文章编号:1000-5404(2010)01-0013-03

论著

食管鳞状细胞癌 survivin 表达与其 CpG 岛甲基化的研究

胡华梅[1],杨晓亚[1],熊 刚[2],王 凯[1],陈雪丹[1],白 云[1] (400038 重庆,第三军医大学:基础医学部医学遗传学教研室[1],西南医院胸心外科[2])

[摘要] **目的** 探讨食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma,ESCC)肿瘤组织 survivin 基因的表达与其 CpG 岛甲基化状态的关系。**方法** 采用 RT-PCR 的方法检测 ESCC 细胞株、ESCC 肿瘤组织及对应的远癌组织中的 survivin 基因 mRNA 的表达;采用亚硫酸氢钠修饰后测序法(BSP)检测 survivin 基因 CpG 岛甲基化状态。**结果** ESCC 肿瘤组织 survivin mRNA 表达阳性率为 65.5 %,而绝大部分远癌组织表达阴性;20 例 survivin 表达阳性的肿瘤组织、survivin 表达阴性的远癌组织及 5 株 ESCC 细胞所扩增片段中的 CpG 位点均呈非甲基化状态。**结论** ESCC 组织中 survivin 的表达与否与其 CpG 岛的甲基化状态无关,提示该区域的甲基化修饰未参与调控 survivin 基因的转录。

[关键词] survivin 基因;食管鳞状细胞癌;甲基化;亚硫酸氢钠修饰后测序法(BSP)
[中图法分类号] R735.1; R730.23; R394.3 **[文献标志码]** A

Methylation of survivin and its expression in human esophageal squamous cell carcinoma

Hu Huamei[1], Yang Xiaoya[1], Xiong Gang[2], Wang Kai[1], Chen Xuedan[1], Bai Yun[1] ([1]Department of Medical Genetics, College Basic Medical Sciences, [2]Department of Thoracic and Cardiac Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression of survivin in the tissues of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and analyze the methylation status of CpG island in the promoter of survivin. **Methods** RT-PCR was used to detect the expression of survivin in 5 ESCC cell lines (EC9706, KYSE150, KYSE450, EC109 and TE-1), and 84 samples of paired carcinoma tissues and para-carcinoma tissues. The methylation status of survivin was detected by using bisulfite sequencing PCR (BSP). **Results** The results of RT-PCR showed that survivin was expressed in all the 5 ESCC cell lines and 65.5% carcinoma tissues but not in para-carcinoma tissues. However, CpG methylation of the survivin promoter was not detected in all the cell lines, and 20 pairs of carcinoma and para-carcinoma tissues. **Conclusion** Survivin is overexpressed in ESCC, however this abnormality is not regulated by its promoter methylation.

[Key words] survivin; esophageal carcinoma; bisulfite sequencing PCR

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872549) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BA5013). Corresponding author: Bai Yun, Tel: 86-23-68752258, E-mail:baiyungene@gmail.com

survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein,IAP)[1,2]家族的成员之一,在肿瘤发生、发展过程中起着重要的作用。survivin 表达水平、食管癌的恶性程度对放、化疗的抵抗性,以及肿瘤的不良预后相关。因此,探讨 survivin 表达调控机制就成为人们关注的一个重要问题。

DNA 甲基化修饰是表观遗传修饰的主要方式之一,主要发生于基因启动子附近的 CpG 岛。survivin 基因含有一个大的 CpG 岛,从启动子区一直延伸到第一外显子区域,提示其甲基化修饰可能参与 survivin 基因的转录调控。本研究在检测食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma,ESCC)细胞株、ESCC 肿瘤组织及相应的远癌组织中 survivin 基因 mRNA 表达的基础上,选择 survivin mRNA 表达状态有差异的肿瘤和远癌组织标本和细胞株,检测 survivin 基因 CpG 岛的甲基化状态,以探讨 ESCC 肿瘤组织 survivin 的表达是否受甲基化修饰的调控。

1 材料与方法

1.1 材料

临床标本来源:肿瘤及远癌组织取自 84 例 ESCC 患者(均系第三军医大学西南医院胸心外科 ESCC 收治患者)。纳入研究的患者均有明确的 ESCC 病理学诊断依据。取材于远离肿瘤

[基金项目] 国家自然科学基金(30872549);重庆市自然科学基金(CSTC2009BA5013)
[通信作者] 白 云,电话:(023)68752258,E-mail:baiyungene@gmail.com

边界5 cm以外,没有转移的组织定义为远癌组织。本研究完全按照中国医学伦理会要求,征得所有研究对象知情同意。ESCC细胞株EC9706、KYSE150、KYSE450、EC109、TE-1来源于北京中国医学科学院肿瘤研究所和中科院上海细胞研究所。

1.2 主要试剂

2×GC buffer Ⅰ(宝生物公司),*rTaq* DNA聚合酶(宝生物公司),Tripure试剂(Invitrogen公司),DNA提取试剂盒(Promega公司),DNA甲基化试剂盒(北京天漠公司),琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(天根生物公司),DNA纯化试剂盒(天根生物公司)。

1.3 survivin mRNA表达检测

1.3.1 提取组织总RNA 取出ESCC肿瘤组织与远癌组织标本(每块50~500 mg),放入加有1 ml Tripure试剂的玻璃匀浆器,研磨组织,再按照具体的操作步骤提取总RNA。

1.3.2 RT-PCR检测 将RNA逆转成cDNA。以肿瘤组织及远癌组织和细胞株分别作为模板进行PCR反应,引物序列上游5′-CAGCCCTTTCTCAAGGACCAC-3′和下游5′-TTTCTCCGCAGTTTCCTCAAA-3′。以β-actin作为内参照,引物序列为上游5′-GTTGCGTTACACCCTTTCTTGACA-3′和下游5′-GCACGAAGGCTCATCATTCAAAA-3′,扩增片段长度分别为360 bp和446 bp。PCR反应条件为94 ℃ 5 min→94 ℃ 40 s→56 ℃ 30 s→72 ℃ 1 min,35个循环→72 ℃ 10 min。

1.4 甲基化检测

1.4.1 组织DNA和细胞株DNA的提取 根据RT-PCR实验结果,选取20例survivin阳性ESCC肿瘤组织,与其相对应的同一患者的survivin阴性远癌组织标本和5株survivin阳性的ESCC细胞株,用Promega的DNA提取试剂盒,按说明书上具体的操作步骤抽提基因组DNA。紫外分光光度仪和琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA浓度和有无断裂。

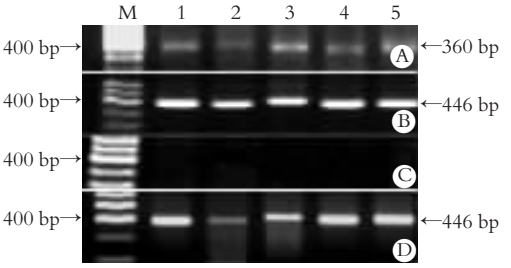
1.4.2 亚硫酸氢钠修饰DNA 取500 ng基因组DNA,用亚硫酸氢钠试剂盒EZ DNA Methylation-Gold kit,按照操作手册进行亚硫酸氢钠的转化。取500 ng基因组DNA,用灭菌双蒸水补足至20 μl,加入130 μl转换试剂,把样品放到PCR仪上进行以下步骤:98 ℃放置10 min,64 ℃放置2.5 h,接下来通过柱层析完成DNA的纯化和脱硫。

1.4.3 修饰后DNA进行PCR反应 用Methyl primer express software 1.0软件设计2对引物。引物1扩增第111~149碱基(相对于survivin基因的转录起始位点),引物序列为:上游5′-GYGGGAGGATTATAATTTT-3′,下游5′-ACCCTCCAAAAAAAAC-CA-3′,扩增片段长度为260 bp。引物2扩增第128~426碱基,上游5′-AATTGGTTTTTTTTGGAGG-3′,下游5′-CCATCTACAAA-AAACAACACA-3′,扩增片段长度为298 bp。PCR反应采用touch down的方法。PCR反应结束后扩增产物用2%的琼脂糖凝胶电泳鉴定,条带比较单一的用DNA纯化试剂盒(天根生物)对其进行浓缩、纯化;条带不单一(有很弱的杂带或是引物二聚体)的PCR产物,将含目的条带的凝胶切下,用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(天根生物)进行PCR产物回收,将回收后的产物进行测序。

2 结果

2.1 食管鳞状细胞癌survivin mRNA的表达

RT-PCR检测了84例ESCC组织标本及相应的远癌组织标本,结果显示,84例肿瘤组织中有55例表达阳性,表达率为65.5%,而相应远癌组织标本仅有2例弱阳性。如图1所示,显示了来自5个ESCC患者的肿瘤组织及相应的远癌组织的RT-PCR结果。

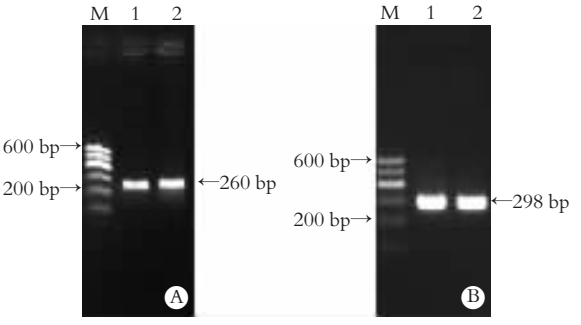


M:DNA标准;1-5:分别为5例ESCC患者癌组织
A:癌组织;B:癌组织内参;C:远癌组织;D:远癌组织内参

图1 5例ESCC患者肿瘤组织、远癌组织中survivin的表达

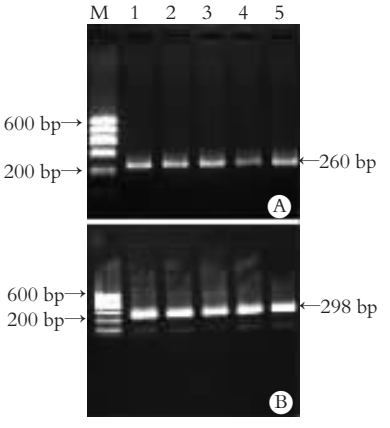
2.2 亚硫酸盐修饰后PCR扩增产物的检测

根据2.1的实验结果,选取肿瘤组织survivin mRNA表达阳性,而相应远癌组织表达阴性的20例ESCC病例,以及5株ESCC细胞株作为本部分实验对象,其基因组DNA经亚硫酸盐修饰后进行PCR反应。PCR产物目的条带锐利、明亮、质量高,可以用于进行直接测序反应(图2、3)。



M:DNA标准;1:肿瘤组织;2:远癌组织
A:用引物1扩增;B:用引物2扩增

图2 患者食管癌组织survivin DNA经亚硫酸盐修饰后PCR电泳结果



M:DNA标准;1:EC9706;2:KYSE150;3:KYSE450;4:EC109;5:TE-1
A:用引物1扩增;B:用引物2扩增

图3 ESCC细胞株DNA经亚硫酸盐修饰后PCR电泳结果

2.3 测序结果

本实验共检测了20例癌组织和相应的远癌组织,5株ESCC细胞株。测序结果经过比对显示,与亚硫酸酸氢钠转换前源序列对应良好,无论survivin mRNA表达与否,所有检测样本扩增序列中的CpG位点都是非甲基化的。

3 讨论

食管癌是我国常见的恶性肿瘤,其发生和发展与细胞周期紊乱和凋亡受阻密切相关。survivin是凋亡抑制蛋白(IAP)家族的成员,不仅抑制凋亡,也参与细胞有丝分裂,在细胞凋亡和细胞周期的基因调控中发挥重要作用。正常情况下,survivin表达于胚胎和发育的胎儿组织细胞,不表达于终末分化的组织细胞。而在大多数人类肿瘤,如肺癌[3]、结肠癌[4]、胰腺癌[5]、前列腺癌[6]、乳腺癌[7]、膀胱癌[8]、神经细胞瘤[9]、胃癌[10]和食管癌[11]等,survivin在肿瘤细胞重新获得高表达。survivin在食管癌发生、发展过程中起着重要的作用,其表达水平同肿瘤的恶性程度以及肿瘤的不良预相关,因此,survivin已被用作新的肿瘤标志物,成为肿瘤诊断和治疗的研究热点。

肿瘤的产生不仅是基因本身突变,还由于不改变基因序列的表观遗传调控的异常。DNA甲基化修饰是表观遗传修饰的主要方式,甲基化主要发生于基因启动子附近的CpG富集区域(又称CpG岛)。迄今为止,关于肿瘤癌基因异常激活和抑癌基因失活与该基因的启动子区域CpG岛甲基化的直接关系已经有大量的报道。分析survivin基因结构发现,survivin基因结构中含有一个从启动子区一直延伸到第一外显子区域的CpG岛,在卵巢细胞[12]及口腔上皮细胞[13]中,肿瘤组织中survivin第一外显子区的CpG呈非甲基化状态,而癌旁正常组织该区域被甲基化。但在对黑色素瘤、星形细胞瘤、肝细胞癌等的研究中,肿瘤组织及远癌组织的survivin启动子都呈非甲基化状态。上述研究结果提示,甲基化修饰可参与survivin基因的转录调控,但其甲基化状态也存在组织细胞差异。

本研究检测了ESCC survivin mRNA的表达情况,结果与以往的研究报道[11]一致。为了进一步探讨ESCC肿瘤组织survivin的异常表达是否与其基因的甲基化状态有关,采用重亚硫酸盐修饰后测序(bisulfite sequencing PCR, BSP)法[14]对甲基化状态进行分析。有关甲基化BSP检测目的区域的选择,为了使实验更有针对性,我们在分析以往有关survivin基因甲基化状态研究的文献的基础上,选择检测其CpG岛的部分启动子和第一外显子区域的甲基化状态。同时,比对测序结果发现,survivin表达阳性的肿瘤组织、ESCC细胞株和survivin阴性的远癌组织都呈非甲基化状态,表明survivin基因CpG岛甲基化状态与其在ESCC肿瘤中的异常表达无直接关系,提示该区域的甲基化修饰不参与调控survivin基因的转录,可能还存在其他的调控机制,有待进一步研究。除了DNA甲基化外,组蛋白修饰、染色质重塑以及非编码RNA等调控方式都可能调控基因表达。肿瘤表观遗传学机制贯穿肿瘤发生、发展的整个过程,其调控的分子机制已经作为肿瘤治疗的新靶点。对肿瘤的表观遗传学进行深入的研究,对肿瘤的临床诊断、治疗和预防都具有重要的指导意义。

参考文献:

[1] Li F, Ambrosini G, Chu E Y, *et al*. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin[J]. Nature, 1998, 396(6711): 580-584.
[2] Deveraux Q L, Reed J C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis [J]. Genes Dev, 1999, 13(3): 239-252.
[3] Warnecke-Eberz U, Baldus S E, Bollschweiler E, *et al*. Up-regulation of survivin mRNA might be a marker for non-invasive detection of non-small cell lung cancer rather than for prognosis[J]. Anticancer Res, 2008, 28(3A): 1525-1529.
[4] Ponnelle T, Chapusot C, Martin L, *et al*. Cellular localisation of survivin: impact on the prognosis in colorectal cancer[J]. Cancer-Res, 2005, 131(8): 504-510.
[5] Kami K, Doi R, Koizumi M. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients[J]. Surgery, 2004, 136: 443-448.
[6] Koike H, Sekine Y, Kamiya M, *et al*. Gene expression of survivin and its spliced isoforms associated with proliferation and aggressive phenotypes of prostate cancer[J]. Urology, 2008, 72(6): 1229-1233.
[7] Nassar A, Lawson D, Cotsonis G, *et al*. Survivin and caspase-3 expression in breast cancer: correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis, and outcome[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2008, 16(2): 113-120.
[8] 杨华安,苟欣,郑传东,等. RNAi沉默Survivin基因表达对膀胱癌EJ细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(13): 1260-1263.
[9] Azuhata T, Scott D, Takamizawa S, *et al*. The inhibitor of apoptosis protein survivin is associated with high-risk behavior of neuroblastoma [J]. J Pediatr Surg, 2001, 36(12): 1785-1791.
[10] Okada E, Murai Y, Matsui K, *et al*. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients[J]. Cancer Lett, 2001, 163(1): 109-116.
[11] Mega S, Miyamoto M, Li L, *et al*. Immunohistochemical analysis of nuclear survivin expression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Dis Esophagus, 2006, 19(5): 355-359.
[12] Hattori M, Sakamoto H, Satoh K, *et al*. DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes[J]. Cancer Lett, 2001, 169(2): 155-164.
[13] Tanaka C, Uzawa K, Shibahara T, *et al*. Expression of an inhibitor of apoptosis, survivin, in oral carcinogenesis[J]. J Dent Res, 2003, 82 (8): 607-611.
[14] Frommer M, McDonald L E, Millar D S, *et al*. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89 (5): 1827-1831.

(**收稿**:2009-05-14;**修回**:2009-07-17)
(编辑 吴培红)