由此判定DNA是否存在甲基化。不同类型胃癌组织的hTERT核心启动子区CpG岛均存在甲基化,但甲基化情况有所差别,见图3。

## 3 讨论

hTERT基因位于染色体5p15.33,编码由1132个氨基酸组成的127kD蛋白,hTERT基因5'端为调控区,其启动子位于该区域内。hTERT基因启动子区存在一个典型的CpG岛,此区域GC含量高达74%,CG/GC为0.87,其中存在大量的调控序列、转录起始点及第一个外显子等<sup>[6]</sup>。hTERT基因的调控极其复杂,包括转录水平的调控及转录后的修饰,而前者为主要的调节方式<sup>[7]</sup>。肿瘤细胞由于DNA甲基转移酶外显子区基因突变而导致其活性异常,使肿瘤



1:hTERT 原始核心启动子序列,2:低分化胃癌组织 MSP 产物测序图,3:高分化胃癌组织 MSP 产物测序图,4:部分癌旁组织 MSP 产物测序图,■:甲基化不同的 CpG 位点。

图 3 PCR 产物部分克隆测序结果

表 2 hTERT 启动子区域甲基化与胃癌临床病理特征的关系

| 临床病理因素   | 例数                             | 癌组织                |          |       | 癌旁组织               |          |       | 转移淋巴结 |                    |          |       |       |
|----------|--------------------------------|--------------------|----------|-------|--------------------|----------|-------|-------|--------------------|----------|-------|-------|
|          |                                | hTERT 基因<br>甲基化(%) | $\chi^2$ | P 值   | hTERT 基因<br>甲基化(%) | $\chi^2$ | P 值   | 例数    | hTERT 基因<br>甲基化(%) | $\chi^2$ | P 值   |       |
| 性别       | 男性                             | 30                 | 21(70.0) | 0.437 | 0.508              | 7(23.3)  | 0.413 | 0.521 | 20                 | 16(80.0) | 0.907 | 0.341 |
|          | 女性                             | 22                 | 16(72.7) |       |                    | 6(27.3)  |       |       | 18                 | 15(83.3) |       |       |
| 年龄(岁)    | $\geq 60$                      | 24                 | 18(75.0) | 0.046 | 0.830              | 8(33.3)  | 0.105 | 0.746 | 17                 | 15(88.2) | 0.070 | 0.791 |
|          | $< 60$                         | 28                 | 19(67.9) |       |                    | 5(17.9)  |       |       | 21                 | 16(76.2) |       |       |
| 肿瘤大小(cm) | $< 5$                          | 21                 | 10(47.6) | 9.506 | 0.002              | 1(4.8)   | 7.695 | 0.006 | 13                 | 11(84.5) | 0.121 | 0.728 |
|          | $\geq 5$                       | 31                 | 27(87.1) |       |                    | 12(38.7) |       |       | 25                 | 20(80.0) |       |       |
| 肿瘤浸润深度   | T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub> | 18                 | 10(55.6) | 3.263 | 0.071              | 2(11.1)  | 2.832 | 0.092 | 11                 | 9(81.8)  | 0.001 | 0.981 |
|          | T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub> | 34                 | 27(79.4) |       |                    | 11(32.3) |       |       | 27                 | 22(81.5) |       |       |
| 组织分化程度   | G <sub>1</sub> /G <sub>2</sub> | 32                 | 18(56.3) | 9.004 | 0.003              | 4(12.5)  | 6.933 | 0.008 | 5                  | 4(80.0)  | 1.576 | 0.209 |
|          | G <sub>3</sub> /G <sub>4</sub> | 20                 | 19(95.0) |       |                    | 9(45.0)  |       |       | 33                 | 27(81.8) |       |       |
| 临床分期     | I/II                           | 22                 | 11(50.0) | 8.314 | 0.004              | 2(9.0)   | 5.147 | 0.023 | 8                  | 6(75.0)  | 0.292 | 0.589 |
|          | III/IV                         | 30                 | 26(86.7) |       |                    | 11(36.7) |       |       | 30                 | 25(83.3) |       |       |
| 淋巴结受累    | N <sub>0</sub> /N <sub>1</sub> | 18                 | 16(88.9) | 0.487 | 0.485              | 2(11.1)  | 6.663 | 0.010 | 18                 | 15(83.3) | 0.070 | 0.791 |
|          | N <sub>2</sub> /N <sub>3</sub> | 20                 | 19(95.0) |       |                    | 11(55.0) |       |       | 20                 | 16(80.0) |       |       |

细胞中某些相关基因 CpG 岛出现高甲基化水平<sup>[8]</sup>。Guilleret 等<sup>[9]</sup>认为:各肿瘤细胞系如宫颈癌、神经母细胞瘤、大肠癌细胞系均存在 hTERT 启动子的高甲基化。Iliopoulos 等<sup>[10]</sup>发现 hTERT 启动子区 CpG 岛甲基化与肝癌细胞的发生、发展密切相关。可见很多肿瘤细胞是通过 hTERT 启动子甲基化促进其表达。

甲基化特异性 PCR 法是一种敏感度、特异性高,快速的基因甲基化检测方法。本研究显示正常胃组织中无一例基因启动子区发生甲基化。胃癌组织中 hTERT 基因启动子区甲基化率(71.2%)显著高于癌旁组(25.0%)( $P < 0.01$ )。Gigek 等<sup>[11]</sup>研究发现 hTERT 甲基化现象在胃癌中频繁出现,而在癌前病变(如胃息肉、肠上皮化生等)中很少出现。结合文献及本研究结果,提示 hTERT 基因启动子区甲基化是胃癌频发的分子事件,提示其可能是导致肿瘤发生的机制之一,是胃癌早期发展中的一个步骤。本研究中 13 例癌旁组织中 hTERT 基因发生了甲基化,因标本来自胃癌患者,虽经病理证实为非癌组织,分子水平上可能并非正常,因为甲基化改变的出现可能早于肿瘤的发生。

本研究分析发现,胃癌组织中不同年龄、性别、肿瘤浸润深度及淋巴结转移状态患者的 hTERT 基因启动子区甲基化率差异均无统计学意义,胃癌中 hTERT 甲基化率与胃癌的临床分期、肿瘤大小和组织分化程度相关。肿瘤的分期与肿瘤浸润深度及有无淋巴结转移相关,而本实验中 hTERT 基因启动子区域甲基化率与两者无关,考虑选取 T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub> 期肿瘤样本量小,且本实验中 3 例肝转移患者肿瘤均未穿透浆膜从而干扰数据形成偏倚所致,有待扩大样本进一步研究。癌旁组织 hTERT 基因启动子区甲基化率不但与肿瘤临床分期、肿瘤大小和组织分化程度有关,而且有淋巴结转移组甲基化率(55.0%)较无淋巴结转移组(11.1%)高,差异有统计学意义。提示癌旁组织 hTERT 甲基化检测可能为胃恶性肿瘤潜在淋巴结的转移提供分子生物学依据。另测序分析发现不同分化程度胃癌组织中 hTERT 基因启动子甲基化程度不同,这与 Guilleret 等<sup>[9]</sup>的观点一致。转移淋巴结中的 hTERT 阳性率高于胃癌组织,胃癌组织联合转移淋巴结进行甲基化检测,对临床肿瘤的诊断价值可能高于单纯对胃癌组织的检测。Suzuki 等<sup>[12]</sup>提出 hTERT 基因在胃癌及癌前病变表达一致,而正

常胃黏膜未发现 hTERT mRNA 表达。Li 等<sup>[13]</sup>提出 71%的胃恶性肿瘤存在 hTERT mRNA 表达,31%相应正常胃组织中有表达,可见单纯检测 hTERT 基因对胃恶性肿瘤的诊断价值有限。

本研究显示,hTERT 基因启动子区高甲基化与胃癌的发生密切相关,可能是胃癌早期发展中的一个分子事件。将 hTERT 基因启动子区高甲基化作为标志物,结合其他几种甲基化率高的基因,用甲基化特异性 PCR 法进行联合检测,可为胃癌的早期诊断提供重要的理论依据和方法。

### 参考文献:

- [1] 张珂,马胜林.胃癌靶向治疗的研究进展[J].中国肿瘤,2011,20(1):49-54.
- [2] Stewart SA,Hahn WC,O'Connor BF,et al. Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism[J].Proc Natl Acad Sci U S A,2002,99(20):12606-12611.
- [3] Zhu J,Zhao Y,Wang S. Chromatin and epigenetic regulation of the telomerase reverse transcriptase gene[J]. Protein Cell,2010,1(1):22-32.
- [4] Yuasa Y. DNA methylation in cancer and ageing [J]. Mech Ageing Dev,2002,123(12):1649-1654.
- [5] Herman JG,Graff JR,Myöhänen S,et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands [J]. Proc Natl Acad Sci U S A,1996,93(18):9821-9826.
- [6] Takakura M,Kyo S,Kanaya T,et al. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells [J]. Cancer Res,1999,59(3):551-557.
- [7] 刘燕,邓志华.靶向人端粒酶逆转录酶启动子在肿瘤基因治疗中的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志,2009,15(2):150-152.
- [8] Kanai Y,Ushijima S,Nakanishi Y,et al. Mutation of the DNA methyltransferase (DNMT) 1 gene in human colorectal cancers [J]. Cancer Lett,2003,192(1):75-82.
- [9] Guilleret I,Benhattar J. Demethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter reduced hTERT expression and telomerase activity and shortened telomeres [J]. Exp Cell Res,2003,289(2):326-334.
- [10] Iliopoulos D,Satra M,Drakaki A,et al. Epigenetic regulation of hTERT promoter in hepatocellular carcinomas [J]. Int J Oncol,2009,34(2):391-399.
- [11] Gigek CO,Leal MF,Silva PN,et al. hTERT methylation and expression in gastric cancer [J].Biomarkers,2009,14(8):630-636.
- [12] Suzuki K,Kashimura H,Ohkawa J,et al. Expression of human telomerase catalytic subunit gene in cancerous and precancerous gastric conditions [J]. J Gastroenterol Hepatol,2000,15(7):744-751.
- [13] Li W,Li L,Liu Z,et al. Expression of the full-length telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcript in both malignant and normal gastric tissues[J]. Cancer Lett,2008,260(1-2):28-36.