论著

文章编号:1000-5404(2014)15-1596-04

血小板反应蛋白1基因甲基化及其表达异常与鼻咽癌的关系

黄 闯,叶 果,李真华,张玉莲,周晓红 (400030 重庆,重庆市肿瘤研究所头颈外科)

[摘要] **目的** 探讨鼻咽癌组织中血小板反应蛋白1(thrombospondin 1,THBS1)基因启动子甲基化对其mRNA及蛋白水平表达的影响及与鼻咽癌临床病理特征的相关性。**方法** 收集51例新鲜鼻咽癌标本及18例正常鼻咽黏膜标本。应用逆转录PCR检测THBS1 mRNA的表达,Western blot检测THBS1蛋白的表达,甲基化特异性PCR检测THBS1基因启动子区CpG岛甲基化。**结果** 鼻咽癌组织中THBS1 mRNA(0.309±0.162)及蛋白(0.214±0.127)表达下调,与正常鼻咽黏膜组织对照组[分别为(0.528±0.096)、(0.514±0.118)]相比差异均具有统计学意义($P<0.01$);鼻咽癌组织中基因启动子区高甲基化率显著高于其在正常鼻咽黏膜组织,差异有统计学意义($P<0.01$)。鼻咽癌组织中THBS1 mRNA及蛋白表达下调均与THBS1基因启动子区高甲基化有关($P<0.01$)。基因启动子区高甲基化率与鼻咽癌临床TNM分期、局部侵袭、淋巴结转移及远处转移呈正相关,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 鼻咽癌组织中存在THBS1 mRNA及蛋白异常低表达及启动子区的高甲基化,THBS1基因高甲基化可能抑制THBS1 mRNA及蛋白的表达,在鼻咽癌发生、发展中发挥重要作用。

[关键词] 鼻咽癌;血小板反应蛋白1;甲基化
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R739.63 [文献标志码] A

Correlation of promoter methylation and abnormal expression of THBS1 gene with nasopharyngeal carcinoma

Huang Chuang, Ye Guo, Li Zhenhua, Zhang Yulian, Zhou Xiaohong (Department of Head and Neck Surgery, Chongqing Cancer Institute, Chongqing, 400030, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the mRNA and protein expression of thrombospondin 1 (THBS1) and its aberrant DNA methylation in nasopharyngeal carcinoma (NPC), and then analyze the relationship of its aberrant DNA methylation with clinicopathological features of NPC. **Methods** A total of 51 NPC tissue samples and 18 normal nasopharyngeal (NNP) tissues were collected. The mRNA expression of THBS1 in NPC tissues and NNP tissues was detected by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and its protein expression was detected by Western blotting. The DNA methylation of the CpG island promoters of THBS1 in NPC tissues and NNP tissues was detected by the DNA methylation specific polymerase chain reaction. **Results** The mRNA and protein levels of THBS1 were significantly decreased in the NPC tissues than the NNP tissues ($P<0.01$). The positive rate of the hypermethylation of THBS1 gene was significantly higher in the NPC tissues than that the NNP tissues ($P<0.01$). The decreased expression of THBS1 at mRNA and protein levels was associated with the hypermethylation of its gene promoter ($P<0.01$). THBS1 gene hypermethylation status was positively correlated with NPC TNM staging, local invasion, lymphatic metastasis and distant metastasis (each for $P<0.05$). **Conclusion** The aberrant hypermethylation of the CpG island promoter of THBS1 gene and their lower expression in NPC tissues may play a crucial role in carcinogenesis and development of NPC.

[**Key words**] nasopharyngeal carcinoma; thrombospondin 1; methylation

Supported by the Project of Medical Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-2-494). Corresponding author: Zhou Xiaohong, E-mail: 996294274@qq.com

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研计划项目(2012-2-494)
[通信作者] 周晓红,E-mail:996294274@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140126.1055.017.html(2014-01-26)

肿瘤的发生、发展是一种多基因参与多阶段的病理过程,其中癌基因的激活和抑癌基因的失活起着关键作用,而启动子区DNA高甲基化是抑癌基因失活的重要机制之一[1-2]。研究证实头颈部鳞癌中抑癌基因因高甲基化而失活更为普遍,更倾向于一个表观遗传学疾病[3]。鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)是头颈部最常见的恶性肿瘤,具有较高的发病率和病死率,目前关于NPC的发病机制仍然不清楚。血小板反应蛋白1(thrombospondin 1, THBS1)属于血小板反应素(thrombospondins,TSPs)家族成员之一,在肿瘤生长与转移过程中能够抑制肿瘤的血管生成,是一种抑癌基因[4-5]。THBS1基因启动子区高甲基化作为一种频发事件已在多种肿瘤中报道[6-9]。本研究拟从作为头颈部鳞癌之一的鼻咽癌入手,检测THBS1 mRNA与蛋白的表达以及启动子区甲基化状态,分析探讨启动子甲基化率与鼻咽癌临床病理特征的关系,以期为揭示鼻咽癌发病的表观遗传发病机制等提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 标本采集 51例鼻咽癌组织标本及18例正常鼻咽黏膜标本均取自2012年7月至2013年3月重庆市肿瘤研究所头颈外科门诊患者,标本组织活检后,立即放入-80 ℃冰箱中备用。患者均未经化疗、放疗及生物治疗,且全部标本组织经重庆市肿瘤研究所病理诊断确诊为鼻咽鳞状细胞癌。收取样品前,均获得了患者的同意以及重庆市肿瘤医院伦理委员会的批准。51例鼻咽癌患者中男性39例,女性12例,年龄最小者39岁,最大者73岁。组织分化程度:低分化组22例,高分化组29例。临床分期采用国际抗癌联盟(Union Internationale Against Cancer, UICC)2010分期标准,Ⅰ、Ⅱ期27例,Ⅲ、Ⅳ期24例。局部侵袭程度:T1~T2为21例,T3~T4为30例;淋巴结转移:N0为23例,N1~N3为28例;远处转移:M0为45例,M1为6例。

1.1.2 主要试剂 DNA提取试剂盒购自德国Roche公司,TRIzol试剂、基因组DNA CpG岛修饰试剂盒购自美国Invitrogen公司,RT-PCR引物及甲基化与非甲基化引物均由TaKaRa公司设计合成,M-MLV反转录及RT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司,DNA甲基化PCR试剂盒及正常人外周血淋巴细胞DNA购自北京天漠科技开发有限公司,CPG甲基转移酶购自NEB(北京)有限公司,聚偏二氟乙烯膜、RIPA蛋白裂解液及ECL化学发光显影试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,预染蛋白Marker购自美国Millipore公司,鼠抗人Thrombospondin 1单克隆抗体和鼠抗人β-actin单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,山羊抗鼠IgG/辣根过氧化物酶标记二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 逆转录PCR检测(RT-PCR) 提取组织总RNA。逆转录成cDNA:取2 μg总RNA采用M-MLV反转录试剂盒反应体系进行逆转录。PCR反应:第1步,94 ℃预变性5 min;第2步,94 ℃变性30 s、52 ℃退火30 s、72 ℃延伸30 s,共30个循环;最后,72 ℃延伸10 min。THBS1引物上游为5′-AAAGCGTCTTCACCAGAGACCT-3′,下游为5′-GCAGATGGTAACTGAGTTCTGACA-3′,产物大小为496 bp。β-actin引物上游为5′-CACCACACCTTCTACAATGAGC-3′,下游为5′-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT-3′,产物为700 bp。取PCR产物5 μL行1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,置于GEL EQ凝胶成像仪上成像,用Quantity One 4.6.2软件进行结果分析,以THBS1条带灰度值/内参β-actin条带灰度值表示THBS1 mRNA的相对表达量。

1.2.2 蛋白印迹检测(Western blot) 提取组织总蛋白,采用BCA法进行蛋白定量,根据结果将所有样品调整为相同蛋白浓度10 mg/mL,同浓度同体积的蛋白样品按体积比1∶5加入5×loading buffer,100 ℃煮5 min使蛋白变性,保存-20 ℃备用于后续的蛋白印迹。电泳:上样行10% SDS-PAGE分离蛋白后,湿转至聚偏二氟乙烯膜,5%小牛血清封闭2 h,分别加入一抗(稀释比例THBS1为1∶1 000,β-actin为1∶1 000),4 ℃过夜;洗膜,加入二抗(1∶5 000),37 ℃反应1 h;洗膜,按照电化学发光试剂盒说明进行显影。采用Quantity One 4.6.2软件对各组电泳条带进行灰度值分析,以THBS1条带灰度值/内参β-actin条带灰度值表示THBS1蛋白的相对表达量。

1.2.3 甲基化特异性PCR(methylation specific PCR) 提取试剂盒提取组织DNA。每份样本取浓度为1 μg/100 μL的DNA 100 μL按照基因组DNA CpG岛修饰试剂盒说明书对DNA进行亚硫酸氢盐修饰。甲基化PCR反应体系为:ddH_2O 7.45 μL,PCR缓冲液1.25 μL,dNTP 1.25 μL,$MgCl_2$ 1 μL,修饰过的DNA模板1 μL,上下游引物各0.25 μL,*Taq*DNA聚合酶0.05 μL。反应条件:94 ℃预变性5 min;第2步,94 ℃变性30 s、60 ℃退火40 s、72 ℃延伸40 s,共35个循环;最后,72 ℃延伸10 min。甲基化特异性引物上游:5′-TTGAGTACGTTAAGGTTGCGTGGGC-3′,下游:5′-AACGCTAAAACTACCGATACGCCGAA-3′,产物为212 bp;非甲基化引物上游:5′-GGTTGAGTATGTTAAGGTTGTGTGGGT-3′,下游:5′-TAAAAACACTAAAACTACCAATACACCAAA-3′,产物为230 bp。为保证检测的可靠性,以*Sss* I甲基转移酶处理过的正常人外周血淋巴细胞DNA做甲基化的阳性对照;以正常人外周血淋巴细胞DNA做非甲基化的阳性对照;以H_2O做空白对照。取扩增产物用琼脂糖凝胶电泳,产物在GEL EQ凝胶成像仪上成像,紫外灯下观察并照相。

1.3 统计学方法

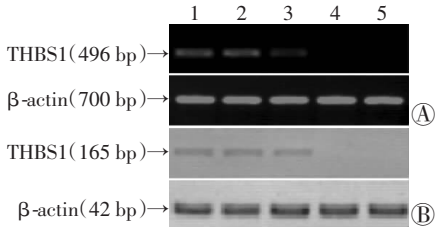
采用SPSS 17.0统计软件,THBS1 mRNA及蛋白表达水平的数据用$\bar{x} \pm s$表示,行t检验;THBS1基因甲基化分析行χ^2检验。

2 结果

2.1 THBS1 mRNA和蛋白的表达

THBS1 mRNA在鼻咽癌组织中的相对表达量(0.309±0.162)显著低于其在正常鼻咽黏膜中的表达(0.528±0.096),差异有统计学意义($t=5.36$,$P<0.01$)。THBS1蛋白在鼻咽癌组织中的相对表达量(0.214±0.127)同样显著低于其在正常

鼻咽黏膜组织中的表达(0.514±0.118),差异有统计学意义($t=8.755$,$P<0.01$,图1)。

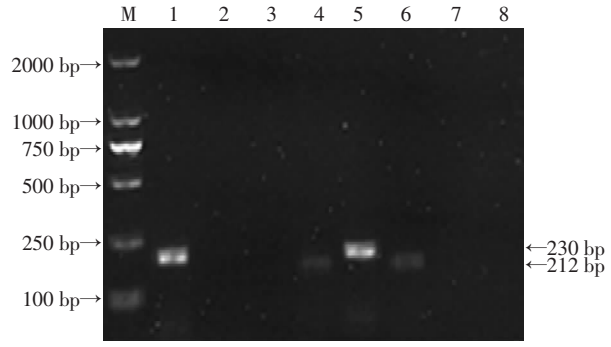


1、2:正常鼻咽黏膜组织;3~5:鼻咽癌组织
A:RT-PCR检测;B:Western blot检测

图1 鼻咽癌与正常鼻咽黏膜组织中THBS1 mRNA和蛋白的相对表达

2.2 鼻咽癌及正常鼻咽黏膜组织中THBS1基因启动子甲基化分析

鼻咽癌组织中有20例发生高甲基化,甲基化率为39.22%;18例正常鼻咽黏膜组织中均无高甲基化的发生,差异具有统计学意义($\chi^2=9.94$, $P<0.01$,图2)。



M:标准(DL2000);1:正常鼻咽黏膜组织非甲基化;2:正常鼻咽黏膜组织甲基化;3:鼻咽癌组织非甲基化;4:鼻咽癌组织甲基化;5:阳性对照非甲基化;6:阳性对照甲基化;7:空白对照非甲基化;8:空白对照甲基化

图2 甲基化特异性PCR检测鼻咽癌及正常鼻咽黏膜组织中THBS1基因启动子甲基化水平

2.3 鼻咽癌标本中THBS1 mRNA和蛋白水平的降低与该基因启动子高甲基化的关系

51例鼻咽癌标本中甲基化20例,非甲基化31例,对这两种类型标本THBS1 mRNA及蛋白相对表达量进行统计学分析,发现在非甲基化的患者标本中其基因mRNA相对表达水平为(0.405±0.103),而甲基化患者为(0.159±0.117),差异有统计学意义($t=7.75$,$P<0.01$);THBS1蛋白相对表达量在非甲基化的患者标本中为(0.272±0.124),甲基化患者标本为(0.117±0.062),差异有统计学意义($t=5.041$,$P<0.01$)。

2.4 THBS1基因启动子甲基化率与鼻咽癌临床病理特征的关系

THBS1基因启动子甲基化状态与患者的临床分期、局部侵袭、淋巴结转移及远处转移相关(均$P<0.05$),与患者年龄、性别及组织分化程度无关。见表1。

表1 鼻咽癌组织中THBS1基因启动子甲基化率与临床病理特征的关系

临床病理参数	n	甲基化(例)	χ^2	P值
年龄				
<60岁	23	8	0.345	0.557
≥60岁	28	12		
性别				
男	39	15	0.04	0.842
女	12	5		
分化程度				
低分化	22	9	0.047	0.829
中高分化	29	11		
TNM分期				
Ⅰ~Ⅱ期	27	7	4.251	0.039
Ⅲ~Ⅳ期	24	13		
局部侵袭				
T1~T2	21	4	5.063	0.024
T3~T4	30	16		
淋巴转移				
N0	23	5	5.368	0.021
N1~N3	28	15		
远处转移				
M0	45	14	7.848	0.005
M1	6	6		

3 讨论

人THBS1基因位于染色体15q15,其编码产物THBS1蛋白为一种基质内的粘附糖蛋白,由血小板、内皮细胞、巨噬细胞及单核细胞等多种细胞合成,与体内多种蛋白发生相互作用,参与细胞的生长、迁移、新生血管的形成等多种生命活动[5]。近年在肿瘤学研究领域中THBS1作为一种抑癌基因逐渐引起人们的重视。研究发现在多种肿瘤组织中出现THBS1表达异常,提示其可能参与并影响了肿瘤的发生、发展[10-11]。关于THBS1在鼻咽癌中是否表达异常及是否参与其发生、发展,目前尚不清楚。

本研究分别采用RT-PCR及Western blot技术对人鼻咽癌及正常鼻咽黏膜标本中THBS1基因及蛋白进行半定量检测与统计学分析,结果显示在鼻咽癌组织中THBS1 mRNA及蛋白水平均低于其在正常鼻咽黏膜中的表达水平,此结果与文献[12-14]报道的THBS1在非小细胞肺癌、胃癌和肠癌组织中表达降低是一致的。以上结果提示鼻咽癌中抑癌基因THBS1 mRNA及蛋白的表达降低可能是鼻咽癌发生、发展的促进因素之一。

DNA甲基化与肿瘤发生密切相关。DNA甲基化修饰是基因表达调控的重要表观遗传学机制之一,它通过多种机制如延迟DNA复制、抑制转录起始、改变染色质的物理或化学结构使基因转录沉默,导致基因功能失活[15]。目前已经发现在多种肿瘤如脑肿瘤、胰腺癌、黑色素瘤及胃贲门癌等组织及细胞系中THBS1基因启动子区有甲基化的发生导致其基因mRNA和蛋白表达下调或缺失[6,16-18]。因此,为了探明在鼻咽

癌中 THBS1 mRNA 及蛋白水平的降低是否与其基因启动子高甲基化有关,我们通过甲基化特异性 PCR 技术对 51 例鼻咽癌及 18 例正常鼻咽黏膜组织标本进行 THBS1 启动子甲基化检测与分析,结果显示在鼻咽癌组织中发生高甲基化达到 20 例(39.22%),而正常鼻咽黏膜组织中均无甲基化发生。并且高甲基化的鼻咽癌患者标本中 THBS1 mRNA 及蛋白水平显著低于其在未发生甲基化患者中的表达。这些结果证实了鼻咽癌中 THBS 基因及蛋白水平的降低跟其基因启动子甲基化有关。

THBS1 参与多种肿瘤的浸润及转移过程。文献[19]报道小鼠体内乳腺癌模型中 THBS1 基因敲除小鼠的肿瘤生长快,易发生转移,而过表达 THBS1 的裸鼠乳腺癌模型能够明显抑制肿瘤生长及转移;同样过表达 THBS1 的人皮肤癌细胞株进行裸鼠皮下瘤实验发现可以降低肿瘤的生长,而且促进了肿瘤坏死,而且动物皮肤癌模型中发现 THBS1 在肿瘤及间质边缘作为一种基质屏障,抑制肿瘤血管生成及肿瘤细胞侵袭[20]。关于其机制,文献[21]报道 THBS1 发挥其抑制肿瘤的浸润及转移与其导致的金属蛋白酶组织抑制因子的水平增加有关。本研究通过 THBS1 启动子甲基化与鼻咽癌临床病理特征相关性分析发现,THBS1 基因启动子甲基化率与鼻咽癌患者年龄、性别及组织分化程度无相关性,但与临床分期、局部侵袭、淋巴结转移及远处转移相关。这些结果进一步提示抑癌基因 THBS1 启动子高甲基化导致的该基因及蛋白表达下调或缺失可能在鼻咽癌发生、发展,特别是在其转移中起着重要作用。

总之,本研究结果说明,基因高甲基化是引起鼻咽癌组织 THBS1 mRNA 及蛋白质表达降低或缺失的重要因素,并提示 THBS1 可能抑制鼻咽癌的发展及转移,这为鼻咽癌的发病机制及防治提供了科学依据,提示检测 THBS1 基因甲基化状态可能成为鼻咽癌早期诊断及其发生、发展与预后判断的手段之一。

参考文献:

[1] Lee C J, Evans J, Kim K, *et al*. Determining the effect of DNA methylation on gene expression in cancer cells[J]. Methods Mol Biol, 2014, 1101: 161 - 178.

[2] Herman J G, Baylin S B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation[J]. N Engl J Med, 2003, 349(21): 2042 - 2054.

[3] Laytragoon-Lewin N, Chen F, Castro J, *et al*. DNA content and methylation of p16, DAPK and RASSF1A gene in tumour and distant, normal mucosal tissue of head and neck squamous cell carcinoma patients [J]. Anticancer Res, 2010, 30(11): 4643 - 4648.

[4] Roberts D D. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1[J]. FASEB J, 1996, 10(10): 1183 - 1191.

[5] Lawler P R, Lawler J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, 2(5): a006627.

[6] 宫杰, 朱树干, 吴承远, 等. 脑膜瘤中 NF2、TIMP-3、THBS1 基因异常甲基化的临床意义[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(41): 2889 - 2892.

[7] Guerrero D, Guarch R, Ojer A, *et al*. Hypermethylation of the thrombospondin-1 gene is associated with poor prognosis in penile squamous cell carcinoma[J]. BJU Int, 2008, 102(6): 747 - 755.

[8] Melnikov A A, Scholtens D, Talamonti M S, *et al*. Methylation profile of circulating plasma DNA in patients with pancreatic cancer[J]. J Surg Oncol, 2009, 99(2): 119 - 122.

[9] Rojas A, Meherem S, Kim Y H, *et al*. The aberrant methylation of TSP1 suppresses TGF-beta1 activation in colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2008, 123(1): 14 - 21.

[10] Wei W, Kong B, Qu X. Alteration of HGF and TSP-1 expression in ovarian carcinoma associated with clinical features [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2012, 38(1): 57 - 64.

[11] Sargiannidou I, Zhou J, Tuszynski G P. The role of thrombospondin-1 in tumor progression[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2001, 226(8): 726 - 733.

[12] Fleitas T, Martinez-Sales V, Vila V, *et al*. VEGF and TSP1 levels correlate with prognosis in advanced non-small cell lung cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2013, 15(11): 897 - 902.

[13] Oue N, Matsumura S, Nakayama H, *et al*. Reduced expression of the TSP1 gene and its association with promoter hypermethylation in gastric carcinoma[J]. Oncology, 2003, 64(4): 423 - 429.

[14] Maeda K, Nishiguchi Y, Kang S M, *et al*. Expression of thrombospondin-1 inversely correlated with tumor vascularity and hematogenous metastasis in colon cancer[J]. Oncol Rep, 2001, 8(4): 763 - 766.

[15] Costello J F, Fruhwald M C, Smiraglia D J, *et al*. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns [J]. Nat Genet, 2000, 24(2): 132 - 138.

[16] Ueki T, Toyota M, Sohn T, *et al*. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 2000, 60(7): 1835 - 1839.

[17] Lindner D J, Wu Y, Haney R, *et al*. Thrombospondin-1 expression in melanoma is blocked by methylation and targeted reversal by 5-Aza-deoxycytidine suppresses angiogenesis [J]. Matrix Biol, 2013, 32(2): 123 - 132.

[18] Guo W, Dong Z, He M, *et al*. Aberrant methylation of thrombospondin-1 and its association with reduced expression in gastric cardia adenocarcinoma[J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 721485.

[19] Yee K O, Connolly C M, Duquette M, *et al*. The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis [J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 114(1): 85 - 96.

[20] Streit M, Velasco P, Brown L F, *et al*. Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas[J]. Am J Pathol, 1999, 155(2): 441 - 452.

[21] John A S, Hu X, Rothman V L, *et al*. Thrombospondin-1 (TSP-1) up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) production in human tumor cells: exploring the functional significance in tumor cell invasion[J]. Exp Mol Pathol, 2009, 87(3): 184 - 188.

(**收稿**:2013-12-23;**修回**:2014-01-09)

(编辑 汪勤俭)