

胃癌环氧化酶-2、hML H1 及 hMSH2 微卫星不稳定性与基因调控的关系

宋伟庆¹,周保军¹,陈 怡²,韦金英²,王 烨²,韩彩丽²

Gene Regulation and Microsatellite Instability of the COX-2, hML H1 and hMSH2 in Gastric Carcinoma

SONG Wei-qing¹, ZHOU Bao-jun¹, CHEN Yi², WEI Jin-ying², WANG Ye², HAN Cai-li²

1. Department of Gastrointestinal Surgery, Secondary Affiliated surgery, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Department of Pathology, Hebei Medical University

Corresponding Author: HAN Cai-li, E-mail: bljysh1@126.com

Abstract :Objective To investigate the COX-2, hML H1 and hMSH2 of genes promoter methylation and MSI frequency in 43 cases of human gastric carcinoma and normal tissues, and to evaluate the relationship between them and occurrence of gastric carcinoma. **Methods** Methylation specific PCR (MSP) and polymerase chain reaction (PCR) methods were employed in this study in order to investigate the promoter methylation of these genes and 5 loci MSI frequency in human gastric carcinoma and normal tissues. **Results** Of 43 gastric carcinoma cases, the total frequency of MSI was 48.84% (21/43). The MSI frequency no significant discrepancy was found among the 5 loci. Cases with methylation of COX-2 and hML H1 gene promoter Cp G islands in gastric carcinoma were 8 and 13, and they were not detected in normal tissues. Methylation of hMSH2 gene promoter Cp G islands was not detected in gastric carcinoma or normal tissues. The methylation rate of hML H1 gene promoter Cp G islands in MSFH was higher than that in MSS ($P < 0.01$). There was no significant difference between MSFH and MSFL, and the same result was found between MSFL and MSS. 8 cases with methylation of COX-2 gene promoter Cp G islands only occurred in MSFH gastric cancer, and 7 cases both with methylation of COX-2 and hML H1 gene promoter Cp G islands was observed in MSFH. **Conclusion** Methylation of hML H1 and COX-2 gene promoter Cp G islands may both occur in the development of MSI gastric carcinoma. The methylation rate of hML H1 gene promoter Cp G islands in MSI gastric carcinoma was higher than that in MSS gastric carcinoma. It suggested that detecting the methylation of hML H1 gene promoter Cp G islands might be a useful method for determining the gastric carcinoma type.

Key words: Gastric carcinoma; Cyclooxygenase-2; hML H1; hMSH2; Polymerase chain reaction; Methylation specific polymerase chain reaction

摘要:目的 检测临床手术切除 43 例胃癌及相应正常组织 COX-2、hML H1 和 hMSH2 微卫星不稳定状态 MSI 及三种基因启动子甲基化情况,并进一步探讨它们与胃癌发生的关系。**方法** 采用聚合酶链反应(PCR)技术检测 5 个位点的 MSI 状态;甲基化特异性 PCR(Methylation specific PCR, MSP)方法检测胃癌及正常组织 COX-2、hML H1 及 hMSH2 三种基因启动子 Cp G 岛甲基化状态。**结果** 43 例胃癌中 MSI 总检出率为 48.84% (21/43),五个位点的 MSI 检出率无显著差别。COX-2 和 hML H1 基因启动子 Cp G 岛甲基化在 43 例胃癌中分别有 8 例和 13 例,正常组织中未检测到。hMSH2 基因启动子 Cp G 岛在胃癌及正常组织中均未检测到甲基化。在 MSFH 组 hML H1 基因启动子 Cp G 岛甲基化率显著高于 MSS 组 ($P < 0.01$);而在 MSFH 和 MSFL 组间以及 MSFL 和 MSS 无差别。MSFH 组中 COX-2 基因启动子 Cp G 岛甲基化 8 例,且有 7 例胃癌同时出现 hML H1 和 COX-2 基因启动子 Cp G 岛甲基化。**结论** 在 MSI 胃癌(尤其是 MSFH 型胃癌)的发生、发展过程中可能同时出现了 hML H1 和 COX-2 基因启动子 Cp G 岛的甲基化(即表型遗传修饰)。MSI 胃癌 hML H1 基因启动子 Cp G 岛甲基化率高于 MSS 胃癌,提示检测 hML H1 基因启动子 Cp G 岛甲基化对于判断肿瘤类型有一定意义。

收稿日期:2006-08-24;修回日期:2006-10-22
基金项目:河北省自然科学基金资助项目(303485)
作者单位:1. 050017 石家庄,河北医科大学第二附属医院胃肠外科;2. 河北医科大学病理教研室
通讯作者:韩彩丽, E-mail: bljysh1@126.com
作者简介:宋伟庆(1956~),男,本科,主任医师,主要从事消化道肿瘤的研究

关键词:胃癌;环氧化酶-2; hML H1; hMSH2; 聚合酶链反应;甲基化特异性聚合酶链反应

中图分类号:R735.2 文献标识码:A
文章编号:1000-8578(2007)03-0171-04

0 引言

MSI是指由于DNA复制错误引起的简单重复序列的增加或减少。MSI的出现使MS不能正常地发挥调控作用,引起细胞的增殖及分化发生异常,由此导致了肿瘤的发生。目前认为错配修复酶表达缺失或减少,导致MS的复制错误不能被修复,使一个或多个重复单位增加或丢失,是MSI产生的主要原因。

研究发现^[1]在一部分散发性MSI结直肠肿瘤中,hML H1基因的突变率却很低,其蛋白表达减少可能经由其他途径所致,譬如基因的表型遗传修饰^[2]。以DNA甲基化方式来修饰基因的表达称为基因表型遗传修饰。真核生物的甲基化大多发生在CpG核苷酸的胞嘧啶上。本研究采用PCR、甲基化PCR等方法,探讨COX-2、hML H1、hMSH2基因启动子甲基化与MSI关系的研究,为进一步阐明胃癌发生机制提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

收集河北医科大学附属第二医院胃肠外科2003年1月~2004年12月手术切除新鲜胃癌及相应距癌组织远端最远部位胃正常组织(>10cm,后文均称正常组织)各43例,所有组织均经病理诊断证实。所有患者术前均未接受放疗或化疗。

1.2 主要试剂

hML H1多克隆抗体(BA0511)(武汉博士德生物工程有限公司);hMSH2(SC-494)、COX-2(SC-1746)多克隆抗体(Santa Cruz公司),一抗工作液浓度分别为1:100、1:200、1:100。第二抗体马抗山羊(ZB-2306)、山羊抗兔(ZB-2301) IgG(H+L),DAB试剂盒(北京中山生物技术有限公司),二抗工作液浓度为1:500。

1.3 方法

1.3.1 甲基化特异性PCR

(1)胃癌及正常组织COX-2、hML H1及hMSH2基因启动子甲基化的检测 采用甲基化特异性PCR(Methylation specific PCR,MSP)方法检测3种基因启动子CpG岛甲基化状态。富含CpG的DNA序列称为CpG岛,真核生物的甲基化大多发生在CpG核苷酸的胞嘧啶上。DNA经亚硫酸氢钠作用后,未发生甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶,发生甲基化的胞嘧啶则无改变。根据DNA修饰后的变化,分别设计甲基化和非甲基化两对特异性引物,进行MSP。

(2)基因组DNA 亚硫酸氢盐修饰 DNA 亚硫酸氢盐修饰方法参见文献^[3],取3μgDNA,补三蒸水至40μl,加入1mol/L 氢氧化钠10μl,37℃保温10min;加入3mol/L 亚硫酸氢钠520μl 和10mmol/L 对苯二酚30μl,覆盖石蜡油,50℃保温18h;DNA提纯试剂盒洗脱,加入1.5 mol/L 氢氧化钠室温5min,乙醇沉淀、离心,-20℃保存。

(3)甲基化PCR反应条件 COX-2、hML H1及hMSH2三种基因启动子甲基化及非甲基化引物参见文献^[4],见表2。反应体系为20μl模板(经修饰的DNA)200ng,10×缓冲液(含MgCl₂)2μl,引物各15pmol,dNTPs 0.5μl,RedTaqDNA聚合酶1.5μl,三蒸水补至20μl。采用Biometra基因扩增仪(德国)扩增,扩增条件:95℃预变性5min(未加Taq酶)后,再加入Taq酶,循环参数为95℃45sec,60℃~61℃60sec,72℃90sec,35个循环,72℃延伸10min。每次扩增均设阴性对照,即用三蒸水代替模板扩增,无扩增产物即说明PCR无污染。产物行2%琼脂糖凝胶电泳,结果由凝胶成像系统照相保存。

(4)结果判断标准 以远端正常胃组织为对照,PCR产物行2%琼脂糖凝胶电泳后在相应位置(COX-2、hML H1、hMSH2)出现条带(目的条带)则可判断存在甲基化或非甲基化。

1.3.2 MSI检测

选用BAT-25、BAT-26、D2S123、D17S250、D5S346五个微卫星位点。赛百胜DNA提取试剂盒提取癌及癌旁正常组织基因组DNA,紫外分光定量后备用。引物序列从http://www.gdb.org中查询,见表1。

引物及PCR反应用品均购自赛百胜生物试剂公司。上述位点均采用同一条件扩增,反应体系为20μl,模板200ng,10×缓冲液(含MgCl₂)2μl,引物各15pmol,dNTPs 0.5μl,RedTaqDNA聚合酶1.5μl。

表1 引物序列

位点	引物序列	产物长度
BAT-25	5'-TCGCCTCCAA GAATGTAA GT-3' 5'-TCTGCA TTTAACATA TGGCTC-3'	~90bp
BAT-26	5'-TGACTACTTTGACTTCA GCC-3' 5'-AACCATTCACAT TTTAACCC-3'	80~100bp
D2S123	5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3' 5'-GGACTTCCACCTA TGGGAC-3'	197~227bp
D17S250	5'-GGAA GAA TCAA ATA GACAA T-3' 5'-GCTGGCCA TATA TATTAAACC-3'	~150bp
D5S346	5'-ACTCACTCTA GTGA TAAA TCG-3' 5'-A GCA GA TAA GACA GT ATTAC-TAGTT-3'	96~122bp

表 2 引物序列

项目	引物序列	产物长度
COX-2		
methyl-	5'-TTAGATACGGCGGCGC-3'	162bp
ation	5'-TCTTACCCGAACGCTTCCG-3'	61
unmethyl-	5'-ATA GATTAGATATGGTGGTGGTGGT-	172bp
ation	3'-CACAA TCTTACCCAAACACTTCCA-3'	61
hML H1		
methyl-	5'-ACGTA GACGTTTATTA GGGTCCC-3'	115bp
ation	5'-CCTCA TCGTA ACTACCCGCG-3'	60
unmethyl-	5'-TTTGATGTAGATGTTTATT-	124bp
ation	3'-GGGTTGT-3'	
	5'-ACCACCTCATCA TAACTACCCACA-3'	60
hMSH2		
methyl-	5'-TCGTGGTCGGACGTCGTT-3'	132bp
ation	5'-CAACGTCTCCTTCGACTACACCG-3'	60
unmethyl-	5'-GGTTGTTGTGGTTGAGTGGT-3'	137bp
ation	5'-CAACTACAACATCTCCTCAACTA-CACCA-3'	60

预变性 94℃ 2.5 min, 循环参数为 94℃ 45 sec, 55℃ 60 sec, 72℃ 90 sec, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。产物行 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 溴化乙锭染色后凝胶成像照相保存。结果判定: 与正常组织相比, 肿瘤组织出现泳动条带增多或减少或等位条带移位, 即判断为 MSI(阳性病例均重复实验 2 次)。根据突变型微卫星位点的多少, 将其分为 MSI-H, MSI-L 和 MSS。

1.3.3 统计学处理 应用 SAS 6.12 软件对结果进行统计处理。COX-2、hML H1 启动子甲基化及微卫星不稳定间相互关系用 chi-square 及 χ^2 Pearson 关联性检验或 Fisher's 确切概率法检验。检验水准为 0.05。

2 结果

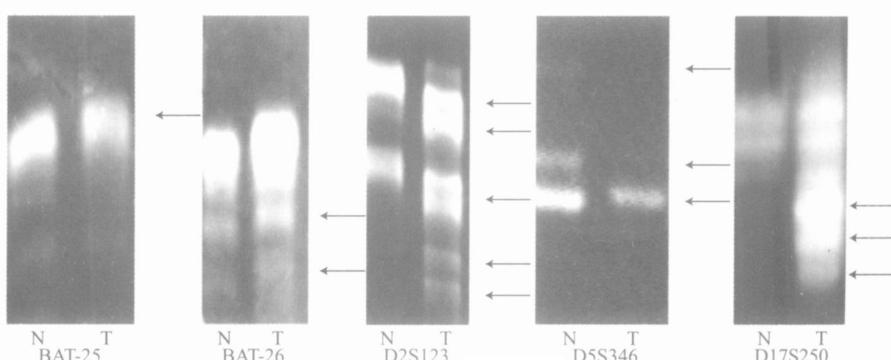
2.1 43 例胃癌中 MSI 总检出微卫星不稳定检测结果 43 例胃癌中 MSI 总检出率为 48.84% (21/43), BAT-25, BAT-26, D2S123, D5S346, D17S250 五个位点 MSI 的检出率分别为 20.93% (9/43), 32.56% (14/43), 30.23% (13/43), 20.93% (9/43), 20.93% (9/43)。五个位点的 MSI 检出率无显著差别。其中, 高频率微卫星不稳定 14 例。低频率微卫星不稳定 7 例, 微卫星稳定 22 例, 见图 1。

2.2 COX-2、hML H1 和 hMSH2 基因启动子甲基化检测结果 见图 2~5。

在 43 例胃癌基因启动子 CpG 岛甲基化中 COX-2 有 8 例, hML H1 13 例。hMSH2 基因启动子 CpG 岛在胃癌及正常组织中均未检测到甲基化。

2.3 COX-2、hML H1 和 hMSH2 基因启动子 CpG 岛甲基化与 MSI

MSF H 组 hML H1 基因启动子 CpG 岛甲基化率为 78.57% (11/14), 显著高于 MSS 组 (0/22, 0%) hML H1 基因启动子甲基化率 ($P < 0.01$) ; 而在



N:癌旁正常组织; T:胃癌组织(箭头所指为增多条带或等位条带移位)

图 1 五个位点的微卫星不稳定状态

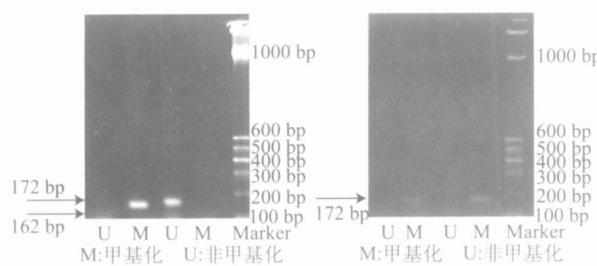


图 2 胃癌 COX-2 基因启动子甲基化状态检测

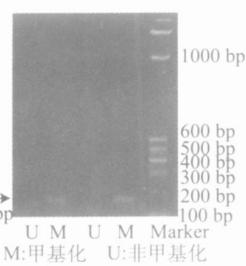


图 3 正常胃组织 COX-2 基因启动子甲基化状态检测

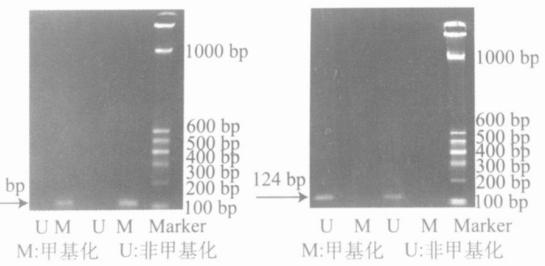


图 4 胃癌 hML H1 基因启动子甲基化状态检测

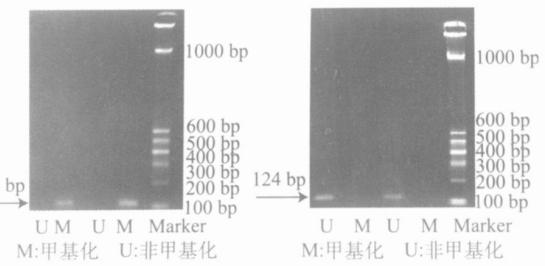


图 5 正常胃组织 hML H1 基因启动子甲基化状态检测

MSI-H(11/14, 78.57%) 和 MSI-L(2/7, 28.57%) 组间以及 MSI-L(2/7, 28.57%) 和 MSS(0/22, 0%) 组间 hML H1 基因启动子 CpG 岛甲基化率无差别。MSI-H 组中 COX-2 基因启动子 CpG 岛甲基化胃癌标本 8 例,且有 7 例胃癌同时出现 hML H1 和 COX-2 基因启动子 CpG 岛甲基化。

3 讨论

本实验室^[5]在研究了 78 例结肠癌患者中发现 hML H1 蛋白表达降低。发现^[6] hML H1 基因的表达降低可能与其启动子 CPG 岛甲基化存在关系,但甲基化产生机制尚不清楚。目前,国际上把与 CpG 岛的甲基化有关的肿瘤称作 CpG 岛甲基化表型(CIMP)阳性肿瘤。

本研究发现,在 MSI 胃癌中有 13 例出现 hML H1 基因启动子 CpG 岛甲基化,而在 MSS 胃癌中则无甲基化发生,提示 hML H1 基因启动子 CpG 岛甲基化与 MSI 胃癌发生关系密切(MSI-H 和 MSI-L 胃癌间 hML H1 基因启动子甲基化率无差别)。有研究发现^[7]去甲基化剂可恢复由于甲基化而失活的基因表达活性(如 hML H1 基因),这为今后治疗 CIMP 阳性肿瘤提供了一个新的治疗靶点。本研究未在胃癌中检测到 hMSH2 基因启动子甲基化,这与房殿春等^[8]在结肠癌中的研究结果一致。提示在胃癌中 hMSH2 蛋白低表达可能与其基因启动子 CpG 岛甲基化无关,其表达降低原因仍需进一步分子水平的研究。

环氧化酶(Cyclooxygenase, COX)具有两种同工酶,其中 COX-1 又称构建型 COX,主要合成生理性 PG,维持正常的生理功能,在大多数细胞中都稳定表达;COX-2 又称诱导型 COX,正常情况下绝大部分组织中无表达,仅在细胞受到各种因素(如细胞因子、生长因子、癌基因、促癌剂、肿瘤促进因子等)作用时迅速从头合成,并参与炎症及肿瘤的发生、发展。研究发现,在伴有 MSI 的胃癌和结肠癌中,COX-2 蛋白的表达明显减少,并且 Akhtar 等^[9]证实,COX-2 基因启动子 CpG 岛甲基化可导致 COX-2 蛋白表达降低。

43 例胃癌甲基化检测中发现,8 例出现 COX-2 基因启动子 CpG 岛甲基化,全部出现在 MSI-H 胃癌(8/14, 57.14%)。上述结果提示,MSI 胃癌尤其是 MSI-H 胃癌中可能伴有因 COX-2 基因表型遗传修饰而导致的蛋白表达降低,这与其他学者的研究结果基本相同,因此考虑 COX-2 在 MSI 胃癌的发生、发展中作用不大。

本研究结果认为,胃癌的发生可能存在 MSI 和

MSS 途径,即可以分为 MSI 和 MSS 两型胃癌。部分 MSI 胃癌(尤其是 MSI-H 胃癌)在发生过程中同时出现了 hML H1 和 COX-2 基因的表型遗传修饰,导致 hML H1 和 COX-2 蛋白表达降低,提示 hML H1 基因的表型遗传修饰产生 MSI 是 MSI 型胃癌发生的重要机制;而 COX-2 在此类胃癌的发生中作用不明显。应用去甲基化剂可恢复由于基因启动子 CpG 岛甲基化导致的蛋白表达抑制,但对同时出现 hML H1 和 COX-2 基因启动子 CpG 岛甲基化的 MSI 胃癌,去甲基化剂可恢复 COX-2 蛋白表达^[10]而促进肿瘤的发展,因此针对此类胃癌,去甲基化剂是否具有临床应用价值尚需进一步研究。MSS 胃癌发生过程中常出现 COX-2 蛋白表达升高,提示 COX-2 蛋白可能是 MSS 胃癌发生、发展的重要促进因素,但 MSS 胃癌的具体发生机制仍需探讨。

参考文献:

- [1] Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, et al. Hypermethylation of the hML H1 promoter in colon cancer with microsatellite instability [J]. Cancer Res, 1998, 58 (15): 3455-3460.
- [2] Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, et al. Genetic and epigenetic modification of hML H1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers [J]. AM J Pathol, 2000, 156 (5): 1773-1779.
- [3] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. PNAS, 1996, 93 (9): 9821-9826.
- [4] Kang GH, Lee S, Kim JS, et al. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis[J]. Lab Invest, 2003, 83 (5): 519-526.
- [5] 韩彩丽,郝军,高蔚娜,等.大肠癌中错配修复酶 hML H1、hMSH2 及环氧化酶-2 表达的研究[J].河北医科大学学报,2004, 25 (5): 266-269.
- [6] Baylin SB, Herman JG, Graff JR, et al. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia[J]. Adv Cancer Res, 1998, 72 (1): 141-196.
- [7] Deng G, Chen A, Hong J, et al. Methylation of CpG in a small region of the hML H1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression[J]. Cancer Res, 1999, 59 (9): 2029-2033.
- [8] 房殿春,杨仕明,杨建民,等.大肠癌组织微卫星不稳与 hML H1 和 hMSH2 基因启动子区甲基化状态[J].世界华人消化杂志,2003, 11 (3): 302-305.
- [9] Akhtar M, Cheng Y, Magno RM, et al. Promoter methylation regulates Helicobacter pylori stimulated COX-2 expression in gastric epithelial cells[J]. Cancer Res, 2001, 61 (6): 2399-2403.
- [10] Song SH, Jong HS, Choi HH, et al. Transcriptional silencing of cyclooxygenase-2 by hypermethylation of the 5 CpG island in human gastric carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2001, 61 (11): 4628-4635.

[编辑:刘红武]