

五聚素 3 基因甲基化在食管鳞癌中的作用

王俊雄 杨硕 贺远龙 朱圣韬 张澍田

【摘要】 目的 研究食管鳞癌组织中五聚素 3 (PTX3) 基因的表达, 以及基因启动子区甲基化状态对其表达的影响。**方法** 应用半定量逆转录 PCR (RT-PCR)、甲基化特异性 PCR (MSP)、免疫组织化学的方法对癌旁食管黏膜组织和食管鳞癌组织进行检测, 分析 PTX3 基因 mRNA 的表达、基因启动子区甲基化状态和 PTX3 蛋白阳性表达与食管癌临床病理特征的关系。**结果** 25% (5/20) 食管鳞癌组织和 90% (18/20) 正常食管黏膜组织存在 PTX3 基因表达, PTX3 mRNA 在食管癌与癌旁组织之间的表达差异有统计学意义 ($\chi^2 = 17.289, P < 0.001$)。80% (16/20) 食管鳞癌组织和 25% (5/20) 正常食管黏膜组织存在 PTX3 基因 CpG 岛超甲基化, 提示 PTX3 基因超甲基化与食管癌发生之间有关联 ($\chi^2 = 12.13, P < 0.001$)。PTX3 蛋白在食管癌组织中表达的阳性率为 30.38% (24/79), 癌旁食管组织 PTX3 蛋白阳性表达率为 84.81% (67/79) ($P < 0.001$)。随着食管癌临床分期增加, PTX3 蛋白阳性表达率逐渐降低。**结论** PTX3 基因启动子高甲基化是 PTX3 表达失活的主要原因, 在食管鳞癌的发生发展中起重要作用, PTX3 基因启动子甲基化可作为食管鳞癌预后评估的潜在肿瘤标志物。

【关键词】 食管肿瘤; 基因, 抑制; DNA 甲基化; 五聚素 3

Effect of PTX3 gene methylation in human esophageal squamous cell carcinoma WANG Jun-xiong, YANG Shuo, HE Yuan-long, ZHU Sheng-tao, ZHANG Shu-tian. Medical and Health Center, Beijing Friendship Hospital Affiliated to The Capital Medical University, Beijing 100050, China
Corresponding author: ZHANG Shu-tian, Email: jxwang88@gmail.com

【Abstract】 Objective The PTX3 gene was identified in our laboratory from esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** We examined PTX3 expression in 79 primary ESCCs and the corresponding non-malignant tissues, We further analyzed the correlation of PTX3 expression with the clinicopathological characteristics of ESCC patients. **Results** The low expression level was significantly associated with increased tumor stage in ESCC ($P < 0.001$). Using methylation-specific PCR (MSP) and semi-quantitative reverse-transcription PCR, we found that PTX3 expression was downregulated due to the gene promoter hypermethylation. Methylation in tumor tissues (85%) was more frequent than adjacent non-malignant tissues (25%) ($P < 0.001$). **Conclusions** The results reveal PTX3 as a novel candidate tumor suppressor gene downregulated through promoter hypermethylation in ESCC.

【Key words】 Esophageal neoplasms; Genes, suppressor; DNA methylation; PTX3

五聚素 3 (pentraxin3, PTX3) 基因位于人染色体的 3q25, 也有学者称之为肿瘤坏死因子刺激基因 14 (TSG14), 编码的蛋白由五个相同的亚单位组成长五聚体, 分泌型的 PTX3 是一个 45 000 Da 的糖蛋白。目前已发现 PTX3 与多种恶性肿瘤如乳腺癌、淋巴瘤的血管生成和细胞凋亡相关^[1-2]。食管癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 人群患病率和病死率仍处于较高水平, PTX3 mRNA 在食管癌中的表达尚无报道。近年来, DNA 异常甲基化在肿瘤发生发展中的作用越来越受到重视, 在肿瘤发生中, 抑癌基因的高甲基化和部分原癌基因的低甲基化形成肿瘤细胞中的异常甲基化模式; 即全基因组普遍的低甲基化和局部性 (CpG 岛区域) 的高

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.16.015

作者单位: 100050 首都医科大学附属北京友谊医院医疗保健中心(王俊雄), 消化内科(朱圣韬、张澍田); 北京大学第三医院检验科(杨硕); 青岛市立医院消化科(贺远龙)

通讯作者: 张澍田, Email: jxwang88@gmail.com

甲基化并存^[3]。本实验检测 PTX3 mRNA 在食管癌中的表达,研究其启动子区甲基化在食管鳞状细胞癌(以下简称食管鳞癌)中的作用。

材料和方法

1. 实验标本:20 例食管鳞癌组织及癌旁食管黏膜组织取自 2006 ~ 2007 年首都医科大学附属北京友谊医院胸外科手术标本,冻存于液氮中。

79 例食管鳞癌组织及癌旁食管黏膜组织取自 2006 ~ 2007 年首都医科大学附属北京友谊医院胸外科手术标本,石蜡包埋。癌旁组织为距病灶 > 5 cm 的同一个体的正常组织。临床分期参考 1997 年 UICC-TNM 分期标准。79 例患者中男 54 例,女 25 例。年龄 37 ~ 86 岁,平均年龄 60.7 岁,中位年龄 61 岁。

2. 实验仪器和试剂:PTC200 PCR 扩增仪(MJ,美国),GEL-DOC2000 型紫外凝胶成像系统(Bio-Rad,美国),石蜡切片机(Leica RM2145),显微镜及数码成像系统(Nikon Eclipse E600W),通用型 SP9000 免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),PTX3 一抗(Millipore,美国),细胞株及组织基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN DP303,北京),甲基化特异性 PCR 试剂盒(Takara,大连宝生物)。

3. RNA 的提取及基因组 DNA 的提取:取所有 20 例患者的肿瘤组织标本及癌旁组织各约 5 mg,放入含 1 ml Trizol 溶液的管中,研碎后按厂商说明书提取 RNA。研磨组织成悬液,离心后取细胞株沉淀。使用基因组 DNA 提取试剂盒,按说明书进行。

4. PTX3 基因表达的检测:将提取的 20 例食管癌组织和癌旁组织中的 RNA 反转录为 cDNA,再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 45 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 60 s,35 次循环;最后 72 °C 延伸 10 min。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,运用凝胶电泳成像及图像分析系统进行图像分析。相关引物如下:PTX3-F:5'-TCTCTGGTCTGCAGTGTGG-3', PTX3-R:5'-TGAAGAGCTTGTCCATTCC-3'; GAPDH-F:5'-CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT-3', GAPDH-R:5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'。

5. PTX3 基因启动子区甲基化检测:将 20 例食管癌组织、癌旁组织基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐修饰,然后采用 MSP 法对修饰后的 DNA 进行甲基化检测。PTX3 甲基化引物:MSP-F:5'-CGTTTGGCGTTAGGAG-TATTC-3', MSP-R:5'-CAAAACGTCGTCGTA ACTTA-3', 扩增片段 103 bp。PTX3 非甲基化引物:PTX3-USP-F:5'-TGTGTTTGTGTTAGGAGTATTTG-3', PTX3-USP-R:5'-CAAAACATCATCCATAACTTA-3', 扩增片段 105 bp。PCR 反应条件:95 °C 预变性 10 min;95 °C 45 s,59 °C (甲基化)/50 °C (非甲基化)45 s,72 °C 45 s,35 次循环;最后 72 °C 延伸 10 min。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶电泳成像及图像分析系统进行图像分析。

6. 免疫组织化学 SP 法检测食管组织中 PTX3 的表达:食管癌和癌旁食管黏膜组织标本用石蜡包埋,4 μm 切片,常规处理。检测过程按 SP 试剂盒操作手册进行,以 PTX3 单抗抗体为一抗,DAB 显色,按阳性细胞比例判断其是否为阳性表达^[4]。

7. 统计学方法:用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析。两组均数的比较用独立样本 *t* 检验;率的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. RT-PCR 结果:25% 食管癌组织(5/20)和 90% 正常食管黏膜组织(18/20)存在 PTX3 基因表达(图 1),PTX3 mRNA 在食管癌与癌旁之间的表达差异有统计学意义($\chi^2 = 17.289, P < 0.001$)。

2. MSP 结果:80% 食管癌组织(16/20)和 25% 正常食管黏膜组织(5/20)存在 PTX3 基因 CpG 岛超甲基化(图 2),PTX3 基因超甲基化与食管癌发生之间有关联($\chi^2 = 12.13, P < 0.001$)。

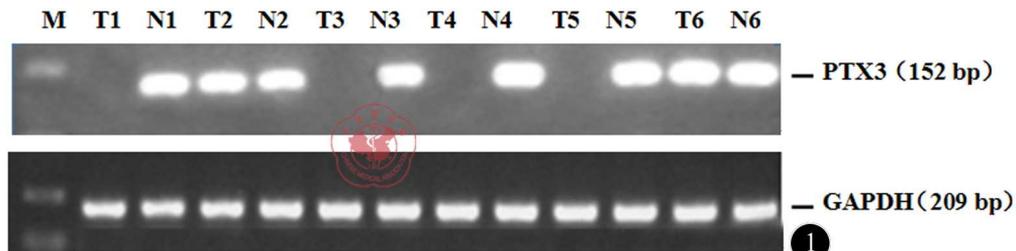
3. 免疫组织化学结果:(1)PTX3 蛋白阳性染色颗粒主要定位于细胞胞质内(图 3)。(2)食管癌组 PTX3 蛋白阳性表达率为 30.38%(24/79),癌旁组 PTX3 蛋白阳性表达率为 84.81%(67/79)。食管癌组 PTX3 蛋白阳性表达率显著低于癌旁组($\chi^2 = 41.039, P < 0.0001$)。(3)PTX3 蛋白阳性表达与食管癌临床病理特征的关系:病变组织的 PTX3 的表达与患者的性别、年龄、吸烟嗜好、肿瘤浸润深度及淋巴结转移均无

关, P 均 >0.05 。根据临床病理分期 I + II a 期组与 II b + III + IV 期组之间 PTX3 蛋白阳性表达率(32.76% vs. 23.81%) 差异有统计学意义($\chi^2 = 6.356, P = 0.012$) (表 1); 随临床分期增加, PTX3 蛋白阳性表达率逐渐降低。PTX3 蛋白表达阳性的年龄为(59.6 ± 21.5)岁, 阴性为(61.2 ± 23.5)岁, $t = 0.677, P = 0.510$ 。

表 1 PTX3 甲基化与临床病理因素的关系

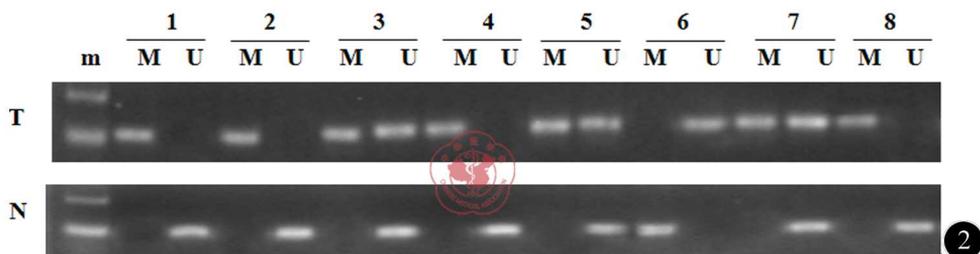
临床因素	例数	PTX3 表达[例, (%)]		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性		
总数	79	24(30.38)	55(69.62)		
性别					
男	54	29.63(16)	70.37(38)	0.045	0.831
女	25	32.00(8)	68.00(17)		
吸烟史					
有	38	31.58(12)	68.42(26)	0.05	0.823
无	41	29.27(12)	70.73(29)		
浸润深度					
未达纤维膜	46	34.78(16)	65.22(30)	1.009	0.315
侵达纤维膜	33	24.24(8)	75.76(25)		
淋巴结转移					
有	20	20.00(4)	80.00(16)	2.536	0.311
无	59	33.90(20)	66.10(39)		
TNM 分期					
I + II a	58	32.76(19)	67.24(39)	6.356	0.012 ^a
II b + III + IV	21	23.81(5)	76.19(16)		

注: I + II a 与 II b + III + IV 两组之间比较, ^a $P < 0.05$



M: DNA标准分子量; 1~6: 食管鳞癌组织及癌旁组织编号; T: 食管鳞癌组织; N: 癌旁正常食管组; GAPDH: 内对照

图1 食管鳞癌组织中PTX3的表达



M: 甲基化引物扩增后产物(103 bp); U: 非甲基化引物扩增后产物(105 bp); m: DNA Marker(标准分子量); 1~8: 食管鳞癌组织及癌旁组织编号; T: 食管鳞癌组织; N: 癌旁正常食管组

图2 MSP检测食管鳞癌组织及癌旁正常组织中PTX3基因启动子甲基化状态

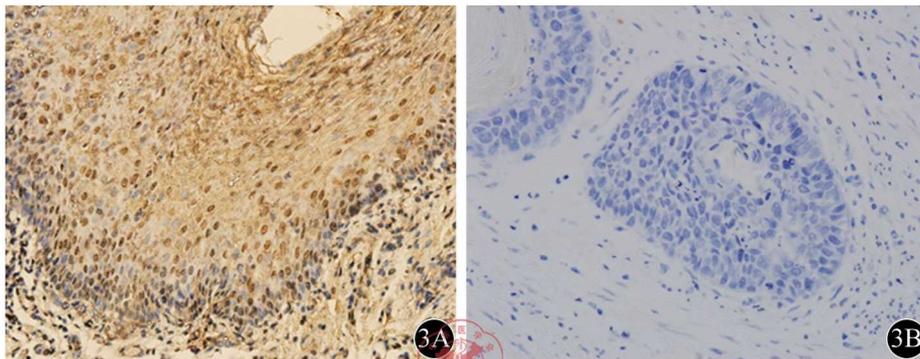


图3 食管鳞癌组织中PTX3蛋白的表达(SP ×40)。PTX3在癌旁食管黏膜的细胞质中呈高表达,弥散分布。3A:癌旁鳞状上皮;3B:食管癌癌巢

讨 论

PTX3是一种长五聚素分子,在机体炎症反应时含量升高,因而称为急性期反应蛋白^[5]。PTX3合成部位广泛,主要有颗粒性白细胞、脂肪细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞等。PTX3具有多种生物学效应,可结合多种可溶性受体配基参与免疫防御、女性生殖生育、细胞凋亡和血管再生的调节,同时也是急性冠状动脉综合征的早期生物学指标之一^[6-10]。

目前的研究证实多种肿瘤与PTX3相关,Willeke等^[1]报道在脂肪肉瘤 pentrax 相关基因即PTX3较正常组织表现出高表达。mRNA和蛋白质表达结果一致。然而并不是所有的病例PTX3的RNA和蛋白质表达水平都具有相关性。PTX3与脂肪细胞的分化有关,并且在人类的软组织肉瘤中其表达有显著增加。

Margheri等^[2]选取两株与正常乳腺上皮细胞比MMP12和PTX3表达非常低的乳腺癌细胞系,并稳定转染目的基因,发现PTX3高表达的克隆株显示了强大的抗成纤维细胞生长因子2(FGF2)毛细血管形成活性。把转染株和对照乳腺癌细胞注入裸鼠皮下,观察到转染株肿瘤生长减缓,肿瘤坏死的程度说明PTX3具有抗血管生成作用从而抑制肿瘤的进展。

半定量RT-PCR检测20例食管鳞癌组织、相应的癌旁正常组织中PTX3 mRNA的表达发现,RT-PCR结果显示PTX3 mRNA在20例食管癌旁正常组织中有18例表达,而20例食管鳞癌组织中有15例PTX3 mRNA表达缺失,缺失率达75%,提示PTX3 mRNA在食管癌与癌旁之间表达差异有统计学意义($\chi^2 = 17.289$, $P = 0.000$)。因此推测PTX3基因在食管鳞癌中是一个抑癌基因。

通过测定基因启动子CpG岛的甲基化状态来判断基因的表达情况,为研究基因表达提供了在DNA水平的重要途径。DNA甲基化与肿瘤发生和演变有密切关系,肿瘤的DNA异常甲基化成为近年来肿瘤研究的一个热点。MSP结果显示80%(16/20)食管癌组织和25%(5/20)正常食管黏膜组织存在PTX3基因CpG岛超甲基化,提示PTX3基因超甲基化与食管癌发生之间有关联($\chi^2 = 12.13$, $P = 0.000$)。PTX3 mRNA表达水平与基础PTX3基因甲基化程度呈负相关趋势,即较高的基因甲基化程度伴随较低的PTX3 mRNA表达水平。这强烈提示PTX3基因过甲基化可能是抑制基因转录表达的机制之一,表明PTX3基因启动子区高甲基化是食管鳞癌中常见的表观遗传事件,造成PTX3的表达缺失,而PTX3基因具有抗血管生成从而抑制肿瘤进展的作用。所以PTX3启动子区高甲基化参与了食管鳞癌的发生发展过程。

免疫组织化学法检测79例的食管鳞癌及癌旁食管黏膜PTX3蛋白的表达关系,并结合临床病理特征(患者性别、年龄、吸烟史、临床病理分期、浸润深度、淋巴结转移)判断PTX3蛋白表达与食管鳞癌临床病理特征的关系。随临床分期增加,PTX3蛋白阳性表达率逐渐降低($P = 0.012$)。另外,PTX3蛋白阳性表达与患者年龄、性别、是否吸烟、浸润深度、部位等无关($P > 0.05$)。因此提示PTX3在食管癌的发展过程中起重要作用,PTX3蛋白量低表达可能预示食管癌预后差。

通过本研究,我们认为食管鳞癌中PTX3的表达可能存在多重调控机制,PTX3基因启动子区域出现异常甲基化,可能是导致该基因失活的重要机制之一,这将有助于揭示食管癌的发生、发展机制,也为肿瘤的

防治提供了新的思路。另外对 PTX3 表达及其甲基化状态的检测也将有助于判断肿瘤的恶性程度和预后。

PTX3 基因启动子高甲基化是 PTX3 表达失活的主要原因,在食管鳞癌的发生发展中起重要作用,PTX3 基因启动子甲基化可作为食管鳞癌早期筛查及预后评估的肿瘤标志物。

参 考 文 献

- [1] Willeke F, Assad A, Findeisen P, et al. Overexpression of a member of the pentraxin family (PTX3) in human soft tissue liposarcoma. *Eur J Cancer*, 2006, 42:2639-2646.
- [2] Margheri F, Serrati S, Lapucci A, et al. Systemic sclerosis-endothelial cell antiangiogenic pentraxin 3 and matrix metalloproteinase 12 control human breast cancer tumor vascularization and development in mice. *Neoplasia*, 2009, 11:1106-1115.
- [3] Ehrlich M. DNA methylation in cancer; too much, but also too little. *Oncogene*, 2002, 21:5400-5413.
- [4] Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, et al. Immunohistochemical study of p53 in human lung carcinomas. *Am J Pathol*, 1993, 143:199-210.
- [5] Huttunen R, Hurme M, Aittoniemi J, et al. High plasma level of long pentraxin 3 (PTX3) is associated with fatal disease in bacteremic patients; a prospective cohort study. *PLoS One*, 2011, 6:e17653.
- [6] Okutani D. The role of long Pentraxin3, a new inflammatory mediator in inflammatory responses. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 2008, 29:107-113.
- [7] Soares AC, Souza DG, Pinho V, et al. Dual function of the long Pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. *Microbes Infect*, 2006, 8:1321-1329.
- [8] Muller B, Peri G, Doni A, et al. Circulating levels of the long Pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Crit Care Med*, 2001, 29:1404-1407.
- [9] Peri G, Inrona M, Corradi D, et al. PTX3, a prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation*, 2000, 102:636-641.
- [10] Kume N, Mitsuoka H, Hayashida K, et al. Pentraxin 3 as a biomarker for acute coronary syndrome; comparison with biomarkers for cardiac damage. *J Cardiol*, 2011. [Epub ahead of print].

(收稿日期:2011-04-22)

(本文编辑:戚红丹)

王俊雄,杨硕,贺远龙,等.五聚素3基因甲基化在食管鳞癌中的作用[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2011,5(16):4694-4698.