

胃癌中 MTS1 基因异常甲基化的研究

全欣鑫¹, 黄志明¹, 周晓东¹, 姚学军²

(1. 中山医科大学孙逸仙纪念医院医学研究中心, 广东 广州 510120; 2. 湖北医科大学病毒研究所, 湖北 武汉 430071)

摘要:【目的】探讨多肿瘤抑制基因(multiple tumor suppressor gene 1, MTS1) 5'端 CpG 岛异常甲基化与原发性胃癌发病机制之间的关系。【方法】PCR 甲基化检测法研究 31 例胃癌标本和 19 例正常胃组织中 MTS1 基因 5'端 CpG 岛异常甲基化情况。【结果】有 35.5%(11/31)的胃癌标本和 5.3%(1/19)正常胃组织出现 MTS1 基因 5'端 CpG 岛异常甲基化, 两者之间有显著性差异($P < 0.05$)。【结论】MTS1 基因 5'端 CpG 岛异常甲基化是其在原发性胃癌中的主要灭活机制, 与胃癌的发生发展密切相关。

关键词: 胃肿瘤; MTS1 基因; 甲基化; 灭活机制

中图分类号: R697.32 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0109-03

Inactivation of the Multiple Tumor Suppressor Gene 1 (MTS1) by *de novo* Methylation in Human Primary Gastric Cancer

QUAN Xin-xin¹, HUANG Zhi-ming¹, ZHOU Xiao-dong¹, YAO Xue-jun²

(1. Lin Bai-xin Research Center Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou 510120 China;

2. Department of Virology, Hubei Medical University, Wuhan 430071, China)

Abstract:【Objective】To study the 5' CpG islands methylation of the multiple tumor suppressor gene 1 (MTS1) gene in human primary gastric cancer. 【Methods】A PCR assay relying on the inability of some restriction enzymes to cut methylated sequences was used to analyze the methylation of the MTS1 gene. 【Results】*de novo* methylation of the MTS1 gene was observed in 11 of 31 (35.5%) primary gastric cancer cases and in 1 of 19 (5.3%) normal gastric mucosa, and there is a significant correlation ($P < 0.05$) between them. 【Conclusion】Our results suggest that *de novo* methylation are predominant inactivation mechanisms of the MTS1 gene and may be associated with pathogenesis of human primary gastric carcinoma.

Key words: gastric carcinoma; MTS1 gene; *de novo* methylation; inactivation

胃癌的发生发展是一个多基因参与的多阶段过程, 其分子生物学水平的发病机制尚不完全清楚。有关近年发现的多肿瘤抑制基因(multiple tumor suppressor gene 1) MTS1 与原发性胃癌的关系有待研究。我们在检测了 MTS1 基因在原发性胃癌中突变缺失的基础上, 进一步研究了胃癌组织中 MTS1 基因 CpG 岛(启动子区富含 C、G 的序列)甲基化的情况。

1 材料与方法

1.1 组织标本

31 例原发性胃癌和 19 例正常胃的组织标本是收集 1997 年 6 月~1998 年 3 月期间湖北医科大学附属第一、第二医院手术切除的标本。切除标本在 1h 内放入液氮或 -70°C 中保存。所有病例均经病理证实。

收稿日期: 2000-03-20

基金项目: 广东省博士后基金资助项目(1999 年)

作者简介: 全欣鑫(1972-), 女, 陕西蒲城人, 医学博士, 博士后, 主治医师, 现在中山医科大学孙逸仙纪念医院博士后流动站工作; 主要研究: ①消化系统肿瘤的发病机制与治疗, ②丙型肝炎病毒的复制机理。

1.2 PCR-SSCP 分析

常规提取组织 DNA 后,用光密度测量法测量 DNA 含量,PCR 扩增 MTS1 基因 α 、 β 型外显子 1 (E1 α 、E1 β)和外显子 2 (E2),引物序列和扩增条件按文献[1, 2]。扩增产物经甲酰胺变性后,5% (v/v)聚丙烯酰胺凝胶电泳 300 V, 1.5 h, 乙醇固定、硝酸脱色,硝酸银染色,在干胶仪上干胶后保存。

1.3 PCR-甲基化检测法

1 μ g 组织 DNA 用 40 U 甲基化敏感酶 (*Hpa* II 37 $^{\circ}$ C 和 *Sma* I 30 $^{\circ}$ C)完全消化 2 h,同时用 40 U 甲基化非敏感酶 (*Msp* I 37 $^{\circ}$ C)消化 2 h 作为对照。消化后的 DNA 进行 MTS1 基因 α 、 β 型外显子 1 (E1 α 、E1 β)的 PCR 扩增,扩增引物和循环条件参见有关文献,产物经 EB 染色,20 g/L 琼脂糖电泳,荧光灯下观察结果。统计学分析采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 MTS1 基因的 PCR-SSCP 分析

对所有 PCR 扩增结果阳性的标本作 SSCP 分析,发现无 1 例标本的 MTS1 基因外显子 1 (E1 α 、E1 β)和外显子 2 (E2)有异常电泳带,提示胃癌组织中未见有该基因的微小突变。

2.2 MTS1 基因异常甲基化情况

MTS1 基因发生异常甲基化的标本,MTS1 序列不能被甲基化敏感酶切割,PCR 扩增 MTS1 基因外显子,产物为阳性,而甲基化非敏感酶则可以切开此序列,PCR 扩增无产物;MTS1 基因没有被异常甲基化的标本用甲基化敏感酶和甲基化非敏感酶均可切割,PCR 扩增 MTS1 基因外显子则均无产物。

2.3 胃癌组织异常甲基化分析

31 例胃癌组织中有 11 例(35.5%)发生 MTS1 基因外显子 1 甲基化,其中 5 例(16.1%)在 *Sma* I 位点发生异常甲基化,另外 6 (19.4%)例在 *Sma* I 和 *Hpa* II 位点均有异常甲基化(图 1); 19 例正常胃粘膜组织中只有 1 例发生 *Sma* I 位点甲基化,胃癌与正常组织之间比较有显著性差异 ($P < 0.05$)(表 1)。

3 讨论

3.1 启动子区 CpG 岛异常甲基化与 mRNA 转录抑制



图 1 胃癌组织 MTS1 基因 PCR-甲基化检测

Fig. 1 PCR-based methylation assay results of MTS1 gene in gastric cancer tissues

M: Marker

1, 3, 5 ~ 9, 16 have no *de novo* methylation of MTS1 gene, so that PCR-based Methylation Assay showed negative PCR productions
2, 4, 10 ~ 15, 17 have hypermethylation of MTS1 gene so that PCR-based Methylation Assay showed positive PCR productions

表 1 原发性胃癌与正常胃粘膜中 MTS1 基因异常甲基化的比较

Table 1 *de novo* methylation of MTS1 gene in primary gastric cancer and normal tissues n (%)

| MTS1 Methylation | Gastric Cancer | Control | χ^2 | P |
|------------------|----------------|----------|----------|--------|
| + | 11(35.5) | 1(5.3) | 4.36 | < 0.05 |
| - | 20(64.5) | 18(94.7) | | |
| Total | 31 | 19 | | |

肿瘤组织 DNA 常常有异常甲基化的作用,包括与细胞增殖周期密切相关的癌基因低甲基化和抑癌基因高甲基化改变,这些异常甲基化改变一方面可激活癌基因,另一方面可使抑癌基因由于 5'端启动子调控区 CpG 岛异常高甲基化而抑制 mRNA 转录作用^[3, 4],导致该基因的失活。

3.2 MTS1 基因 CpG 岛异常甲基化是其在胃癌中的主要灭活机制

多肿瘤抑制基因 MTS1 在人的众多类型的恶性肿瘤中有高频率的变异,包括突变、缺失甲基化^[5, 6]、染色体易位等,这些变异导致该基因的正常抑制细胞增殖的功能丧失(即灭活或失活)与癌的发生发展密切相关。但 MTS1 基因在原发性胃癌中的变异情况却报道较少,并且缺失率较低,没有发现突变的存在,提示可能 MTS1 基因在胃癌组织中有其他的失活机制^[7]。为探讨抑癌基因 MTS1 与原发性胃癌的关系及其在胃癌中的灭活机制,我们在用 PCR-SSCP 法研究了胃癌组织中 MTS1 基因突变缺失的基础上,首次检测了胃癌和

正常胃粘膜组织中 MTS1 基因 5' 端 CpG 岛异常甲基化的情况。CpG 岛为启动子区一段富含 C 和 G 的序列, 该序列的甲基化状态与其转录水平密切相关。CpG 岛的高甲基化可抑制该基因的转录。抑癌基因启动子区 CpG 岛如存在异常高甲基化, 则可能由于该基因的转录抑制而导致功能失活。本检测结果发现 35.5% 的原发性胃癌有 MTS1 基因 5' 端 CpG 岛异常甲基化现象, 与正常胃组织相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明胃癌中有 MTS1 基因的变异, 5' 端 CpG 岛异常甲基化是其在胃癌中的主要失活机制。

3.3 PCR-甲基化检测法的影响因素

PCR-甲基化检测法^[8]的原理是根据一些限制性内切酶的识别位点都包含 CG, 如果 C 被甲基化后, 切割作用则不能产生。PCR 扩增这一序列, 未被切割的为扩增阳性, 反之则为阴性。甲基化敏感酶 *Hpa* II 和 *Sma* I 只能切割 CCGG 和 CCCGGG 序列, 而不能切割 CmCGG 和 CCmCGGG 序列; 甲基化非敏感酶 *Mps* I 则可切割 CCGG 和 CmCGG 序列而作为对照。此法检测序列 5' 端 CpG 岛异常甲基化现象灵敏度高, 但可能由于酶切不完全而出现假阳性。本研究用过量的酶量(每 1 μ g DNA 加 40 U 酶)完全消化组织 DNA 以避免出现假阳性结果。实验结果表明在胃癌中 MTS1 基因甲基化的序列主要在 CmCGG 和 CCmCGGG。

本实验: ①首次检测了原发性胃癌和正常胃粘膜组织中 MTS1 基因 5' 端 CpG 岛异常甲基化的情况; ②首次发现 35.5% 的胃癌有 MTS1 基因异常甲基化, 与正常胃组织相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 认为 MTS1 基因甲基化与原发性胃癌的发生发展密切相关, CpG 岛异常甲基化是 MTS1 基因在胃癌中的主要失活机制; ③胃癌中 MTS1 基因甲基化的序列主要为 CmCGG 和 CCmCGGG。

参考文献:

- [1] Kamb A, Gruis N A, Weaver-Feldhaus J, *et al* . A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J] . *Science*, 1994, 264(15): 436.
- [2] Mao L, Merio A, Bedi G, *et al* . A novel p16^{INK4A} transcript[J] . *Cancer Res*. 1995, 55: 2995.
- [3] Costello J F, Berger M S, Huang H S, *et al* . Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation[J] . *Cancer Res*. 1996, 56: 2405.
- [4] Gonzalez-Zulueta M, Bender C M, Yang A S, *et al* . Methylation of 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing[J] . *Cancer Res*. 1995, 55: 4531.
- [5] Herman J G, Merlo A, Mao L, *et al* . Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers [J] . *Cancer Res*. 1995, 55: 4525.
- [6] Reed A L, Califano J, Cairns P, *et al* . High frequency of p16 (CDKN2/MTS1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma[J] . *Cancer Res*. 1996, 56: 3630.
- [7] Sakata K, Tamura G, Maesawa C, *et al* . Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 9 without p16 gene mutation in gastric carcinomas[J] . *Jpn J Cancer Res*, 1995, 86(12): 333.
- [8] Maesawa C, Tamura G, Nishizuka S, *et al* . Inactivation of the CDKN2 gene by homozygous deletion and *de novo* methylation is associated with advanced stage esophageal squamous cell carcinoma[J] . *Cancer Res*, 1996, 56: 3875.

(编辑 关淡庄)