

食管癌中 hMSH2 启动子区 CpG 岛过甲基化研究

周素丽^{1,2}, 毛伟敏¹, 凌志强¹, 郑秋青¹, 刘 玮¹, 王长春¹

(1.浙江省肿瘤医院浙江省肿瘤研究所, 浙江省胸部肿瘤诊治技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310022; 2.台州市肿瘤医院, 浙江 台州 318000)

摘要: [目的] 探讨 hMSH2 甲基化在食管癌发生发展中的作用。[方法] 应用实时荧光甲基化特异性聚合酶链反应 (real-time MSP) 分别检测 130 例食管癌患者癌组织及癌旁正常组织中 hMSH2 甲基化情况, 并分析其与临床病理等参数及预后之间的关系。[结果] 在 130 例原发性食管癌组织中, hMSH2 甲基化的有 63 例 (48.5%), 与之相对应的癌旁正常组织中甲基化的有 18 例 (13.8%) ($P < 0.05$)。hMSH2 高甲基化分别与患者的年龄、肿瘤远处转移及不良预后有关 ($P < 0.05$), 而与患者性别、淋巴结转移及临床分期等无关 ($P > 0.05$)。[结论] hMSH2 高甲基化是食管癌频发的分子事件, 也是导致其错配修复功能缺陷的重要原因之一。hMSH2 基因启动子区甲基化可能在老龄化及食管癌的发生发展过程中发挥重要作用, 是一个潜在的预后相关因子。

关键词: 食管肿瘤; hMSH2; 甲基化; 实时荧光甲基化特异性聚合酶链反应

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)02-0081-05

Hypermethylation of CpG Island in Promoter Region of hMSH2 in Esophageal Cancer

ZHOU Su-li^{1,2}, MAO Wei-min¹, LING Zhi-qiang¹, et al.

(1. Zhejiang Cancer Research Institute, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 2. Taizhou Cancer Hospital, Taizhou 318000, China)

Abstract: [Purpose] To study the function of hMSH2 gene promoter region 5'-CpG island methylation in carcinogenesis of esophageal cancer. [Methods] The promoter region of hMSH2 5'-CpG island methylation was detected in 130 cases with esophageal cancer and adjacent normal tissues by real-time methylation-specific PCR (real-time MSP), and its relationship with clinicopathological parameters and prognosis was analyzed. [Results] In 130 cases with primary esophageal cancer, 63 (48.5%) cases occurred hMSH2 gene methylation in promoter region 5'-CpG island, cancer adjacent tissue methylation was found in 18 (13.8%) cases, with statistically significant difference ($P < 0.05$). hMSH2 gene promoter 5'-CpG island hypermethylation related to patients' age, distant metastasis and prognosis ($P < 0.05$), but not to gender, lymph node metastasis and clinical stage ($P > 0.05$). [Conclusion] hMSH2 gene promoter region 5'-CpG island methylation is a frequent molecular event in esophageal cancer, and is one of the important reasons of causing defective mismatch repair. It may play an important role in aging and carcinogenesis for esophageal cancer, and may be a potential prognostic factor.

Subject words: esophageal neoplasms; hMSH2; methylation; real-time fluorescence methylation specific PCR (real-time MSP)

hMSH2 是发现最早的错配修复基因, 在遗传性

非息肉病性结肠癌 (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC) 等遗传性肿瘤和胃癌、肺癌等散发性肿瘤错配修复基因异常改变中, hMSH2 的突变居首位。为系统研究 hMSH2 基因在食管癌中的作用, 本研究选择 hMSH2 基因作为研究目标, 分析了散发性食管癌中 hMSH2 基因启动子区域 5'-CpG 岛甲基化状况, 探讨 hMSH2 基因在食管癌发生、发展中的意义。

基金资助: 浙江省科技计划 (2009C33143); 浙江省自然科学基金资助项目 (Y2080749, Y2091110); 卫生部—浙江省重大科技基金项目 (WKJ2010-2-004, WKJ2011-2-015); 2011 年度浙江省重大科技专项计划项目 (2011C13039-1)

通讯作者: 毛伟敏, 教授, 主任医师, 博士生导师, 院长, 浙江省胸部肿瘤诊治技术研究重点实验室主任; 浙江省肿瘤医院胸外科, 浙江省肿瘤研究所, 浙江省杭州市半山桥广济路 38 号 (310022); E-mail: maowm1218@163.com。

收稿日期: 2011-12-20; **修回日期:** 2012-02-13

1 材料与方法

1.1 实验标本

本研究采用 130 例食管鳞癌组织及相应癌旁正常组织, 病例均来自于 2004 年 12 月至 2009 年 7 月浙江省肿瘤医院食管癌手术后组织标本, 癌旁正常组织取自肿瘤边缘 5cm 外区域, 为肉眼下正常组织, 上述组织切除后, 固定于 10% 的福尔马林中作病理诊断及 DNA 提取用, 所有患者临床病理资料齐全。其中男性 120 例, 女性 10 例, 年龄 41~85 岁, TNM 分期按照世界卫生组织 (WHO) 和国际抗癌联盟 (UICC) 的标准。上、中段病变 74 例, 下段 56 例; 高中分化 96 例, 低分化 34 例; I/II 期 31 例, III/IV 期 99 例。

1.2 主要试剂及仪器

苯酚购自中国医学科学院, EpiTect Bisulfite 试剂盒来自 QIAGEN (德国), SYBR Premix Taq Ex Taq kit 试剂盒来自 TaKaRa (中国大连)。所用引物由 Invitrogen 公司合成。hMSH2 去甲基化引物序列为: (F) 5'-GGTTGTTGTGGTTGGATGTTGTTT-3', (R) 5'-CAACTACAACATCTCCTTCAACTACACCA-3', 扩增产物长度为 151bp。hMSH2 甲基化引物序列为: (F) 5'-TCGTGGTCCGACGTCGTTTC-3', (R) 5'-CAACGTCCTCTCGACTACACCG-3', 扩增产物长度 150 bp。所用仪器由浙江省肿瘤医院浙江省肿瘤研究所提供。

1.3 目标细胞捕获

在光学显微镜下, 采用 27G 号针显微捕获食管癌组织中的肿瘤细胞及癌旁正常细胞。针挑肿瘤细胞具体方法如下: 取 2~3 张连续的 7 μ m 厚的石蜡玻片进行苏木精和伊红染色, 脱蜡后在显微镜下分别寻找食管癌细胞及癌旁正常食管细胞, 并用 27G 号针获取。采用上述两种方法分别获取大约 3 000~5 000 个目标细胞, 并将其置于蛋白酶 K 提取缓冲液中。

1.4 基因组 DNA 提取、鉴定及修饰纯化

采用经典苯酚、氯仿方法从食管鳞癌组织标本中提取高分子量 DNA。以紫外分光光度计测定 DNA 浓度: 取 1 μ l DNA 样本, 读取 DNA 浓度值、 A_{260}

和 A_{280} 光密度值, A_{260}/A_{280} 比值应在 1.8~2.0 之间。基因组 DNA 亚硫酸氢盐修饰及纯化按 EpiTect Bisulfite 试剂盒说明书进行操作。

1.5 实时荧光甲基化特异性聚合酶链反应扩增及分析

使用 SYBR Premix Taq Ex Taq kit 试剂盒进行实时荧光甲基化特异性聚合酶链反应 (real-time methylation-specific PCR, real-time MSP) 扩增, 反应结束后, 确认扩增融解曲线及电泳, 进行结果分析。

1.6 随访

对本研究中 130 例食管癌病例进行随访 (每 3 个月电话随访一次), 随访日期截止到 2010 年 3 月 1 日。失访病例作为删失数据当作确切数据处理。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件对 hMSH2 基因甲基化在食管癌组织中表达情况及与临床病理参数之间的关系进行统计学分析。采用 χ^2 检验或 Fisher's 确切概率法进行分析。采用 Kaplan-Meier 法进行单因素生存分析, 绘制生存曲线。Log-Rank 检验进行生存曲线比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤组织与癌旁正常组织中 hMSH2 启动子区域 5'-CpG 岛甲基化状况比较

本研究成功建立了 real-time MSP 分析 hMSH2 启动子区域 5'-CpG 岛甲基化方法, 见图 1、2。

130 例食管癌患者肿瘤组织中有 63 例发生了 hMSH2 启动子区域 5'-CpG 岛甲基化, 甲基化率为 48.5% (63/130), 癌旁正常组织中有 18 例出现了甲

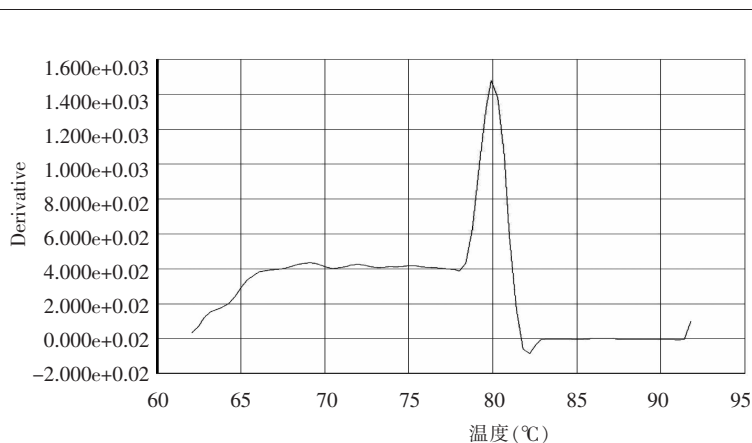
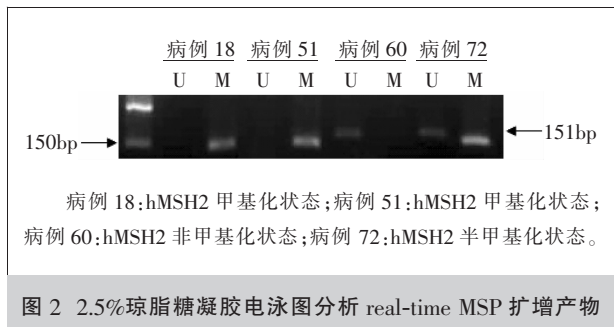


图 1 real-time MSP 分析 hMSH2 启动子区域 5'-CpG 岛甲基化 (甲基化引物)



甲基化, 甲基化率为 13.8% (18/130), 两者之间有显著统计学差异 ($\chi^2=35.734, P=0.000$), 见表 1。

表 1 食管癌组织与癌旁正常组织中 hMSH2 启动子区域 5'-CpG 岛甲基化状况比较

组别	例数	甲基化	非甲基化	P
癌旁正常组织	130	18	112	0.000
肿瘤组织	130	63	67	

2.2 hMSH2 启动子区域 5'-CpG 岛甲基化与临床病理参数相关性分析

hMSH2 启动子区域 5'-CpG 岛甲基化在老年患者中发生率较高, 60 例 ≥ 60 岁的食管癌患者中有 42 例出现甲基化 (70.0%, 42/60), 而在 70 例 < 60 岁患者中有 21 例发现甲基化 (30.0%, 21/70), 两组之间有显著统计学差异 ($P=0.000$)。在 38 例发生远处转移的患者中 (M_1) 有 35 例患者肿瘤组织中检测到 hMSH2 启动子区域 5'-CpG 岛甲基化, 其发生率高达 92.1% (35/38), 92 例无远处转移患者 (M_0) 中仅 28 例出现 hMSH2 启动子区域 5'-CpG 岛甲基化, 其甲基化率为 30.4% (28/92), 两者有明显统计学差异 ($P=0.000$)。hMSH2 启动子区域 5'-CpG 岛甲基化与性别、肿瘤部位、分化程度、淋巴结转移等均不存在相关性 ($P>0.05$), 见表 2。

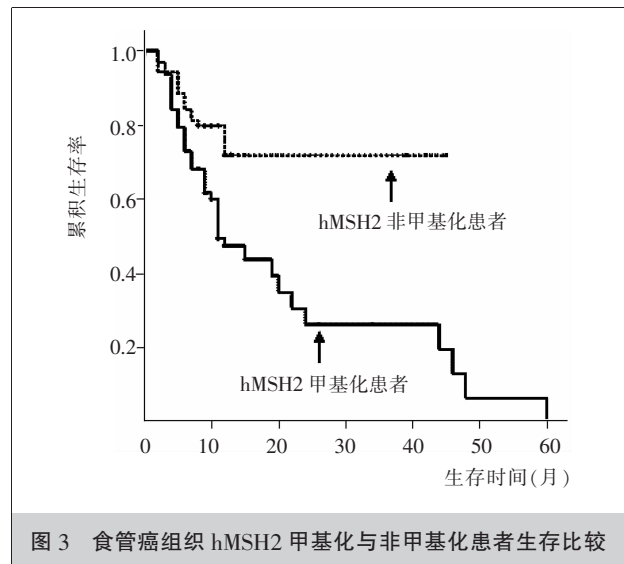
2.3 hMSH2 启动子区域 5'-CpG 岛甲基化与预后的相关性分析

130 例随访患者中有 2 例失访, 失访率为 1.5% (2/130)。死亡 57 例, 其余病例在随访截止时间内生存状况良好。发生 hMSH2 启动子区域 5'-CpG 岛甲基化的患者较非甲基化的患者预后不良, 两者有显著统计学差异 ($\chi^2=9.162, P=0.002$)。hMSH2 启动子区域 5'-CpG 岛甲基化患者与非甲基化患者生存曲线比较见图 3。

应用 Cox 回归模型的生存分析: 结合年龄、性别、分化、转移等情况进行预后的多因素分析, 结果

表 2 食管癌组织中 hMSH2 基因的甲基化与临床病理参数关系

组别	例数	甲基化	非甲基化	P
年龄 (岁)				
≥ 60	60	42	18	0.000
< 60	70	21	49	
性别				
男性	120	59	61	0.648
女性	10	4	6	
分化程度				
高、中	96	48	48	0.668
低	34	15	19	
肿块位置				
中上段	74	33	41	0.232
下段	56	30	26	
淋巴结转移情况				
N_0	41	22	19	0.646
N_1	89	41	48	
远处转移情况				
M_0	92	28	64	0.000
M_1	38	35	3	
分期				
I / II	31	10	21	0.065
III / IV	99	53	46	



显示 hMSH2 甲基化加重、年龄增大及远处转移比肿瘤临床分期对预后的影响更大。

3 讨论

hMSH2 基因是 1993 年 Fishel 等^[1]研究人类 HNPCC 时, 分离克隆到的第一个人类 MMR 基因, 位于人类染色体 2p21~p22, 是正常基因编码损伤 DNA 修复的必须蛋白质。文献报道 hMSH2 基因在 HNPCC 中种系突变检出率为 21%~54%, 突变多为

单碱基的改变由碱基缺失或插入引起的移码突变,导致下游提前出现终止密码,而使蛋白截断或功能散失,故 DNA 错配碱基不能修复,引起基因组的不稳定,导致复制错误而发生肿瘤^[2]。DNA 甲基化是由 DNA 甲基转移酶(DNMT)催化,将甲基转移到胞嘧啶 5 位碳原子上,生成 5-甲基胞嘧啶(5-mC)的过程, DNA 甲基化主要发生在 CpG 二核苷酸,在某些区域 CpG 二核苷酸序列重复出现, G+C 含量大于 50%,其长度大于 200 个碱基,这些区域被称为 CpG 岛基因甲基化,不同于基因突变。甲基化不涉及基因结构的改变,而是作为 DNA 的一种修饰作用,甲基化是可逆的,通过作用于这种可逆的过程,逆转基因甲基化改变,可以为肿瘤的治疗开辟一条新路。Laird 等^[3]的试验发现,利用基因杂合性改变和药物的作用,降低 DNA 甲基转移酶(DNMT)的活性,降低 DNA 的甲基化,可以明显减少试验组小鼠肠道腺瘤的数目,从而抑制肠道肿瘤的形成。有报道^[4]认为甲基化所引起的基因失表达是产生肿瘤化疗耐药性的重要原因,通过试验可以证明利用去甲基化药物恢复基因的表达,可以恢复肿瘤对化疗药的敏感性。

近年来,有关 DNA 甲基化的研究速度非常迅猛,这与出现的各种科学检测手段密不可分。DNA 甲基化检测方法具有灵敏度高、经济简便、不易受患者体内非肿瘤因素(高热、生物钟)的影响^[5]。用亚硫酸氢钠处理基因组 DNA 使之碱性变,未甲基化的胞嘧啶变为尿嘧啶,而甲基化胞嘧啶则不变。故采用两对特异性引物对目标基因进行扩增,可区分修饰后的模板 DNA。若由甲基化特异性引物扩增出产物,则说明样品是甲基化状态,反之,由非甲基化引物扩增出的产物则证实该模板是非甲基化状态的。

本研究中发现 130 例食管癌患者肿瘤组织中 63 例发生了 hMSH2 基因的甲基化,甲基化率为 48.5%,癌旁正常组织中 18 例出现了甲基化,甲基化率为 13.8%,食管癌组织中 hMSH2 基因甲基化水平明显高于癌旁正常组织,两者之间有显著统计学差异($\chi^2=35.734, P=0.000$)。提示 hMSH2 基因甲基化参与了食管癌发生的过程。据文献报道^[6,7],食管癌患者组织中的 hMSH2 基因甲基化率为 32.4%,食管癌组织中 hMSH2 阳性表达率为 46.88%、癌旁为 53.12%、正常组织为 84.38%。与正常食管组织相比,食管癌和癌旁组织中 hMSH2 阳性表达率均明显降

低 ($P<0.05$), hMSH2 阳性表达率与食管癌患者年龄及性别、肿瘤大小、肿瘤位置、病理类型、组织学分级、淋巴结转移、浸润深度等均无明显相关性 ($P>0.05$), 认为 hMSH2 缺失是食管癌发生的早期事件。本实验甲基化率高于文献报道,可能与标本来源及样本量大小不同有关,他们共入选 32 例患者,而本研究有 130 例患者,且中晚期患者较多(Ⅲ/Ⅳ期 99 例)。

本研究发现 hMSH2 基因甲基化在不同年龄组有显著统计学差异, P 值为 0.000, 在 60 例 ≥ 60 岁的患者中有 42 例发生甲基化(甲基化率:70.0%), 在 70 例 < 60 岁的患者中仅 21 例发生 hMSH2 基因甲基化(甲基化率:30.0%), hMSH2 基因甲基化在老年组更常见。随着年龄的增加,细胞的老化速度增加,细胞老化时 DNA 修复能力随之下降,基因修复能力下降也促使细胞的老化、修复能力下降,更多错配基因不能得到修复,进而促使更多的肿瘤细胞的分化生长,疾病进一步发展。本实验另一个发现是 hMSH2 基因甲基化与肿瘤远处转移有关($P=0.000$), 在病情较晚的患者中, hMSH2 基因甲基化发生率高,说明 hMSH2 甲基化参与肿瘤的进展。未发现 hMSH2 甲基化与性别、肿瘤发生部位、淋巴结转移等有关关系,病例组中女性患者较少,需要进一步扩大样本量进行研究。随访中发现发生 hMSH2 基因甲基化的患者死亡事件发生较多,生存曲线也证明了出现 hMSH2 基因甲基化患者较非甲基化患者预后不良,两组有显著统计学差异 ($\chi^2=9.162, P=0.002$)。提示 hMSH2 基因甲基化参与了食管癌的发生发展,与预后相关。结合 hMSH2 甲基化、年龄、性别、分化、转移等情况进行预后的多因素分析,结果显示 hMSH2 甲基化加重、年龄增大及远处转移比肿瘤临床分期对预后的影响更大。

综上所述 hMSH2 基因启动子区域 5'-CpG 岛的高甲基化是食管癌频发的分子事件,食管癌组织中 hMSH2 基因启动子区域 5'-CpG 岛的甲基化明显高于癌旁正常组织,并且与年龄、肿瘤远处转移及不良预后显著相关,提示 hMSH2 基因启动子区域 5'-CpG 岛甲基化是导致其错配修复功能缺陷的重要原因之一, hMSH2 基因启动子区甲基化可能在老龄化及食管癌的发生发展过程中发挥重要作用,是一个潜在的预后相关因子。

参考文献:

- [1] Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer [J]. Cell, 1993, 75(5):1027-1038.
- [2] Wei W, Liu F, Liu L, et al. Distinct mutations in MLH1 and MSH2 genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) families from China [J]. BMB Rep, 2011, 44(5):317-322.
- [3] Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, et al. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation [J]. Cell, 1995, 81:197-205.
- [4] Wang LS, Arnold M, Huang YW, et al. Modulation of genetic and epigenetic biomarkers of colorectal cancer in humans by black raspberries: a phase I pilot study [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(3):598-610.
- [5] Candiloro IL, Mikeska T, Dobrovic A. Closed-tube PCR methods for locus-specific DNA methylation analysis [J]. Methods Mol Biol, 2011, 791:55-71.
- [6] 张功员, 马春晓, 刘秋亮, 等. 食管癌组织中 hMSH2 基因启动子区甲基化检测 [J]. 中华肿瘤杂志, 2005, 27(9): 541-543.
- [7] 张功员, 刘秋亮, 马春晓, 等. 食管癌组织中 hMSH2 基因的表达 [J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(6):662-669.

第五届浙江省胸部肿瘤论坛暨长三角专家峰会征文

(第一轮通知)

“第五届浙江省胸部肿瘤论坛暨长三角专家峰会”将于2012年6月29日至7月1日在杭州举行。本次会议将同时召开“长三角专家峰会”,大会将邀请国内外著名胸部肿瘤专家进行精彩的专题讲座;被邀专家中将有多位参加了第48届美国临床肿瘤学会年会(ASCO-2012),他们将传递本次ASCO会议中胸腹部肿瘤领域的最新信息,使国内临床肿瘤工作者能够快速、便捷地分享到国际最新的研究成果和创新技术。会议期间举行的“长三角专家峰会”等都成为大会的一大亮点,还有各种形式的病例讨论与案例点评等,增加与会专家和学者的感性认识。

“浙江省胸腹部肿瘤论坛”由浙江省肿瘤医院和浙江省癌症中心胸部肿瘤研究指导中心、浙江省抗癌协会主办,浙江省肿瘤诊治质控中心、浙江省肿瘤防治办公室、肿瘤学杂志社以及著名制药企业等共同参与的肿瘤学专业论坛。大会组委会诚挚邀请您参加本次大会并踊跃投递学术论文或研究报告,共同交流。本届论坛同时有两个国家级继续教育项目,凡参加大会交流者,均可获得相应的Ⅰ类继续教育学分:第五届乳腺癌内科治疗新进展【2012-03-10-119(国)】;乳腺癌预防及早诊早治新进展学习班【2012-12-07-081(国)】。

征文内容:胸部肿瘤领域的临床和基础研究相关学术论文,主要议题包括:①肺肿瘤;②食管肿瘤;③乳腺肿瘤。

征文要求:①尚未在国内外学术期刊公开发表的学术论文;②论文请按正式发表之格式撰写,提交全文并附500~1000字左右的中文摘要,摘要包括目的、方法、结果和结论四部分;③会议只接受网上投递,以word文档附件形式发送至Zhejiangxfzl@126.com;④发送稿件时注明通讯作者联系信息:姓名、性别、单位科室、通讯地址、E-mail、手机或办公室电话。

截稿日期:2012年5月31日,论文经学术委员会审稿后选编入论文集,确定优秀论文者将安排大会发言。

联系方式:地址:浙江省杭州市半山桥广济路38号(310022)浙江省肿瘤医院科教科;
联系人:吴国萍、邹德宏、江洪;电话:0571-88122515;网址:www.zchospital.com