论著

文章编号:1000-5404(2009)21-2094-04

贲门腺癌 Wif-1 基因启动子区甲基化状态的检测及临床意义

郭艳丽[1],郭 炜[1],靳国梁[2],杨植彬[1],邝 钢[1],孙萍萍[3],董稚明[1] ([1]河北医科大学第四医院肿瘤研究所病理室,石家庄 050011;[2]河北省磁县肿瘤医院病理室,河北 邯郸 056000;[3]北京市怀柔区第一医院病理科,北京 101400)

摘 要:目的 研究贲门腺癌(gastric cardiac adenocarcinoma,GCA)中 Wnt 抑制因子-1(Wnt inhibitory factor-1,Wif-1)基因启动子区甲基化状态及表达情况,探讨其与贲门癌发生的关系及可能机制。**方法** 分别用巢式甲基化特异性 PCR(MSP)和 RT-PCR 方法检测贲门腺癌及相应正常黏膜组织中 Wif-1 基因的甲基化状态和 mRNA 表达水平;应用免疫组化 S-P 法检测 β-catenin 蛋白的表达情况。**结果** Wif-1 基因在贲门腺癌及正常黏膜组织中的甲基化率分别 61.7%(58/94)和 34.0%(32/94),癌组织中 Wif-1 基因的甲基化率明显高于正常黏膜组织($\chi^2=14.409$,$P=0.000$);癌及正常黏膜组织中 Wif-1 基因 mRNA 的阳性表达率分别为 10.6%(10/94)和 86.2%(81/94),β-catenin 蛋白的异质表达率分别为 90.4%(85/94)和 38.3%(36/94),癌组织中 Wif-1 mRNA 表达及 β-catenin 蛋白的表达均与 Wif-1 基因的甲基化明显相关($P<0.01$);Wif-1 基因的甲基化与肿瘤的浸润深度及淋巴结转移相关($P<0.05$),而与肿瘤的病理分级及临床分期无关。**结论** Wif-1 基因启动子区甲基化在贲门腺癌中频繁发生,可能通过引起经典 Wnt/β-catenin 通路的异常激活与贲门腺癌的发生密切相关。

关键词:贲门腺癌;甲基化;Wif-1 基因;β-catenin

中图法分类号:R394.3;R730.23;R735.2 **文献标识码**:A

Detection and clinical significance of Wif-1 promoter methylation in gastric cardiac adenocarcinoma: report of 94 cases

GUO Yan-li[1], GUO Wei[1], JIN Guo-liang[2], YANG Zhi-bin[1], KUANG Gang[1], SUN Ping-ping[3], DONG Zhi-ming[1] ([1]Department of Pathology, Hebei Cancer Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011; [2]Department of Pathology, Tumor Hospital of Cixian County, Handan 056000, Hebei Province; [3]Department of Pathology, First Hospital of Beijing Huairou District, Beijing 101400, China)

Abstract: Objective To investigate the promoter methylation of Wif-1 in gastric cardiac adenocarcinoma (GCA). **Methods** Tumor samples of 94 cases of GCA before chemotherapy and radiotherapy admitted in our hospital from January 2004 to December 2006 were collected, and their normal mucosal tissues served as normal control. Nested methylation-specific PCR (MSP) and RT-PCR were applied respectively to examine the Wif-1 promoter methylation and its mRNA expression in tumors and corresponding normal mucosal tissues. Immunohistochemical staining was used to determine the protein expression of β-catenin. The correlation of the Wif-1 methylation and clinical data was analyzed. **Results** The frequency of Wif-1 promoter methylation in GCA and corresponding normal mucosa were 61.7% (58/94) and 34.0% (32/94), respectively. The frequency of Wif-1 promoter methylation in GCA was significantly higher than that in normal mucosa ($\chi^2=14.409$, $P=0.000$). In the tissues of GCA and normal mucosa, the positive rate of Wif-1 mRNA expression were 10.6% (10/94) and 86.2% (81/94), and the protein expression of β-catenin were 90.4% (85/94) and 38.3% (36/94). The expression of Wif-1 mRNA and β-catenin protein were correlated with the frequency of Wif-1

基金项目:河北省强势特色学科基金(2005-52);河北省科技厅科技攻关项目(052761163)

Supported by the Foundation of the Considerable Distinctive Subjects of Hebei Province (2005-52) and the Tackling Program of Sci & Tech Department of Hebei Province (052761163)

作者简介:郭艳丽,女,河北省邯郸市人,硕士,医师,主要从事肿瘤病因学方面的研究。电话:(0311)86095337,E-mail:yanli800224@163.com

通信作者:董稚明,E-mail:dddzzzmmm@yahoo.com.cn

收稿日期:2009-03-23;**修回日期**:2009-04-30

methylation in the GCA tissues ($P<0.01$). Furthermore, the frequency of Wif-1 methylation was correlated with the invasion depth and lymphatic metastasis ($P<0.05$), but not with pathological classification and clinical stage. **Conclusion** CpG methylation of the Wif-1 promoter is a frequent event in GCA and may contribute to pathogenesis of GCA through aberrant canonical Wnt/ β-catenin signaling pathway.

Key words: gastric cardiac adenocarcinoma; methylation; Wif-1 gene; β-catenin

流行病学调查表明, 多数地区的食管癌和胃癌发病及死亡呈下降趋势,而贲门癌的发病却不断上升[1]。因此,对贲门癌的病因学研究不容忽视。Wnt/β-catenin 信号传导通路是调控细胞生长增殖的重要途径之一,其异常激活已发现与多种人类肿瘤密切相关[2]。Wif-1 是这条通路的拮抗基因。本研究检测贲门腺癌中 Wif-1 基因启动子区的甲基化状态及 mRNA 表达情况和该通路的关键因子 β-catenin 蛋白的表达,旨在说明 Wif-1 基因甲基化与贲门癌发生的关系及可能的作用机制,以期为贲门癌的早发现、早治疗提供重要的候选指标。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　主要试剂　　蛋白酶 K(Merck 公司);氢醌、亚硫酸氢钠(Sigma 公司);Wizard DNA 纯化试剂盒(Promega 公司);Trizol (Invitrogen, USA),所有引物均在北京赛百胜公司合成。

1.1.2　研究对象和标本来源　　研究对象均来自河北医科大学第四医院 2004 – 2006 年的贲门癌手术患者,共 94 例,其中男性 78 例,女性 16 例,年龄 37 ~ 79 岁,平均 53.8 岁。每例患者均取贲门癌原发灶及相应残端正常黏膜组织,全部患者术前均未经化疗和放疗。手术切除标本 – 80℃低温冰箱保存提取 DNA 及 RNA。术后标本组织学类型均经病理诊断证实。按照 2002 年修改的国际抗癌联盟(UICC)标准进行临床分期:Ⅰ、Ⅱ期肿瘤患者共 38 例,Ⅲ、Ⅳ期患者共 56 例;按照肿瘤的病理学分级:高、中分化 40 例,低分化 54 例。

1.2　方法

1.2.1　巢式甲基化特异性 PCR(MSP)　　取适量 DNA 标本按 Wizard DNA 纯化试剂盒说明进行纯化,经亚硫酸氢盐处理后,DNA 中的 C 转变为 U, 而基因的 CpG 岛发生甲基化后, 则不能发生这种改变, 根据此原理设计相应的引物(表 1),检测该基因是否发生甲基化。反应条件为 95 ℃ 预变性 10 min 后,94 ℃变性 45 s,60.5 ℃(甲基化引物)或 55.2 ℃(非甲基化的引物)退火 50 s,72 ℃延伸 45 s,40 个循环后,72 ℃继续延伸 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,用 UV 凝胶电泳成像及图像分析系统进行图像分析。MSP 阳性对照采用基因组 DNA 经甲基化酶(Sss I,New England BioLabs 公司)处理以后进行 PCR,阴性对照用灭菌双蒸水取代 DNA 模板进行 PCR。为进行 MSP 检测的质量控制,选取 10% 标本进行重复实验。

表 1　引物序列

引物名称	序列	产物大小(bp)
MSP 引物		
第一轮	上游:5′-TAGGGGTTTTTGAGTGTTT-3′	404
	下游:5′-ACCTAAATACCAAAAAACCTAC-3′	
第二轮甲基化	上游:5′-cGTTTTATTGGGCGTATCGT-3′	145
	下游:5′-ACTAACGCGAACGAAATACGA-3′	
第二轮非甲基化	上游:5′-GGGTGTTTTATTGGGTGTATTGT-3′	154
	下游:5′-AAAAAAACTAACACAAACAAAATACAAAC-3′	
RT-PCR 引物		
Wif-1	上游:5′-TCTGTTCAAAAGCCTGTCTGC-3′	111
	下游:5′-cCTTTTATTGCAGTGTCTTCCA-3′	
GAPDH	上游:5′-GGGAAACTGTGGCGTGAT-3′	354
	下游:5′-GTGGTCGTTGAGGGCAAT-3′	

1.2.2　RT-PCR 检测　　按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA (Invitrogen 公司),并参照逆转录试剂盒(Reverse Transcription System A3500, Promega 公司)说明将 RNA 逆转录成 cDNA。Wif-1 mRNA 的合成引物见表 1。反应条件为:RNA 70 ℃ 预热 10 min 后,25 ℃ 10 s,42 ℃ 60 min,99 ℃ 5 min,4 ℃ 5 min,共 40 个循环。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,GAPDH 作为内参照。

1.2.3　免疫组化检测　　用免疫组化 S-P 法试剂盒(北京中杉金桥公司)检测 β-catenin(北京中杉金桥公司)的表达情况。石蜡切片常规脱蜡,梯度酒精水化。3% 甲醇过氧化氢封闭后用 pH 8.5 的 EDTA 高压修复 3 min,羊血清封闭,再依次加入一抗、二抗和三抗,DAB 显色,苏木精复染。以 PBS 代替一抗做空白对照。

1.3　统计学分析

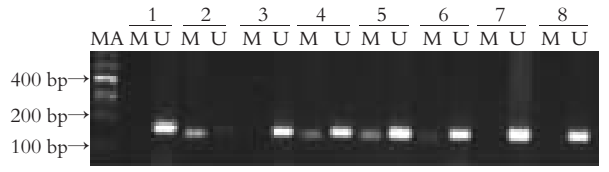
各组间的差异采用 SPSS 11.5 统计软件进行 χ^2 检验,双侧检验。

2　结果

2.1　贲门腺癌 Wif-1 基因启动子区甲基化状态分析

94 例贲门腺癌及 94 例相应残端正常黏膜组织均成功进行了 MSP 检测,结果共有 4 种情况(图 1):①肿瘤组织发生了完全甲基化,正常组织没有发生甲基化(标本 1、2);②肿瘤组织发生了不完全甲基化,而正常组织没有甲基化(标本 3、4);③肿瘤组织和正常组织均发生了不完全甲基化(标本 5、6);④肿瘤组织和正常组织均未发生甲基化(标本 7、8)。完全甲基化:

仅出现了甲基化条带,不完全甲基化:出现了甲基化和非甲基化条带,未发生甲基化:仅出现了非甲基化条带。



MA:DNA 标准;M:甲基化条带; U:非甲基化条带;1、3、5、7:正常黏膜组织;2、4、6、8:贲门腺癌组织

图1 贲门腺癌组织及正常黏膜组织中 Wif-1 基因甲基化状态分析

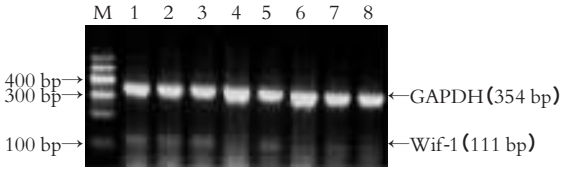
将不完全甲基化状态计入甲基化进行统计,94 例贲门癌组织的甲基化率为 61.7%(58/94),而相应正常黏膜仅有 32 例检测到甲基化,占总例数的 34.0%,癌组织中 Wif-1 基因的甲基化率显著高于正常黏膜组织($\chi^2 = 14.409$, $P = 0.000$)。癌细胞侵出浆膜组中该基因的甲基化率明显高于未侵出浆膜组($P < 0.05$);有淋巴结转移组中该基因的甲基化率明显高于无淋巴结转移组($P < 0.01$);而该基因的甲基化率与临床分期及病理分级无关(表 2)。

表2 贲门腺癌患者 Wif-1 基因启动子区甲基化情况

病理学指标	例数	甲基化	非甲基化	χ^2	P
病理分级					
高、中分化	40	24	16	0.085	0.770
低分化	54	34	20		
浸润深度					
未浸出浆膜	28	12	16	5.993	0.014
侵出浆膜	66	46	20		
淋巴结转移					
阳性	50	40	10	15.135	0.000
阴性	44	18	26		
临床分期					
Ⅰ、Ⅱ期	38	20	18	2.221	0.136
Ⅲ、Ⅳ期	56	38	18		

2.2 Wif-1 基因 mRNA 的表达

94 例贲门腺癌组织中有 10 例 mRNA 表达阳性,阳性率为 10.6%,明显低于正常黏膜组织中该基因 mRNA 表达的阳性率(86.2%, $\chi^2 = 107.365$, $P = 0.000$,图 2);在发生甲基化的贲门癌组织中 Wif-1mRNA 表达水平明显低于未发生甲基化的贲门癌组织,Wif-1 基因启动子区的甲基化和该基因在 mRNA 水平上的表达缺失有明显的相关性($P < 0.01$,表 3)。



M:DNA 标准;1、3、5、7:正常黏膜组织;2、4、6、8:贲门癌组织

图2 贲门腺癌组织及相应正常黏膜组织中 Wif-1 基因 mRNA 表达

表3 贲门腺癌患者癌组织中 Wif-1 基因甲基化与该基因 mRNA 表达及 β-catenin 蛋白表达的关系

Wif-1 基因甲基化状态	例数	Wif-1 mRNA +	Wif-1 mRNA −	χ^2	P	β-catenin 正常表达	β-catenin 异质表达	χ^2	P
甲基化	58	2	56	8.172	0.004	1	57	11.096	0.001
非甲基化	36	8	28			8	28		

2.3 β-catenin 蛋白表达情况

β-catenin 蛋白免疫组化染色镜下观察为细胞质/细胞膜着色。正常生理状态下,β-catenin 的表达定位于细胞膜(图 3A);当 Wnt 信号通路异常激活时,其表达定位于细胞质(图 3B)。将 β-catenin 的细胞膜表达定义为正常表达,而将细胞质的异常积聚定义为异质表达。94 例贲门癌组织中有 85 例 β-catenin 蛋白呈异质表达(90.4%),而相应正常黏膜组织中仅有 36 例异质表达(38.3%),癌组织中 β-catenin 的异质表达率明显高于正常黏膜($\chi^2 = 55.679$, $P = 0.000$)。在发生甲基化的贲门癌组织中 β-catenin 蛋白的异质表达率明显高于未发生甲基化的贲门癌组织, Wif-1 基因启动子区的甲基化和 β-catenin 蛋白的异质表达有明显的相关性($P < 0.01$,表 3)。

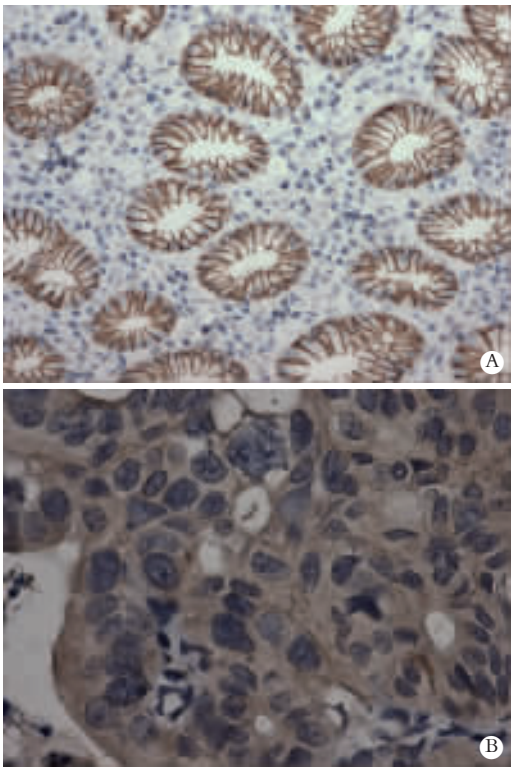


图3 正常黏膜(A,S-P ×200)和贲门腺癌(B,S-P ×400)中 β-catenin 蛋白的表达

3 讨论

Wnt/β-catenin 信号传导通路是细胞增殖和分化的强大调节器,其异常激活与多种人类肿瘤密切相关[2]。Wif-1 基因是该通路的拮抗基因之一,属 sfrp 拮抗家族,在种族间高度保守,最早在人类视网膜中发

现[3]。它主要通过捆绑 Wnt 信号蛋白,阻止其与 frizzled 受体相互作用,从而抑制通路的异常激活。Nosho 等[4]研究发现,在早期结肠癌中伴有 Wif-1 表达的下调。与其研究结果相同,本次实验中也观察到贲门腺癌中 Wif-1 mRNA 的表达水平明显低于正常黏膜。Wif-1 表达的下调可能通过引起经典 Wnt 信号通路的激活,导致通路下游靶基因的过度表达,伴随细胞过度的增殖和失控的分化从而引起了肿瘤的发生。然而,导致 Wif-1 表达下调的机制还有待进一步研究。基因失活的机制除了遗传学改变外, 表现遗传学的改变如基因 5′端 CpG 岛甲基化也是一个非常重要的机制。Wif-1 基因启动子的 msp 分析显示在贲门腺癌中 Wif-1 基因呈高甲基化状态,其甲基化率明显高于正常黏膜组织,并且癌组织中 Wif-1 基因启动子区的甲基化与该基因 mRNA 表达的缺失明显相关。提示 Wif-1 基因启动子区的高甲基化可能是引起该基因 mRNA 表达下调的原因之一。Urakami 等[3]对膀胱癌的研究中也发现癌组织中 Wif-1 基因 mRNA 的表达明显下降,并且与该基因启动子区的高甲基化有关,揭示了参与膀胱癌发生的新途径。Clement[5]及 Tang 等[6]也有过相关的报道。同时,本实验还观察到在 58 例发生了甲基化的癌组织中有 2 例 mRNA 也呈阳性表达,并且这 2 例的甲基化均表现为不完全甲基化,究其原因,一是肿瘤组织中可能混杂有正常组织,再有就是组织发生甲基化的程度不够。有研究报道 CpG 岛甲基化的程度与转录的抑制程度有关[7],当肿瘤组织中基因甲基化程度不高,不足以完全抑制其转录时,即可出现上述情况。此外,在正常黏膜组织中也发现有 34% 的标本发生了甲基化,且全部为不完全甲基化状态,其原因可能是本次甲基化检测采用了巢式 MSP 的方法,相对于以往单一 MSP 法,其灵敏度较高,发生甲基化的等位基因低于总 DNA 的 5% 即可被检测出来[8],故正常黏膜组织中混杂有微量的肿瘤组织即可表现为甲基化阳性[9]。实验还观察到癌组织中 Wif-1 基因的甲基化率与肿瘤的浸润深度及淋巴结转移相关,提示 Wif-1 基因的高甲基化参与调节了贲门癌的恶性表型,并在侵袭和转移中起重要作用,从而使其对贲门癌患者的转移风险及预后评估具有潜在的应用价值。

β-catenin 是这条传导通路的核心成分,在生理状态下,β-catenin 受这条通路的上游调控因子调控, 主要存在于细胞膜,但在病理情况下,多种原因可引起 Wnt 传导通路异常激活,使 β-catenin 游离于细胞质。当细胞质内游离的 β-catenin 增至一定水平便易位于细胞核与 Tcf/Lef 作用形成 β-catenin-Tcf/ Lef 复合体,从而活化转录,促进下游靶基因的过度表达[10]。Kansara[11]、Chung 等[12]的研究结果显示,Wnt 拮抗物的高甲基化可以增加 β-catenin 的细胞质积聚及经典 wnt 信号通路的激活。此次实验也观察了贲门癌中 Wif-1 基因甲基化与 β-catenin 蛋白异质表达的关系。实验发现贲门腺癌中 β-catenin 蛋白的异质表达明显高于正常黏膜组织,并且与 Wif-1 基因的高甲基化呈明显正相关。提示 Wif-1 基因启动子区的高甲基化可能是引起 β-catenin 蛋白的异质表达的机制之一,并通过 Wnt 信号通路异常激活与贲门腺癌的发生相关。

本研究报告了在贲门腺癌中 Wif-1 基因启动子区呈高甲基化状态,并通过引起经典 Wnt/β-catenin 通路的异常激活与贲门腺癌的发生密切相关。研究结果将有助于从分子水平揭示贲门腺癌的病因,并有望为贲门腺癌高危人群的筛查工作提供一项新的候选指标。

参考文献:

[1] 陈志峰,侯　浚,贺宇彤,等. 食管胃交界腺癌——肿瘤登记面临的新课题[J]. 中国肿瘤临床, 2007, 34(24): 1381 - 1382.

[2] Karim R, Tse G, Putti T, *et al*. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers[J]. Pathology, 2004, 36(2): 120 - 128.

[3] Urakami S, Shiina H, Enokida H, *et al*. Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 plays an important role in bladder cancer through aberrant canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(2): 383 - 391.

[4] Nosho K, Yamamoto H, Takahashi T, *et al*. Genetic and epigenetic profiling in early colorectal tumors and prediction of invasive potential in pT1 (early invasive) colorectal cancers[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(6): 1364 - 1370.

[5] Clement G, Guilleret I, He B, *et al*. Epigenetic alteration of the Wnt inhibitory factor-1 promoter occurs early in the carcinogenesis of Barrett's esophagus[J]. Cancer Sci, 2008, 99(1): 46 - 53.

[6] Tang M, Torres-Lanzas J, Lopez-Rios F, *et al*. Wnt signaling promoter hypermethylation distinguishes lung primary adenocarcinomas from colorectal metastasis to the lung[J]. Int J Cancer, 2006, 119(11): 2603 - 2606.

[7] Bird A. Molecular biology. Methylation talk between histones and DNA[J]. Science, 2001, 294(5549): 2113 - 2115.

[8] Licchesi J D, Herman J G. Methylation-specific PCR[J]. Methods Mol Biol, 2009, 507: 305 - 323.

[9] 谢　坤,朱立新,耿小平,等. 肝细胞癌 CHFR、EDNRB 和 3-OST-2 基因异常甲基化的研究[J]. 中华消化外科杂志, 2007, 6(2): 117 - 120.

[10] Tang S J. The synaptic Wnt signaling hypothesis[J]. Synapse, 2007, 61(10): 866 - 868.

[11] Kansara M, Tsang M, Kodjabachian L, *et al*. Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice[J]. J Clin Invest, 2009,119(4): 837 - 851.

[12] Chung M T, Sytwu H K, Yan M D, *et al*. Promoter methylation of SFRPs gene family in cervical cancer[J]. Gynecol Oncol, 2009, 112(2): 301 - 306.

(编辑　吴培红)