

贲门腺癌中 TGF-β1 型受体启动子区甲基化状态分析

郭 炜¹, 郭艳丽¹, 杨植彬¹, 邝 钢¹, 乔义岭², 董稚明¹

Promoter Methylation of Transforming Growth Factor-beta Receptor Type 1 Gene and Expression of TGF-β1 in Gastric Cardia Adenocarcinoma

GUO Wei¹, GUO Yan-li¹, YANG Zhi-bin¹, KUANG Gang¹, QIAO Yi-ling², DONG Zhi-ming¹

1. Hebei Cancer Institute, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. Division of Medical Affairs, Hebei Youfu Hospital

Corresponding Author: DONG Zhi-ming, E-mail: dddzzzmmm@yahoo. com. cn

Abstract: Objective To investigated the relationships between the promoter methylation of transforming growth factor-beta receptor type 1 gene (TGFBR1) and protein expression of TGF-β1 and gastric cardia adenocarcinoma (GCA). **Methods** MSP approach, RT-PCR and immunohistochemistry methods were used respectively to examine the methylation status of the 5' CpG island, mRNA and protein expression of TGFBR1 and TGF-β1 in tumors and corresponding normal tissues. **Results** The prevalence TGFBR1 methylation was 34 /110 (30. 9%) in tumor specimens, and significantly higher than that in corresponding normal tissues($P<0. 01$). Methylation frequencies of stage III and IV tumor tissues were significantly higher than those in stage I and II tumor tissues($P<0. 05$). TGFBR1 mRNA and protein expression of tumor tissues were significantly lower than that in corresponding normal tissues and was correlated with its methylation status. 72/110 (65. 5%) tumor tissues were demonstrated positive immunostaining of TGF-β1 and the frequency of positive protein expression of TGF-β1 was significantly higher than that in corresponding normal tissues($P<0. 01$). The protein expression of TGF-β1 was significantly different among three differentiation groups of GCA($P<0. 05$). The protein expression of TGFBR1 was inversely correlated with TGF-β1 in GCA. **Conclusion** Promoter hypermethylation of TGFBR1 and the higher protein expression of TGF-β1 might play important roles in gastric cardia adenocarcinoma.

Key words: Gastric cardia adenocarcinoma; DNA methylation; TGFBR1 gene; TGF-β1 gene

摘要:目的 探讨贲门腺癌(gastric cardia adenocarcinoma, GCA)中 TGF-β1 型受体(transforming growth factor-beta receptor type 1 gene, TGFBR1)启动子区的甲基化状态及其与 TGF-β1 蛋白表达之间的相关性。**方法** 分别应用甲基化特异性 PCR(MSP)方法、RT-PCR 方法和免疫组织化学法检测贲门腺癌组织及相应癌旁组织的 TGFBR1 甲基化情况、mRNA 和蛋白表达情况,应用免疫组织化学法检测相应 TGF-β1 的蛋白表达情况。**结果** TGFBR1 在贲门腺癌组织的甲基化率为 30. 9%(34/110),显著高于癌旁正常组织($P<0. 01$)。Ⅲ期和Ⅳ期贲门癌患者中 TGFBR1 基因发生甲基化的比率显著高于Ⅰ期和Ⅱ期患者($P<0. 05$)。贲门癌组织中 TGFBR1 基因的 mRNA 及蛋白表达显著低于癌旁正常组织($P<0. 05$)且与其甲基化状态之间有明显的相关性。TGF-β1 在贲门癌组织中的表达(65. 5%)明显升高,与相应癌旁正常组织相比差异有统计学意义($P<0. 01$),且随肿瘤分期的增高和肿瘤分化程度的降低,TGF-β1 的阳性表达率明显升高($P<0. 05$)。TGFBR1 和 TGF-β1 蛋白在贲门腺癌中的表达呈明显的负相关。**结论** TGF-β1 型受体基因启动子区的高甲基化及其 TGF-β1 的过表达可能参与了贲门腺癌的发生发展过程,

收稿日期:2010-05-05;修回日期:2010-11-12
基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划资助项目(20090465)
作者单位:1. 050011 石家庄,河北医科大学第四医院河北省肿瘤研究所;2. 河北省优抚医院医务处
通信作者:董稚明, E-mail: dddzzzmmm@yahoo. com. cn
作者简介:郭炜(1973-),女,硕士,副教授,主要从事肿瘤分子病因学的研究

TGF-β1 型受体基因启动子区发生甲基化导致的基因沉默可能是贲门腺癌发生的机制之一。
关键词:贲门腺癌;DNA 甲基化;TGF-β1 型受体;TGF-β1 基因
中图分类号:R735. 2 文献标识码:A
文章编号:1000-8578(2011)05-0524-04

0 引言

转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)信号通路在多种肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[1]。TGF- β 信号的转导有赖于 TGF- β 受体的存在,研究表明,TGF- β 受体的表达缺失是肿瘤发生的一个重要原因,TGF- β 1 型受体(TGFBR1)在某些肿瘤中可发生启动子区高甲基化从而导致其失去活性^[2-4],但 TGFBR1 在贲门腺癌中的甲基化状态国内外尚未见报道。本研究拟检测贲门腺癌中 TGFBR1 基因的甲基化状态及其与 TGF- β 1 蛋白表达的相关性,并结合临床资料探讨其与各种指标之间的关系,以期对 TGFBR1 基因甲基化及其 TGF- β 1 蛋白的过表达在贲门腺癌发生发展中的作用有更深入的认识。

1 材料与方法

1.1 研究对象和标本来源

研究对象均来自河北医科大学第四医院 2004-2007 年间的贲门癌手术患者,共 110 例,其中男 85 例,女 25 例,年龄范围 38~78 岁,平均年龄 58.2 岁。每例患者均取癌旁正常黏膜及贲门癌原发灶,全部患者术前均未经化疗和放疗。手术切除标本一部分于-80℃冻存用于 RNA 的提取,一部分以 10%中性甲醛溶液固定,常规制作蜡块保存,用于 DNA 的提取和免疫组织化学染色。肿瘤组织及癌旁组织均经常规病理诊断证实,按照国际抗癌联盟(UICC)标准进行 TNM 分期。

1.2 方法

1.2.1 甲基化特异性 PCR(MSP)方法检测 TGFBR1 的甲基化状态 每个标本均取 10 μ m 石蜡切片 10~20 片,按常规蛋白酶 K 消化,酚/氯仿抽提法提取癌组织和癌旁正常组织基因组 DNA。用于检测 TGFBR1 甲基化的引物为 5'-ACCCTCCGAAAC-TAACGACTAAACGA-3' (上游引物)和 5'-CG-GTTTTTGGTTACG TTTTACGTTTTT-3' (下游引物) (142 bp);用于检测 TGFBR1 非甲基化的引物为 5'-CAACCCTCCAAAATAACAATA-AACAA-3' (上游引物)和 5'-TGTTGGTTTTTG-GTTA TGTTTTATGTTTTT-3' (下游引物) (147 bp)。反应条件为 94℃ 预变性 10 min 后,94℃ 变性 45 s,52℃ (甲基化扩增)或 60℃ (非甲基化扩增)退火 45 s,72℃ 延伸 60 s,35 个循环后,72℃ 继续延伸 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,用 UV 凝胶电泳成像及图像分析系统进行图像分析。MSP 阳性对照采用基因组 DNA 经甲基化酶 (Sss I) (New England BioLabs, Inc., Beverly,

MA)处理以后进行 PCR,阴性对照用灭菌双蒸水取代 DNA 模板进行 PCR。为进行 MSP 检测的质量控制,随机选取 10% 标本进行重复实验。

1.2.2 RT-PCR 检测 TGFBR1 基因的 mRNA 表达 按 Trizol(Invitrogen 公司)试剂说明书提取总 RNA,并参照反转录试剂盒说明书(Reverse Transcription System A3500, Promega 公司)的比例加样,将 RNA 反转录成 cDNA。TGFBR1 的上游引物为 5'-GGAGAAGAAGTTGCTGTTAAG-3',下游引物为 5'-ATGGTATCTGTGG CTGAATC-3',产物大小为 419bp。GAPDH 作为内参照,其上游引物为 5'-GGGAAACTGTGGCGTGAT-3',下游引物为 5'-GTGGTCGTTGAGGGCAAT-3',产物大小为 342 bp。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,采用 Gel work-2ID 软件,对电泳图像中 TGFBR1 的表达进行半定量研究。以 TGFBR1 条带的吸光度值与 GAPDH 条带的吸光度值的比值作为参数,该值表示 TGFBR1 基因的相对表达强度,并重复三次取平均值。

1.2.3 免疫组织化学方法检测 TGFBR1 和 TGF- β 1 的蛋白表达 石蜡切片常规脱蜡至水,3% 甲醇 H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶,微波修复 15 min。依次加入一抗即兔抗人 TGFBR1 多克隆抗体(sc-398, Santa Cruz)或兔抗人 TGF- β 1 多克隆抗体(sc-146, Santa Cruz)及相应生物素化二抗和辣根过氧化物酶标记的三抗,DAB 显色,苏木精对比染色细胞核,常规脱水,透明,中性树胶封片。PBS 取代一抗作为空白对照,其余步骤同上。正常胃黏膜组织作为 TGFBR1 表达的阳性对照,乳腺癌组织作为 TGF- β 1 表达的阳性对照。

1.3 统计学方法

数据统计分析采用 SPSS 11.5 软件包进行。计数资料采用 χ^2 和校正 χ^2 检验,计量资料采用 *t* 检验,相关性分析采用 Spearman 分析,双侧检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 贲门腺癌中 TGFBR1 基因甲基化状态

全部 110 例贲门腺癌组织及相应癌旁组织均成功进行了 MSP 分析,见图 1。癌组织 TGFBR1 基因甲基化率(34/110,30.9%)显著高于癌旁正常组织(2/110,1.8%) (*P* < 0.01)。按照 TNM 分期进行统计分析,Ⅲ期和Ⅳ期贲门癌患者中 TGFBR1 基因发生甲基化的比率显著高于Ⅰ期和Ⅱ期患者(χ^2 = 6.51, *P* = 0.01)。按照贲门癌的病理分级进行统计分析,高、中、低分化肿瘤组发生甲基化的比例差

异无统计学意义($\chi^2=0.72,P=0.69$),见表 1。

表 1 贲门癌患者 TGFBR1 基因甲基化、蛋白表达以及 TGF- β 1 蛋白表达分析结果
Table 1 Methylation status, immunohistochemical staining characteristics of TGFBR1 and immunohistochemical staining characteristics of TGF- β 1 in GCA patients

Items	Methylation status of TGFBR1		<i>P</i>	Protein expression of TGFBR1		<i>P</i>	Protein expression of TGF-β1		<i>P</i>
	M	U		-	+		-	+	
TNM stages									
I	1	6		3	4		5	2	
II	8	34		27	15		17	25	
III	17	29		37	9		14	32	
IV	8	7	0, 011 ^a	13	2	0, 015 ^a	2	13	0, 041 ^a
Pathological differenti- ation of tumor									
Well	13	34		31	16		23	24	
Moderate	12	27	0, 697 ^b	30	9	0, 380 ^b	12	27	0, 008 ^b
Poor	9	15		19	5		3	21	

Note: a: P value of stage III and IV patients against stage I and II patients; b: P value among three differentiation groups

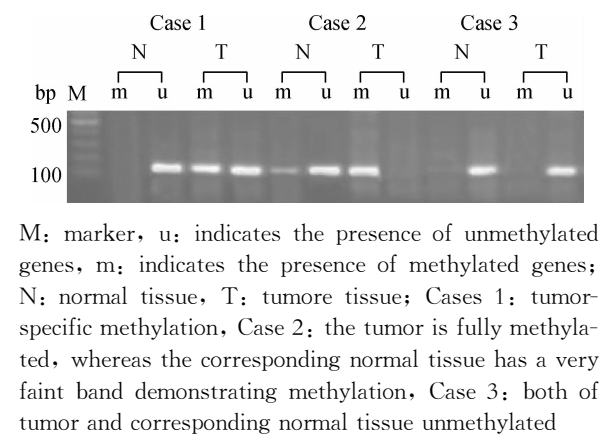


图 1 TGFBR1 基因甲基化分析
Figure 1 Methylation analysis of TGFBR1 in tumor tissue and corresponding normal tissue

2.2 贲门腺癌中 TGFBR1 基因 mRNA 检测情况

在 58 例贲门癌组织及相应的癌旁组织中检测了 TGFBR1 的 mRNA 表达情况,见图 2。贲门癌组织中 TGFBR1 基因的 mRNA 表达显著低于相应的癌旁组织[OD: (0.4015 ± 0.1758) vs. (0.9064 ± 0.2925), $P<0.01$],甲基化阳性的贲门癌组织其 mRNA 表达显著低于未发生甲基化的贲门癌组织 (OD: 0.1816 ± 0.0816 vs. 0.6514 ± 0.2187, $P<0.01$)。TGFBR1 基因启动子区的甲基化与其在 mRNA 水平上的表达缺

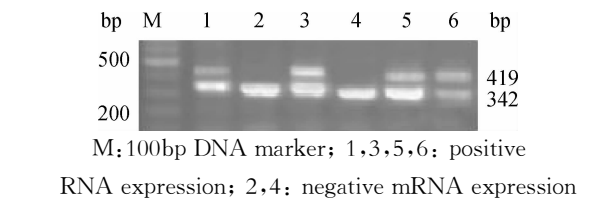


图 2 TGFBR1 RT-PCR 分析
Figure 2 RT-PCR analysis of TGFBR1

失有明显的相关性($P<0.01$)。

2.3 贲门腺癌中 TGFBR1 基因蛋白表达情况

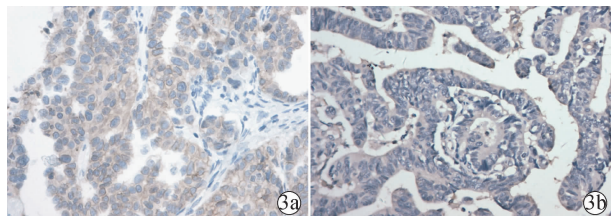
TGFBR1 蛋白免疫组织化学染色为胞膜及胞质着色,见图 3。贲门癌组织的蛋白表达阳性率为 27.3%(30/110),而相应的癌旁正常组织的蛋白表达均呈阳性(100%),两者相比差异有统计学意义($P<0.01$)。Ⅲ期和Ⅳ期贲门癌患者 TGFBR1 基因蛋白表达显著低于Ⅰ期和Ⅱ期患者($\chi^2=5.89,P=0.01$)。高中低分化癌组的蛋白表达率差异无统计学意义($\chi^2=1.93,P=0.38$)。发生 TGFBR1 高甲基化的肿瘤组织蛋白表达均为阴性,TGFBR1 基因启动子区的甲基化与其蛋白表达缺失有明显的正相关性($P<0.01$)。

2.4 贲门腺癌中 TGF- β 1 基因蛋白表达情况及与 TGFBR1 的关系

TGF- β 1 蛋白免疫组织化学染色为胞质着色,见图 3。TGF- β 1 在贲门癌组织的蛋白表达阳性率(72/110,65.5%)显著高于相应的癌旁正常组织(17/110,15.5%)($P<0.01$)。Ⅲ期和Ⅳ期贲门癌患者 TGF- β 1 的蛋白表达显著高于Ⅰ期和Ⅱ期患者($\chi^2=4.19,P=0.04$),且随肿瘤分化程度的降低,TGF- β 1 在贲门腺癌组织中的阳性表达率明显升高($\chi^2=9.71,P<0.01$),见表 1。贲门癌中 TGFBR1 与 TGF- β 1 的蛋白表达之间呈明显的负相关($r=-0.75,P<0.05$),34 例发生 TGFBR1 甲基化的贲门癌组织有 30 例 TGF- β 1 蛋白表达阳性,两者呈明显的正相关性。

3 讨论

TGF- β 家族通过 TGF- β /Smad 信号转导通路



3a: positive staining of TGFBR1 in GCA tissue;

3b: positive staining of TGF-β1 in GCA tissue

图 3 TGFBR1 和 TGF-β1 的蛋白表达 (SP × 200)

Figure 3 Protein expression of TGFBR1 and TGF-β1 (SP × 200)

发挥重要的生物学效应, TGF-β 超家族成员通过膜受体介导将信号传入细胞内。TGF-β 受体根据相对分子质量大小可分为三类: I 型 (50~60kD)、II 型 (75~85kD) 和 III 型 (280kD), I、II 型受体是参与 TGF-β 信号转导的主要分子。TGFBR1 分子是 TGF-β 抗增殖信号的最初转导者, 在恶性转化和对 TGF-β 抗增殖效应散失之间有一个很强的相关性, 并且常常与 TGF-β 受体的表达降低或失活相联系。TGFBR1 在头颈部鳞癌和胃癌中可发生启动子区高甲基化从而导致其失去活性^[2-4], 但其在贲门腺癌中的甲基化状态研究较少。我们发现 TGFBR1 基因在贲门腺癌组织中可发生高频率的甲基化 (30.9%), 并有相应的蛋白表达缺失, 提示由于 TGFBR1 基因启动子区发生甲基化导致的基因沉默可能是贲门腺癌中此基因失活的重要原因之一。

本研究发现, 发生 TGFBR1 高甲基化的贲门癌组织其蛋白表达均为阴性, 与 Zhang^[5] 和 Jonson^[6] 等的研究结果相似, 提示贲门腺癌中 TGFBR1 的表达缺失与其甲基化密切相关。但一些未发生 TGFBR1 甲基化的贲门腺癌组织其蛋白表达仍可呈阴性, 究其原因, 另一种表遗传学的改变即组蛋白乙酰化可能也与 TGFBR1 的表达缺失有关, Ammanamanchi^[7] 等研究发现通过抑制乳腺癌细胞株 TGFBR1 的组蛋白去乙酰化可恢复其表达, 另外, Chen^[8] 等报道了乳腺癌淋巴结转移患者 (5/12) 的 TGFBR1 基因密码子 387 中碱基 C 突变为 A, 使丝氨酸被苏氨酸替代, 提示 TGFBR1 的突变与肿瘤的转移密切相关。

在正常情况下, TGF-β 作用于多种上皮细胞、肿瘤细胞的 G₁ 期, 使细胞停滞于 G₁ 期从而抑制细胞增殖, 诱导其分化或凋亡。但在肿瘤发生发展中 TGF-β 的作用却是双重的: 即在肿瘤发生早期, 细胞对 TGF-β 的抗增殖效应有反应, TGF-β 作为肿瘤的抑制物, 起着抑制肿瘤的作用; 随着肿瘤的发生发展, 其表达及激活发生变化, TGF-β 受体或受体后

水平信号 Smads 缺陷以及下游底物血管内皮生长因子表达改变等任一异常情况的出现, 均可使肿瘤细胞失去对 TGF-β 的敏感度而发生不受控的异常增殖, 肿瘤细胞亦增加了 TGF-β 的分泌, 使其迁移并侵袭正常组织, 细胞呈现恶性增殖现象^[9]。本研究发现, 贲门腺癌中 TGF-β1 的蛋白表达明显升高, 并且随着肿瘤分期的增高和分化程度的降低, 其表达也明显升高, 提示 TGF-β1 与贲门癌的发生发展浸润转移密切相关。另外, 贲门腺癌中 TGFBR1 和 TGF-β1 的蛋白表达呈负相关, 且发生 TGFBR1 甲基化的贲门癌组织多数表现为 TGF-β1 的阳性表达, 提示由于 TGFBR1 的高甲基化导致其蛋白表达降低从而导致了 TGF-β/Smad 信号转导通路的阻滞, 使得肿瘤细胞逃脱 TGF-β 的抑制作用而有利于肿瘤的发生发展, 同时肿瘤细胞在肿瘤的发展过程中增加了 TGF-β 的分泌, 促使肿瘤迁移。

参考文献:

- [1] Bieri B, Moses HL. TGF-beta and cancer [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2006, 17(1-2): 29-40.
- [2] Muñoz-Antonia T, Torrellas-Ruiz M, Clavell J, et al. Aberrant methylation inactivates transforming growth factor Beta receptor I in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Int J Otolaryngol, 2009, 2009:848695.
- [3] Pinto M, Oliveira C, Cirnes L, et al. Promoter methylation of TGFbeta receptor I and mutation of TGFbeta receptor II are frequent events in MSI sporadic gastric carcinomas [J]. J Pathol, 2003, 200(1):32-8.
- [4] Kang SH, Bang YJ, Im YH, et al. Transcriptional repression of the transforming growth factor-beta type I receptor gene by DNA methylation results in the development of TGF-beta resistance in human gastric cancer [J]. Oncogene, 1999, 18(51): 7280-7286.
- [5] Zhang Q, Rubenstein JN, Jang TL, et al. Insensitivity to transforming growth factor-beta results from promoter methylation of cognate receptors in human prostate cancer cells (LN-CaP) [J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(9):2390-2399.
- [6] Jonson T, Albrechtsson E, Axelson J, et al. Altered expression of TGFβ receptors and mitogenic effects of TGFβ in pancreatic carcinomas [J]. Int J Oncol, 2001, 19(1):71-81.
- [7] Ammanamanchi S, Brattain MG. Restoration of transforming growth factor-beta signaling through receptor RI induction by histone deacetylase activity inhibition in breast cancer cells [J]. J Biol Chem, 2004, 279(31):32620-32625.
- [8] Chen T, de Vries EG, Hollema H, et al. Structural alterations of TGFβ receptor genes in cervical carcinoma [J]. Int J Cancer, 1999, 82(1): 43-51.
- [9] Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-β signaling in tumor suppression and cancer progression [J]. Nat Genet, 2001, 29(2):117-129.

[编辑:安 凤;校对:黄国玲]