

hMSH2 在胃癌组织中的表达及其与 DNA 甲基化之间的关系

程中华, 房静远, 杨 丽, 陈 紫, 陆 嵘, 朱红音, 顾伟齐, 陈晓宇, 彭延申, 施 尧

程中华, 房静远, 杨丽, 陈紫, 陆嵘, 朱红音, 顾伟齐, 陈晓宇, 彭延申, 施尧. 上海第二医科大学附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所 上海市 200001 国家自然科学基金资助项目, No. 30170413

高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金资助, No. 199946

项目负责人: 房静远, 200001, 上海市山东中路 145 号, 上海第二医科大学附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所. jingyuanfang@yahoo.com

电话: 021-62360930

收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-04-05

摘要

目的: 分析胃癌组织中 DNA 甲基化酶 Dnmt1 和 hMSH2 表达情况的相关性及与肿瘤生物学行为之间的关系。

方法: 以 real-time RT-PCR 法检测 28 例胃癌组织中 Dnmt1 和 hMSH2 mRNA 的表达 亚硫酸氢钠变性后测序分析 hMSH2 启动子区甲基化状态。

结果: 在 28 例胃癌组织中有 9 例 (32%) DNMT1 mRNA 的高表达 10 例 hMSH2 (35.7%) 的低表达在 hMSH2 低表达的胃癌组织中有 2 例存在 DNA 启动子区的高甲基化。两个基因 mRNA 的表达与胃癌生物学行为包括肿瘤大小淋巴结转移 组织学类型均无明显相关性。

结论: 胃癌组织中存在 Dnmt1 的高表达 DNA 甲基化在一定程度上参与了 hMSH2 基因表达的缺失。

程中华, 房静远, 杨丽, 陈紫, 陆嵘, 朱红音, 顾伟齐, 陈晓宇, 彭延申, 施尧. hMSH2 在胃癌组织中的表达及其与 DNA 甲基化之间的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1731-1733

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1731.asp>

0 引言

肿瘤组织多有 DNA 甲基化的紊乱. DNA 甲基化由 DNA 甲基化酶 (DNA methyltransferase Dnmt) 催化 他能够将甲基供体提供的甲基集团转移至胞嘧啶 5 位碳上形成 5-甲基胞嘧啶. DNA 甲基化酶包括参与甲基化的形成 (Dnmt3a 和 Dnmt3b 的主要作用) 和维持 (主要是 Dnmt1) 两类酶. 人类 DNA 错配修复系统 (mismatch repair system MMR) 是由一系列特异性修复 DNA 碱基错配的酶分子组成 此系统的存在能避免遗传物质产生突变保证 DNA 复制的高保真度. hMSH2 是目前研究较广泛的 DNA 错配修复基因 他的失活可导致 DNA 错配修复能力的降低 引起微卫星不稳定性 (microsatellite instability MSI) 可使癌基因激活或抑癌基因失活诱发细胞癌变^[1]. 现已发现 癌发生过程中导致错配修复基因失活的另一方式为 DNA 甲基化的改变 这种改变常伴有错配修复基因表达的丢失^[2-3]. 目前对于 hMSH2 启动子甲基化情况的研究还较少. 我们研究了胃癌组织中 DNA 甲基

化酶 Dnmt1 和 hMSH2 表达情况的相关性及与肿瘤生物学行为之间的关系并进一步分析了 hMSH2 启动子区的甲基化状态。

1 材料和方法

1.1 材料 2001-05/2002-07 组织学确诊为胃癌的手术患者 28 例 临床资料完整术前均未进行任何抗肿瘤治疗. 癌组织取自肿块中央非坏死部分癌旁组织取自距癌灶边缘 5 cm 以内的黏膜组织 正常组织取自距肿块 10 cm 以上的正常黏膜组织. 所有标本均经本院两位高年资病理科医生证实. 患者平均年龄 58.4 岁. 行胃癌根治术 27 例 姑息性胃大部切除术 1 例. 病理类型: 溃疡性腺癌 6 例 浸润溃疡 15 例 弥漫浸润腺癌 7 例. 临床分期: Ⅱ期 2 例 Ⅲ期 26 例. 淋巴结转移: 21 例存在淋巴结转移 7 例不存在。

1.2 方法 RNA 的提取和 cDNA 的合成见文献[4]. 定量 PCR 检测 Dnmt1 hMSH2 的表达方法见文献[4]. 具体引物和探针见表 1. hMSH2 DNA 亚硫酸氢钠变性后测序. DNA 经亚硫酸氢盐修饰能够使没有甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶后者在 PCR 扩增中以胸腺嘧啶形式扩增而原有甲基化的胞嘧啶则保持胞嘧啶不变. 处理步骤: 取 5 μg DNA 加 NaOH 至终浓度为 0.2 mol/L 37℃ 变性 10 min. 向变性 DNA 中加入新鲜配置的 10 mmol/L 的氰醌 30 μl 及 3 mol/L 的亚硫酸氢钠 (pH=5) 520 μl 加入矿物油 200 μl. 样品于 50℃ 孵育 16 min. 修饰后的 DNA 根据说明书用 Wizard DNA 纯化树脂 (Promega) 纯化 用 50 μl 水洗脱. 加 5.5 μl 3 mol/L NaOH 至洗脱液室温放置 5 min. 加 17 μl 10 mol/L 的醋酸胺 1 μl 的糖原及 500 μl 的 95% 乙醇过夜. 14 000 r/min 4℃ 离心 30 min 以 70% 乙醇洗沉淀物. 真空干燥 加 20 μl 水稀释. 处理后的 DNA 行巢式 PCR 基因 bank 号 AB006445 引物序列循环 1 为: 正义 5'-TGT TTA GAA AGA AAA AGG GA-3'; 反义 5'-AAA CCT CCT CAC CTC CT-3'. 循环 2 为: 正义 5'-AAA TAT TGG GAG GAG GAG GA-3'; 反义 5'-ACC CAC TAA ACT ATT TCC CA-3'. 产物片断 357 bp 位于第一外显子上游启动子 -32 -388. 两次 PCR 反应体系均为: 3 μL MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μL dNTP (2.5 mmol/L) 10 pmol 上下游引物模板 2 μL. 产物送上海申友生物科技公司测序。

统计学处理 t 检验 χ^2 检验 相关分析法。

2 结果

2.1 Dnmt1 与 hMSH2 mRNA 的表达 定量 RT-PCR 反

表1 定量PCR的引物和探针

Gene	正义引物 (5' → 3')	反义引物 (5' → 3')	探针
β-actin	CTG GCA CCC AGC ACA GAT ATG	GGA CAG CGA GGC CGA	ATC ATT GCT CCT CCT GAG
Dnmt1	GCA CCT CAT TTG CCG AAT ACA	TCT CCT GCA TCA GCC CAA ATA	AGT CCC GAG TAT GCG C
HMSH2	ATC CAA GGA GAA TGA TTG GTA TTT G	CAA AGA GAA TGT CTT CAA ACT GAG AGA	CAT ATA AGG CTT CTC CTG GC

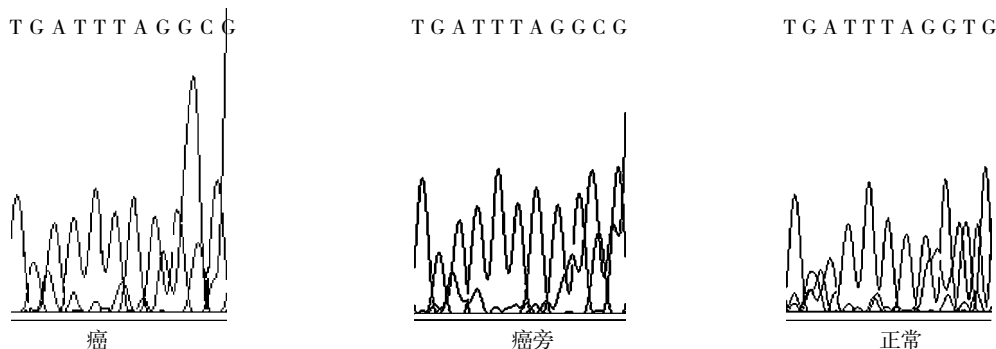


图1 hmsH2 测序结果.

应良好扩增符合要求. 28例胃癌组织中有9例(32%) Dnmt1高表达 10例(36%)不同程度的低表达; 癌组织平均 Dnmt1 为 5.08 10.11 明显高于正常组织均值 1 ($P=0.04$). hMSH2 10例(35.7%)低表达 3例(10.7%)高表达 其余无明显变化. 癌组织平均 hMSH2 为 1.86 3.01 与正常组织无明显差异 ($P=0.14$). 在 mRNA 表达水平上 Dnmt1 与 hMSH2 无显著相关性 ($P=0.53$).

2.2 hMSH2 亚硫酸氢钠测序 将 10 例 hMSH2 mRNA 低表达的样品 DNA 进行测序分析其启动子区甲基化情况. 用亚硫酸氢钠测序法可以检测到其中 2 例存在癌组织 DNA 启动子区的高甲基化. 测序结果见图 1. 正常组织中单链 DNA CpG 中的未甲基化的胞嘧啶已被亚硫酸氢钠脱氨基而变成 U U 经 PCR 扩增后被 T 代替; 反之在癌和癌旁组织相应的甲基化序列中 CpG 二核苷酸中的胞嘧啶保持不变说明他们因甲基化而未被亚硫酸氢盐修饰而 CpG 二核苷酸以外的胞嘧啶由于未被甲基化都变成 T(U).

2.3 Dnmt1 hmsH2 与肿瘤生物学行为的关系 不但如我们前文所述^[4] Dnmt1 转录水平与胃癌生物学行为不明确关系且 hMSH2 基因 mRNA 表达与肿瘤大小淋巴结转移组织学类型均无明显相关性.

3 讨论

基因不稳在胃癌的发生中起重要作用. 这种基因不稳可以分为二种不同的形式即染色体不稳和微卫星不稳. hMLH1 和 hMSH2 是错配修复基因系统中最重要成员. 胃癌 hMLH1 突变均发生在 MSI 阳性的癌组织但相当一部分 MSI 阳性胃癌组织并未发现 hMLH1 和

hMSH2 基因的突变因此可能有其他机制参与了这种缺陷. 目前认为肿瘤发生过程中导致 hMLH1 失活的另一重要方式为 DNA 甲基化的改变这种改变可引起 hMLH1 表达的丢失^[5]. Dnmt1 是体内最重要的 DNA 甲基化酶 他能维持 DNA 的甲基化修饰. 在癌细胞中 Dnmt1 基因表达升高往往先于高甲基化改变一般认为 Dnmt1 活性升高是癌组织的一个具有特征的早期分子改变. 很多肿瘤组织存在着不同程度的 Dnmt1 高表达^[6-7]. 但目前对于 DNA 甲基化是否能引起 hMSH2 表达缺失仍有异议^[8-9].

我们发现 32 的胃癌组织存在 Dnmt1 的高表达癌区 Dnmt1 的表达均值显著高于正常黏膜区 ($P=0.04$); Dnmt1 的表达与肿瘤大小淋巴结转移组织学类型均无明显相关性. 这一结果与日本学者得到的结论相近^[10]. 同时我们还发现胃癌组织中的 Dnmt1 高表达以及 DNA 甲基化在一定程度上参与了 hMSH2 基因表达的缺失. 我们同时发现这两例存在 hMSH2 癌组织启动子高甲基化的病例其 Dnmt1 在 mRNA 的表达上并无明显变化我们猜测 Dnmt1 可能通过影响 hMLH1 而非 hMSH2 的甲基化状态从而导致微卫星不稳定并进一步参与了肿瘤的进程. 在本次实验中我们没有观察到 Dnmt1 和 hMSH2 与肿瘤各种生物学行为之间有相关性. 我们拟进一步研究 DNA 甲基化与微卫星不稳定之间的关系.

4 参考文献

- 1 Tang R, Changchien CR, Wu MC, Fan CW, Liu KW, Chen JS, Chien HT, Hsieh LL. Colorectal cancer without high microsatellite instability and chromosomal instability-an alternative genetic pathway to human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2004;25:841-846
- 2 Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Yang JM, Liu HF, Peng GY, Xiao TL, Luo YH. Mutation and methylation of hMLH1 in gastric carcinomas with microsatellite instability. *World J*

- Gastroenterol* 2003;9:655-659
- 3 Kang GH, Lee S, Shim YH, Kim JC, Ro JY. Profile of methylated CpG sites of hMLH1 promoter in primary gastric carcinoma with microsatellite instability. *Pathol Int* 2002;52:764-768
- 4 程中华, 房静远, 杨丽, 陈紫, 陆嵘, 陆娟, 朱红音, 顾伟齐. 人胃癌组织 DNA 甲基化酶去甲基化酶与肿瘤相关基因的表达. *中华消化杂志* 2004;24:203-206
- 5 Sakata K, Tamura G, Endoh Y, Ohmura K, Ogata S, Motoyama T. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in solitary and multiple gastric cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer* 2002;86:564-567
- 6 Girault I, Tozlu S, Lidereau R, Bieche I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003;9:4415-4422
- 7 Sato M, Horio Y, Sekido Y, Minna JD, Shimokata K, Hasegawa Y. The expression of DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins is not associated with the methylation status of p14(ARF), p16(INK4a) and RASSF1A in human lung cancer cell lines. *Oncogene* 2002;21:4822-4829
- 8 Kim HC, Kim CN, Yu CS, Roh SA, Kim JC. Methylation of the hMLH1 and hMSH2 promoter in early-onset sporadic colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Int J Colorectal Dis* 2003;18:196-202
- 9 Saito T, Oda Y, Kawaguchi K, Takahira T, Yamamoto H, Sakamoto A, Tamiya S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Possible association between tumor-suppressor gene mutations and hMSH2/hMLH1 inactivation in alveolar soft part sarcoma. *Hum Pathol* 2003;34:841-849
- 10 Kanai Y, Ushijima S, Kondo Y, Nakanishi Y, Hirohashi S. DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. *Int J Cancer* 2001;91:205-212

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

大鼠胃壁细胞的分离及纯化

李燕舞, 王建华, 王汝俊

李燕舞, 王建华, 王汝俊, 广州中医药大学脾胃研究所 广东省广州市 510405
国家自然科学基金项目, No. 30271650
项目负责人: 王汝俊, 510405, 广东省广州市机场路 12 号, 广州中医药大学脾胃研究所.
电话: 020-36585555
收稿日期: 2004-03-11 接受日期: 2004-04-27

摘要

目的: 建立和完善大鼠胃壁细胞分离和纯化的方法.

方法: 采用 Pronase-EDTA 酶消化法脱颈椎处死大鼠取胃制作翻转胃袋并注入消化酶溶液. 通过三步即消化-分散-纯化来完成大鼠胃壁细胞的游离和收集过程.

结果: 即时分离细胞经 HE 染色鉴别纯度达到 70% 活度经台盼兰排除实验鉴定可达到 90% 以上在 0-4 环境下 22 h 后细胞活度仍可达 70-80% 左右.

结论: 严格控制分离细胞操作的条件可获得较为稳定的实验结果包括细胞的活度和纯度.

李燕舞, 王建华, 王汝俊. 大鼠胃壁细胞的分离及纯化. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1733-1735

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1733.asp>

0 引言

壁细胞是胃底腺干细胞分化的一种终末细胞主要功能是分泌胃酸在一些种属包括人猴子兔猫豚鼠牛等壁细胞还有分泌内因子的作用这对于维生素 B₁₂ 的吸收必不可少但对于大鼠和小鼠壁细胞的功能只有泌酸^[1]. 由于许多消化系疾病均与胃酸分

泌有关故对胃黏膜及壁细胞的研究必不可少. 国外 1970 年代就建立了分离壁细胞的方法^[1]. 近年国内李晓波 *et al*^[2]建立了兔胃壁细胞的分离方法我室聂克 *et al*^[3]根据 Lewin 的方法略加改善建立了大鼠胃壁细胞的分离方法. 由于壁细胞的分离较难操作过程较为复杂因此分离细胞的活率和纯度也存在较大差异我们在此基础上对该法进一步摸索有几点体会.

1 大鼠胃壁细胞的分离方法

1.1 材料 实验动物采用 SD 普通级大鼠雌雄均可 200-250 g 实验前不予禁食. 基础营养液包括: NaH₂PO₄ Na₂HPO₄ NaHCO₃ NaCl KCl HEPES Glucose. A 液: 基础液 + BSA + EDTA B 液: 基础液 + BSA + CaCl₂ + MgCl₂ C 液: B 液 + DTT 消化液: A 液 + pronase. 其中 A 液中 BSA 的含量由 20 g/L 减至 10 g/L 细胞分离的数量和活率未见明显变化. HEPES 配制时应单独溶解为无色溶液, 若颜色变黄时会影响细胞分离结果. DTT 在临用前加入, 所用各种营养液均用 NaOH 调整 pH 值 7.0-7.5 酶的用量应控制在 1 g/L EDTA 用量为 2 mmol/L.

1.2 胃袋 脱颈椎处死动物剖开腹腔结扎贲门和幽门将取出的胃放入冰冷的生理盐水中冲洗表面由胃底剪开一口用玻璃棒将胃翻转后再置冰冷生理盐水中洗涤胃内容物及黏液在胃盲囊与胃体交界处结扎切口由胃窦部进针(4 号)注入消化液至胃袋充满为止. 若胃袋出现充血溃疡胃内容物变稀等异常状况则对胃壁细胞的分离结果有很大影响.