

抑癌基因 TIP30 启动子甲基化对大肠癌诊断及预后的影响

陈贝贝, 马一杰, 陈小兵, 罗素霞, 吕慧芳, 李 宁

Methylation of Tumor Suppressor Gene TIP30 in Promoter Region for Colorectal Cancer Diagnosis and Prognosis

CHEN Beibei, MA Yijie, CHEN Xiaobing, LUO Suxia, LV Huifang, LI Ning

Department of Medical Oncology, He'nan Cancer Hospital, The Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China

Corresponding Author: CHEN Xiaobing, E-mail: chenxiaobing@medmail.com.cn

Abstract: Objective To investigate the difference of promoter methylation of TIP30 gene between colorectal cancer (CRC) and the normal colorectal samples. To analyze the relationship between TIP30 gene methylation and the clinicopathological features of patients. **Methods** The difference of methylation status of TIP30 between 50 cases of patients with CRC and the paired normal colorectal samples from 2009 to 2010 in the hospital was detected using methylation-specific PCR. **Results** There was a significant correlation between hypermethylation of TIP30 and unfavorable variables, including lymph nodes metastasis ($P = 0.003$), CEA levels ($P = 0.005$), and advanced colorectal cancer ($P = 0.048$). There was no obvious difference between colon and rectal tissues in carcinoma samples ($P = 0.309$). Interestingly, hypermethylation of TIP30 was more frequently founded ($P = 0.005$) in the tumors from patients with higher serum level of CEA (>15 ng/ml) than that from the patients with lower serum level of CEA (<15 ng/ml).

Conclusion This study showed a significant positive correlation between hypermethylation of TIP30 promoter and nodal metastasis, CEA levels, and advanced CRC. There was no obvious difference between colon and rectal tissues in carcinoma samples. Our research suggested that hypermethylation of TIP30 might be used as a new tumor marker for CRC molecular diagnosis and prognosis.

Key words: Colorectal cancer (CRC); TIP30 gene; Tumor suppressor gene; DNA methylation

摘要:目的 研究 TIP30 启动子甲基化在大肠癌与配对正常大肠黏膜中的表达差异,分析 TIP30 启动子甲基化状态与患者临床病理特征间的关系。**方法** 对我院 2009-2010 年收治的 50 例大肠癌患者的手术切除标本和配对正常大肠黏膜组织,采用甲基化特异性 PCR 方法检测 TIP30 基因启动子甲基化状态。**结果** 大肠癌 TIP30 启动子高甲基化与患者淋巴结转移情况 ($P = 0.003$)、CEA 水平 ($P = 0.005$) 及临床分期 ($P = 0.048$) 之间存在显著相关性,与病变部位(结肠与直肠)之间未见显著相关性 ($P = 0.309$)。此外, TIP30 启动子高甲基化在血清 CEA 水平较高 (>15 ng/ml) 的患者中比血清 CEA 水平较低 (<15 ng/ml) 的患者中更常见 ($P = 0.005$)。**结论** TIP30 启动子高甲基化与大肠癌淋巴结转移、CEA 水平及临床分期呈正相关,与病变部位无明显相关性。TIP30 启动子甲基化有望成为一种新的大肠癌分子诊断肿瘤标志物,用于大肠癌患者的早期诊断与预后判断。

关键词: 大肠癌; TIP30 基因; 抑癌基因; DNA 甲基化

中图分类号: R735.3⁺4 **文献标识码:** A

0 引言

大肠癌作为消化系统最常见的恶性肿瘤之一,其发病率逐年上升,男、女发病率分别位列肿瘤发病率的第 4 位和第 3 位,病死率分别位列第 4 和第 5 位,对人类健康造成严重威胁^[1]。随着现代医学的迅猛发展,大肠癌的诊疗水平有了很大提高,但晚期患者的中位生存期仍然徘徊在 20 月左右。因此全

收稿日期:2012-05-31;修回日期:2012-12-17

基金项目:河南省医药卫生重大攻关项目及卫生部科研基金资助项目(WKJ2011010012)

作者单位:450008 郑州,郑州大学附属肿瘤医院内科 河南省肿瘤医院

通信作者:陈小兵, E-mail: chenxiaobing@medmail.com.cn

作者简介:陈贝贝(1982-),女,博士,主治医师,主要从事消化系统肿瘤的病因研究及诊断治疗

面认识大肠癌发病机制,寻找特异性及敏感度均较高的指标以帮助临床医师进行大肠癌早期诊断及预后评估,成为了肿瘤科医生尤其是肿瘤内科医生亟需解决的重要问题。

随着分子生物学的发展,人们发现肿瘤的发生和发展不仅受基因突变、基因缺失等经典遗传学变异影响,还受基因甲基化、组蛋白修饰、miRNA 表达异常等表观遗传学调控^[2-3]。TIP30 基因作为肿瘤转移抑制相关基因的一种,在肿瘤发生发展中发挥关键作用。既往研究表明,癌组织中 TIP30 蛋白表达明显低于癌旁组织,且与肿瘤临床分期和侵袭转移有关^[4-5]。然而,大肠癌 TIP30 表达下调的原因尚不明确,其调控机制仍需要进行深入探讨。

本研究以 2009 - 2010 年间我院收治的 50 例接受大肠癌手术的患者为研究对象,以其术中切除肿瘤组织及配对癌旁组织为样本,旨在探讨高甲基化在大肠癌 TIP30 表达中的调控作用,为其成为大肠癌诊断及预后标志物候选指标之一提供理论依据。

1 资料和方法

1.1 临床资料

50 例组织标本为 2009 年 1 月至 2010 年 9 月期间,在郑州大学附属肿瘤医院住院治疗的大肠癌患者手术切除标本。每例标本分别在癌灶和正常组织两处取材,癌灶经术后病理证实均为腺癌。50 例大肠癌患者术前均未接受任何抗肿瘤治疗(包括化疗、放疗、靶向治疗等)。男 32 例,女 18 例;年龄 45 ~ 87 岁,平均年龄 66.2 岁;中低分化 33 例,高分化 17 例;直肠 34 例,结肠 26 例;早期 26 例,进展期 24 例。此项研究经过本院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 大肠癌组织 TIP30 基因启动子甲基化状态检测 采用 MSP 方法检测大肠癌和正常肠黏膜组织中 TIP30 基因启动子甲基化状态。采用 Qiagen 公司的 EpiTect Bisulfite kit 试剂盒进行基因组 DNA 甲基化修饰。采用 TOYOBO 公司的 Blend-plus 体系进行 PCR 扩增甲基化产物。载体选用 TAKARA 公司的 pMD18-T simple 进行 T-A 克隆测序。

1.2.2 免疫组织化学 采用北京中杉金桥生物技术公司生产免疫组织化学 S-P 试剂盒,生物素标记 DAB 显色试剂盒及 Imgenex 公司的鼠抗人 TIP30

抗体,Dako 公司的酶标抗小鼠 TIP30 抗体等进行标准的免疫组织化学流程实验。

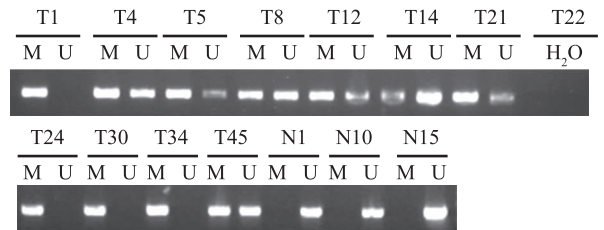
1.3 统计学方法

所有数据均采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,阳性率之间的比较采用 χ^2 和 Fisher's 精确检验方法,比较 TIP30 基因启动子甲基化状态,及其与 TIP30 蛋白表达的关系和临床特征,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 大肠癌 TIP30 启动子的甲基化状态

对 TIP30 转录起始位点周围的 450 个碱基对(包括密集的 CpG 岛)进行放大,应用 MSP 法测定 TIP30 启动子区的甲基化状态。将 DNA 经过亚硫酸氢盐处理后用作甲基化与未甲基化 TIP30 的 PCR 扩增。以蒸馏水作为阴性对照。经 MSP 法扩增后显示:在 50 例大肠癌组织中,有 18 例(36%) TIP30 启动子高甲基化,而在正常大肠组织标本中未见到一处高甲基化,见图 1。



T: colorectal cancer tissue cells; N: normal colorectal tissue cells; M: methylated primer amplification products; U: unmethylated primer amplification products

图 1 MSP 检测大肠癌组织与正常大肠组织中 TIP30 甲基化状态

Figure 1 The methylation status of TIP30 in the CRC tissues and normal tissues detected using MSP

为了进一步验证 MSP 结果的可靠性,我们对 MSP 产物进行 T-A 克隆测序验证。结果显示:在大肠癌组织 TIP30 基因高甲基化序列中,除 CG 二核苷酸外,其余的胞嘧啶(C)都转变为尿嘧啶(T);在正常大肠组织 TIP30 基因非甲基化序列中,所有的 C 都转变为 T,从而证实了 MSP 结果的可靠性。

2.2 大肠癌 TIP30 甲基化状态与 TIP30 蛋白表达的关系

在 18 例 TIP30 高甲基化的大肠癌肿瘤组织标本中,有 12 例(66.7%)显示 TIP30 蛋白的表达缺失;而在 32 例 TIP30 未甲基化的肿瘤组织标本中,仅有 8 例(25%)显示 TIP30 蛋白的表达缺失,有 24 例(75%)显示 TIP30 蛋白表达阳性。两两

比较, 差异有统计学意义。结果提示, 大肠癌 TIP30 蛋白表达与 TIP30 的甲基化状态明显相关, 见表 1。

表 1 大肠癌标本中 TIP30 的高甲基化状态及蛋白表达
Table 1 TIP30 hypermethylation status and protein expression in CRC samples

| TIP30 protein expression | Methylation | Non-methylation | χ^2 | P |
|--------------------------|-------------|-----------------|----------|-------|
| Positive | 6(33.3%) | 24(75.0%) | 8.333 | 0.006 |
| Negative | 12(66.7%) | 8(25.0%) | | |

2.3 TIP30 甲基化状态与大肠癌临床病理特征的关系

大肠癌 TIP30 启动子高甲基化与患者的年龄、肿瘤发生的部位均未显示出统计学差异; 而与血清 CEA 水平、淋巴结转移情况及临床分期组间阳性率差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。提示 TIP30 启动子高甲基化可能作为大肠癌的一个新的肿瘤标志物。

表 2 TIP30 甲基化状态与大肠癌的临床病理学特征
Table 2 Clinicopathologic characteristics and methylation status of TIP30 in CRC

| Characteristics | Methylation status | | χ^2 | P |
|-----------------------|--------------------|-------------|----------|-------|
| | Non-methylation | Methylation | | |
| Age(years) | | | 0.935 | 0.333 |
| <60 | 17 | 7 | | |
| ≥60 | 15 | 11 | | |
| Cancer site | | | 1.034 | 0.309 |
| Colon | 13 | 10 | | |
| Rectal | 19 | 8 | | |
| CEA level(ng/ml) | | | 7.975 | 0.005 |
| <15 | 22 | 5 | | |
| ≥15 | 10 | 13 | | |
| Lymph node metastasis | | | 8.528 | 0.003 |
| Negative | 19 | 3 | | |
| Positive | 13 | 15 | | |
| Clinical stage | | | 3.926 | 0.048 |
| Early | 20 | 6 | | |
| Advanced | 12 | 12 | | |

3 讨论

遗传学与表观遗传学(epigenetics)是一对相应的体系, 表观遗传学是针对可遗传基因表达的改变, 研究如何通过抑制、激活某类基因的表达来有选择性地利用某些基因组信息来实现研究目的, 不涉及 DNA 序列的变化。最近几年来, 随着科学家对表观遗传学的不懈探寻, 尤其是 DNA 甲基转移酶抑制物、组蛋白乙酰化抑制物等在肿瘤治疗中的成功

应用, 表观遗传学已经慢慢成为肿瘤研究的热点。DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑以及非编码 RNA 调控等表观遗传学调控方式广泛参与肿瘤发生发展的生物学进程^[6]。其中, DNA 甲基化被认为在 TIP30 异常表达中承担了重要的作用。

对特定基因 DNA 甲基化状态的检测可用于某些肿瘤的筛查, 因此对于肿瘤的早期诊断具有重要意义^[7-9]。事实上, O6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(MGMT)^[10]、细胞凋亡相关基因 CMTM3^[11]、细胞黏附侵袭相关基因 CDH3 和 CD133^[12-13]、胰岛素样生长因子结合蛋白 7(IGFBP7)^[14]等基因均已被证实其异常甲基化状态与大肠癌的发生密切相关^[15-16]。

本研究为了探讨 TIP30 在大肠癌中表达下调的调控机制, 对 50 例大肠癌肿瘤组织及配对癌旁组织中 TIP30 基因启动子甲基化状态进行检测, 结合相应临床资料进行分析。结果显示: 在肿瘤组织中, TIP30 启动子甲基化阳性率与淋巴结转移情况 ($P = 0.003$)、肿瘤标志物 CEA 水平 ($P = 0.005$) 以及临床分期 ($P = 0.048$) 正相关, 而与病变部位无关 ($P = 0.309$)。此外, TIP30 启动子甲基化水平与血清 CEA 水平存在正相关性 ($P = 0.005$), 提示其可能成为大肠癌肿瘤候选标志物之一。Lu 等^[17]以肝细胞癌为对象的研究取得了与本实验相似的结果, 他们发现在肝细胞癌中, 47% 患者 TIP30 基因启动子高甲基化, 而正常肝组织细胞中无此现象, 提示 TIP30 基因启动子的高甲基化与肝癌的发生发展有关。既往研究及本实验结果均提示抑癌基因 TIP30 启动子高甲基化是其表达下降的关键因素之一, 且与大肠癌生物学进程密切相关, 有望作为新型肿瘤标志物用于大肠癌的早期诊断以及预后评估。

本研究显示, TIP30 基因启动子在人大肠癌肿瘤组织中高甲基化, 而且是 TIP30 表达下调的重要因素之一, 与大肠癌患者的临床分期、淋巴结转移情况有关, 与肿瘤位置无关。TIP30 启动子 CpG 岛高甲基化有望成为一种新型肿瘤标志物辅助大肠癌诊断及评估预后。但是, TIP30 基因发生作用的详细机制是什么, TIP30 启动子 CpG 岛高甲基化与其转录、翻译的确切关系是怎样的, TIP30 的甲基化状态如何影响大肠癌的生物学行为? 这些问题, 均需要我们进一步研究, 以期为大肠癌的分诊断、预后评估及靶向治疗等提供更详实的理论基础。

参考文献:

- [1] Center MM, Jemal A, Smith RA, *et al.* Worldwide variations in colorectal cancer[J]. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59(6): 366-78.
- [2] Esteller M. Epigenetics in cancer[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(11): 1148-59.
- [3] Migheli F, Migliore L. Epigenetics of colorectal cancer[J]. *Clin Genet*, 2012, 81(4): 312-8.
- [4] Shi M, Yan SG, Xie ST, *et al.* Tip30-induced apoptosis requires translocation of Bax and involves mitochondrial release of cytochrome c and Smac/DIABLO in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(2): 263-74.
- [5] Zhang X, Ouyang XN, Li XD, *et al.* Relationship between TIP30 expression and colon cancer metastasis and prognosis[J]. *Di Er Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2005, 26(5): 488-91. [张霞, 欧阳学农, 李晓冬, 等. 肠癌组织中 TIP30 基因的表达与转移、预后间的关系及机制[J]. *第二军医大学学报*, 2005, 26(5): 488-91.]
- [6] Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy[J]. *Cell*, 2012, 150(1): 12-27.
- [7] Guenin S, Mouallif M, Deplus R, *et al.* Aberrant promoter methylation and expression of UTF1 during cervical carcinogenesis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42704.
- [8] Villalva C, Cortes U, Wager M, *et al.* O6-Methylguanine-Methyltransferase (MGMT) promoter methylation status in glioma stem-like cells is correlated to Temozolomide sensitivity under differentiation-promoting conditions[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 6983-94.
- [9] Pan J, Chen LW, Wang WW, *et al.* Clinical implications of methylation status of Apaf-1 and APC gene in bladder carcinoma[J]. *Zhongshan Da Xue Xue Bao (Yi Xue Ke Xue Ban)*, 2010, 31(3): 397-400, 405. [潘俊, 陈凌武, 王文卫, 等. 膀胱癌抑癌基因 Apaf-1 和 APC 的甲基化状况及其临床意义[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2010, 31(3): 397-400, 405.]
- [10] Hawkins NJ, Lee JH, Wong JJ, *et al.* MGMT methylation is associated primarily with the germline C > T SNP (rs16906252) in colorectal cancer and normal colonic mucosa[J]. *Mod Pathol*, 2009, 22(12): 1588-99.
- [11] Wang Y, Li J, Cui Y, *et al.* CMTM3, located at the critical tumor suppressor locus 16q22. 1, is silenced by CpG methylation in carcinomas and inhibits tumor cell growth through inducing apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(12): 5194-201.
- [12] Hibi K, Goto T, Mizukami H, *et al.* Demethylation of the CDH3 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(6): 2215-7.
- [13] Hibi K, Sakata M, Kitamura YH, *et al.* Demethylation of the CD133 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(6): 2235-7.
- [14] Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, *et al.* IGFBP7 is a p53-responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(3): 342-9.
- [15] Kang HJ, Kim EJ, Kim BG, *et al.* Quantitative analysis of cancer-associated gene methylation connected to risk factors in Korean colorectal cancer patients[J]. *J Prev Med Public Health*, 2012, 45(4): 251-8.
- [16] Yang E, Kang HJ, Koh KH, *et al.* Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(3): 567-75.
- [17] Lu B, Ma Y, Wu G, *et al.* Methylation of Tip30 promoter is associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(22): 7405-12.

[编辑校对: 安 凤]