

胃癌 MGMT 基因启动子 CpG 岛甲基化与蛋白表达缺失

齐 健, 朱尤庆, 杨 冬, 张友才, 张蔚英, 刘 军, 魏 芸

齐健, 朱尤庆, 杨冬, 张友才, 武汉大学中南医院消化内科
湖北省武汉市 430071
张蔚英, 刘军, 魏芸, 武汉大学医学院病毒所 湖北省武汉市 430071
2002年湖北省科技攻关计划资助项目, No. 2002AA301C84
项目负责人: 朱尤庆, 430071, 湖北省武汉市武昌区东湖路169号, 武汉大学中南医院消化内科. uqing_zhu@sina.com
电话: 027-87317915
收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-10-22

摘要

目的: 探讨6-氧-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶基因启动子甲基化状况在胃癌发生、发展中的作用。

方法: 用甲基特异性聚合酶扩增链式反应检测20例正常胃黏膜组织、38例胃癌组织及癌旁正常组织DNA中MGMT基因启动子的甲基化状况, 用免疫组化方法检测MGMT蛋白的表达情况。

结果: 19.1%(9/47)的肿瘤组织和10.6%(5/47)的癌旁正常组织存在MGMT基因启动子甲基化, 正常胃黏膜组织均不存在甲基化。免疫组化发现有21.3%(10/47)的肿瘤组织MGMT蛋白失表达, 其中7例(70.0%)存在启动子甲基化。胃癌中MGMT基因启动子高甲基化与MGMT蛋白表达缺失存在显著联系($P < 0.001$)。

结论: 胃癌组织中存在一定程度的MGMT基因启动子高甲基化和MGMT蛋白表达缺失。胃癌发生过程中MGMT基因高甲基化可导致MGMT蛋白表达缺失, 可能是胃癌发生的重要途径之一。

齐健, 朱尤庆, 杨冬, 张友才, 张蔚英, 刘军, 魏芸. 胃癌MGMT基因启动子CpG岛甲基化与蛋白表达缺失. 世界华人消化杂志 2004;12(3):751-753
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/751.asp>

0 引言

6-氧-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)是一种普遍存在的DNA修复酶, 可将烷化剂使DNA鸟嘌呤 O^6 位发生烷基化而形成 O^6 -鸟嘌呤加合物从DNA上移除, 使细胞免受烷化剂的损伤, 并抑制随后的细胞反应, 使存在DNA损伤的细胞不再增生, 从而保持基因组的完整性^[1]。MGMT基因启动子区域含有一个CpG岛, 若其CpG岛发生甲基化导致MGMT蛋白表达缺失或减少, 则烷化剂造成的损伤不能被及时修复, 在转录过程中会导致G:C配对转换为A:T配对(G→A转换), 使细胞发生癌性转化^[2-6]。我们检测了正常胃黏膜组织20例、胃癌组织47例及癌旁正常组织DNA中MGMT基因启动子甲基化状况和蛋白表达情况, 分析他们之间是否存在

联系, 从而探讨MGMT基因启动子高甲基化在胃癌发生、发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌组织47例及相应的癌旁正常组织来自武汉大学中南医院外科手术患者, 男26例, 女21例, 年龄31-68(平均54.8岁)。癌旁组织为距肿瘤5cm的正常组织, 经病理证实不存在不典型增生。正常胃黏膜组织20名来自门诊的健康志愿者。所有标本均取2份, 1份立即放入 -70°C 冰箱保存, 1份用甲醛固定、石蜡包埋后保存。所有患者术前均未接受过放疗。

1.2 方法 以传统的酚-氯仿方法从上述各种组织中提取DNA。按James et al (Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:9821)^[7]描述的方法用亚硫酸氢钠可对DNA进行化学修饰, 并用Wizard DNA纯化试剂盒(promega公司)纯化, 分别以MGMT基因甲基化和非甲基化引物进行扩增。甲基化的引物序列上游为5'-TTT CGA CGT TCG TAG GTT TTC GC-3', 下游为5'-GCA CTC TTC CGA AAA CGA AAC G-3'; 非甲基化的引物序列上游为5'-TTT GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT-3', 下游为5'-AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A-3'^[8]。反应条件为 95°C 预变性360s, 然后 94°C 45s, 59°C 45s, 72°C 60s, 35个循环后 72°C 延伸600s^[6, 8]。PCR产物用8g/L的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色观察结果。组织标本用甲醛固定、石蜡包埋, 制成4 μm 厚切片, 进行HE染色以确定其是否为肿瘤组织或正常组织及其病理类型和分期。免疫组化使用鼠抗MGMT单克隆抗体和SP试剂盒(北京中山公司)。以表达率大于10%为阳性结果。

统计学处理 用SPSS 11.0软件, Pearson χ^2 检验, Fisher确切概率法, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

MSP结果显示, 正常胃黏膜组织均未显示甲基化条带, 19.1%(9/47)的胃癌组织和10.6%(5/47)的癌旁正常组织存在启动子甲基化。5例甲基化的癌旁正常组织中有1例癌组织同时存在甲基化, 其余4例癌组织无甲基化(图1)。统计学分析显示, 胃癌组织中MGMT基因启动子甲基化率与癌旁正常组织之间的差异无显著性($\chi^2 = 1.343$, $P = 0.247$), 而与正常胃黏膜(0/20)之间有差异($P = 0.049$)。

在20正常胃黏膜中MGMT蛋白在绝大多数实质细胞和间质细胞的胞核、胞质均有表达。10例胃癌组织MGMT失表达, 其中7例存在MGMT启动子甲基化;

癌旁正常组织蛋白表达均为阳性,但有7例为弱阳性表达,其中4例存在甲基化(图2)。统计学分析显示胃癌组织MGMT蛋白表达缺失率21.3%(10/47)与癌旁正常组织(0/47)、正常胃黏膜组织(0/20)之间的差异均有显著性($P=0.001$, $P=0.027$)。并且MGMT启动子高甲基化与MGMT蛋白表达缺失存在显著联系(表1, $\chi^2=17.249$, $P<0.001$)。

表1 胃癌组织MGMT甲基化及蛋白表达情况

免疫组化	MSP		合计
	非甲基化	甲基化	
+	35	2	37
-	3	7	10
合计	38	9	47

$P<0.001$.

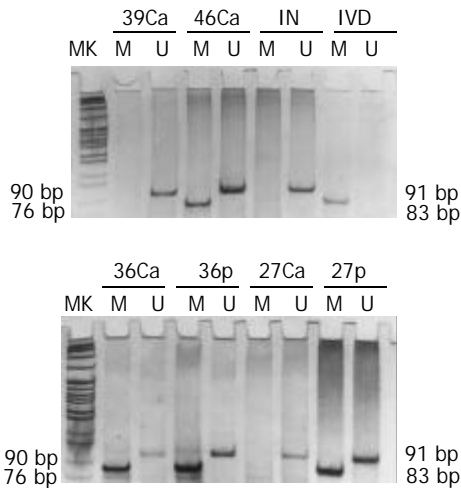


图1 A: 癌组织(Ca)同时显示甲基化(M)和非甲基化条带(U),正常胃黏膜(N)无甲基化条带,体外甲基化的DNA(IVD)作为阳性对照; B: 36号癌组织和癌旁正常组织(P)都存在甲基化,27号只有癌旁正常组织存在甲基化。

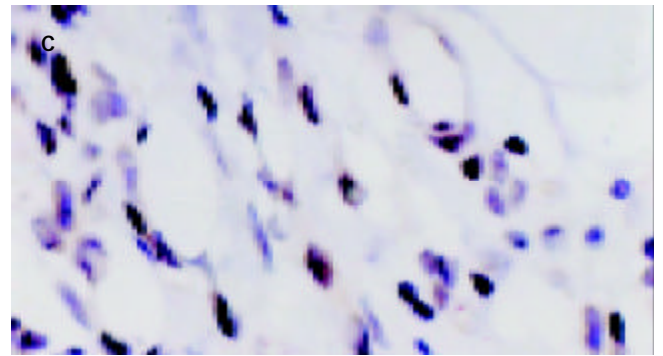
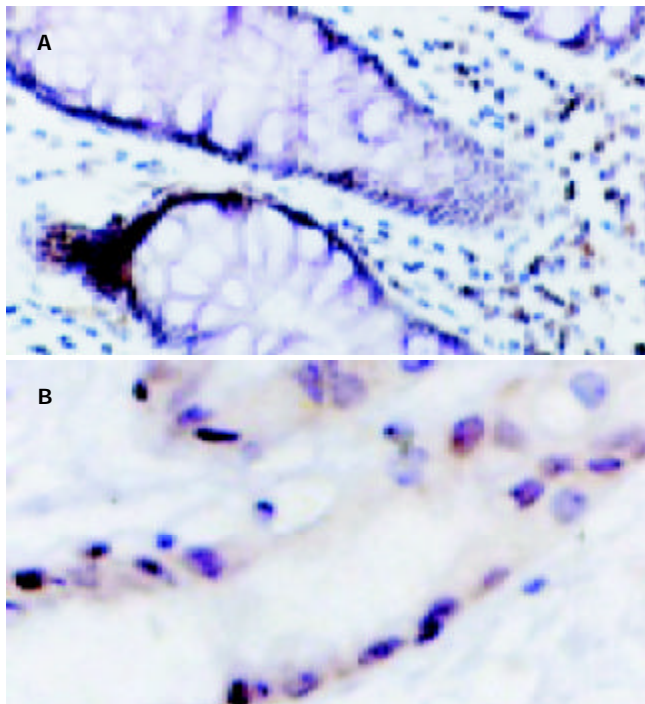


图2 免疫组化检测组织标本中MGMT的表达。A: 正常胃黏膜组织MGMT强阳性表达; B: 甲基化的癌旁正常组织中MGMT表达减弱; C: 胃癌组织中MGMT表达缺失。

3 讨论

N-亚硝基化合物可能是引起胃癌的主要化学致癌物,可以在人胃中由其前体合成,最终活性形式烷基正离子可使DNA发生烷基化。鸟嘌呤O⁶位甲基化可以影响碱基配对,且修复缓慢,因而对致突变和致癌十分重要。MGMT是惟一能将O⁶-鸟嘌呤加合物从DNA上移除的蛋白,若其表达减少或缺失,则不能有效地修复该损伤,使细胞失去了对烷化剂等突变原的保护性。人类基因组中约有29000个CpG岛,几乎总是存在于基因启动子和(或)外显子周围,除了印迹基因和女性失活的X染色体上的几个基因外,CpG双核苷酸在正常情况下都是非甲基化的,而大多数CpG岛以外的CpG双核苷酸则是甲基化的^[9-10]。许多肿瘤抑制基因启动子区域的CpG岛在正常情况下是非甲基化的,而在肿瘤组织中被高度甲基化^[11-13]。本组中,有19.1%(9/47)的胃癌组织存在MGMT基因启动子甲基化,而在正常胃黏膜组织中均未检测到甲基化,与国外文献^[8, 14]报道相近。提示在胃癌中存在较高频率的MGMT基因启动子甲基化。启动子高甲基化能抑制基因转录,导致蛋白表达缺失或减少。我们同时用免疫组化方法检测了标本中MGMT蛋白的表达情况,结果显示:47例胃癌组织中有10例MGMT表达缺失,而癌旁正常组织和正常胃黏膜组织中均无MGMT表达缺失,表明MGMT在胃癌中表达缺失。9例存在MGMT基因启动子甲基化的胃癌组织中有7例蛋白表达缺失,表明MGMT基因启动子高甲基化与MGMT蛋白表达缺失有显著联系。本研究中胃癌组织的甲基化率19.1%(9/47)和相应的癌旁正常组织10.6%(5/47)并无差异。由于MSP是一种敏感性非常高的检测方法,只要样本中有很微量的甲基化DNA就可以观察到甲基化条带。一种可能是在取组织时癌旁正常组织被癌细胞污染,若癌细胞存在甲基化,则被污染的癌旁正常组织也出现甲基化条带。另一种可能是这些癌旁正常组织细胞DNA中已存在一定程度的甲基化,但尚未引起细胞癌变,36号癌组织和癌旁正常组织都存在甲基化,但都表达MGMT蛋白,癌旁组织甲基化条带更浓,与电泳点样量有关。本组中5例存在甲基化的癌旁正常组

织中有4例免疫组化表现为弱阳性,表明这些组织中MGMT蛋白表达减少,一个MGMT分子只能修复一处烷基化损伤,MGMT蛋白表达减少将使细胞的修复能力降低,提示MGMT基因甲基化改变可能很早就已经出现,可能是胃癌发生过程中的早期分子事件,其后续变化可能在胃癌的发生、发展过程中起重要作用。

启动子甲基化抑制基因转录的机制尚不清楚,但已有多项研究表明蛋白表达缺失或减少与基因启动子甲基化有关^[15-19]。我们的研究表明胃癌中存在一定程度的MGMT基因启动子高甲基化和MGMT蛋白表达缺失,MGMT基因表达缺失多由MGMT基因启动子高甲基化引起,可能是胃癌发生过程中的早期分子事件。胃癌在我国常见也是表现出高频率甲基化的肿瘤之一,p16^{INK4a}、p14^{ARF}、hMLH1、APC等基因在胃癌中均存在一定程度的甲基化^[14, 20-25],因此联合检测MGMT基因和其他肿瘤相关基因的甲基化状况,可能作为早期发现胃癌的分子标志物。

4 参考文献

- Dolan ME, Schilsky RL. Silence is golden: gene hypermethylation and survival in large-cell lymphoma. *J Natl Cancer Institute* 2002;94:6-7
- Fang JY, Lu J, Chen YX, Yang L. Effects of DNA methylation on expression of tumor suppressor genes and proto-oncogene in human colon cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2003; 9:1976-1980
- Yue CM, Deng DJ, Bi MX, Guo LP, Lu SH. Expression of ECRG4, a novel esophageal cancer-related gene, downregulated by CpG island hypermethylation in human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1174-1178
- Fang JY, Lu YY. Effects of histone acetylation and DNA methylation on p21 (WAF1) regulation. *World J Gastroenterol* 2002;8:400-405
- Esteller M, Kiskies RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation of the DNA repair Gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001;61: 4689-4692
- Park TJ, Han SU, Cho YK, Paik WK, Kim YB, Lim IK. Methylation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene is associated significantly with K-ras mutation, lymph node invasion, tumor staging, and disease free survived in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001;92:2760-2768
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 9821-9826
- Bae SI, Lee HS, Kim SH, Kim WH. Inactivation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter CpG island hypermethylation in gastric cancers. *Br J Cancer* 2002;86: 1886-4892
- 刘仲敏, 刘芝华, 吴昊. DNA高甲基化与抑癌基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:1420-1424
- 周永宁, 徐采朴, 房殿春. CpG岛甲基化与胃肠道肿瘤. *世界华人消化杂志* 2003;11:65-71
- Costello FJ, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001; 38:285-303
- Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human Mol Genetics* 2001;10:687-692
- 朱卫国. DNA甲基化, 基因调控和癌症. *世界华人消化杂志* 2002; 10:680-683
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3225-3229
- Esteller M, Hamilton SR, Bugar PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999;59: 793-797
- Oue N, Shigeishi H, Kuniyasu H, Yokozaki H, Kuraoka K, Ito R, Yasui W. Promoter hypermethylation of MGMT is associated with protein loss in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2001; 93:805-809
- Liu LH, Xiao WH, Liu WW. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on the P16 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *World J Gastroenterol* 2001;7:131-135
- Cui J, Yang DH, Bi XJ, Fan ZR. Methylation status of c-fms oncogene in HCC and its relationship with clinical pathology. *World J Gastroenterol* 2001;7:136-139
- Liao C, Zhao MJ, Zhao J, Song H, Pineau P, Marchio A, Dejean A, Tiollais P, Wang HY, Li TP. Mutation analysis of novel human liver-related putative tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:89-93
- Ding Y, Le XP, Zhang QX, Du P. Methylation and mutation analysis of p16 gene in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:423-426
- Zhao P, Hu YC, Talbot IC. Expressing patterns of p16 and CDK4 correlated to prognosis in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2202-2206
- Yi J, Wang ZW, Cang H, Chen YY, Zhao R, Yu BM, Tang XM. p16 gene methylation in colorectal cancers associated with Duke's staging. *World J Gastroenterol* 2001;7:722-725
- Deng DJ, Zhou J, Zhu BD, Ji JF, Harper JC, Powell SM. Silencing-specific methylation and single nucleotide polymorphism of hMLH1 promoter in gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003;9:26-29
- Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Yang JM, Liu HF, Peng GY, Xiao TL, Luo YH. Mutation and methylation of hMLH1 in gastric carcinomas with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2003;9:655-659
- 张晓兵, 刘泽军. 胃癌DNA甲基化谱研究进展. *世界华人消化杂志* 2002;10:1454-1457