DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.22.027
第25卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 22
2003年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2003

文章编号:1000-5404(2003)22-2029-03

论著

DNMT在星形细胞瘤中的活性和表达及放化疗对其影响

卢佳友[1],卞修武[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]神经外科;[2]病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 了解DNA甲基转移酶在星形细胞瘤中的活性和DNMT mRNA表达水平及放、化疗对它的影响。方法 根据第1次手术后的治疗方案将30例因复发而两次手术的Ⅰ-Ⅱ级星形细胞瘤患者分为单纯手术组、综合1组(手术+放疗)、综合2组(手术+化疗)、综合3组(手术+放疗+化疗)。采用10 MV加速器X线连续外照射适形放疗;采用威猛及司莫司汀进行化疗。取手术切除新鲜瘤组织,采用同位素微量示踪法测定其DNMT活性;RT-PCR法测定DNMT mRNA表达水平。结果 放疗或/和化疗患者2年生存率显著提高,胶质瘤DNMT活性及其mRNA表达显著下调。结论 DNMT的活性与表达异常参与胶质瘤的发生发展;放、化疗对胶质瘤的疗效可能与DNMT活性和表达变化有关;提示胶质瘤DNMT活性与DNMT mRNA表达水平检测可能对胶质瘤的预后及治疗方案选择具有一定意义。

关键词:胶质细胞瘤;甲基转移酶;PCR;同位素标记
中图法分类号:R345.5;R394.3;R730.264 文献标识码:A

Effects of chemotherapy and radiotherapy on activity and mRNA expression of DNMT in gliomas

LU Jia-you, BIAN Xiu-wu (Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the activity and mRNA expression of DNA methyltransferase (DNMT) in gliomas and the effects of chemotherapy and radiotherapy on them. **Methods** A total of 30 cases of glioma were divided in four groups: operation group, treatment groups A (operation + chemotherapy), B (operation + radiotherapy) and C (operation + radiotherapy + chemotherapy). Group A was treated with VM-26 and Semustine MeCCNU, B with continuous external radiation with X-ray accelerated by 10MV accelerator. Fresh tissues removed surgically were used for the detection of the DNMT activity of tumors by ^{3}H-labeled tracing microassay and DNMT mRNA expression by RT-PCR. **Results** The 2-year survival rate of the patients treated by chemotherapy or / and radiotherapy increased significantly, but the activity and the mRNA expression of DNMT decreased significantly. **Conclusion** DNMT is involved in the genesis and development of gliomas. The curative effect of chemotherapy and radiotherapy may be related with DNMT activity and expression. Detection of DNMT activity and DNMT mRNA may play an important role in the prognosis of gliomas and choice of treatment regimens.

Key words: glioma; DNA-methyltransferase; PCR; isotope labeling

手术、放疗及化疗是目前胶质瘤治疗常用的有效手段,但仍存在治疗方案盲目性较大、复发率高等问题,能否结合日趋成熟的生物技术,根据肿瘤的生物学特点提高预见性,并制定相应的治疗方案以降低复发率将是胶质瘤治疗急待解决的问题。甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)广泛存在于各种生物体内,与多种肿瘤的发生发展有关[1,2],我们既往研究发现DNMT的活性和表达水平与体外培养的胶质瘤细胞分化状态有关[3]。本实验拟通过检测30例Ⅰ~Ⅱ级星形细胞瘤DNMT活性和mRNA表达水平以及常规治疗(手术、化疗及放疗)后的变化情况,进一步明确DNMT与人胶质瘤发生发展及分化状态的关系,同时了解放化疗对DNMT表达与活性的影响,初步探讨其机制,为临床提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 临床病例

收集我校3所附属医院1997-09—2001-04期间Ⅰ~Ⅱ级星

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970268)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39970268)
作者简介:卢佳友(1974-),男,湖北省建始县人,硕士,医师,主要从事肿瘤诱导分化方面的研究。电话:(023)68752247
通信作者:卞修武,E-mail:bianxiuwu@263.net
收稿日期:2003-04-07;修回日期:2003-09-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

形细胞瘤病例，根据首次治疗方案将30例因复发而行两次手术的患者进行分组：单纯手术组10例、综合1组（手术＋化疗）6例、综合2组（手术＋放疗）9例、综合3组（手术＋放疗＋化疗）5例。男18例，女12例。年龄23～64岁，平均34岁。所有病例均无其他重要脏器严重伤病。样本均通过手术获得，并经病理检查分级。

1.2 治疗方法

首次手术均为显微镜下肉眼全切。综合组在手术后15～30 d开始行放疗或化疗。化疗方案：威猛（VM26）：60 mg·m^{-2}·d^{-1}，加入10%葡萄糖液500 ml静滴，连续2 d；司莫司汀胶囊（Semustine MeCCNU）：60 mg·m^{-2}·d^{-1}，口服，连续2 d。以上4 d为一疗程，每个疗程间隔6周。放疗组采用10 MV加速器X线连续外照射适形放疗，全颅照射40 Gy，然后缩野追加15～20 Gy。综合3组先行放疗，一个疗程后再行化疗。

1.3 试剂

Tripure提取液为Rothe公司产品；Taq酶、AMV反转录酶及dNTP、Marker均为日本Takara生物公司产品；^{3}H-SAM、poly[d(I-C)d(I-C)]为Amersham Pharmacia Biotech UK Limited产品。

1.4 疗效

分别于综合治疗前和一个治疗量（或疗程）后行头部CT或MRI检查，单纯手术患者于术后60～90 d行CT或MRI检查。采用国际抗癌联盟（UICC）实体瘤近期客观疗效标准观察疗效，即完全缓解（Complete response，CR）：病变完全消失，大于1个月；部分缓解（Partial response，PR）：肿瘤缩小50%以上，不短于4周；稳定（Stable disease，SD）：肿瘤缩小不及50%或增大未超过25%；进展（Progreeive disease，PD）：一个或多个病变增大25%以上或出现新病变。有效率按CR＋PR计算。以第1次手术后开始记录2年存活率。

1.5 DNMT活性检测

其具体检测方法采用文献[3]介绍的方法。参照组织为切除肿瘤周围3 cm以上组织。以实验组样本检测值/参照组检测值表示DNMT相对活性。

1.6 DNMT mRNA表达水平检测

DNMT基因DNMT的上游引物P1：5′-ATCGGATGAGTCCATCA-3′；下游引物P2：5′-TTCTTCTGCAGGAAGCY-3′。扩增长度为100 bp。内参照采用小鼠β-actin，上游引物：5′-TTGTCACCACCTGGGACGATATGG-3′，下游引物：5′-CATAGGTCTTCTCCAGGGAG-3′，扩增长度：500 bp。由上海生物工程公司合成。

总RNA提取及RT-PCR采用Tripure试剂盒，按文献[3]介绍的方法进行。取扩增产物5 ml于2.0%琼脂糖电泳30 min。Bio Rad凝胶扫描仪上进行荧光强度扫描。以DNMT mRNA扩增强度/内参照作为其检测值。

1.7 统计学处理

计量数据以$\bar{x}\pm s$表示，有效率采用百分数（%）表示，采用SPSS进行两样本均值间t检验，有效率采用χ^2检验。

2 结果

2.1 治疗疗效检测

综合1组CR 1例，PR 4例，有效率为83.3%；综合2组CR 1例，PR 6例，有效率77.8%；综合3组CR 1，PR 3例，有效率80%，其中一人术后多次癫痫，未能坚持完成放疗；单纯手术组CR 1例，PR 5例，有效率60%。综合治疗组与单纯手术组相比，有效率差异显著（$P<0.05$）。综合组间差异无统计学意义。4组病例2年存活率分别为：100%、83.3%、80%、70%。

2.2 首次治疗前后甲基转移酶活性的变化

第1次手术切除胶质瘤甲基转移酶活性在所有4组中无显著差异（$P>0.05$）。再次手术时，所有经过综合治疗组的DNMT活性均低于单纯手术组（$P<0.01$），单纯放疗和放疗＋化疗组之间差异无统计学意义，但二者均显著低于单纯化疗组（$P<0.05$，$P<0.01$）。各综合治疗组DNMT活性在第2次手术时较首次手术时明显下降（$P<0.01$），而单纯手术组差异不显著（$P>0.05$），见表1。

表1 放疗和/或化疗前后甲基转移酶活性（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Changes of the DNMT activity before and after therapy（$\bar{x}\pm s$）

	Control	Group A	Group B	Group C
Pretreatment	4.152 4±1.852 2	4.114 57±1.343 5	3.935 77±1.420 7	4.547 30±1.786 0
Post-treatment	5.036 2±1.727 4	2.708 63±0.554 5※*	2.086 54±0.490 1※*#	1.911 38±0.438 9※*##

*：$P<0.01$ *vs* the same group before therapy；※：$P<0.01$ *vs* control group；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* group A

表2 第1次治疗前后甲基转移酶mRNA的表达水平（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Changes of the DNMT mRNA expression before and after the first therapy（$\bar{x}\pm s$）

	Control	Group A	Group B	Group C
Pretreatment	1.34±0.09	1.27±0.06	1.29±0.07	1.30±0.06
Post-treatment	1.38±0.10	0.85±0.08*※	0.63±0.05*※##	0.61±0.04*※##

*：$P<0.01$ *vs* the same group before therapy；※：$P<0.01$ *vs* control group；##：$P<0.01$ *vs* group A

2.3 首次治疗前后甲基转移酶mRNA表达水平变化

第1次治疗前所有四组DNMT mRNA无显著差异（$P>0.05$），综合治疗后所有综合治疗组均低于单纯手术组（$P<0.01$），放疗和放疗＋化疗组之间差异无统计学意义，但均显著低于化疗组（$P<0.01$），见表2。

3 讨论

DNMT是细胞生长发育必不可少的调控因子，除

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

了通过影响基因组甲基化状态调整细胞内各种基因表达以外, 也能通过其它非甲基化相关性活性改变细胞的生长状态, 有直接的证据证实它与很多肿瘤关系密切[4,5]: 将 DNMT 基因正义 cDNA 显微注射入肿瘤细胞后细胞恶性度增加; 而用反义 cDNA 进行注射时肿瘤细胞恶性度降低。近来研究显示人星形细胞瘤细胞中 DNMT 也存在明显异常。我们既往发现, 两种人星形细胞瘤细胞系(CHG-5、SHG-44)DNMT 活性与表达显著高于人胎脑星形细胞; 本研究中手术切除的星形细胞瘤瘤体组织 DNMT 活性高出瘤周组织数倍以上。以上均提示 DNMT 在星形细胞瘤的发生发展过程中可能起某种作用, 推测其机制可能包括: ①抑制抑癌基因表达: 通过甲基转移活性, DNMT 催化抑癌基因的胞嘧啶发生甲基化; 或结合于抑癌基因或管家基因上游的转录调控元件(如 SP1 和 SP2)结合位点, 引起抑癌基因表达"沉寂"[6,7]; ②干扰转录的调控: 与其它转录调控子(如 p21 等)竞争性结合于 PCNA 上, 干扰 PCNA 对转录的正常调控[8]; ③促进甲基化的胞嘧啶脱氨基作用, 引起碱基 C→U→T 的转换突变。该机制在微卫星不稳定的 DNA 中作用更突出。

实验显示, 采用放疗或化疗方案后, 星形细胞瘤 DNMT 活性及表达水平明显下降, 机制尚不完全明确。由于 DNMT 是原癌基因信号转导途径的一个关键的下游成分[9], 既往研究表明放疗及某些化疗药能对该途径及细胞周期产生影响, 因此有理由相信, 放、化疗可能通过影响原癌基因信号转导途径中的某些环节(如 Ras-Jun 或某些顺式作用元件), 影响 DNMT 的活性及表达, 从而改变基因组活性状态, 诱导或转化胶质瘤。该机制提示 DNMT 基因及其表达产物可能作为胶质瘤治疗的一个潜在靶点。实验还表明, 单纯化疗或放疗后 DNMT 活性和 mRNA 表达改变存在差异, 形成这种差异的原因尚不明确, 可能与两种治疗方案的不同作用方式有关。星形细胞瘤治疗的最大难题在于其高复发率, 对其分化状态、复发特性及预后进行动态评估, 采取相应的防治措施, 具有重要的临床意义。国外研究初步表明 DNMT 与细胞分化状态直接相关: 运用反义探针技术抑制 DNMT 在细胞内表达, 导致了成纤维细胞向肌细胞分化; 某些诱导分化剂诱导星形细胞瘤分化后, DNMT 的活性及其 mRNA 表达水平呈逐渐下调趋势。本实验中显示, 经综合治疗后, 随着患者 2 年生存率及治疗有效率的提高, DNMT 也表现出类似的特点。结合既往研究结果[3,10], 我们认为 DNMT 的活性及表达与星形细胞瘤的分化状态直接相关, 因肿瘤细胞的分化状态与其生物学特性高度一致, 故对星形细胞瘤 DNMT 表达及活性进行检测可能对了解患者复发及预后、治疗方案制定等方面有一定提示意义, 这方面的研究有待进一步深入。

参考文献:

[1] Chan E C, Lam S Y, Tsang K W. *et al*. Aberrant promoter methylation in Chinese patients with non-small cell lung cancer: patterns in primary tumors and potential diagnostic application in bronchoalevolar lavage[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(12): 3741－3746.

[2] Xing R H, Rabbani S A. Transcriptional regulation of urokinase (uPA) gene expression in breast cancer cells: role of DNA methylation[J]. Int J Cancer, 1999, 81(3): 443－450.

[3] 卢佳友, 卞修武, 赵　雯, 等. NDGA 诱导人胶质瘤细胞株分化过程中基因组甲基化及甲基转移酶的变化及意义[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(4): 283－286.

[4] Alcock R A, Dey S, Chendil D. *et al*. Farnesyltransferase inhibitor (L-744, 832) restores TGF-beta type Ⅱ receptor expression and enhances radiation sensitivity in K-ras mutant pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 [J]. Oncogene, 2002, 21(51): 7883－7890.

[5] Antoun G, Baylin S B, Ali-Osman F, *et al*. DNA methyltransferase levels and altered CpG methylation in the total genome and in the GSTP1 gene in human glioma cells transfected with sense and antisense DNA methyltransferase cDNA[J]. J Cell Biochem, 2000, 77(3): 372－381.

[6] Kishikawa S, Murata T, Kimura H, *et al*. Regulation of transcription of the Dnmt1 gene by Sp1 and Sp3 zinc finger proteins[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(12): 2961－2970.

[7] Periyasamy S, Ammanamanchi S, Tillekeratne M P, *et al*. Repression of transforming growth factor-beta receptor type I promoter expression by Sp1 deficiency[J]. Oncogene, 2000, 19(40): 4660－4667.

[8] Araujo F D, Croteau S, Slack A D, *et al*. The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus[J]. J Biol Chem, 2001, 276(10): 6930－6936.

[9] Robert A M, Rouleau J. Regulation of DNA methylation by ras signaling pathway[J]. J Biol Chem, 1998, 270(19): 11327－11337.

[10] 姚　莉, 卞修武, 张树辉, 等. 去甲二氢愈创木酸对恶性胶质瘤细胞基因组甲基化水平的影响及其意义[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(3): 251－253.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net