doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.07.020

• 临床研究 •

新疆哈萨克族与汉族食管鳞癌中smad4基因启动子甲基化的状态及意义

康 雪[1], 齐翠花[1], 韩玉胜[2], 张 娟[3], 刘 芳[1], 刘晓燕[1], 李 睿[1], 郑 勇[1], 陈卫刚[1]

Significance and Status of smad4 Promoter Methylation in the Hans and Kazaks with Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Xinjiang

KANG Xue[1],QI Cuihua[1],HAN Yusheng[2],ZHANG Juan[3],LIU Fang[1],LIU Xiaoyan[1],LI Rui[1], ZHENG Yong[1],CHEN Weigang[1]

1.Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Medical College in Shihezi University,Shihezi 832000,China;2.Department of Gastroenterology, Friendship Hospital of Yili;3.Department of Gastroenterology,The Fourth Hospital of Xinjiang Production and Construction Corps

Corresponding Author:CHEN Weigang,E-mail:cwg_sh@126.com

Abstract: Objective To investigate the level and significance of smad4 promoter methylation in the Hans and the Kazaks with esophageal squamous cell carcinoma in Xinjiang. **Methods** We collected 37 cases of ESCC and 33 cases of local normal esophageal tissues of the Kazaks, and 31 cases of ESCC and 33 cases of local normal esophageal tissues of the Hans. Mass ARRAY methylation DNA quantitative analysis technology was used to detect the methylation status of smad4 gene promoter in ESCC. **Results** The average methylation rates of smad4 gene promoter CpG units were 3.4% in esophageal cancer in the Hans and 2.8% in relevant control group, 3.4% in esophageal cancer in the Kazaks and 2.5% in relevant control group, with no statistically significant difference (P>0.05). The average methylation rates of CpG-15 and CpG-27(4.7%, 4.9%) in smad4 gene in the Hans with ESCC were significantly higher than those in relevant control group (2.8%, 3.5%). The average methylation rates of CpG-1, CpG-16-19, CpG-27-28, CpG-31-33(1.7%, 4.5%, 4.9%, 6.8%) in smad4 gene in the Kazaks with ESCC were significantly higher than those in relevant control group (0.7%, 2.2%, 3.0%, 5.5%). The average methylation rates of CpG-6 in the Kazaks with ESCC and relevant control group (1.9%, 1.1%) were significantly higher than that in the Hans with ESCC(0.4%), with statistically significant difference (P<0.05). **Conclusion** Smad4 gene promoter hypermethylation may participate in the occurrence of ESCC. Hypermethylation of CpG-15 and CpG-27 in smad4 gene promoter may closely relate with the occurrence of ESCC in the Hans. Hypermethylation in CpG-1, CpG-16-19, CpG-27-28 and CpG-31-33 may closely relate with the occurrence of ESCC in the Kazaks. Hypermethylation in CpG-6 may result in higher incidence of ESCC in the Kazaks than that in the Hans.

Key words: Esophageal squamous cell carcinoma;Smad4 gene;Methylation;The Kazaks

摘 要：目的 研究新疆汉族与哈族(哈萨克族)食管鳞癌中smad4基因启动子区的甲基化水平及意义。**方法** 收集哈族食管癌组织37例和正常对照组织33例；汉族食管癌组织31例和正常对照组织33例。应用Mass ARRAY甲基化DNA定量分析技术对食管组织中smad4基因启动子区的甲基化水平行定量分析。**结果** 汉族与哈族食管癌组和对照组中smad4基因启动子区的平均甲基化率分别为3.4%和2.8%、 3.4%和2.5% ，差异均无统计学意义(P>0.05)。smad4基因启动子区CpG-15、CpG-27在汉族食管癌中的平均甲基化率(4.7%、4.9%)明显高于对照组 (2.8%、3.5%)；CpG-1、CpG-16-19、CpG-27-28、CpG-31-33在哈族食管癌中的平均甲基化率(1.7%、4.5%、4.9%、6.8%)明显高于哈族对照组(0.7%、2.2%、3.0%、5.5%)，CpG-6在哈族食管癌和正常组织中的平均甲基化水平(1.9%、 1.1%)均明显高于汉族食管癌组(0.4%)，差异均有统计学意义(P<0.05)。**结论** (1)smad4基因启动子区的高甲基化可能参与了食管癌的发生。(2)smad4基因启动子区CpG-15、CpG-27的高甲基化可能与汉族食管癌发生关系密切；而CpG-1、CpG-16-19、CpG-27-28、CpG-31-33的高甲基化可能是新疆哈族食管癌高发的原因；smad4基因启动子区CpG-6的高甲基化可能导致哈族食管癌较汉族食管癌高发。

关键词： 食管鳞癌；smad4基因；甲基化；哈萨克族

中图分类号： R735.1

文献标识码： A

收稿日期： 2013-09-05；**修回日期：** 2013-12-10

基金项目： 国家自然科学基金资助项目(81260362)；石河子大学医学院基础与临床医学联合科研基金资助项目(LHJJ2010B04)

作者单位： 1. 832000 新疆石河子，石河子大学医学院第一附属医院消化内科；2.伊犁友谊医院消化内科；3.新疆生产建设兵团农四师医院消化内科

通信作者： 陈卫刚，E-mail:cwg_sh@126.com

作者简介： 康雪（1987-），女，硕士在读，主要从事消化系统肿瘤的研究

0　引言

我国是食管癌发病率和死亡率最高的国家，新疆是我国食管癌高发区之一，而在新疆居住的13个民族中哈族食管癌的发病率（155.9/10万）[1]和死亡率（68.88/10万）[2]均高于其他民族。目前认为哈族食管鳞癌的高发主要与其特殊的饮食生活习惯如大量饮酒、喝热奶茶、酸奶疙瘩、饮食快、饮食粗糙等相关[3]。

smad4基因是由Hahn发现的[4]，该基因是定位于胰腺癌染色体18q21.1上的一种抑癌基因。抑癌基因启动子区CPG岛发生高甲基化是基因失活的重要机制，而基因失活可导致肿瘤的发生[5]。

1　资料和方法

1.1　临床资料

组织标本来源于2009年1月—2011年12月新疆哈萨克自治州新源县人民医院就诊的食管癌患者，由新疆石河子大学医学院第一附属医院经内镜病理诊断为食管鳞癌，其中哈族食管鳞癌和正常食管组织分别为37和33例；汉族食管鳞癌和汉族正常食管组织分别为31和33例。所有患者均未行放 、化疗和手术治疗。其中男66例，女68例，年龄分布30~80岁，中位年龄55岁。组织学分级高、中、低分化食管鳞癌分别为21、25、22例。

1.2　方法

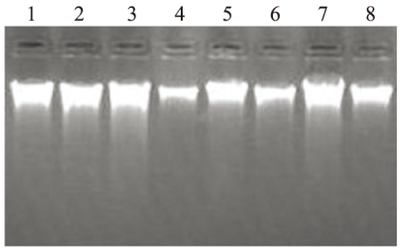
1.2.1　引物设计　内参β-actin引物由上海生工生物有限公司设计合成，甲基化引物使用Sequenom公司Epidesigner设计软件对smad4基因启动子区CpG片段扫描、设计引物。引物扩增片段为320 bp，见表1。引物序列用PCR扩增，在正向引物5’端加入10mertag，用于平衡PCR反应条件；反向引物5’端加入T7-Promoter 序列，用于后续的体外转录。

表1　smad4基因甲基化引物序列

Table1　The primer sequences of smad4 gene methylation

Genes	Sequences	Sizes
SMAD4-F	aggaagagag AGTTTAGGGGAGAGTAGGAAGGGT	320bp
SMAD4-R	cagtaatacgactcactatagggagaaggct AAACCCAAATCCAAATTCAAAAC	

1.2.2　DNA提取　取50 mg组织标本，研磨成粉末状，加入裂解液、蛋白酶K等，56℃过夜，第二天用QIAGEN DNA提取试剂盒提取DNA并收集约50 μg DNA样本，内参β-actin 用于检测DNA，所有DNA应用分光光度计定量，电泳主带明显没有降解，浓度高于75 ng/μl，总量不小于2 μg，A_{260}/A_{280}=1.7~2.1，质检合格DNA样本于–20℃冰箱保存，见图1。



1-8:esophageal squamous cell carcinoma tissues of the Kazaks

图1　哈萨克族食管癌组织中DNA提取

Figure1　DNA extraction from the ESCC tissues of the Kazaks

1.2.3　DNA样本亚硫酸处理、PCR扩增　DNA样本亚硫酸处理应用EZ DNA Methylation-Gold Kit，ZYMO试剂盒, PCR扩增应用PCR Accessory Set试剂盒，将5'-primer-(T7)primer混合成primer MAX使用，终浓度为1 μmol/L。

1.2.4　碱性磷酸酶处理及体外转录、RNase酶切、纯化、点样及质谱分析　应用MassCLEAVE Kit试剂盒对样本进行碱性磷酸酶处理及体外转录和RNase酶切。应用Mass ARRAY Nanodispenser RS1000点样仪将纯化后的产物点至384格式的SpectroCHIP芯片上，最后将芯片放入Mass ARRAY Compact System进行检测。SpectroCHIP芯片使用MALDI-TOF基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱分析技术，通过EpiTYPER软件完成数据分析。

1.3　统计学方法

应用SPSS17.0统计学软件对数据进行分析，两独立样本Wilcoxon秩和检验对两样本间甲基化率进行比较，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　食管癌组织smad4基因启动子区总体平均甲基化率的比较

汉族食管癌组和对照组、哈族食管癌组和对照组中smad4基因启动子区平均甲基化率分别为3.4%和2.8%(P=0.488)、3.4%和2.5% (P=0.271)，差异均无统计学意义。

2.2　食管癌组织smad4基因启动子区不同CPG位点甲基化率比较

smad4基因启动子区CpG-15、CpG-27的平均甲基化率在汉族食管癌中（4.7%、4.9%）明显高于正常对照组（2.8%、3.5%）（P= 0.018、0.045）；CpG-1、CpG-16-19、CpG-27-28、CpG-31-33在哈族食管癌中的平均甲基化率（1.7%、4.5%、4.9%、6.8%）明显高于正常对照

组的（0.7%、2.2%、3.0%、5.5%）（*P*=0.028、0.001、0.007、0.012），CpG-6在哈族食管癌中的平均甲基化水平（1.9%）明显高于汉族食管癌（0.4%）（*P*=0.000）；CpG-14在哈族正常组织中的平均甲基化水平（6.2%）与在汉族正常组织中的甲基化水平也有差异（7.3%）(*P*=0.021)；CpG-6、CpG-15、CpG-16-19、CpG-27-28、CpG-31-33在哈族正常组织中的平均甲基化率（1.1%、3.1%、2.2%、3.1%、5.5%）与在汉族食管癌组织中的平均甲基化率的差异（0.4%、4.8%、4.1%、4.9%、7.6%）也有统计学意义（*P*=0.035、0.025、0.006、0.004、0.025），见表2。

2.3 不同分化程度和性别食管癌组织中smad4基因启动子区CPG位点平均甲基化率比较

smad4基因在汉族、哈族食管鳞癌组织中的不同的分化程度的平均甲基化率的差异有统计学意义，且随分化程度增高甲基化率降低。但smad4基因在汉族、哈族食管癌组织不同性别中的甲基化率的差别没有统计学意义，见表3~4。

表3 食管癌患者smad4基因启动子区总甲基化率在不同分化程度之间的差异

Table3 Differences of total methylation rates of smad4 gene promoters at different differentiated degrees in esophageal cancer patients

Groups	Well	Moderately	Poorly	Chi-Square	*P*
Kazakh ESCC	10	16	11	7.129	0.028
Han ESCC	11	10	10	6.675	0.036
Kazakh and Han ESCC	21	25	22	13.802	0.001

Notes:rank-sum test of independent samples of three groups;ESCC: esophageal squamous cell carcinoma

表4 食管癌患者smad4基因启动子区总甲基化率在不同性别之间的差异

Table4 Differences of total methylation rates of smad4 gene promoters in different gender of esophageal cancer patients

Groups	Male	Female	Mann-Whitney U	*P*
Kazakh ESCC	18	19	158.000	0.693
Han ESCC	14	17	110.000	0.721
Kazakh and Han ESCC	32	36	535.000	0.614

Notes:rank sum test of two independent samples

3 讨论

遗传学和表观遗传学的改变是影响肿瘤形成的两大机制，DNA甲基化是一种重要的表观遗传学现象。DNA启动子区高甲基化存在于多种肿瘤中，可作为肿瘤诊断、预防、治疗、预后判断的指标[6-8]。在食管鳞癌中也存在多种基因的异常甲基化，如P16、MGMT、Hmlh1、RASSF1A、hMSH2、RIZ1[9-11]等，均说明基因异常甲基化与食管癌的发生有关。转化生长因子β（TGF-β）在细胞的生长、增殖、分化、凋亡、基质产生、肿瘤形成等过程中均起着重要的作用，TGF-β/smad信号传导通路能通过抑制肿瘤细胞增殖从而抑制肿瘤的发生、发展[12]，smad4基因表达产物smad4蛋白是TGF-β/smad信号传导通路中的组成成分，smad4基因缺失或突变可引起肿瘤细胞逃避TGF-β对肿瘤细胞增殖的抑制作用引起肿瘤的发生[13]。

本实验采用Mass ARRAY甲基化DNA定量分析技术检测食管鳞癌组织中smad4基因的甲基化水平，共分析了33个CpG位点，12个CpG单位。试验结果中汉族食管癌组和对照组、哈族食管癌组和对照组中smad4基因启动子区CpG位点的平均甲基化率的差异不明显，但总体甲基化率之间的差异

表2 哈萨克族和汉族病例SMAD4基因CpG片段甲基化水平的Wilcoxon W秩和检验

Table2 Wilcoxon W rank-sum test of methylation levels of CPG sites in smad4 gene in the Kazaks and the Hans

No.	Gene fragments	Han ESCC/ Han NESE	Kazakh ESCC/ Kazakh NESE	Han ESCC/ Kazakh ESCC	Han NESE/ Kazakh NESE	Han ESCC/ Kazakh NESE
		Mann-Whitney U/P	Mann-Whitney U/P	Mann-Whitney U/P	Mann-Whitney U/P	Mann-Whitney U/P
1	smad4_CpG_1	496.0/0.808	448.5/0.028	526.0/0.516	474.0/0.265	437.5/0.218
2	smad4_CpG_3-4	496.5/0.830	527.5/0.298	544.0/0.702	525.0/0.787	477.0/0.617
3	smad4_CpG_6	396.0/0.070	475.5/0.096	292.0/0.000	516.0/0.693	374.0/0.035
4	smad4_CpG_7-8	481.0/0.674	494.5/0.165	504.5/0.384	474.5/0.361	499.5/0.868
5	smad4_CpG_10-11	496.5/0.830	527.5/0.298	544.0/0.702	525.0/0.787	477.0/0.617
6	smad4_CpG_14	444.0/0.361	505.0/0.208	568.0/0.946	366.5/0.021	455.0/0.441
7	smad4_CpG_15	338.5/0.010	574.0/0.660	428.5/0.070	517.5/0.722	347.0/0.025
8	smad4_CpG_16-19	420.0/0.215	327.5/0.001	521.0/0.515	404.5/0.068	307.5/0.006
9	smad4_CpG_20	393.0/0.071	600.5/0.896	528.5/0.544	452.5/0.173	480.0/0.645
10	smad4_CpG_27-28	363.0/0.045	384.0/0.007	566.5/0.931	461.5/0.281	300.0/0.004
11	smad4_CpG_29	393.0/0.071	600.5/0.896	528.5/0.544	452.5/0.173	480.0/0.645
12	smad4_CpG_31-33	380.0/0.076	398.0/0.012	548 .0/ 0.752	479.5/0.400	346.0/0.025

Notes:NESE:normal esophageal squamous epithelium

对试验结论的影响较小，总体中存在每个位点的甲基化率，试验中研究的是个别位点的甲基化率。郭炜[14]和董稚明[15]等分别对汉族贲门腺癌和食管鳞癌中smad4基因甲基化状态进行分析，发现smad4基因在启动子区发生了高甲基化并使smad4基因沉默，导致肿瘤的发生，这与本试验结果相近。

汉族食管癌组织中smad4基因启动子区CpG-15、CpG-27的平均甲基化率（4.7%、4.9%）明显高于对照组（2.8%、3.5%），表明这两个位点的高甲基化可能与汉族食管鳞癌的发生有关,可以作为汉族食管鳞癌的诊断标志物，可通过大样本试验来判断其对汉族食管癌诊断的意义；CpG-1、CpG-16-19、CpG-27-28、CpG-31-33的平均甲基化率在哈族食管癌组（1.7%、4.5%、4.9%、6.8%）明显高于哈族正常对照组（0.7%、2.2%、3.0%、5.5%），故这四个位点的高甲基化可能参与了哈族食管癌的发生；CpG-6在哈族食管癌和哈族正常组织中的平均甲基化水平(1.9%, 1.1%)均明显高于汉族食管癌组(0.4%)，CpG-15、CpG-16-19、CpG-27-28、CpG-31-33的平均甲基化率在哈族对照组（3.1%、2.2%、3.1%、5.5%）与在汉族食管癌组（4.8%、4.1%、4.9%、7.6%）的差异也有统计学意义。故CpG-6的高甲基化可能参与了哈族食管癌的发生，是哈族食管鳞癌的高危因素，可能是哈族较汉族食管鳞癌高发的关键性原因之一。因为哈族食管鳞癌高发，那么理论上就可能会存在某个CpG位点的甲基化率在哈族食管鳞癌组或哈族对照组中较在汉族食管组织中高，本试验中发现的CpG-6很可能是哈族smad4基因特异的高甲基化位点之一，这一发现若得到证实将对哈族食管癌患者有重要意义。

smad4基因在汉族、哈族食管鳞癌组织中不同分化程度的平均甲基化率差异有统计学意义，且随分化程度增高甲基化率降低；smad4基因在汉族、哈族食管癌不同性别中甲基化率差别没有统计学意义。故smad4基因启动子区高甲基化不仅参与了食管鳞癌的发生，还可能与食管鳞癌的发展有关系，可作为食管鳞癌诊断及治疗的指标。由于试验时间有限，目前随访工作正在进行，smad4基因是否可以作为食管鳞癌预后监测的指标尚需继续验证。

研究发现甲基化是可逆的，因此应用去甲基化剂来抑制癌细胞的增殖成为治疗食管鳞癌的新方法。CpG-6对哈族食管鳞癌高发的原因研究中有重要意义，需进一步探索研究。随着对肿瘤抑制基因启动子区甲基化研究的深入，找到与食管鳞癌密切相关的基因对食管鳞癌患者的预防、诊治、指导放化疗及新药的开发等方面均有很大意义。

参考文献：

[1] Li JY. Epidemiology of esophageal cancer in China[J]. Natl Cancer Inst Monogr,1982,62:113-20.

[2] Zhang YM. The distribution of esophageal cancer in Xinjiang[J]. Xinjiang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 1988,11(2):139-45.[张月明.新疆食管癌的分布[J].新疆医科大学学报,1988,11(2):139-45.]

[3] Zhang HX, Chen Y, Yin D, *et al*. Exploration of the risk factors of esophageal cancer in Xinjiang kazak nationality[J]. Xian Dai Yu Fang Yi Xue,2009,36(10):1804-6. [张慧霞,陈艳,尹东,等. 新疆哈萨克族食管癌危险因素的探讨[J].现代预防医学,2009,36(10):1804-6.]

[4] Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, *et al*. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1[J]. Science,1996, 271(5247):350-3.

[5] Jain PK. Epigenetics: the role of methylation in the mechanism of action of tumor suppressor genes[J]. Ann N Y Acad Sci,2003,983:71-83.

[6] Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age[J]. Nat Genet,1999,21(2):163-7.

[7] Van De Voorde L, Speeckaert R, Van Gestel D, *et al*. DNA methylation-based biomarkers in serum of patients with breast cancer[J]. Mutat Res,2012,751(2):304-25.

[8] Roossink F, de Jong S, Wisman GB, *et al*. DNA hypermethylation biomarkers to predict response to cisplatin treatment, radiotherapy or chemoradiation: the present state of art[J]. Cell Oncol (Dordr), 2012,35(4):231-41.

[9] Chen J, Huang ZJ, Duan YQ, *et al*. Aberrant DNA methylation of P16, MGMT, and hMLH1 genes in combination with MTHFR C677T genetic polymorphism and folate intake in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2012,13(10):5303-6.

[10] Mao WM, Li P, Zheng QQ, *et al*. Hypermethylation-modulated downregulation of RASSF1A expression is associated with the progression of esophageal cancer[J]. Arch Med Res,2011,42(3):182-8.

[11] Zhang GY, Ma CX, Liu QL, *et al*. Detection of methylation of h MSH2 gene promoter region of esophageal cancer[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi,2005,27(9):541-3. [张功员,马春晓,刘秋亮,等. 食管癌组织中hMSH2基因启动子区甲基化检测[J].中华肿瘤杂志, 2005,27(9):541-3.]

[12] Hata A, Shi Y, Massagué J. TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads[J]. Mol Med Today,1998,4(6):257-62.

[13] Bierie B, Moses HL. TGF-beta and cancer[J]. Gytokine Growth Factor Rev,2006,17 (1-2):29-40.

[14] Guo W, Dong ZM, Guo YL, *et al*. CpG island methylation of Smad4 gene in gastric cardia adenocarcinoma[J]. Ai Bian·Ji Bian·Tu Bian,2011,23(4):269-74.[郭炜,董稚明,郭艳丽,等. 贲门腺癌中Smad4基因甲基化状态分析[J]. 癌变·畸变·突变，2011,23(4):269-74.]

[15] Dong ZM, Guo W, Guo YL, *et al*. Methylation status of CpG island of Smad4 gene in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Zhongguo Zhong Liu Sheng Wu Zhi Liao Za Zhi,2010,17(6):597-603.[董稚明,郭炜,郭艳丽,等.食管鳞状细胞癌中Smad4基因CpG岛甲基化状态分析[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2010,17(6):597-603.]

[编辑校对：周永红]