

· 专栏 · 临床研究 ·

MUC3A 基因在神经母细胞瘤中的甲基化状态及其与预后的关系

吴迪 张可仞

摘要 目的:探讨神经母细胞瘤中 MUC3A 基因甲基化状态与肿瘤预后的关系。方法:收集 2009 年 3 月至 2011 年 5 月中国医科大学附属盛京医院小儿外科收治神经母细胞瘤新鲜冰冻原发肿瘤组织 44 例,采用 RT-PCR 法检测 44 例肿瘤组织标本中 MYCN 基因扩增状态, MSP 检测肿瘤组织 MUC3A 甲基化状态。结果:NB 中 MUC3A 基因甲基化发生率达 79.55%(35/44),且与患儿年龄、肿瘤分期及病理分型密切相关($P < 0.05$),低危组甲基化发生率 38.46%明显低于中危组 100%及高危组 92.31%($P < 0.05$);MYCN 扩增的肿瘤患者 MUC3A 基因的甲基化发生率明显升高($RR = 1.46, P < 0.005$)。结论:预后不良的 NB 中 MUC3A 基因呈高甲基化,与 MYCN 基因扩增具有相关性,该基因的表达对 NB 的预后评估具有重要临床意义,是预后不良的主要因素之一。

关键词 神经母细胞瘤 MUC3A 甲基化

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.15.006

Status of MUC3A Methylation in NB and Its Relationship with Prognosis

Di WU, Keren ZHANG

Correspondence to: Keren ZHANG; E-mail: zkr425@yahoo.com

Department of Pediatric General Surgery, Shengjing Hospital Affiliated from China Medical University, Shenyang 110004, China

Abstract Objective: The present study explores MUC3A methylation and evaluates its effects on the prognosis of neuroblastoma (NB). **Methods:** Fresh frozen primary tumor tissue sections from 44 NB patients were collected consecutively from March 2009 to May 2011. We detected the status of N-MYC amplification and MUC3A methylation in the 44 NB patients by RT-PCR and MSP. **Results:** MUC3A is methylated by 79.55% (35/44), and the DNA methylation pattern is intimately correlated with age, INSS stage, and pathology type ($P < 0.05$) in NB. Methylation in the low-risk group (38.46%) was significantly less than that in the intermediate-risk group (100%) and high-risk group (92.31%). As expected, the risk of methylation was higher in the MYCN-amplified patients ($RR = 1.46, P < 0.005$). **Conclusion:** Methylation in the poor prognosis NB of MUC3A is high. Based on its correlation with MYCN gene amplification, methylation of MUC3A, as a factor of poor prognosis, has clinical significance in the prognostic evaluation of NB.

Keywords Neuroblastoma; MUC3A; Methylation

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是幼儿期常见的恶性实体肿瘤之一,占儿童恶性肿瘤的 8%~10%,年发病率为(0.3~5.5)/10 万,80%病例发生于 5 岁以下儿童。NB 起源于原始神经嵴细胞,具有原发部位隐匿、早期诊断困难、恶性程度高、发展迅速和早期转移等临床特点,临床上常出现两个极端的现象:预后良好型常自行消退或经治疗后预后较好,常见于年龄<1 岁或肿瘤分期为 I 期、II 期及 IVS 期的患者。而预后不良型无论采用何种治疗,死亡率仍然较高,多为诊断年龄>1 岁、肿瘤分期为 III 或 IV 期的患者。因此探索预后相关因素对于指导 NB 的治疗尤为重要。

实验证明有些肿瘤抑制基因 DNA 启动子区域的甲基化可以影响神经母细胞瘤的预后,如 CASP8、

RASSF1A 等。一些与肿瘤预后相关的基因改变,如 MYCN 基因的扩增,则提示患者有较高的肿瘤进展风险,需要进行积极治疗。但是,MYCN 基因扩增仅出现在 30%的肿瘤,这使得对风险估计偏低,因此,为了更好的治疗,其他肿瘤标记物的鉴定亦非常重要。

MUC3A(粘蛋白 3A)是位于染色体 7q22 上的粘蛋白簇,2010 年 Kitamoto 等^[1]研究首次证明 MUC3A 基因 DNA 甲基化与 MUC3A 在乳腺癌、肺癌、胰腺癌和结肠癌细胞株中的表达正相关。但其在神经母细胞瘤中基因启动子是否发生甲基化,以及基因甲基化与肿瘤预后的关系目前国际上尚未见报道。因此本研究选择 MUC3A 作为肿瘤抑制候选基因,检测在神经母细胞瘤中的甲基化状态,分析其与肿瘤预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

-80℃保存的冰冻肿瘤组织来自2009年3月至2011年5月中国医科大学附属盛京医院小儿外科收治神经母细胞瘤44例,肝母细胞瘤6例,肾母细胞瘤4例,其中44例NB根据病例临床特征分为三组:低危组为病理分化良好,INSS分期为I期、II期、IVS期的患者共13例(29.55%);中危组为病理分化差的III期患者共18例(40.91%);高危组为病理未分化的III期及IV期患者共13例(29.55%)。

RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 试剂盒及 ExTaq PCR 试剂盒均为 TaKaRa 产品, EZ DNA Methylation-Direct™ Kit 为 ZYMO RESEARCH 产品, MSP 试剂盒为 GENMED 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 检测肿瘤样本 MYCN 采用 Trizol RNA 提取试剂盒提取肿瘤组织总 RNA, 逆转录成 cDNA (RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 试剂盒, TaKaRa 大连)。MYCN 及内参基因 β -actin 引物序列见表1, 使用 ExTaq PCR 试剂盒 (TaKaRa 产品, 大连) 进行 RT-PCR。反应程序如下: 95℃ 10 min 后, 94℃ 1 min, 58~60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环, 72℃ 延长 10 min。将扩增产物进行 1.5% 琼脂凝胶电泳, 电压 5.0 V/cm。电泳结束后, 取出凝胶用紫外成像仪进行凝胶成像分析。

表1 RT-PCR的引物及其参数

Table 1 RT-PCR primers and parameters

目的基因	引物序列	退火(℃)	产物(bp)
MYCN	5'GTGAATCAGGTTGAGTTCATTG3'	58	178
	3'GGTACTATTCGTCCTCCATTGGCA5'		
β -actin	5'GGGAAATCGTGCGTGAC3'	62	139
	3'GTCCAGTACTGTAACCGTT5'		

1.2.2 甲基化特异性 PCR (MSP) 检测肿瘤样本 MUC3A 采用 EZ DNA Methylation-Direct™ Kit (ZYMO RESEARCH) 一步抽提纯化肿瘤组织 DNA, 根据日本鹿儿岛大学 Kitamoto 等^[1] 的系列研究合成 MUC3A 的甲基化及非甲基化特异性引物, 引物序列见表2, 每个正向引物标记10个碱基的序列(5'-AGG AAGAGAG-3')以平衡 PCR。每个反向引物标记一个 T7 启动子(5'-CAGTAATACGACTCACTATAGGGAG AAGGCT-3')进行体外转录。甲基化特异性 PCR 应用 GMS20024.2 试剂盒 (GENMED)。反应程序如下: 95℃ 10 min 后, 96℃ 5 s, 59℃ 5 s, 68℃ 5 s, 40 个循环, 72℃ 延长 10 min。扩增产物进行 1.5% 琼脂凝胶

电泳, 电压 5.0 V/cm。电泳结束后, 取出凝胶用紫外成像仪进行凝胶成像分析。

表2 MUC3A 基因的引物序列

Table 2 MUC3A gene primers (U: non-methylated, M: methylation, L: forward primer, R: reverse primer)

基因	引物序列(5'-3')	位置
MUC3A UL	GTTAAGGGTATTTTTTATGGGTGTT	-362 ~ -338
	CAAAAACATAACCCTAAAACATACACA	-81 ~ -55
ML	GTTAAGGGTATTTTTTACGGGTGTC	-362 ~ -338
	AAACGTAACCCTAAAACGTACACG	-81 ~ -58

注: U 非甲基化, M 甲基化, L 正向引物, R 反向引物

1.3 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件, 对所得数据进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 MYCN 基因在预后不良的 NB 中表达情况

应用 RT-PCR 检测 44 例 NB 中 MYCN 基因的表达状态, 出现 MYCN 扩增的病例共 21 例, 扩增率 47.73%, 与低危组 (0/13) 相比, 中危组扩增率为 44.44% (8/18), 高危组扩增率为 100% (13/13, 图1、2)。

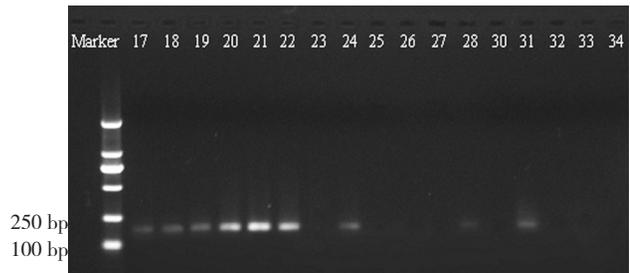


图1 部分 NB 肿瘤组织 MYCN 扩增检测结果

Figure 1 MYCN amplification test results

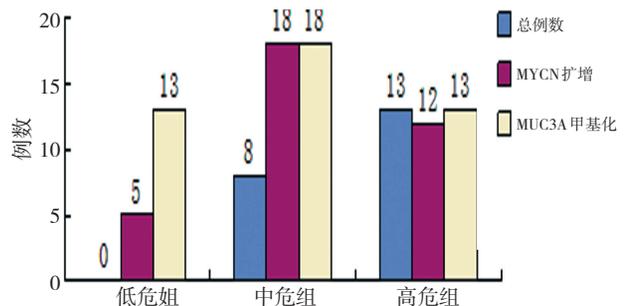


图2 各组 MYCN 扩增情况及 MUC3A 甲基化情况

Figure 2 Status of MYCN amplification and MUC3A methylation for each group

2.2 MUC3A 基因在 NB 中甲基化检测

应用甲基化特异性 PCR (MSP) 扩增 54 例肿瘤样

本,44例NB中出现MUC3A甲基化(包括甲基化和半甲基化)的病例共35例(图3),甲基化发生率为79.55%,其中低危组甲基化发生率38.46%(5/13),中危组甲基化发生率100%(18/18),高危组甲基化发生率92.31%(12/13,图2)。综合肿瘤临床特征(诊断年龄,性别,病理类型,肿瘤分期,MYCN扩增状态),MUC3A基因MSP扩增结果(图4,表3)。

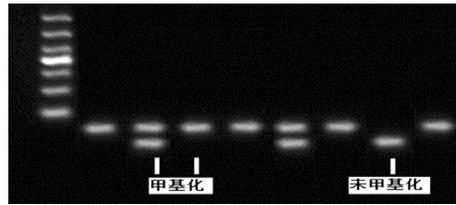
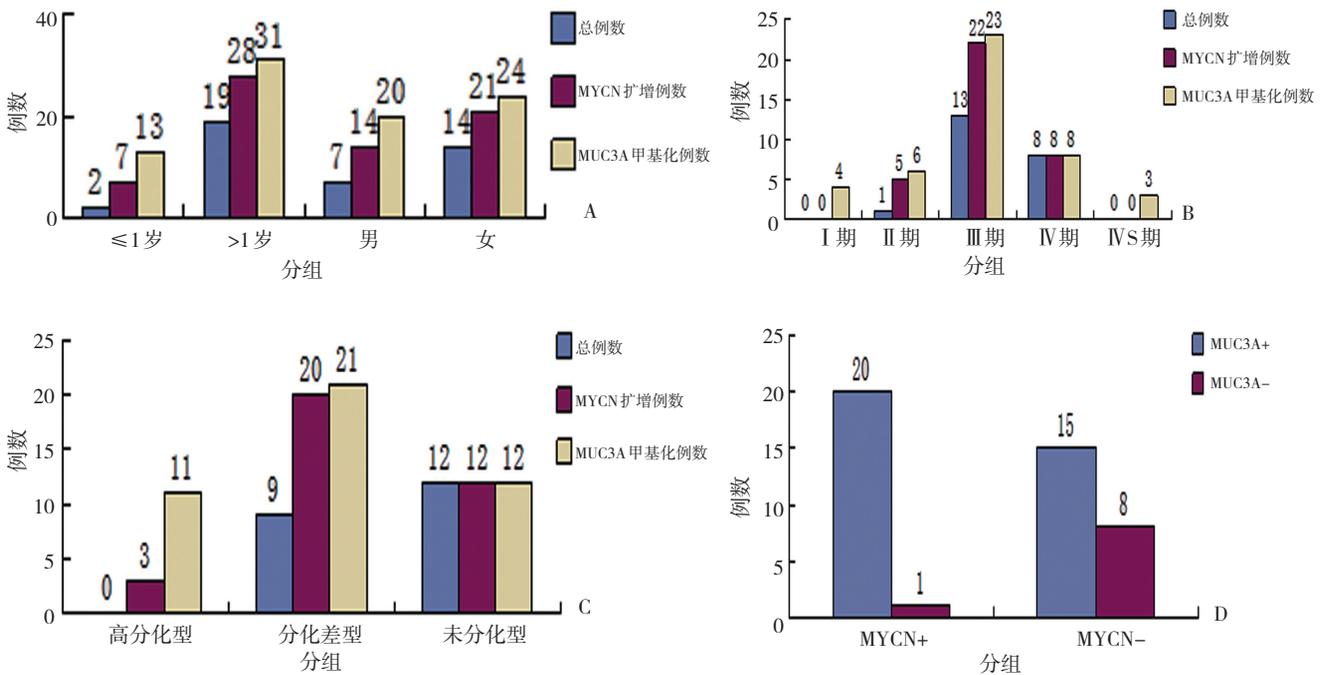


图3 肿瘤样本MUC3A基因MSP扩增结果判定
Figure 3 MSP amplification results of the MUC3A gene



A: 年龄性别与MUC3A甲基化关系; B: 肿瘤分期与MUC3A甲基化关系; C: 病理类型与MUC3A甲基化关系; D: MYCN扩增情况与MUC3A甲基化关系

图4 各临床特征NB肿瘤MUC3A基因甲基化检测结果

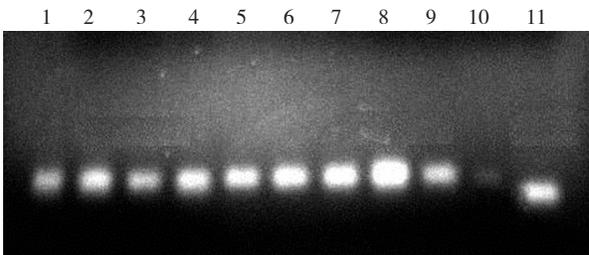
Figure 4 MUC3A gene methylation results for each clinical feature

表3 各临床特征与神经母细胞瘤甲基化状态的关系

Table 3 Status of MUC3A methylation and its relationship with clinical characteristics

临床特征	MUC3A甲基化阳性	MUC3A甲基化阴性	合计	甲基化率%	RR	χ^2	P
年龄/岁							
≤1	7	6	13	53.85			
>1	28	3	31	90.32	0.6	5.416	<0.025
性别							
男	14	6	20	70.00			
女	21	3	24	87.50	0.8	1.119	>0.05
临床分期							
I、II、IVS期	5	8	13	38.46			
III、IV期	30	1	31	96.77	2.5	15.73	<0.005
病理类型							
分化良好型	3	8	11	27.27			
分化差及未分化型	32	1	33	96.97	3.57	20.53	<0.005
MYCN							
扩增	20	1	21	95.23			
未扩增	15	8	23	65.22	1.46	33.54	<0.005
合计	35	9	44	79.55	—	—	—

2.3 MUC3A 基因在其他胚胎性肿瘤中的甲基检测
在6例肝母细胞瘤及4例肾母细胞瘤中,均检测到MUC3A基因发生甲基化(图5)。



1~6:肝母细胞瘤,7~10:肾母细胞瘤,11:阴性对照

图5 胚胎性肿瘤中MUC3A基因MSP扩增结果

Figure 5 MUC3A gene MSP amplification results of embryonal tumors

3 讨论

表观遗传学修饰,特别是在基因启动子区胞嘧啶、鸟嘌呤残基的5'端(CpGs)的甲基化是细胞的发育必不可少的调控机制,其不改变DNA的一级结构,在细胞正常发育及基因表达模式一级基因组稳定性中起着至关重要的作用,对基因的转录活性调控、染色质构型修饰、X染色体的失活等都有较大影响。癌基因低甲基化、抑癌基因高甲基化、错配修复基因高甲基化、基因启动子DNA甲基化等都与肿瘤的发生密切相关。研究表明,基因启动子富含CpG-(CpG岛,CGI的基因)的区域的异常甲基化,协同组蛋白乙酰化和脱乙酰,可以改变核染色质构象,干扰基因的转录和表达。虽然甲基化的直接影响较有限,涉及到不同生物学途径的多个参与基因,但只要甲基化达到某一水平或与其他因素共同作用,如细胞累积几个关键的基因突变,加上非基因层次的改变如DNA甲基化的现象,就可导致基因的部分或全部转录沉默,促进癌细胞的快速生长。因此,DNA甲基化特别是某些肿瘤关键基因甲基化程度的改变可能在肿瘤发生的早期起重要调控作用。

粘蛋白(mucin)是大量O型糖化蛋白质,存在于上皮的黏液层并在许多上皮细胞表面差异表达,能够维持黏液凝胶的物理性质,保护上皮细胞,维持局部分子微环境。证据表明,粘蛋白的异常表达促使癌症的发生^[2-3]。多个研究显示粘蛋白是许多恶性肿瘤的有效预后指标,如MUC1与MUC4的高表达是肿瘤预后不良的标志^[4-5],而MUC2的表达在胰腺导管腺癌等多种人类肿瘤中提示预后良好,MUC5AC的表达可以作为胰腺肿瘤有效的早期检测手段^[6-8]。

MUC3A(粘蛋白3A)是位于染色体7q22上的粘蛋白簇,归类为膜相关粘蛋白^[9-11],其在乳腺癌、肺癌、胰腺癌和结肠癌中表达与预后具有相关性^[12-14]。

Kitamoto等^[1]研究首次提供证据证明MUC3A基因启动子的甲基化导致基因的失活,影响肿瘤预后。然而,MUC3A在神经母细胞瘤中基因启动子是否发生甲基化,以及基因甲基化与肿瘤预后的关系目前国际上尚未见报道。

本实验应用MSP技术检测了44例NB的MUC3A基因的甲基化状态,结合其临床特征,我们得出结论:MUC3A基因甲基化的发生与年龄,肿瘤分期及病理类型密切相关,MUC3A基因的甲基化影响肿瘤的预后,是预后不良的因素之一。

神经母细胞瘤具有自然消退的特点,常发生在新生儿及婴幼儿,因此,发病及诊断年龄 ≤ 1 岁被认为是预后良好的重要指标。本实验中MUC3A基因的甲基化与患儿发病诊断年龄密切相关($P < 0.025$, $RR = 0.60$),诊断年龄越小,MUC3A基因的甲基化发生可能性越低,预后越好。在性别差异方面,本研究未见该基因甲基化与性别有统计学相关性。

国际分期(INSS)已被广泛应用,I期病例单纯手术切除,不用化疗和放疗,生存率可达90%,IIa、IIb、III期低危病例,采用手术辅以术后化疗,生存率可达85%以上。儿童IIb、III期和IV期中危组病例,手术加化疗和放疗,生存率也可达60%~75%,而年龄大于2岁的高危病例,各种综合治疗的预后均不理想,生存率仅15%左右。因此,INSS分期对于神经母细胞瘤具有重要的指导意义。本研究中将I、II、IVS期合并为预后良好组,III期及IV期患儿为预后不良组,两组病例甲基化发生率具有显著差异($P < 0.005$, $RR = 2.5$),MUC3A基因的甲基化与患儿疾病分期密切相关,并且疾病分期越早,MUC3A基因的甲基化率越低,预后越好。

根据瘤细胞的分化程度、瘤细胞浆内颗粒的多少及神经纤维丝的有无等,可以将瘤细胞分为4个阶段:原始未分化神经瘤细胞、低分化神经母细胞、中分化神经母细胞、高分化神经母细胞。据此,将神经母细胞划分为三个病理类型:高分化型,分化差型(包括低分化及中分化),未分化型,根据病理与预后的关系,将分化差型及未分化型合并为预后不良组,高分化型为预后良好组,两组病例具有显著性差异($P < 0.005$, $RR = 3.57$),MUC3A基因的甲基化与患儿肿瘤细胞分化程度密切相关,肿瘤细胞分化程度越高,MUC3A基因的甲基化率越低,预后越好。

MYCN基因是Kohl首先从NB的细胞中分离出神经外胚层专一的原癌基因,通常表现为单拷贝,并定位于人类第2对染色体短臂远端(2p23~2p25)。近年来应用分子杂交技术对NB细胞系及瘤组织

MYCN 基因进行检测,结果显示 MYCN 基因扩增是 NB 迅速发展和预后不良的指标。本实验根据 RT-PCR 的检测结果显示将 44 例 NB 患者分为两组, MYCN+ (扩增组) 及 MYCN- (未扩增组), 两组病例甲基化发生率具有显著差异 ($P < 0.005$, $RR = 1.46$), 表明 MUC3A 基因的甲基化与患儿 MYCN 基因扩增密切相关, 并且 MYCN 扩增的患儿 MUC3A 基因的甲基化可能性越高, 预后越差。并且相对于 MYCN 基因扩增的整体检出率较低而言, MUC3A 基因的甲基化检出率较高, 灵敏度更高, 可能成为更好的预后指标。

在 6 例肝母细胞瘤及 4 例肾母细胞瘤中, MUC3A 基因全部发生了甲基化, 但因样本量不足, 无法得出确切结论, 可能预示 MUC3A 基因甲基化在胚胎性恶性肿瘤的发生发展过程中具有重要意义, 有待于进一步研究证实。

综上所述, MUC3A 基因启动子在神经母细胞瘤中发生了甲基化, 并且该基因的甲基化状态与诊断年龄、肿瘤分期、病理类型具有密切相关性, 与 MYCN 基因扩增一样, MUC3A 基因甲基化预示着肿瘤不良预后, 并且, 其检出率高于 MYCN 扩增的检出率, 可能成为更有效的神经母细胞瘤预后标志。

参考文献

- 1 Kitamoto S, Yamada N, Yokoyama S, et al. Promoter hypomethylation contributes to the expression of MUC3A in cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 397(2): 333-339.
- 2 Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(12): 874-885.
- 3 Yonezawa S, Goto M, Yamada N, et al. Expression profiles of MUC1, MUC2, and MUC4 mucins in human neoplasms and their relationship with biological behavior[J]. *Proteomics*, 2008, 8(16): 3329-3341.
- 4 Khodarev N, Ahmad R, Rajabi H, et al. Cooperativity of the MUC1 oncoprotein and STAT1 pathway in poor prognosis human breast cancer[J]. *Oncogene*, 2010, 29(6): 920-929.
- 5 Aloysius MM, Zaitoun AM, Awad S, et al. Mucins and CD56 as markers of tumour invasion and prognosis in periampullary cancer[J]. *Br J Surg*, 2010, 97(8): 1269-1278.
- 6 Kang H, Min BS, Lee KY, et al. Loss of E-cadherin and MUC2 expressions correlated with poor survival in patients with stages II and III colorectal carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18(3): 711-719.
- 7 Park SY, Roh SJ, Kim YN, et al. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 in cholangiocarcinoma: prognostic impact[J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(3): 649-657.
- 8 Yonezawa S, Higashi M, Yamada N, et al. Significance of mucin expression in pancreaticobiliary neoplasms[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2010, 17(2): 108-124.
- 9 Mall AS, Tyler MG, Ho SB, et al. The expression of MUC mucin in cholangiocarcinoma[J]. *Pathol Res Pract*, 2010, 206(12): 805-809.
- 10 Pelaseyed T, Hansson GC. CFTR anion channel modulates expression of human transmembrane mucin MUC3 through the PDZ protein GOPC[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 18): 3074-3083.
- 11 Hoorens PR, Rinaldi M, Li RW, et al. Genome wide analysis of the bovine mucin genes and their gastrointestinal transcription profile[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 140.
- 12 Zimmer KP, Heine M, Weissen-Plenz G, et al. TGF α -associated MUC2 and MUC3 expression of the gastric epithelium in Menetrier's disease during remission of ulcerative colitis[J]. *Gut*, 2011, 60(11): 1607-1608.
- 13 Rakha EA, Boyce RW, Abd El-Rehim D, et al. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer[J]. *Mod Pathol*, 2005, 18(10): 1295-1304.
- 14 Wang RQ, Fang DC. Alterations of MUC1 and MUC3 expression in gastric carcinoma: relevance to patient clinicopathological features[J]. *J Clin Pathol*, 2003, 56(5): 378-384.

(2012-03-09 收稿)

(2012-07-05 修回)

(本文编辑: 郑莉)