

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)07-0651-03

喉癌组织中 TSLC1 基因启动子过甲基化及 mRNA 表达

王军利¹, 张惠中², 白万胜¹, 刘丽², 卞卡¹, 成诗银¹(第四军医大学唐都医院:¹耳鼻喉科,²临床实验科,陕西西安 710038)

Promoter hypermethylation and mRNA expression of TSLC1 gene in laryngeal squamous cell carcinoma

WANG Jun-Li¹, ZHANG Hui-Zhong², BAI Wan-Sheng¹, LIU Li², BIAN Ka¹, CHENG Shi-Yin¹¹Department of Otorhinolaryngology, ²Department of Clinical Laboratory, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

【Abstract】 AIM: To explore the relationship between hypermethylation of the promoter of TSLC1 gene and laryngeal squamous cell cancer. **METHODS:** Promoter hypermethylation and mRNA expression of TSLC1 gene were respectively detected by methylation-specific PCR and RT-PCR in normal laryngeal mucosa ($n = 4$) and laryngeal squamous cell cancer ($n = 40$). **RESULTS:** Among the 40 patients with laryngeal squamous cell cancer, hypermethylation of TSLC1 promoter was seen in 21 cases (52.5%). There was no significant difference in hypermethylation in relation to pathological grade and clinical stage and classification ($P > 0.05$), but a highly significant difference was observed between the patients with and without lymph node metastasis (N0 and N1) ($P < 0.05$). TSLC1 promoter hypermethylation was observed in human laryngeal squamous cell line Hep-2. TSLC1 mRNA was not expressed in all laryngeal squamous cell cancers with hypermethylation of TSLC1 promoter and Hep-2 cells, whereas it was expressed in normal laryngeal mucosa, polyp of vocal cord and laryngeal squamous cell cancers without hypermethylation. **CONCLUSION:** Hypermethylation of TSLC1 promoter is associated with loss of its transcription in laryngeal squamous cell carcinoma. The high-frequency hypermethylation of TSLC1 promoter illustrates its potential clinical application as tumor marker for diagnosis and prognosis.

【Keywords】 TSLC1 gene, laryngeal neoplasms, promoter, methylation

【摘要】目的:探讨 TSLC1 基因启动子区过甲基化与喉癌

收稿日期 2006-10-27 接受日期 2006-12-20

通讯作者:成诗银. Tel (029)84777718 Email Chengsy@fmmu.edu.cn

作者简介:王军利. 硕士生(导师成诗银). Tel (029)84777718

Email Wangjunli1975@163.com

的关系. 方法:采用甲基化特异性 PCR 和 RT-PCR 法分析喉部正常粘膜、声带息肉、喉癌细胞 Hep-2 和喉癌组织中 TSLC1 基因启动子区过甲基化及其 mRNA 表达状况. 结果:40 例喉癌组织中,有 21(52.5%)例 TSLC1 基因启动子区过甲基化,其在各病理分级、临床分期和分型之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而在 N 分级(N0 和 N1)之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 喉癌细胞 Hep-2 也显示 TSLC1 基因启动子区过甲基化. RT-PCR 结果显示,TSLC1 mRNA 在所有甲基化的喉癌组织和喉癌细胞 Hep-2 中均无表达,而喉部正常组织、声带息肉组织和非甲基化的喉癌组织中均有表达. 结论:喉癌组织中 TSLC1 基因启动子区过甲基化与其 mRNA 失表达有关,可能是喉癌发生、发展的原因之一,可作为喉癌诊断和预后分析的检测指标.

【关键词】 TSLC1 基因; 喉肿瘤; 启动子; 甲基化

【中图分类号】 R739.65 **【文献标识码】** A

0 引言

TSLC1 基因(tumor suppressor in lung cancer-1)属于免疫球蛋白超家族成员,在组织中广泛表达^[1-2]. 已经证实 TSLC1 甲基化失活与多种肿瘤的发生及预后相关^[3-7]. 我们通过观察喉部正常组织、息肉组织、喉癌细胞株 Hep-2 及喉癌组织中该基因启动子区甲基化及其 mRNA 表达情况,旨在为进一步探讨 TSLC1 基因启动子过甲基化与喉癌的关系提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 喉癌患者组织 40(男 36,女 4)例,年龄 44~75 岁,术前均未行化疗或放疗. 喉部正常组织 4 例,声带息肉切除组织 5 例,均来源于第四军医大学唐都医院手术切除标本. 组织切除后立即投入液氮而后转存于 -70℃ 冰箱保存备用. 肿瘤位于声门上 16 例,声门 22 例,声门下 2 例,病理诊断均为鳞状细胞癌. 按 1998 年 TNM 分期的标准分期,Ⅰ期 9 例,Ⅱ期 12 例,Ⅲ期 16 例,Ⅳ期 3 例,NO 期:27 例,N1 期 13 例.

1.1.2 细胞培养 喉癌细胞株 Hep-2(第四军医大学唐都医院中心实验室). 培养于含 10 mL/L 小牛血

清 DMEM(美国 Gibco 公司)的培养液中,37℃,50 mL/L CO₂ 孵箱培养。

1.1.3 主要试剂和仪器 Tris-饱和酚购自北京鼎国公司,亚硫酸氢钠购自天津津北精细化工;氢醌购自上海山浦化工,蛋白酶 K 购自美国 AMRESCO 公司;凝胶回收试剂盒购自北京 Tiangen 公司,TRIzol 购于美国 GIBCO 公司;逆转录酶 M-MLV 为美国 GIBCO 公司产品;Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;PCR 仪为 Minicycler TMPTC150 型 美国 Research 公司 紫外分光光度仪为 UV-265W 型 美国 BECKMAN 公司;凝胶成像系统 GelBase 紫外可见光透射分析仪 美国 UVP 公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 按常规苯酚-氯仿-异戊醇法提取 DNA 紫外分光光度法定量。

1.2.2 亚硫酸氢钠修饰 取 1 μg DNA 加入终浓度为 0.3 mmol/L 的氢氧化钠溶液,加水至总体积 50 μL,37℃ 水浴 30 min 后加入 10 mmol/L 氢醌 30 μL,3 mol/L 亚硫酸氢钠 520 μL,45℃ 水浴 16 h。应用凝胶回收试剂盒回收 DNA,溶于 50 μL 水中,加入终浓度为 0.3 mmol/L 的氢氧化钠,37℃ 水浴 30 min 终止反应,乙醇沉淀 DNA,溶于 50 μL 水中,备用^[7]。

1.2.3 RNA 的提取及 RT-PCR 检测 mRNA 收集对数生长期培养细胞,细胞密度为 1×10^7 或取约 50 mg 组织用 1 mL TRIzol(按说明书操作)逐步提取总 RNA。cDNA(complementary DNA)第一链合成体系为 25 μL,取总 RNA 2 μg,逆转录酶 M-MLV,oligo 寡核苷酸引物(dT)以及相关试剂均按说明书配成适当浓度合成 cDNA。常规 PCR 扩增 TSLC1 基因 所用引物如下(合成于北京奥科生物技术公司):上游引物:5'-CCG GGT TAA GCC TTG TAG AG-3';下游引物:5'-TCA GGT GTT CAA AGG GAA C-3'。内参照选用 β-actin,上游引物为:5'-GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC-3',下游引物为:5'-CAA ACA TGA TCT GGG TCA TCT TCT C-3'。PCR 反应体系为:模板 cDNA 2 μL,10 × PCR 缓冲液 2.5 μL,10 mmol/L dNTP 2 μL,10 μmol/L 引物各 1 μL 及 Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,加水至 25 μL,于 95℃ 变性 5 min 95℃ 30 s 56℃ 30 s 72℃ 30 s,共计 35 个循环,72℃ 延伸 10 min。15 g/L 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离并回收 PCR 产物。

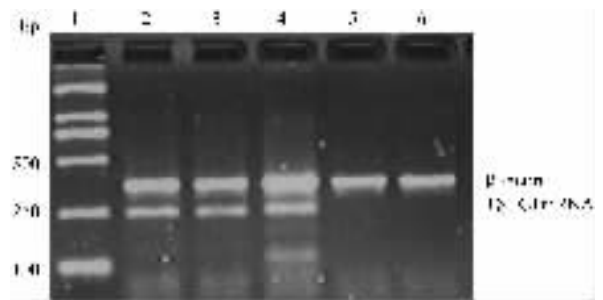
1.2.4 甲基化特异性 PCR(methylation-specific PCR, MSP) 甲基化上游引物(M1):5'-TTT TAA TTA TTT TCG AGT TTA TCG-3',甲基化下游引物(M2):5'-TCT TTA AAA ACG AAA ACT ATA CG-3';非甲基化上游引物(U1):5'-TTT TTT AAT TAT TTT

TGA GTT TAT TG-3',非甲基化下游引物(U2):5'-AAA TCT TTA AAA ACA AAA ACT ATA C-3'。MSP 反应体系为:模板 DNA 2.5 μL,10 × PCR 缓冲液 2.5 μL,10 mmol/L dNTP 3 μL,10 μmol/L 引物各 1 μL 及 Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,加水至 25 μL。95℃ 变性 5 min 95℃ 40 s 56℃ 40 s 72℃ 40 s,共计 40 个循环,72℃ 延伸 10 min。以正常人外周血淋巴细胞 DNA 经甲基化酶 SssI 处理过的喉癌组织 DNA 和水,分别做非甲基化、甲基化和空白对照^[8]。

统计学处理:用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,TSLC1 基因启动子甲基化与喉癌患者临床病理的关联分析用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 TSLC1 mRNA 表达状况 正常人喉部组织 4 例,声带息肉组织 5 例以及非甲基化喉癌组织均表达 TSLC1 mRNA,而 Hep-2 喉癌细胞系及甲基化喉癌组织均不表达 TSLC1 mRNA(图 1)。



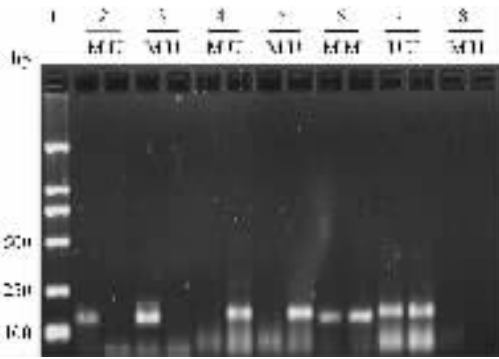
1:DL2000 marker;2:非甲基化喉癌组织;3:息肉组织;4:正常组织;5:甲基化喉癌组织;6:Hep-2 细胞。

图 1 TSLC1mRNA 表达状况电泳图

2.2 TSLC1 基因启动子的甲基化状态 MSP 40 例喉癌组织中有 21 例(52.5%)出现 TSLC1 基因启动子区 CpG 岛甲基化,4 例正常组织和 5 例声带息肉组织中无一例甲基化(图 2)。统计检验结果显示,喉癌组织中 TSLC1 基因 CpG 岛过甲基化在不同病理分级,T 分期和临床分型中差异无统计学意义($P > 0.05$)而在 N 分级(N0 和 N1)之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。TSLC1 基因启动子甲基化与喉癌患者临床病理有一定关系(表 1)。

3 讨论

DNA 甲基化是哺乳动物表遗传机制在细胞分裂过程中进行,不改变基因的 DNA 序列而影响相关基因的表达,在基因表达的调控、基因结构的稳定等方



1:DL2000 marker 2:Hep-2 细胞 3:喉癌组织 4:正常组织;5:息肉组织;6:甲基化阳性对照 7:甲基化阴性对照 8:空白对照;M:甲基化产物;U:非甲基化产物。

图2 喉癌和正常组织 TSLC1 基因启动子甲基化状态电泳图

表1 Tslc1 启动子甲基化与喉癌患者临床病理的关系

[r(%)]

项目	n	甲基化	非甲基化
临床分型(部位)			
声门上	16	11(68.8)	5(31.2)
声门	22	9(40.9)	13(59.1)
声门下	2	1(50.0)	1(50.0)
病理分级			
高分化	13	4(30.8)	9(69.2)
中分化	17	10(58.8)	7(41.2)
低分化	10	7(70.0)	3(30.0)
TNM 分期			
I - II 期	21	10(47.6)	11(52.4)
III - IV 期	19	11(57.9)	8(42.1)
淋巴结转移			
NO 期(阴性)	27	11(40.7)	16(59.3)
N1 期(阳性)*	13	10(76.9)	3(23.1)

*P < 0.05 vs NO 期(阴性)。

面有着重要作用^[9]。DNA 异常局部的甲基化可引起抑癌基因的失活,从而导致肿瘤发生^[10-11]。Baylin 等^[12]研究发现,有多种抑癌基因的失活与其 5'端启动子区 CpG 岛过甲基化有关。启动子异常甲基化导致抑癌基因失活,频发于肿瘤发生的早期,被认为是研究肿瘤的一个非常有效的分子标志物。Fujita 等^[13]认为 TSLC1 基因的表达可能保持鳞状上皮紧密连接,从而抑制了肿瘤的转移及浸润,相反可能促进了肿瘤发生。

本研究结果显示,52.5% 喉癌组织中 TSLC1 基因启动子过甲基化,而正常喉部组织和息肉组织中均无甲基化。RT-PCR 显示,所有甲基化的喉癌组织均

无 TSLC1 mRNA 表达,而所有正常组织、息肉组织和非甲基化的喉癌组织均有其表达。TSLC1 启动子甲基化与 mRNA 的表达有显著相关性($P = 0.000$),这说明喉癌中 TSLC1 基因启动子区 CpG 岛甲基化与其转录失活有关,可能是喉癌发生的原因之一。同时统计分析显示,喉癌组织中 TSLC1 基因 CpG 岛过甲基化在不同病理分级、T 分期和临床分型中差异无统计学意义($P > 0.05$),而在 N 分期(N0 和 N1)之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示 TSLC1 基因甲基化与喉癌的转移及预后有关。同时在肺癌、胃癌、宫颈癌和鼻咽癌等多种肿瘤的研究中也证实 TSLC1 基因表达与癌变进展阶段、淋巴结浸润与转移、血管浸润之间存在反向关联^{3-6]}。因此,检测肿瘤组织 TSLC1 基因的甲基化,研究 TSLC1 与喉癌的关系,可为肿瘤发生发展和预后提供理论依据。

【参考文献】

[1] Gomyo H, Arai Y, Tanigami A, et al. A 2-Mb sequence-ready contig map and a novel immunoglobulin superfamily gene IGSF4 in the LOH region of chromosome 11q23. 2 [J]. Genomics, 1999, 62(2): 139 - 146.

[2] Shingai T, Ikeda W, Kakunaga S, et al. Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells [J]. J Biol Chem, 2003 278(37) 35421 - 35427.

[3] Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, et al. TSLC1 is a tumor suppressor gene in human non-small-cell lung cancer [J]. Nat Genet, 2001, 27(4) #27 - 430.

[4] Honda T, Tamura G, Waki T, et al. Hypermethylation of the TSLC1 gene promoter in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines [J]. Jpn J Cancer Res 2002 93(8) 857 - 860.

[5] Steenbergen RD, Kramer D, Braakhuis BJ, et al. TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia [J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(4): 294 - 305.

[6] Hui AB, Lo KW, Kwong J. Epigenetic inactivation of TSLC1 gene in nasopharyngeal carcinoma [J]. Mol Carcinog, 2003, 38(4): 170 - 178.

[7] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(5) 1827 - 1831.

[8] 李明, 楼方定, 卢学春, 等. 急性白血病细胞 IGSF4 基因启动子甲基化的研究 [J]. 中华实验血液学杂志, 2004, 12(2): 125 - 127.

[9] Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics [J]. Science 2001 293(5532) 1068 - 1070.

[10] 张云丽. DNA 甲基化与肿瘤的关系 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2006 33(1) 15 - 18.

[11] Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer [J]. J Clin Oncol, 2004 22(22) #632 - 4642.

[12] Baylin SB, Herman JC, Graff JR, et al. Alterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia [J]. Adv Cancer Res, 1998 72 141 - 196.

[13] Fujita E, Soyama A, Momoi T, et al. RA175, which is the mouse ortholog of TSLC1, a tumor suppressor gene in human lung cancer is a cell adhesion molecule [J]. Exp Cel Res, 2003 287(1) 57 - 66.