

# Correlation of Promoter Hyper-methylation of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA Methyltransferase Gene and the Risk for Esophageal Cancer

## DNA 修复酶基因 *MGMT* 启动子区异常甲基化与食管癌的关系

XIAO Zhi-ping<sup>1</sup>, LIU Ran<sup>1</sup>, XU Jing<sup>1</sup>, YIN Li-hong<sup>1,\*</sup>,  
PU Yue-pu<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>2</sup>, PAN En-chun<sup>2</sup>, ZHANG Xue-yan<sup>1</sup>  
(1. School of Public Health, Southeast University, Nanjing  
210009; 2. Huai'an Center for Disease Control and  
Prevention, Huai'an 223001, China)

肖志平<sup>1</sup>/刘冉<sup>1</sup>/许婧<sup>1</sup>/尹立红<sup>1,\*</sup>/  
浦跃朴<sup>1</sup>/王仪<sup>2</sup>/潘恩春<sup>2</sup>/张学艳<sup>1</sup>  
(1. 东南大学公共卫生学院, 江苏 南京  
210009; 2. 淮安市疾病预防控制中心, 江苏  
淮安 223001)

【摘要】背景与目的：分析食管癌组织中 *MGMT* 启动子区 CpG 岛甲基化状态和食管癌发病风险的关系，探讨 *MGMT* 基因启动子的异常甲基化在食管癌筛查及早期诊断中的意义。材料与方法：对江苏淮安的 91 例新发食管癌病例的癌组织、癌旁组织及外周血浆样本提取 DNA，应用甲基化特异性 PCR(MSP)分析 *MGMT* 启动子区 CpG 岛的甲基化状态；对食管癌组织和癌旁组织提取总 RNA，采用 SYBR GREEN I 实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定 *MGMT* 的 mRNA 水平。结果：*MGMT* 启动子区 CpG 岛异常甲基化与食管癌发病风险增高有关联 ( $OR = 7.750$ ,  $95\% CI = 2.736 \sim 21.955$ )。 *MGMT* 启动子区 CpG 岛甲基化状态与 *MGMT* mRNA 水平无显著相关；血浆循环 DNA 中 *MGMT* 启动子区 CpG 岛甲基化与癌组织中 *MGMT* 启动子区 CpG 岛甲基化相关 ( $P < 0.01$ )。血浆循环 DNA 中 *MGMT* 启动子区 CpG 岛甲基化检出率与癌组织中 *MGMT* 启动子区 CpG 岛甲基化检出率中度相关 ( $Kappa = 0.603$ ,  $P < 0.01$ )。结论：*MGMT* 基因的启动子区 CpG 岛的异常甲基化与食管癌发病风险增加有关；检测血浆循环 DNA 中 *MGMT* 基因启动子的异常甲基化，可为食管癌的筛查、早期诊断提供有价值的信息。

【关键词】食管癌；*MGMT*；甲基化；循环 DNA

中图分类号：R730.45

文献标识码：A

文章编号：1004-616X(2009)02-0105-04

【ABSTRACT】BACKGROUND AND AIM: To analyze whether promoter methylation of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) gene is associated with the risk for esophageal squamous cell carcinoma(ESCC), and to evaluate the clinical significance in the screening and early diagnosis of ESCC. MATERIALS AND METHODS: 91 patients with newly diagnosed, untreated esophageal cancer were recruited in the present study. Esophageal cancer tissues, tissues adjacent to the tumors and peripheral blood were collected to determine CpG island hypermethylation of the promoter. Methylation specific PCR(MSP) was used to examine the methylation status of *MGMT* gene, total mRNA was extracted from esophageal cancer tissues and tissues adjacent to the tumors, expression levels of *MGMT* gene were measured by quantitative real-time reverse transcription-PCR. RESULTS: The risk for ESCC showed significant correlation to promoter hypermethylation of *MGMT* gene ( $OR = 7.750$ ,  $95\% CI = 2.736 \sim 21.955$ ). There was no significant correlation between methylation status and mRNA level. Hypermethylation of *MGMT* gene in plasma from ESCC patients was significantly correlated to that in tumor tissue ( $P < 0.01$ ). The detection rate of CpG island hypermethylation of *MGMT* promoter in plasma was moderately correlated with that in tumor tissue ( $Kappa = 0.603$ ,  $P < 0.01$ ). CONCLUSION: This study suggested that CpG island hyper-methylation of *MGMT* gene was associated with an enhanced risk for ESCC. Detection of the aberrant methylation in the promoter of *MGMT* gene from ESCC patient plasma might provide valuable information for the screening and early diagnosis of ESCC.

收稿日期：2008-10-07；修订日期：2008-11-15

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30571540, 30671732, 30800891)，江苏省预防医学基金项目(Y2006007)

作者简介：肖志平(1982-)，女，硕士研究生，研究方向：肿瘤环境基因组学。

\* Correspondence to: YIN Li-hong, Tel 025-83272583, E-mail: lhyin@seu.edu.cn

【KEY WORDS】 esophageal cancer; O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase; methylation; circulating DNA

O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (MGMT) 是一种高效的 DNA 损伤直接修复酶, 能够修复 DNA 序列中的 O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤损伤。食管癌是我国常见的恶性肿瘤, 其发生和发展是致癌物代谢活化和解毒, DNA 损伤与修复, 细胞增殖与凋亡等一系列因素综合作用的结果。

在恶性肿瘤中, 外周血循环 DNA 主要来源于肿瘤细胞 DNA, 已证实肿瘤患者血浆 DNA 及相对应的肿瘤组织存在一致的基因改变<sup>[1]</sup>, 为肿瘤的早期诊断及病情监控提供新的手段。

本研究检测 91 例新发食管癌病例的癌组织和配对癌旁组织的 MGMT 启动子区甲基化状态与其 mRNA 水平, 以及食管癌病例外周血中循环 DNA 的 MGMT 甲基化状况, 探讨 MGMT 启动子甲基化在食管癌中的作用; 比较食管癌病例的癌组织与血浆循环 DNA 中 MGMT 甲基化状况, 探讨其在食管癌早期诊断和筛查中的意义。

## 1 材料与与方法

**1.1 研究对象** 2006 年经病理或内镜诊断明确的原发性食管癌新发病例, 未经放、化疗, 在淮安当地居住 20 年以上, 共 91 例, 均为淮安籍汉族人群。平均年龄 (58.41 ± 7.51) 岁, 男女比例 1.28:1。

**1.2 样品采集** 在取得被调查人员的知情同意后, 收集肿瘤患者新鲜手术组织, 包括癌组织和远端癌旁组织 (距癌组织边缘 5 cm 以上) 各 2 块, RNAlocker 保存, 同时采集肝素抗凝全血 5 ml, 6 h 内分离血浆。

### 1.3 方法

**1.3.1 总 RNA 和基因组 DNA 的提取** 取 RNA-locker 处理后的组织 0.03 ~ 0.05 g, 用研钵研碎, 加 1 ml Trizol 变性裂解液吹打混匀, 依次提取总 RNA 和基因组 DNA; 血浆 DNA 用 QIAamp DNA Blood Midi Kits 试剂盒 (Qiagen 公司) 提取。

**1.3.2 启动子区 CpG 岛的甲基化分析** ① 基因组 DNA 亚硫酸氢钠修饰: 取 1.5 ~ 2 μg DNA 加入总体积为 50 μl 的灭菌去离子水中, 加 3 mol/L NaOH 5.5 μl, 37 °C 变性 10 min, 向变性的 DNA 样品中加 10 μmol/L 对苯二酚 30 μl 和 3 mol/L 亚硫酸氢钠 (pH 5.0) 415 μl, 覆盖矿物油 100 μl, 50 °C 水浴 16 ~ 24 h。② 亚硫酸氢钠修饰 DNA 的纯化: 使用 Winzard DNA Clean-up system 纯化修饰后的 DNA, 操作步骤按说明书进行。③ 巢式 - 甲基化特异性 PCR

(nest-methylation-specific PCR, MSP): 外引物 (Pan-primer) 扩增的反应总体积为 20 μl, 内含引物各 10 pmol、10 mmol/L dNTP 0.4 μl、10 × buffer 2 μl、MgCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L、修饰 DNA 样品 0.5 μl。PCR 反应参数: 94 °C 预变性 5 min 后手动热启 Taq 酶, 每管 0.75 U; 95 °C 30 s, 55 °C 60 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 扩增产物 289 bp, 2% 琼脂糖电泳观察; 内引物扩增的反应体系如下: 10 × Hotstart Taq buffer 2 μl, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 0.4 μl, 10 mmol/L dNTP 0.4 μl, 上下游 U/M 引物 (10 μmol/L) 各 1 μl, Hotstart Taq 酶 0.5 U, 第一轮 PCR 产物 0.2 μl, 补水至 20 μl。PCR 反应参数: 94 °C 预变性 5 min, 95 °C 30 s, 特异退火温度 45 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 扩增产物分别为 81 bp (甲基化产物) 和 93 bp (未甲基化产物), 3% 琼脂糖电泳, 用 Chemilmager™5500 凝胶成像处理系统观察。内外引物序列及扩增条件<sup>[2]</sup>见表 1。

表 1 甲基化特异性 PCR 分析的引物序列

Table 1 Oligonucleotides sequences of primers for MSP

Primer	Primer sequences	Product size (bp)	Anneal temperature (°C)
Pan-F	5'-GGATATGTTGGGATAGTT-3'	289	55.5
Pan-R	5'-CCAAAAACCCCAAAACCC-3'		
U-F	5'-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3'	93	67
U-R	5'-ACTCCACACTCTTCCAAAAACAAACA-3'		
M-F	5'-TTTCGACGTTCTAGTTTTTCGC-3'	81	67
M-R	5'-GCACCTCTCCGAAAACGAAACG-3'		

**1.3.3 mRNA 水平测定** ① cDNA 合成: 取上述总 RNA 1 ~ 2 μg 进行逆转录, RNA 与 Oligo dT18 0.5 μg 及适量 DEPC 水混合 70 °C 5 min 后迅速冰浴, 再加入 5 × MMLV buffer 5 μl、10 mmol/L dNTP 1.25 μl、RNase 20 U、MMLV 200 U, 加 DEPC 水补足体积至 25 μl; 42 °C 1 h 后 95 °C 5 min 降解 DEPC, -20 °C 保存备用。② 实时荧光定量 PCR 扩增<sup>[3-4]</sup>: 以 β-actin 为内参照基因, 测定 MGMT 基因的 mRNA 水平, 反应体系包括: SYBR Green I Master Mix 12.5 μl、10 μmol/L 引物各 1 μl、cDNA 2 μl, 加去离子水补足体积至 25 μl。反应条件: 50 °C 2 min, 95 °C 预变性 3 min 后, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s 并采集荧光信号, 40 个循环; 自 60 °C 至 99 °C 缓慢升温进行熔解曲线分析。目的基因相对于内参基因的 mRNA 水平以 ΔCt 值表示。

**1.4 统计学方法** 采用 SPSS15.0 软件应用方差分析、χ<sup>2</sup> 检验和条件 Logistic 回归方法, Spearman 相关分析及 Kappa 检验对结果进行分析。

## 2 结果

**2.1 癌组织、癌旁组织中 MGMT 基因 CpG 岛甲基化状态分析** 应用 MSP 方法,我们分析了 91 对食管癌组织和癌旁组织的 MGMT 基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态,部分电泳结果如图 1,在所检测的 91 例食管癌组织中,共有 45 例有启动子区 CpG 岛的甲基化,发生率 49.45%;在癌旁组织中共 18 例有启动子区 CpG 岛的甲基化,发生率 19.78%;配对四格表  $\chi^2$  检验结果表明,癌组织与癌旁组织的 MGMT 基因启动子区 CpG 岛的甲基化率有显著性差异 ( $\chi^2 = 20.829, P < 0.01$ );条件 Logistic 回归分析显示 MGMT 基因启动子区 CpG 岛的异常甲基化可增加食管癌患病风险 ( $OR = 7.750, 95\% CI = 2.736 \sim 21.955$ )。

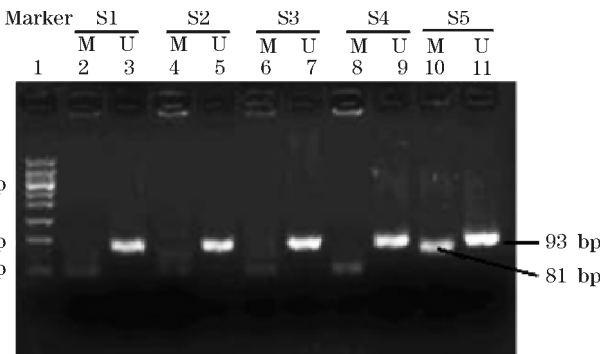


图 1 MGMT 的 CpG 岛甲基化 MSP 分析电泳图谱。泳道 1 为 50 bp DNA Marker,泳道 2,4,6,8,10 为用 MGMT-M 引物扩增片段;泳道 3,5,7,9,11 为用 MGMT-U 引物扩增片段  
Figure 1 MSP of CpG island hypermethylation of MGMT gene by electrophoretogram. Lane1: 50 bp DNA Marker; Lane 2, 4, 6, 8, 10: PCR products of MGMT-M primer; Lane 3,5,7,9,11: PCR products of MGMT-U primer

**2.2 癌组织和血浆中循环 DNA 甲基化相关性分析** 应用 MSP 方法分析 91 例食管癌患者血浆循环 DNA 的 MGMT 基因甲基化状态,结果显示,在所检测的 91 例血浆中,有 27 例启动子区 CpG 岛的甲基化,发生率 29.67%,食管癌组织的甲基化发生率为 49.45%。在癌组织甲基化阳性标本(45 例)中,血浆循环 DNA 中甲基化 27 例,检出率为 60.0%;血浆循环 DNA 甲基化为阳性的病例,其组织均为甲基化阳性,吻合率为 100%,组织是阴性的病例,其血浆均为阴性。Pearson  $\chi^2$  检验结果表明,癌组织与血浆 MGMT 基因启动子区 CpG 岛的甲基化差异具有统计学意义 ( $\chi^2 = 7.445, P < 0.01$ ),配对  $\chi^2$  检验结果表明癌组织的甲基化率与血浆循环 DNA 甲基化率相关 ( $\chi^2 = 39.224, P < 0.01$ ),Kappa 检验结果,  $Kappa = 0.603, P < 0.01$ ;表明癌组织甲基化发生率与血浆循环 DNA 的甲基化率中度相关。

**2.3 MGMT 基因的 mRNA 在食管癌组织和配对癌旁组织中的分布** 我们测定了 MGMT 基因在 91 对食管癌组织和配对癌旁组织中的 mRNA 相对表达水平,

MGMT 基因在绝大部分受检个体的食管组织中均有表达,经  $t$ -test 两组的表达水平差异具有统计学意义 ( $t = 2.435, P = 0.017$ ),癌组织的表达水平为配对癌旁组织表达水平的 71.4%。以条件 Logistic 回归分析癌组织和配对癌旁组织 MGMT 基因表达水平的  $\Delta Ct$  值与食管癌发病风险的关系,结果可见癌组织的 MGMT 表达水平较癌旁组织明显下调 ( $OR = 1.311$ ),MGMT 表达每下调 50%,食管癌发病风险即增加 1.311 倍。

表 2 食管癌组织和配对癌旁组织 MGMT 基因的 mRNA 表达水平  
Table 2 Distribution of relative mRNA expression levels of MGMT gene in ESCC tissues and tissues adjacent to the tumors

Group	n	$\Delta Ct^a$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	OR (95% CI) <sup>b</sup>	P value <sup>b</sup>
Cases	91	5.389 ± 1.055	0.714	1.311(1.041 ~ 1.651)	0.022
Controls	91	4.908 ± 1.566	1.00		

a:  $\Delta Ct = Ct, interest\ gene - Ct, \beta\text{-actin}$ ; b: Adjusted in a Logistic regression model including age in years, gender, smoking status and alcohol usage

**2.4 MGMT 基因 CpG 岛不同甲基化状态的 mRNA 表达情况** 对癌组织、癌旁组织及配对食管组织 MGMT 的 CpG 岛不同甲基化状态分组比较,结果显示各组 MGMT 基因 CpG 岛甲基化和未甲基化个体的 MGMT 基因 mRNA 表达水平的差异无统计学意义。癌组织、癌旁组织甲基化或两者均甲基化的 MGMT 基因 mRNA 表达水平,与癌组织和癌旁组织均未甲基化组比较,其差异亦无统计学意义(见表 3)。

表 3 MGMT 基因 CpG 岛甲基化状态的 mRNA 表达水平  
Table 3 The level of mRNA expression under CpG island methylation statuses of MGMT gene

Group	States	n	$\Delta Ct$	t value	P value
ESCC	+	45	5.408 ± 1.077	0.1	0.920
	-	46	5.385 ± 1.054		
Controls	+	18	4.823 ± 1.603	0.21	0.835
	-	73	4.696 ± 2.444		
Match	case -, control -	42	0.661 ± 1.817 <sup>a</sup>	0.27 <sup>b</sup>	0.850
	case -, control +	4	0.593 ± 1.356 <sup>a</sup>	0.07 <sup>c</sup>	0.942
	case +, control -	31	0.370 ± 1.685 <sup>a</sup>	0.69 <sup>c</sup>	0.493
	case +, control +	14	0.842 ± 2.070 <sup>a</sup>	0.31 <sup>c</sup>	0.758

ESCC: esophageal squamous cell carcinoma; a:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ case - \Delta Ct\ control$ ; b: analysis of variance; c: compared with the groups without methylation of case and control by  $t$ -test

## 3 讨论

O<sup>6</sup> 甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (MGMT),是一种高效的 DNA 损伤直接修复酶,能特异地修复 N-亚硝基化合物引起的烷化损伤,对保护细胞免受烷化剂损害,防止细胞癌变和死亡起重要作用<sup>[5]</sup>。人 O<sup>6</sup> 甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (MGMT) 定位于染色体 10q26,基因全长约 170 kb,由 5 个外显子以及 4 个内含子构成;其启动子区有较多的 GC 二核苷酸结构。现有研究发现启动子区 CpG 岛的过甲基化可影响基因的转录活性,导致相关蛋白表达缺失,间接促进了肿瘤的发生<sup>[6]</sup>。有关 MGMT



基因启动子区异常甲基化与肺癌、肠癌和食管癌的关系已有报道,但在不同地区、不同肿瘤中报道的甲基化率有所不同<sup>[7-9]</sup>。本研究结果显示癌组织中MGMT的甲基化检出率(49.45%)明显高于癌旁组织(19.78%),MGMT基因启动子区CpG岛的过甲基化可增加食管癌患病风险,提示MGMT过甲基化是食管癌发生的一个重要因素,可作为食管癌筛选和早期诊断的指标之一。

已有的一些研究表明检测血浆中某些抑癌基因甲基化可对多种人类肿瘤,如肺癌<sup>[10]</sup>、肝细胞癌<sup>[11]</sup>、神经胶质瘤等<sup>[12]</sup>筛查和早期诊断提供帮助。循环DNA是存在于血液(血清或血浆)、滑膜液等体液中的细胞外DNA,目前认为增殖旺盛的肿瘤细胞持续释放DNA进入血液循环,成为血液循环中游离DNA的主要来源<sup>[13]</sup>。我们研究发现,食管癌患者血浆循环DNA的MGMT甲基化与癌组织MGMT甲基化具有显著相关性;血浆循环DNA甲基化为阳性的病例,其组织均为甲基化阳性,组织是阴性的病例,其血浆均为阴性,提示可以通过检测患者血浆中循环DNA来反映肿瘤组织中MGMT启动子甲基化状态。在癌组织甲基化阳性标本中,血浆循环DNA的甲基化阳性检出率为60.0%;血浆循环DNA的甲基化率与癌组织甲基化发生率中度相关,可能是由于血浆中DNA量相对较少,同时在血浆提取过程中的部分丢失和提取后经化学修饰使一部分DNA降解等因素所致<sup>[14]</sup>,因此,进一步研究我们可以考虑用荧光定量MSP的方法来提高检测灵敏度。上述研究结果提示检测血浆中MGMT基因启动子甲基化可为食管癌的筛查、早期诊断及预后判断提供有价值的信息。

目前关于MGMT在转录水平上精确的调控机制尚不清楚,多数研究结果显示MGMT基因本身极少发生突变、缺失或重排等改变,MGMT基因表达差异可能与启动子区域CpG岛的甲基化有关。我们对食管癌组织和癌旁组织MGMT的mRNA表达水平的分析结果显示,癌组织的mRNA水平低于癌旁组织,可见癌组织的MGMT基因mRNA表达水平较癌旁组织明显下调;进一步对食管癌组织和癌旁组织的MGMT CpG岛甲基化与其mRNA水平的相关性进行了分析,结果未发现其与mRNA水平的相关性。分析其原因可能为:①由于CpG岛的不同甲基化水平对基因表达的抑制程度不同,因此对基因CpG岛甲基化的定量分析有助于明确甲基化与基因表达之间的关系;②MGMT在食管癌组织中表达水平显著降低,可能受到多种调控机制的影响,除了在靶组织研究中已经肯定的表遗传机制外,诸如调控区的碱基变异和调控相关蛋白的表达异常等都可能影响它们的转录。关于MGMT基因启动子区异常甲基化导致

其mRNA转录障碍的机制尚需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(4): 892-895.
- [2] Fang MZ, Wang Y, Ai N, et al. Tea Polyphenol(-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(22): 7563-7570.
- [3] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [4] Tanaka S, Kobayashi I, Utsuki S, et al. O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression in gliomas by means of real-time quantitative RT-PCR and clinical response to nitrosoureas [J]. *Int J Cancer*, 2003, 103(1): 67-72.
- [5] Ishikawa T, Zhang SS, Qin X, et al. DNA repair in cancer: lessons from mutant mouse models [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(2): 112-117.
- [6] Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics [J]. *Trends Genet*, 2000, 16(4): 168-174.
- [7] Liu Y, Lan Q, Siegfried JM, et al. Aberrant promoter methylation of P16 and MGMT genes in lung tumors from smoking and never-smoking lung cancer patients [J]. *Neoplasia*, 2006, 8(1): 46-51.
- [8] Roth MJ, Abnet CC, Hu N, et al. p16, MGMT, RARbeta2, CLD3, CRBP and MT1G gene methylation in esophageal squamous cell carcinoma and its precursor lesions [J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(6): 1591-1597.
- [9] Shen L, Kondo Y, Rosner GL, et al. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(18): 1330-1338.
- [10] Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1219-1225.
- [11] 张吉才, 吕军, 李海平, 等. 血浆p16启动子异常甲基化在肝癌诊断中的应用价值 [J]. *中华检验学杂志*, 2006, 29(10): 895-899.
- [12] Weaver KD, Grossman SA, Herman JG. Methylated tumor-specific DNA as a plasma biomarker in patients with glioma [J]. *Cancer Invest*, 2006, 24(1): 35-40.
- [13] 傅士龙. 肿瘤循环DNA的研究进展 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2005, 10(1): 104-106.
- [14] 严子禾, 潘世扬, 陈丹, 等. 4种血浆游离DNA提取方法的比较 [J]. *临床检验杂志*, 2006, 25(5): 363-365.