

食管癌组织中PTEN基因启动子区高甲基化的临床特征

葛 晖, 金普乐, 丁翠敏, 胡文霞, 张健慧

Clinical Characteristics of Promoter Hypermethylation of PTEN Gene in Esophageal Carcinoma Tissues

GE Hui, JIN Pule, DING Cuimin, HU Wenxia, ZHANG Jianhui

Department of Respiration, The Fourth Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China

Abstract: Objective To explore the association of PTEN gene hypermethylation status and the occurrence and development of esophageal squamous cell cancer (ESCC), and the relationship of PTEN gene hypermethylation with mRNA expression. **Methods** Firstly, PTEN methylated pattern was determined by methylation specific polymerase chain-reaction (MSP) among 94 ESCC patients. In the meantime, the relationship between PTEN methylated pattern and the risk of ESCC, lymphatic metastasis, penetration, pTNM staging were analyzed. Secondly, PTEN mRNA expression was detected by reverse transcription PCR (RT-PCR), and the relationship between PTEN genes methylation and mRNA expression was analyzed. **Results** The frequency of PTEN gene hypermethylation among the 94 tumor tissues was 45.7%(43/94), while that in adjacent normal tissues was 11.7% (11/94), with significant difference ($P=0.00$). The frequency of PTEN hypermethylation in the positive lymphatic metastasis group (62.9%, 22/35) was significantly higher than that in negative lymphatic metastasis group (35.6%, 21/59, $P=0.01$). No significant difference were observed for the frequency of PTEN hypermethylation between two groups with different depth of penetration ($P=0.23$) or different pTNM staging ($P=0.14$). Among the tumor tissues with negative mRNA expression of PTEN, 74.2% (23/31) cases showed PTEN hypermethylation. The lost mRNA expression of PTEN was significantly associated with PTEN hypermethylation ($P_{\text{hi}}=-0.40$, $P=0.00$). **Conclusion** The high frequency of PTEN hypermethylation was associated with the development and lymphatic metastasis of ESCC. In addition, PTEN hypermethylation is one of the reasons for PTEN inactivation.

Key words: Esophageal squamous cell carcinoma; PTEN gene; Aberrant methylation; mRNA

摘要: 目的 探讨PTEN基因的甲基化状态与食管癌发生、发展的关系, 以及PTEN基因的甲基化与其mRNA表达的关系。**方法** 首先采用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific PCR, MSP)方法, 检测94例食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)患者PTEN基因启动子区的甲基化状态, 分析其与食管癌发病、淋巴结转移、浸润深度及临床病理分期的关系。其次应用反转录聚合酶链反应(reverse transcription PCR, RT-PCR)方法检测PTEN基因mRNA表达情况, 分析PTEN基因甲基化状态与其基因mRNA表达的关系。**结果** 食管癌组织中, PTEN基因的甲基化发生率为45.7% (43/94), 而相应的病变周围的正常食管组织中甲基化频率为11.7%(11/94), PTEN基因的甲基化在食管癌组织中显著高于食管正常组织 ($P=0.00$); 食管癌中, 淋巴结转移阳性组PTEN基因甲基化频率为62.9% (22/35), 显著性高于阴性组 (35.6%, 21/59) ($P=0.01$); 浸润深度T1+T2组和T3+T4组PTEN基因甲基化频率以及临床病理分期 I + II 期组和 III + IV 期组PTEN基因甲基化频率差异均无统计学意义($P=0.23$ 和 $P=0.14$)。PTEN mRNA表达阴性的肿瘤组织中, 74.2% (23/31)发生了PTEN基因的甲基化, PTEN基因mRNA阴性表达与其甲基化状态有显著的相关性($P_{\text{hi}}=-0.40$, $P=0.00$)。**结论** 食管癌组织中PTEN基因的甲基化高频率与食管癌的发生和淋巴结转移密切相关; 此外, PTEN基因甲基化是引起其mRNA阴性表达(失表达)的重要原因。

关键词: 食管鳞状细胞癌; PTEN基因; 异常甲基化; mRNA

中图分类号: R730.231; R735.1 文献标识码: A

收稿日期: 2013-10-22; 修回日期: 2014-02-19

作者单位: 050011石家庄, 河北医科大学第四医院呼吸内科

作者简介: 葛晖 (1967-), 女, 博士, 副主任医师, 主要从事肺癌及消化道肿瘤基因多态性及甲基化的研究

0 引言

PTEN基因定位于人类染色体10q23, 编码一种双特异的磷酸脂质酶, 被认为是一种抑癌基因。早期研究普遍认为PTEN突变是肿瘤发生的主

要原因, 近几年的研究发现某些肿瘤中并未检测到PTEN基因的突变, 或突变频率很低, 如胃癌、肺癌、某些妇科肿瘤等^[1-3], 却发现PTEN基因高甲基化与这些肿瘤的发生有关。已有研究表明, 多种基因的异常甲基化与食管癌的发生有关, 如p16、E-Cadherin及FHIT基因在食管癌中甲基化频率均在50%以上^[4-6], 但是PTEN基因甲基化在食管癌中的研究却少有报道。本研究检测食管鳞状细胞癌中PTEN基因启动子区甲基化状态和PTEN基因mRNA表达情况, 旨在分析PTEN基因甲基化在食管癌发生、发展中的作用以及PTEN基因mRNA失表达与其甲基化之间是否存在相关性, 以期对食管癌发生的分子机制有更深入的认识。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2007年8月至2010年2月在河北医科大学第四医院胸外科行食管癌根治性切除术的患者94例, 其中男67例, 女27例, 年龄26~75岁, 平均年龄(59.0±8.91)岁, 患者术前均未行化疗和放疗。按UICC标准进行TNM分期, 其中I期9例, II期53例, III期30例, IV期2例。按肿瘤侵及深度, T1 11例, T2 14例, T3 61例, T4 8例; 有区域淋巴结转移的35例, 无转移的59例。其中食管上段癌14例, 中段癌47例, 下段癌33例。所有患者均在其出院后复查病历, 以确认诊断信息无误。

1.2 标本采集

同时采集肿瘤组织及距肿瘤组织≥3 cm的癌旁组织约1/2黄豆大小, 分别将其置于经0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)水处理后并高压消毒过的1.5 ml Eppendorf管中, 液氮速冻, 然后转运至-80℃冰箱保存备用。均经术后病理证实: 肿瘤组织均为食管鳞状细胞浸润癌, 癌旁组织均为非肿瘤组织。

1.3 实验方法

以蛋白酶K(德国Merck公司)消化, 酚氯仿异戊醇抽提法提取组织DNA。将提取的组织DNA进行亚硫酸氢钠处理。将健康者外周血白细胞DNA用SssI甲基转移酶(新西兰BioLabs公司)处理, 并进行亚硫酸氢钠处理后作为甲基化阳性对照。以Trizol(美国Invitrogen公司)法提取总RNA。

1.4 甲基化特异性PCR(MSP)法

PTEN基因甲基化和非甲基化引物设计参照Yang等^[7]报告的文献。用于检测PTEN甲基化(PTEN-M)引物序列为: 5'-TTC GTT CGT CGT CGT CGT ATTT-3'(上游)和5'-GCC GCT TAA CTC TAA ACC GCA ACCG-3'(下游); 检测PTEN非甲基化(PTEN-U)引物序列为: 5'-GTG TTG GTG GAG

GTA GTT GTTT-3'(上游)和5'-ACC ACT TAA CTC TAA ACC ACA ACCA -3'(下游)。取经亚硫酸盐处理后DNA约100 ng进行MSP。反应条件为: 采用Hot-start方法进行PCR, 循环参数为94℃预变性5 min, 之后加入Taq-DNA聚合酶(北京赛百盛), 然后94℃变性30 s、65.5℃(甲基化引物)或62.5℃(非甲基化引物)退火45 s、72℃延伸1 min, 35个循环后, 72℃继续延伸5 min, 扩增产物为206bp(甲基化)和162bp(非甲基化)。

以经SssI甲基转移酶处理的健康者外周血DNA为甲基化阳性对照, 以去离子水作为阴性对照。取PCR扩增产物10 μl, 用3%琼脂糖凝胶电泳, 以Alphamager TM2200型凝胶成像系统观察并记录图像。并留取PTEN-M、PTEN-U的MSP产物经3730测序仪进行双向测序分析(上海英骏生物技术有限公司)以证实结果的可靠性。

将单纯出现甲基化条带者或同时出现甲基化条带和非甲基化条带者确定为甲基化状态; 将单纯出现非甲基化条带确定为非甲基化状态。

1.5 RT-PCR法

PTEN及GAPDH引物序列参照白伟良等^[8]的设计。PTEN引物: 5'-TTT GAA GAC CAT AAC CCA CCA-3'(上游); 5'-TCA TTA CAC CAG TTC GTC CCT-3'(下游)。2, 3-二羟基丙醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)内参照引物: 5'-AGG TGA AGG TCG GAG TCA ACG-3'(上游), 5'-AGG GGT CAT TGA TGG CAA CA -3'(下游)。应用RT-PCR试剂盒(A3500, 美国Promega公司)反转录合成cDNA第一链。在20 μl反应体系中加入cDNA 2 μl, 循环参数: 94℃预变性5 min后, 94℃30 s; 53℃(PTEN)、59℃(GAPDH)45 s; 72℃60 s; 35个循环, 最后72℃延伸5 min, 扩增过程采用去离子水作为阴性对照。扩增的PTEN及GAPDH PCR产物大小分别为136 bp、102 bp。将PCR产物于3%琼脂糖凝胶电泳, 经凝胶成像分析系统摄影, 观察PTEN及GAPDH基因mRNA表达情况。

以同时出现PTEN和GAPDH扩增条带者为PTEN mRNA表达阳性; 以仅出现GAPDH条带、未出现PTEN条带者为PTEN mRNA表达阴性。

1.6 统计学方法

采用实际观察值(百分比)表示各统计量, 数据分析采用卡方检验及Phi相关系数检验, 应用SPSS11.5软件包完成, 双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

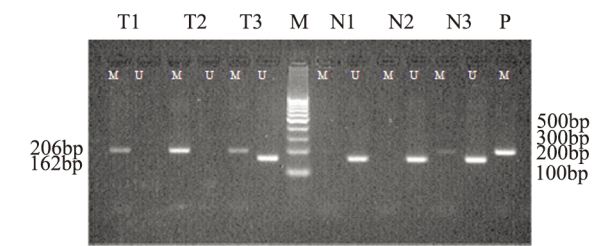
2.1 PTEN基因的甲基化检测结果

PTEN基因的甲基化在食管癌组织中显著高于食管正常组织 ($P=0.00$), 见表1, 图1、2。

表1 食管癌和癌旁正常组织中PTEN甲基化分布[n(%)]
Table1 Distribution of PTEN methylation patterns in ESCC tissues and adjacent normal tissues[n(%)]

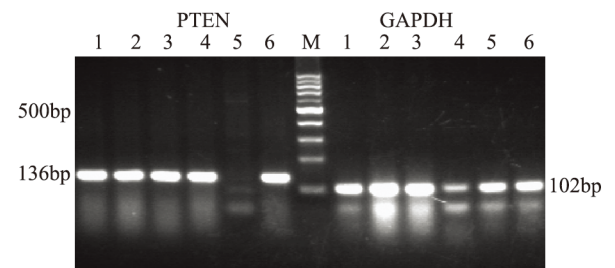
Groups	PTEN methylation patterns		P
	M	U	
ESCC	43 (45.7)	51 (54.3)	0.00
Control	11 (11.7)	83 (88.3)	

Notes:ESCC:esophageal squamous cell carcinoma;M: methylation pattern; U: unmethylation pattern



MSP:methylation specific polymerase chain-reaction;T1,T2 and T3: ESCC tissues;N1,N2 and N3: adjacent normal ESCC tissues;P: positive control of PTEN gene methylation pattern with genomic DNA treated by SssI; Ma: 100bp DNA marker; M: PTEN gene methylation pattern (206bp); U: PTEN gene unmethylation pattern (162bp)

图1 MSP法检测食管癌和癌旁正常组织中PTEN甲基化情况
Figure1 PTEN gene methylation pattern in ESCC tissues and adjacent normal tissues detected by MSP



1,2,3,4,6:positive PTEN mRNA expression;5:negative PTEN mRNA expression;M:100bp DNA marker

图2 RT-PCR检测PTEN基因mRNA表达
Figure2 PTEN mRNA expression detected by RT-PCR

2.2 PTEN基因甲基化与食管癌淋巴结转移的关系
94例浸润癌中, 淋巴结转移阳性组和阴性组PTEN基因甲基化频率分别为62.9%和35.6%, 阳性组PTEN基因甲基化频率显著性高于阴性组($P=0.01$), 见表2。

2.3 PTEN基因甲基化与食管癌浸润深度的关系
94例浸润癌中, T1+T2组和T3+T4组PTEN基因甲基化频率分别为56.0%和42.0%, 两组相比, PTEN基因甲基化频率差异无统计学意义($P=0.23$), 见表2。

2.4 PTEN基因甲基化与食管癌临床病理分期的关系
94例浸润癌中, I+II期组和III+IV期组PTEN基因甲基化频率分别为40.3%和56.3%, 两组相比, PTEN基因甲基化频率无显著性差异($P=0.14$), 见表2。

表2 食管癌组织中PTEN甲基化模式与临床病理特征的关系[n(%)]
Table2 Relationship of PTEN gene methylation patterns and clinical characteristics in ESCC tissues[n(%)]

Items	PTEN methylation patterns		P
	M	U	
Lymphatic metastasis			0.01
Positive	22 (62.9)	13 (37.1)	
Negative	21 (35.6)	38 (64.4)	
Penetration			0.23
T1+ T2	14 (56.0)	11 (44.0)	
T3+ T4	29 (42.0)	40 (58.0)	
pTNM staging			0.14
I + II	25 (40.3)	37 (59.7)	
III +IV	18 (56.3)	14 (43.8)	

2.5 PTEN mRNA表达定性检测结果
在94例食管癌组织中, 63例(67.0%)PTEN mRNA表达阳性, 31例(33.0%) 表达阴性。

2.6 PTEN mRNA表达与其基因甲基化的关系
PTEN mRNA表达阳性的63例肿瘤组织中, 20例(31.7%)发生了PTEN基因的甲基化, 而PTEN mRNA表达阴性的31例肿瘤组织中, 23例(74.2%)出现PTEN基因的甲基化。在PTEN mRNA失表达个体中, PTEN基因的甲基化频率显著升高, 显示食管癌肿瘤组织中PTEN基因mRNA的失表达与其甲基化状态有显著的相关性($P_{hi}=-0.40$, $P=0.00$), 见表3。

表3 食管癌中PTEN mRNA表达与其甲基化的关系[n(%)]
Table3 Correlation between PTEN mRNA expression and methylation patterns in ESCC tissues[n(%)]

Items	PTEN methylation patterns		P_{hi}	P
	M	U		
PTEN mRNA			-0.40	0.00
Positive	20(31.7)	43(68.3)		
Negative	23(74.2)	8(25.8)		

3 讨论
通常认为基因突变、杂合性缺失(LOH)、启动子高甲基化是抑癌基因失活并引起肿瘤发病的主要原因。其中肿瘤抑制基因CpG岛的高甲基化已成为研究的热点领域, 食管癌也不例外。DNA甲基化是真核细胞DNA最普遍的修饰过程, 它不改变DNA的一级结构并且在细胞正常发育、基因表达模式以及基因组的稳定性中起着至关重要的作用。DNA甲基化是肿瘤发生过程中常见的分子改变之一, 包括基因组总体的广泛性低甲基化和某些特定基因启动子区域的高甲基化。对食管癌甲基化的研究将有助于深入了解食管鳞癌发生的分子机制, 并为筛选用于食管鳞癌早期诊断和检测其复发和转移的特异性分子标志物提供极具价值的理论依据。
PTEN是一种抑癌基因, 结构上, PTEN与

鸡张力蛋白和牛辅助素有广泛同源性,在PTEN cDNA的5'端长的非翻译区含多个CG重复序列,这为甲基化调节提供了可能。功能上,该基因编码的蛋白PTEN能特异性地使磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, PIP3)去磷酸化,拮抗PI3K/AKT信号转导通路,具有调节细胞生长、增殖、迁移、分化等多种效应。体内外实验还表明,PTEN可使FAK脱磷酸,从而阻碍肿瘤细胞的扩散、转移、侵袭。

虽然PTEN突变与多种肿瘤的发生密切相关,但在一些肿瘤尤其是散发性肿瘤中并未检测到PTEN基因的突变,或突变频率很低,推测在这些肿瘤中可能存在着突变以外的其他机制,如表遗传学的修饰、基因的甲基化。本研究中观察到,在食管鳞状细胞癌中PTEN甲基化频率为43.7%,与食管正常组织相比存在着显著差异,认为PTEN甲基化与食管鳞癌的发生密切相关,这也与一些研究者的研究一致。一些研究者分别在胃癌^[9]、肺癌^[2]、散发性乳腺癌^[10]、宫颈癌^[3]的研究中,发现存在PTEN基因不同程度的甲基化,PTEN甲基化频率在19%~58%,并且认为PTEN甲基化与这些肿瘤的发生密切相关。因此推测,除PTEN基因突变与肿瘤的发生密切相关外,PTEN甲基化也是包括食管癌在内的某些肿瘤发生的重要机制。

本研究显示,有淋巴结转移者PTEN甲基化高达62.9%,显著高于无淋巴结转移者,PTEN甲基化与食管癌的淋巴结转移密切相关,预示着PTEN甲基化可能与食管癌预后不良有关。其原因可能为正常PTEN基因可使FAK脱磷酸,从而阻碍肿瘤细胞的扩散、转移,而一旦发生PTEN基因甲基化,使PTEN基因表达受到抑制,最终造成肿瘤细胞的扩散、转移。这在一些研究中也得到证实,Yang等^[7]在宫颈癌和卵巢癌及Kang等^[9]在胃癌的研究中均发现PTEN甲基化与淋巴结转移或预后有关。由于本研究未能对术后患者随访观察,所以PTEN基因的甲基化情况与患者生存的关系无法确定,这有待于今后的研究来进一步证实PTEN甲基化在食管癌预后中的作用。此外,由于循环血中存在肿瘤组织的游离DNA,所以,检测循环血中PTEN基因的甲基化状态有可能为食管癌的早期筛查、监测食管癌的复发和转移提供新的靶点。

此外本研究结果还显示,在食管癌中PTEN甲基化与其基因失表达密切相关,提示PTEN甲基化是引起其基因表达异常的主要机制,这也与许多研究者的结果一致。Rizvi等^[11]在印度人宫颈癌研究中发现,在甲基化阳性病例中有41%出现PTEN的表达缺失,并证实PTEN高甲基化与其基因失表达相关。在一项乳腺癌的研究中也证实了PTEN甲

基化引起基因失活,导致肿瘤发生^[12]。Fan等^[13]在体外实验中表明,在腺样囊性癌细胞系中,PTEN高甲基化引起该基因低表达。并在甲基化的细胞系中用去甲基化制剂处理后,可恢复PTEN基因的mRNA表达,得出结论PTEN基因甲基化正是引起表达缺失的一个主要原因。这都表明PTEN基因甲基化导致其基因失活,而PTEN基因失活,可通过不同途径引起细胞过度增殖,抑制细胞凋亡,从而导致了肿瘤的转化和生长。

综上所述,本研究从表遗传学(基因甲基化)以及转录(mRNA)水平上,较深入地探讨了食管癌发生的分子机制,证实PTEN甲基化是食管癌发生中常见的分子事件,并与食管癌预后有关;此外,PTEN甲基化还是其基因失活的重要原因。这为进一步研究PTEN基因与肿瘤的关系奠定了基础,同时也为食管癌的防治提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Sato K, Tamura G, Tsuchiya T, *et al.* Analysis of genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in gastric cancer[J]. *Virchows Arch*, 2002, 440(2): 160-5.
- [2] Soria JC, Lee HY, Lee JI, *et al.* Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(5): 1178-84.
- [3] Cheung TH, Lo KW, Yim SF, *et al.* Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm[J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 93(3): 621-7.
- [4] Abbaszadegan MR, Raziee HR, Ghafarzadegan K, *et al.* Aberrant p16 methylation, a possible epigenetic risk factor in familial esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Gastrointest Cancer*, 2005, 36(1): 47-54.
- [5] Takeno S, Noguchi T, Fumoto S, *et al.* E-cadherin expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation, Snail overexpression, and clinicopathologic implications[J]. *Am J Clin Pathol*, 2004, 122(1): 78-84.
- [6] Noguchi T, Takeno S, Kimura Y, *et al.* FHIT expression and hypermethylation in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Mol Med*, 2003, 11(4): 441-7.
- [7] Yang HJ, Liu VW, Wang Y, *et al.* Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinicopathological data[J]. *BMC Cancer*, 2006, 6: 212.
- [8] Bai WL, Li W, Chen XQ, *et al.* The relationship between hypermethylation of the PTEN promoter and laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Lin Chuang Er Bi Hou Ke Za Zhi*, 2006, 20(6): 254-7. [白伟良, 李巍, 陈晓秋, 等. 蛋白酪氨酸磷酸酶基因启动子过甲基化与喉癌的关系[J]. 临床耳鼻喉科杂志, 2006, 20(6): 254-7.]
- [9] Kang YH, Lee HS, Kim WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma[J]. *Lab Invest*, 2002, 82(3): 285-91.
- [10] García JM, Silva J, Peña C, *et al.* Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004, 41(2): 117-24.
- [11] Rizvi MM, Alam MS, Ali A, *et al.* Aberrant promoter methylation and inactivation of PTEN gene in cervical carcinoma from Indian population[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(8): 1255-62.
- [12] Khan S, Kumagai T, Vora J, *et al.* PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers[J]. *Int J Cancer*, 2004, 112(3): 407-10.
- [13] Fan X, Chen B, Xu J, *et al.* Methylation status of the PTEN gene in adenoid cystic carcinoma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2010, 3(5): 775-9.

[编辑校对: 周永红]