

结肠腺瘤性息肉病基因异常甲基化在上皮性卵巢癌中的检测及临床意义

孙 健¹, 卢 健², 邹冬芳¹, 吴国平¹

(1. 解放军第85医院妇产科, 上海 200052; 2 上海市第一妇幼保健院, 上海 200040)

[摘 要] 目的 观察结肠腺瘤性息肉病(APC)基因异常甲基化在上皮性卵巢癌中的作用及临床意义。方法 59例上皮性卵巢癌组织原发灶、32例相应的盆腹腔转移灶、12例癌旁卵巢组织及30例正常卵巢组织, 采用甲基化特异性聚合酶链式反应(MSP)法检测APC基因启动子区甲基化状态。结果 上皮性卵巢癌组织原发灶及相应的盆腹腔转移灶中存在APC基因启动子区异常甲基化, 发生率分别为32.2%、40.6%, 显著高于正常卵巢组织($P < 0.01$)。12例癌旁卵巢组织中1例检测到APC基因启动子区甲基化, 30例正常卵巢组织未检测到APC基因启动子区甲基化。APC基因启动子区甲基化的发生率在临床Ⅰ期和Ⅱ期显著低于Ⅲ期和Ⅳ期($P < 0.05$), 在高分化癌中低于低分化癌($P < 0.05$)。结论 APC基因启动子区异常甲基化与上皮性卵巢癌发生密切相关, 并可能与上皮性卵巢癌临床分期及分化程度有关。

[关键词] 卵巢癌; APC; DNA 甲基化

中图分类号: R737.31 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2008)06-0414-04

Significance of hypermethylation of APC in epithelial ovarian carcinoma

SUN Jian¹, LU Jian², ZOU Dong-fang¹, WU Guo-ping¹ (1 The 85th Hospital of PLA, Shanghai 200052, China; 2 Shanghai First Maternity & Infant Health Hospital, Shanghai 200040, China)

[Abstract] Objective To investigate the role and clinical significance of hypermethylation of adenomatous polyposis coli gene (APC) in the carcinogenesis of epithelial ovarian carcinoma. Methods Hypermethylation of APC was detected by using a methylation specific PCR (MSP) in 59 epithelial ovarian cancer patients, 32 metastatic tissues of pelvic and abdomen cavity, 12 adjacent non-cancerous ovarian tissues and 30 normal ovarian tissues. Results Hypermethylation of APC was detected in 32.2% ovarian cancer tissues and 40.6% metastatic sites respectively, in which the frequency was significantly higher than that in normal ovarian tissues ($P < 0.01$). Hypermethylation of APC was detected in 1 out of 12 adjacent non-cancerous ovarian tissues, and no hypermethylation was detected in normal ovarian tissues. The frequency of hypermethylation of APC was significantly lower in cancers of stage I and II than that in stage III and IV ($P < 0.05$), and in well differentiated cancers than in poorly differentiated ones. Conclusion Promoter hypermethylation of APC plays an important role in the course of epithelial ovarian carcinoma, and it is related to clinical stage and histopathological grade in epithelial ovarian carcinoma.

[Key words] Ovarian carcinoma; APC gene; DNA hypermethylation

结肠腺瘤性息肉病(adenomatous polyposis coli, APC)基因是一种抑癌基因, 该基因启动子区CpG岛甲基化可使APC蛋白缺失。近来发现在结直肠癌、乳腺癌、肺癌、子宫内膜癌、食管癌、膀胱癌、胃

癌、T淋巴细胞瘤等肿瘤中均有APC超甲基化^[1], 然而对上皮性卵巢癌中APC甲基化相关的系统分析还少见报道。我们以上皮性卵巢癌中为对象, 用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific PCR, MSP)法对APC甲基化进行检测, 观察APC甲基化后对APC mRNA的表达的影响, 并进一步探讨其临床意义。

作者简介: 孙 健(1969-), 女, 辽宁沈阳人, 本科, 主治医师, 从事妇产科专业。

1 资料与方法

1.1 一般资料 59例原发上皮性卵巢癌组织,32例相应的盆腹腔转移灶,12例癌旁卵巢组织及30例正常卵巢组织取自本院妇科及上海市第一妇幼保健院2001年至2006年手术治疗患者,术前均未经放疗和化疗,术后经病理学诊断及组织学分级皆明确。患者手术后立即取材,置于液氮中速冻后转入-70℃冰箱冻存。59例上皮性卵巢癌患者年龄39~68岁(平均48.2岁),其中浆液性囊腺癌30例,粘液性囊腺癌18例,子宫内膜样癌9例,透明细胞癌2例。根据细胞分化程度分为:高分化17例,中分化19例,低分化23例。32例相应的盆腹腔转移灶取自大网膜20例,子宫直肠窝转移结节9例,肠管浆膜面转移结节2例,侧腹壁浆膜面转移结节1例。非癌卵巢组织12例取自上述“癌旁”正常卵巢组织。30例正常卵巢组织取自因子宫疾病或卵巢良性病变切除卵巢组织。患者年龄在39~59岁(平均49.5岁)。

1.2 甲基化特异性PCR

1.2.1 组织DNA提取 常规酚-氯仿-异戊醇法提取组织DNA,紫外分光光度法检测DNA浓度和纯度。

1.2.2 DNA修饰及纯化 取2 μg DNA,在50 μl反应体系中加入3 mol/L NaOH 5 μl,混匀后75℃15 min,加入新鲜配置的20 mmol/L 氢醌12.6 μl和4.8 mol/L 亚硫酸氢钠320 μl(Sigma公司),混匀后加入10 μl矿物油,55℃水浴过夜。每个DNA样本中加入1 ml DNA纯化树脂(Promega公司),混匀后通过纯化柱,再加入2 ml 80%异丙醇溶解树脂。3 mol/L NaOH脱硫,5 mol/L 醋酸钠,100%冰乙醇沉淀,75%乙醇吹洗DNA。离心后弃上清液,溶于30 μl TE溶液备用。

1.2.3 甲基化特异PCR反应 反应体系共25 μl,包括样品DNA 2 μl,10×PCR buffer 2.5 μl,引物各0.5 μl,dNTP 2 μl,Taq酶0.2 μl,双蒸水17.3 μl。反应条件:95℃预变性5 min;94℃30 s,57℃45 s,72℃30 s,35个循环;72℃延伸10 min。甲基化反应退火温度57℃,非甲基化反应退火温度54℃。以甲基转移酶SssI处理和未处理的正常人外周血细胞DNA作为阳性对照和阴性对照,以双蒸水作为空白对照。

引物序列:甲基化引物:上游引物F5'-GGTA TATTTTCGAGGGGTACG-3',R5'-TTCCCGACCCGCACTCCGC-3',预期产物为90 bp;非甲基化引物:

F5'-TGTGAGGGTA TATTTTGA GGGGTA T-3',R5'-CTTCTCTCTCCA CTCCCAACCA-3',预期产物为109 bp^[2],由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.4 电泳 取PCR产物5 μl,应用2%琼脂糖凝胶电泳,实验重复3次。

1.3 FQ-PCR(荧光定量PCR)检测组织标本APC mRNA表达的影响 为检测组织标本APC mRNA表达的影响,我们用SYBR Green 荧光染料进行了FQ-PCR:提取组织标本总RNA。引物序列:APC mRNA: F5'-GAGACA GAATGGA GGTGCTGC-3',R5'-GTAA GATGA TTGGAATTA TCTTCT-3',预期产物为170 bp^[3]; GAPDH mRNA: F5'-AACGGA TTTGGTCGTA TTGGG-3',R5'-TTG-ATTTTGGAGGGA TCTCGC-3',预期产物为233 bp,由上海生工生物工程技术有限公司合成:逆转录第一链cDNA合成:取总RNA 10 μl,Oligo(dT) 5 pmols,65℃5 min之后插入冰中,加入5×Buffer 4 μl,10 mmol/L dNTPs 2 μl,MMLV逆转录酶100 U,RNase抑制剂20 U,加DEPC水至20 μl,42℃1 h; FQ-PCR反应体系为25 μl,其中包含0.7 μl SYBR Green 染料,Mg²⁺浓度为3.5 mmol/L,扩增条件为95℃5 min,95℃30 s,56℃30 s,72℃30 s,共50个循环后,72℃延伸7 min,每样本4个复孔,在CFD-3220 DNA Engine Option自动荧光PCR仪上进行反应。

1.4 统计学处理 采用 χ^2 检验及Fisher检验法对甲基化频率进行比较。

2 结果

2.1 上皮性卵巢癌组织中APC基因启动子区甲基化状态 59例上皮性卵巢癌组织原发灶中19例检测到APC基因启动子区甲基化,占32.2%,32例盆腹腔转移灶中13例检测到APC基因启动子区甲基化,占40.6%。12例癌旁卵巢组织1例检测到APC基因启动子区甲基化,占8.3%。30例正常卵巢组织未检测到APC基因启动子区甲基化。上皮性卵巢癌组织原发灶及转移灶与正常卵巢组织中APC基因启动子区甲基化率相比差异有显著性意义($P < 0.01$)。盆腹腔转移灶中APC基因启动子区异常甲基化率高于卵巢癌组织原发灶,但差异无显著意义($P > 0.05$),见表1。

2.2 APC基因启动子区甲基化与上皮性卵巢癌临床病理特征的关系 上皮性卵巢癌组织中APC基

因启动子区甲基化的发生率在高分化癌中显著低于低分化癌($P < 0.05$),在浆液性癌、粘液性癌和内膜样癌之间差异无显著性意义;在临床Ⅰ期和Ⅱ期显著低于Ⅲ期和Ⅳ期($P < 0.05$),见表2。

表1 不同卵巢组织APC基因启动子区甲基化状态

分组	例数	阳性例数	阳性率(%)
卵巢癌原发灶	59	19	32.2 [*]
盆腹腔转移灶	32	13	40.6 [*]
癌旁卵巢组织	12	1	8.3
正常卵巢组织	30	0	0

注:与正常卵巢组织比较,^{*} $P < 0.01$

表2 上皮性卵巢癌临床病理特征与APC基因启动子区甲基化的关系

临床病理特征	例数	阳性例数	阳性率(%)
组织类型			
浆液性癌	30	11	36.7
粘液性癌	18	5	27.8
内膜样癌	9	3	33.3
透明细胞癌	2	0	0
病例分级			
高分化	17	1	5.9
中分化	19	4	21.1
低分化	23	14	60.9 [#]
临床分期			
Ⅰ、Ⅱ期	21	2	9.5
Ⅲ、Ⅳ期	38	17	44.7 ^Δ

注:与高分化癌比较,[#] $P < 0.05$;与Ⅰ、Ⅱ期相比较,^Δ $P < 0.05$

3 讨论

近年来,随着对卵巢癌发病机制的深入研究,基因甲基化在卵巢癌中的作用已受到广泛的关注,DNA甲基化是肿瘤抑制基因突变失活及缺失失活之外基因失活的第三种机制。抑癌基因甲基化是一种可遗传的、酶诱导的、对抑癌基因结构的特殊碱基序列有特异性的稳定作用,即在甲基转移酶(DNMTs)作用下将一个甲基集团加到抑癌基因DNA分子核苷酸碱基上,以胞嘧啶的5'羧基端(5'C)被甲基化最为常见。

DNA甲基化异常在包括卵巢癌、胃癌在内的多种肿瘤的发生中起重要作用^[3]。目前诸多基因启动子位点超甲基化的研究已经应用于提高卵巢癌的诊断率,并且可以进一步揭示卵巢癌发生和浸润转移的机制。Wiley等^[4]采用基因检测方法研究234例恶

性或低度潜在恶性卵巢肿瘤患者,认为多种抑癌基因(BRCA1, hMLH1, p16, IGFBP-3, ER-α)超甲基化在卵巢癌的发生发展中起重要作用。Makarla等^[5]也通过研究8种肿瘤抑制基因和癌症相关基因(p16, RARβ, E-cadherin, H-cadherin, APC, GSTP1, MGMT, RASSF1A)启动子区域超甲基化来了解在卵巢癌的发生机制,说明在浸润性卵巢上皮癌启动子区域的超甲基化是一种普遍现象,而且特定基因异常甲基化的累积作用可激发良性或低度恶性肿瘤向恶性转化。

结肠腺瘤性息肉病(adenomatous polyposis coli, APC)基因是一种抑癌基因,该基因定位于染色体APC基因的染色体5q21-22,编码在细胞浆内含2844个氨基酸的蛋白产物,其相对分子质量为312 kD。在Wnt信号途径中,当APC蛋白和β连环蛋白(βcatenin, βcat)结合时,可促进βcat磷酸化,继而βcat可在蛋白酶体中降解。APC在部分肿瘤组织中表达常减少或缺失,与基因5'端启动子区域的CpG岛异常甲基化有关。APC启动子区CpG岛甲基化可使APC蛋白缺失。一旦APC蛋白缺失,就不能和βcat结合,累积的βcat转位到细胞核和Tcf-4结合成复合体,启动增殖相关基因(如c-myc)转录,最终导致细胞生长失控^[6]。

本研究检测上皮性卵巢癌组织原发灶中APC基因启动子区甲基化发生率32.2%,显著高于正常卵巢组织($P < 0.01$),表明APC基因启动子区甲基化与上皮性卵巢癌发生密切相关。同时,卵巢癌盆腹腔转移灶中APC基因启动子区甲基化发生率40.6%,高于上皮性卵巢癌原发灶,而且显著高于正常卵巢组织($P < 0.01$),表明APC基因启动子区甲基化可能与上皮性卵巢癌临床浸润转移相关。另外,APC基因启动子区甲基化在临床Ⅰ期和Ⅱ期低于Ⅲ期和Ⅳ期($P < 0.05$),在高分化癌中APC基因启动子区甲基化所占比率明显低于低分化癌($P < 0.05$),表明APC基因启动子区甲基化与上皮性卵巢癌临床分期和细胞分化程度相关,多发生在临床Ⅰ、Ⅱ期和低分化者,可能与卵巢癌临床进展相关。由此可以推测APC基因可能是与上皮性卵巢癌发生发展相关的重要的抑癌基因,由于启动子区异常甲基化而导致表达失活。本研究发现在正常卵巢组织中APC基因呈非甲基化状态,表明DNA甲基化是肿瘤发生发展的特有事件,而癌旁非癌卵巢组织1例检测到APC基因启动子区甲基化,这可能反映了这些组织虽然病理形态是正常的,但是卵巢上皮细

胞在分子水平可能已经发生改变,同时也说明甲基化可能作为癌变早期事件。

基因甲基化的研究将广泛应用于卵巢肿瘤的分类、早期诊断、治疗以及预测肿瘤转移复发等^[7-9]。全面了解卵巢癌基因组中的甲基化状态,分析基因甲基化产生和维持的机制有助于促进卵巢癌的研究,并为卵巢癌的治疗提出新策略。

参考文献

- [1] Yang Y, Takeuchi S, Tsukasaki K, et al. Methylation analysis of the adenomatous polyposis coli (APC) Gene in adult T-cell leukemia lymphoma [J]. *Leuk Res*, 2005, 29(1): 47-51.
- [2] Zysman M, Saka A, Millar A, et al. Methylation of adenomatous polyposis coli in endometrial carcinoma occurs more frequently in tumors with microsatellite instability phenotype [J]. *Carcinoma Res*, 2002, 62(13): 3663-3666.
- [3] Zambrano P, Segura Pacheco B, Perez Cardenas E, et al. A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes [J]. *BMC Carcinoma*, 2005, 5(1): 44-55.

(上接第410页)素能及去甲肾上腺素能细胞,而单胺能神经元的兴奋可抑制脑胆碱能神经元的快速眼动活动,并引起组胺释放,使觉醒增加^[8]。因此,食欲素神经元兴奋传递的增加,可能不仅影响了OSAHS患者的微觉醒,而且可能导致血浆食欲素A水平增高。本研究中血浆食欲素A水平与微觉醒指数成正相关符合以上观点。OSAHS患者经过连续CPAP治疗后,暂停低通气指数、微觉醒指数、最低血氧饱和度和平均血氧饱和度等指标明显改善,血浆食欲素A水平显著下降,其机制可能与夜间缺氧改善,交感活动减弱有关,使上述过程得以逆转。

本研究结果表明,食欲素A在调节睡眠-觉醒过程中扮演重要角色,不但可作为评估OSAHS患者病情程度的生物学指标,还可能作为评价CPAP治疗疗效的指标。然而,限于例数,本研究尚未区分中度、重度OSAHS患者组间血浆食欲素A之变化,以及CPAP更长期治疗能否继续明显改善血浆食欲素A水平等问题,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Young T, Palta M, Dempsey J. The occurrence of sleep-disor-

- [4] Wiley A, Katsaros D, Chen H, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in malignant ovarian tumors and in ovarian tumors with low malignant potential [J]. *Cancer*, 2006, 107(2): 299-308.
- [5] Makarla PB, Saboorian MH, Ashfaq R, et al. Promoter hypermethylation profile of ovarian epithelial neoplasms [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(15): 5365-5369.
- [6] Lustig B, Behrens J. The wnt signaling pathway and its role in tumor development [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, 129(4): 199-221.
- [7] Hatle KM, Neveu W, Dienz O, et al. Methylation-controlled J protein promotes c-Jun degradation to prevent ABCB1 transporter expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(8): 2952-2966.
- [8] Collins Y, Diiccio R, Keitz B, et al. Methylation of death-associated protein kinase in ovarian carcinomas [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(Suppl 1): 195-199.
- [9] Wei SH, Balch C, Pak HH, et al. Prognostic DNA methylation biomarkers in ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(9): 2788-2794.

(收稿日期: 2008-05-04; 修回日期: 2008-07-04)

(本文编辑: 黄攸生; 英文编辑: 王建东)

dered breathing among middle-aged adults [J]. *N Engl J Med*, 1993, 328(17): 1230-1235.

- [2] 中华医学会呼吸病分会睡眠呼吸疾病学组. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南(草案) [J]. *中华内科杂志*, 2003, 42(8): 594-597.
- [3] Sakurai T. Orexins and orexin receptors implication in feeding behavior [J]. *Regul Pept*, 1999, 85(1): 25-30.
- [4] Kastin AJ, Akerman V. Orexin-A but not orexin-B rapidly enters brain from blood by simple diffusion [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 289(4): 219-223.
- [5] Chamelier RM, Willie JT, Sinton CN, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation [J]. *Cell*, 1999, 98(3): 437-451.
- [6] Horvath TL, Peyron C, Diano S, et al. Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system [J]. *J Comp Neurol*, 1999, 45(2): 145-159.
- [7] Nishijima T, Sakurai S, Aihara Z, et al. Plasma orexin-A like immunoreactivity in patients with sleep apnea hypopnea syndrome [J]. *Peptides*, 2003, 24(2): 407-441.
- [8] Bayer L, Eggemann E, Serafin M, et al. Orexins (Hypocretins) directly excite tuberomammillary neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 2001, 14(12): 1571-1575.

(收稿日期: 2008-04-10; 修回日期: 2008-08-21)

(本文编辑: 潘雪飞; 英文编辑: 王建东)