DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.003
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1010 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1010-02

胃癌组织 hMLH1 和 hMSH2 基因启动子区甲基化状态研究

房殿春,罗元辉,刘为纹 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨 hMLH1 和 hMSH2 基因启动子区的甲基化状态与微卫星 DNA 不稳的关系。方法 采用甲基化特异性 PCR 方法检测 hMLH1 和 hMSH2 基因启动子区的甲基化状态,采用 PCR 为基础的方法检测微卫星 DNA 不稳。结果 正常胃粘膜未见 hMLH1 和 hMSH2 基因启动子区的高甲基化。68 例胃癌中检出 hMLH1 高甲基化 11 例,占 16.2%,而且均为去甲基化和高甲基化并存,未见有 hMSH2 高甲基化者。将 MSI 分为高频率 MSI(MSI-H,≥2 个位点)8 例、低频率 MSI(MSI-L,仅为 1 个位点)9 例和 MSI 阴性(MSS)51 例 3 组,结果 MSI-H 组 hMLH1 高甲基化的检出率显著高于 MSI-L 和 MSS 组($P<0.01$)。结论 hMLH1 高甲基化可能参与了 MSI 病理途径,而 hMSH2 甲基化状态可能与 MSI 途径无关。

关键词:胃癌;hMLH1 和 hMSH2 基因启动子区甲基化;微卫星不稳
中图法分类号:R394.2;R735.2 文献标识码:A

Methylation status of hMLH1 and hMSH2 promoter in gastric cancer

FANG Dian-chun, LUO Yuan-hui, LIU Wei-wen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To correlate the methylation status of hMLH1 and hMSH2 promoter with microsatellite instability in gastric carcinomas. Methods Methylation of hMLH1 and hMSH2 promoter was measured with methylation-specific PCR; MSI was analyzed by PCR-based methods. Results No methylation of hMLH1 and hMSH2 promoter was found in 10 cases of normal gastric mucosa. Sixty-eight cases of sporadic gastric carcinoma were studied for methylation of hMLH1 and hMSH2 promoter and MSI. Methylation of hMLH1 promoter was detected in 11(16.2%) gastric cancer. By using five microsatellite markers, MSI in at least one locus was detected in 17 of 68 (25%) of the tumors analyzed. Methylation frequence of hMLH1 in MSI-H (≥2 loci, $n=8$) was significantly higher than that in MSI-L (only one locus, $n=9$) or MSS (tumor lacking MSI or stable, $n=51$) ($P<0.01\sim0.001$), but no difference was found between MSI-L and MSS groups ($P>0.05$). Conclusion Methylation of hMLH1 promoter is involved in the MSI pathway but not related to the LOH pathway in gastric carcinogenesis.

Key words: gastric carcinoma; methylation of hMLH1 and hMSH2 promoter; microsatellite instability

错配修复为细胞准确复制增殖所必须,若错配修复系统异常,细胞突变频率可增加 100 倍以上[1]。微卫星不稳(Microsatellite instability, MSI)是错配修复(Mismatch repair, MMR)基因缺陷的重要标记,研究发现 90%以上的遗传性非息肉性直结肠癌(HNPCC)可检出 MSI,且多伴有错配修复基因 hMLH1 和 hMSH2 基因的胚系突变,而少有其它错配修复基因的突变[2]。我们的研究发现,胃癌 hMLH1 突变均发生在 MSI 阳性癌组织,但相当一部分 MSI 阳性胃癌组织并未发现 hMLH1 基因突变,猜测可能有其它机制参与了这种缺陷。业已发现,癌发生过程中导致错配修复基因失活的另一方式为 DNA 甲基化的改变,这种改变常伴有错配修复基因表达的丢失[3]。为探讨胃癌组织甲基化改变与微卫星不稳的关系,我们进一步检测了胃癌组织 hMLH1 和 hMSH2 基因启动子区的甲基化状态。

1 材料和方法

1.1 组织标本

68 例胃癌及相应正常组织均为我院外科手术切除标本。标本切除后立即置-80 ℃冻存备用。每例组织行冰冻切片 HE 染色,以确定肿瘤细胞的丰度。10 例正常胃粘膜取自因消化性溃疡或幽门梗阻手术切除患者。DNA 提取采用蛋白酶 K 消化,酚/氯仿提取法。68 例胃癌中,男 45 例,女 23 例,年龄 30~76 岁,平均 56.2 岁。所有病人均无肿瘤家族史,亦未接受过放疗和化疗。

1.2 甲基化特异 PCR(MSP)

hMLH1 和 hMSH2 基因 CpG 岛 DNA 甲基化类型参照文献[4]采用甲基化特异性 PCR(MSP)方法进行检测。用于 hMLH1 去甲基化反应的引物序列为 5′-TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT-3′(正义),5′-ACCACCTCATCATAACTACCCACA-3′(反义);用于甲基化反应所用引物序列为 5′-ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC-3′(正义);5′-CCTCATCGTAACTACCCGCG-3′(反义);用于 hMSH2 去甲基化反应的引物序列为 5′-GGTTGTTGTGGTTGGATGTTGTTT-3′(正义),5′-CAACTACAACATCTCCTTCAACTACACCA-3′(反义);用于甲基化反应所用的引物序列为 5′-TCGTGGTCGGACGTCGTTC-3′(正义),CAACGTCTCCTTCGACTACACCG-3′(反义)。MSP 的检测步骤、PCR 的反应条件和电泳方法见文献[4]。

1.3 微卫星不稳(MSI)的检测

包括 5 个微卫星位点:BAT25、BAT26、BAT40、D2S123、和 D5S346。检测方法、步骤见文献[5]。与正常组织相比,若肿瘤组织出现泳动的条带即判断为 MSI。根据每例肿瘤组织突变型微卫星位点的多少,将其分为高频率 MSI(MSI-H,≥2 个位点)、低频率 MSI(MSI-L,仅为 1 个位点)和 MSI 阴性(MSS)3 组。

1.4 统计学分析

采用 χ^2 检验。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070043);全军"十五"科研基金重点资助项目(01Z075)
作者简介:房殿春(1951-),男,吉林省长春市人,博士,主任医师,教授,主要从事胃粘膜癌变的分子机制及防治方面的研究,发表论文 200 余篇。电话:(023)68754124
收稿日期:2001-07-20;修回日期:2001-08-24

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

2　结果

2.1　胃癌 hMLH1 甲基化状态

为检测 hMLH1 和 hMSH2 启动子区甲基化状态, 我们采用甲基化特异性 PCR 检测 hMLH1 和 hMSH2 基因 5′ CpG 甲基化状态。所扩增的 hMLH1 区域为 CpG 岛最密集区域[3]。正常胃粘膜未见 hMLH1 和 hMSH2 启动子区甲基化现象, 68 例胃癌中发现高甲基化 11 例, 占 16.2%, 而且均为去甲基化和高甲基化并存, 见图 1。68 例胃癌均有 hMSH2 基因 5′ CpG 岛去甲基化, 未发现有甲基化现象。

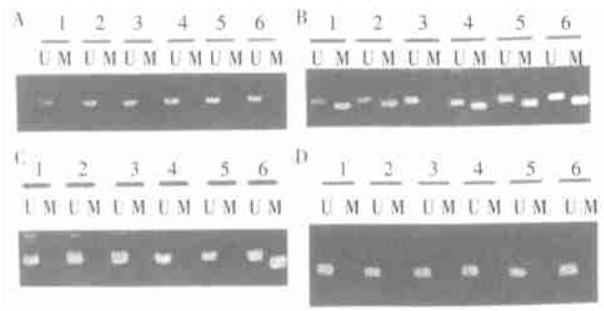


图 1　胃癌 **hMLH1** 和 **hMSH2** 甲基化检测结果

Fig 1　Methylation of hMLH1 and hMSH2 in gastric cancer

A: No methylation was found in normal mucosa; B: Methylation of hMLH1 in MSI-H gastric cancer. Cases 1, 2, 4, 5 and 6 showed both hypermethylation and unmethylation; C: Methylation of hMLH1 in MSI-H gastric cancer; D: Methylation of hMLH1 in MSI-L gastric cancer; U: Unmethylation; M: Methylation

2.2　hMLH1 与 MSI 的关系

68 例胃癌中至少有 1 个位点检出 MSI 者 17 例(25%), 其中属 MSI-H 8 例(11.8%)、MSI-L 9 例(13.2%)和 MSS 51 例(75%)。8 例 MSI-H 胃癌中有 7 例(87.5%)为甲基化类型, 9 例 MSI-L 有 1 例(11.1%), 51 例 MSS 组有 3 例(5.9%)呈高甲基化。MSI-H 组高甲基化的发生率与 MSI-L 和 MSS 组相比差别非常显著($P < 0.01$), 而 MSI-L 与 MSS 组相比差别不显著($P > 0.05$)。

3　讨论

本研究采用甲基化特异 PCR 检测了胃癌组织 hMLH1 和 hMSH2 的甲基化状态, 68 例胃癌检出 hMLH1 高甲基化 11 例, 检出率为 16.2%, hMSH2 未发现有高甲基化者, 此结果与文献报道的检测结果相一致。文献[6]报道 MSI-H 胃癌与 hMLH1 启动子区高甲基化有关, 而与 hMLH1 基因突变无关; 亦有文献报道 MSI-L 胃癌虽然在临床表型方面与 MSI-H 胃癌有明显不同, 但在 hMLH1 甲基化改变方面具有与 MSI-H 胃癌相似的特点[7]。从本组资料来看, 8 例 MSI-H 胃癌中有 7 例(87.5%)表现为 hMLH1 启动子区的高甲基化, 提示 hMLH1 启动子区高甲基化与 MSI-H 胃癌密切相关。但 MSI-H 胃癌高甲基化的检出率显著高于 MSI-L 和 MSS 胃癌, 而 MSI-L 胃癌 hMLH1 启动子区高甲基化的检出率与 MSS 胃癌相比差异不显著, 提示 MSI-H 胃癌在 hMLH1 启动子区高甲基化方面与 MSI-L 和 MSS 胃癌有明显不同, 而 MSI-L 胃癌可能涉及到一条与 MSS 胃癌相似的分子途径, 此与我们过去对不同 MSI 状态胃癌发生分子途径的研究结果相一致[8]。

有作者检测 MSI+肿瘤细胞株 hMLH1 的甲基化状态发现, 肿瘤细胞均表现为高甲基化类型, 而无去甲基化现象[9], 而本组原发 MSI+胃癌却表现为 hMLH1 启动子区的甲基化和去甲基化并存现象。肿瘤组织中的非甲基化部分可能与原发肿瘤中存在非肿瘤细胞成分, 如间质细胞、炎细胞和血管细胞等有关, 这些细胞普遍存在原发肿瘤中, 而不存在于培养的细胞株中, 由此导致了肿瘤细胞株仅表现为高甲基化, 而胃癌组织中却表现为高甲基化和去甲基化共存现象。

我们过去的研究表明, 基因不稳在胃癌的发生中起重要作用。这种基因不稳可以分为二种不同的形式, 即染色体不稳和微卫星不稳。前者包括 MSS 和 MSI-L 组的多数胃癌, APC/MCC、DCC 和 p53 抑癌基因的丢失在其发生发展中起重要作用; 而后者包括少数 MSI-H 胃癌, 由于错配修复基因突变导致了广泛的 MSI。本研究进一步分析了 hMLH1 和 hMSH2 启动子区甲基化与两条病理途径的关系, 发现 hMLH1 启动子高甲基化通常发生在 MSI-H 胃癌, 提示 hMLH1 启动子高甲基化与微卫星不稳途径有关。有报道 hMLH1 启动子区甲基化与 hMLH1 基因 mRNA 和蛋白表达的减少有关[3], 而 hMLH1 启动子去甲基化可以导致肿瘤细胞 hMLH1 蛋白的再表达, 进而恢复 MMR 活性。由于 DNA 甲基化状态可被逆转, 因此针对基因甲基化的靶向治疗已引起人们的重视。通过恢复未发生突变或丢失, 而仅仅被抑制的生长调控基因的表达而恢复细胞正常生长调控功能, 从而可达到治疗的目的。

参考文献:

[1] Thomas D C, Umar A, Kunkel T A. Microsatellite instability and mismatch repair defects in cancer[J]. Mutat Res, 1996, 350(1): 201－205.

[2] Papadopoulos N, Lindblom A. Molecular basis of HNPCC: mutations of MMR genes[J]. Hum Mutat, 1997, 10(2): 89－99.

[3] Kane M F, Loda M, Gaida G M, *et al*. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines[J]. Cancer, 1997, 57(5): 808－811.

[4] Herman J G, Jeremy R. Graff J R, *et al*. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18): 9 821－9 826.

[5] 房殿春, 杨仕明, 罗元辉. 胃癌粘膜基因不稳与染色体端粒长度改变的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(1): 2－5.

[6] Bevilacqua R A, Simpson A J. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability[J]. Int J Cancer, 2000, 87(2): 200－203.

[7] Pinto M, Oliveira C, Machado J C, *et al*. MSI-L gastric carcinomas share the hMLH1 methylation status of MSI-H carcinomas but not their clinicopathological profile[J]. Lab Invest, 2000, 80(12): 1 915－1 923.

[8] 房殿春, 罗元辉, 杨仕明, 等. 胃癌微卫星不稳极其相关突变研究[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(12): 920－922.

[9] Herman J G, Umar A, Polyak K. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(12): 6 870－6 875.

(编辑　薛国文)

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