

DLC-1基因甲基化检测与肝细胞癌复发转移的关系

刘继斌, 张素青, 施民新, 邵冰锋, 张一心

刘继斌, 张素青, 施民新, 邵冰锋, 张一心, 南通大学附属肿瘤医院肿瘤研究所 江苏省南通市 226361
江苏省南通市科技局课题资助项目, No. ntl200305
作者贡献分布: 此课题由刘继斌设计; 研究过程由刘继斌, 张素青及施民新操作完成; 外科标本由张素青及邵冰锋完成; 研究所用新试剂及分析工具由刘继斌提供; 数据分析由刘继斌及张一心完成; 本论文写作由刘继斌及张一心完成.
通讯作者: 张一心, 226361, 江苏省南通市通州平潮镇通扬北路30号, 南通大学附属肿瘤医院肿瘤研究所. tians2008@163.com
电话: 0513-86729067
收稿日期: 2007-11-21 修回日期: 2008-03-08

Relationship between methylation status of DLC-1 gene and metastasis of hepatocellular carcinoma

Ji-Bin Liu, Su-Qing Zhang, Min-Xin Shi, Bing-Feng Shao, Yi-Xin Zhang

Ji-Bin Liu, Su-Qing Zhang, Min-Xin Shi, Bing-Feng Shao, Yi-Xin Zhang, Institute of Oncology, Tumor Hospital Affiliated to Jiangsu Nantong University, Nantong 226361, Jiangsu Province, China

Supported by: the Foundation from Department of Science and Technology of Nantong City, Jiangsu Province, No. ntl200305

Correspondence to: Yi-Xin Zhang, Institute of Oncology, Tumor Hospital Affiliated to Nantong University, 30 Tongyang Northern Road, Tongzhou Pingchao Town, Nantong 226361, Jiangsu Province, China. tians2008@163.com

Received: 2007-11-21 Revised: 2008-03-08

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the methylation status of DLC-1 gene and metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Seventy-three surgical specimens of human HCC were divided into high- and low-invasion groups according to their clinicopathological features. The methylation status of DLC-1 gene was detected in both groups by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP).

RESULTS: The methylation level of DLC-1 gene in HCC specimens with high invasion was significantly higher than that in specimens with low invasion ($\chi^2 = 4.3567, P < 0.05$). The double-positive rate of alpha-fetoprotein (AFP) and

hepatitis B virus (HBV) was significantly different between methylation-positive and -negative specimens ($\chi^2 = 4.4224, P < 0.05$). The methylation status of DLC-1 gene was also related to TNM stages ($\chi^2 = 10.8478, P < 0.05$). After short-term following-up, the median survival time was significantly different between HCC patients with positive- and negative methylation of DLC-1 gene (9.45 mo vs 36 mo, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The aberrant methylation of DLC-1 gene may not only offer an effective method for the early auxiliary diagnosis of invasion and metastasis, but also serve as a new target for HCC therapies.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Metastasis; Methylation; DLC-1; Methylation-specific polymerase chain reaction

Liu JB, Zhang SQ, Shi MX, Shao BF, Zhang YX. Relationship between methylation status of DLC-1 gene and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(11): 1237-1240

摘要

目的: 研究DLC-1基因甲基化检测与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)复发转移的关系。

方法: 73例HCC标本依据临床以及病理学特征被分为高侵袭组和低侵袭组; 采用甲基化特异性PCR对不同侵袭组HCC之间DLC-1基因甲基化表达进行分析。

结果: DLC-1甲基化表达率高侵袭组明显高于低侵袭组, 二者之间有明显差异($\chi^2 = 4.3567, P < 0.05$)。DLC-1甲基化阳性与阴性患者之间AFP、HBV双阳性率有明显差异($\chi^2 = 4.4224, P < 0.05$); TNM分期越后DLC-1甲基化程度越高($\chi^2 = 10.8478, P < 0.05$); 短期随访发现DLC-1甲基化的HCC患者中位生存期低于非甲基化患者(9.45 mo vs 36 mo, $P < 0.05$)。

结论: DLC-1基因甲基化可作为HCC复发转移监测指标, 并可作为靶向治疗HCC复发转移的新靶点。

■背景资料

目前随着治疗手段的提高, 肝癌患者的生存期明显延长, 肝癌的转移复发, 对于肝癌患者和医务工作者是个迫切需要解决的问题。

■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

■研发前沿

DLC-1基因是一个与肝癌发生、转移乃至复发关系密切的肿瘤抑制基因。目前有关DNA甲基化与肿瘤之间的关系已成为近年来肿瘤学研究的热点。

关键词: 肝细胞癌; 转移; 甲基化; DLC-1; 甲基化特异性PCR

刘继斌, 张素青, 施民新, 邵冰峰, 张一心. DLC-1基因甲基化检测与肝细胞癌复发转移的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(11): 1237-1240

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1237.asp>

0 引言

肝癌是严重危害人类生命健康的重大疾病, 肝癌手术切除后, 生存率约40%左右, 但仍然有50%左右的患者手术后出现转移复发. DLC-1基因定位于人类染色体8p21.3-22^[1]. 研究发现DLC-1基因在肝癌、乳腺癌、结直肠癌中常低表达或表达缺失^[2]. 而DNA启动子甲基化的改变通常是作为肿瘤抑制基因未被激活的机制^[3-4]. 研究显示甲基化是在肝癌、乳腺癌、肠癌和前列腺癌中DLC-1表达低下的原因^[5]. DLC-1基因甲基化在HCC复发转移的作用未见有报道. 通过甲基化特异性PCR技术检测分析DLC-1基因甲基化在不同转移潜能临床手术标本中的表达, 为进一步研究DLC-1基因甲基化在肝细胞癌复发转移中的作用奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2005-03/2006-10南通大学附属肿瘤医院73例肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC及癌旁正常组织(其中12例含癌栓)手术切除标本, 标本均经过病理证实. 标本离体10 min内取材, 液氮速冻5 min后放置-80℃保存. HCC依据临床以及病理学特征被分为高侵袭组和低侵袭组, 肿瘤病灶局限、肉眼以及镜下均无肝内播散和门静脉浸润为低侵袭组, 共32例; 肿瘤组织伴有多发性肝内播散和(或)门静脉主干癌栓者为高侵袭组, 共41例. 德国Biometra温度梯度PCR扩增仪; ECPS3000/150电泳仪; 美国Beckman Allegra™ RA 64R高速低温离心机; 美国BIO-RAD公司凝胶图像分析仪. 参考Wong *et al*^[7]根据GenBank的DLC-1甲基化引物由上海生工公司设计合成, DLC-1甲基化引物为(从-31到+147 bp): 5'-TTTAAAGATCGAAACGAGGGAGCG-3'(forward)和5'-CCCAACGAAAAAACCCGACTAACG-3'(reverse). 非甲基化引物为(从-28到+144 bp): 5'-TTTTTTAAAGATTGAAATGAGGGAGTG-3'(forward)和5'-AAACCCAACAAAAAACCCA ACTACA-3'(reverse).

1.2 方法

1.2.1 DNA提取: DNA提取试剂盒采用上海闪晶生物公司临床标本基因组DNA抽提试剂盒. 严格按照操作说明, 具体如下: (1)用手术剪将标本剪成小块, 用液氮将50 mg左右样品碾碎转移, 加入200 μL LB, 电动匀浆, 然后将样品转移到1.5 mL离心管中, 彻底混匀室温10 min. (2)加入200 μL氯仿, 剧烈振荡20 s, 然后15 000 r/min离心5 min, 取上清液转入吸附柱, 9000 r/min离心1 min, 弃滤液. (3)在吸附柱内加500 μL清洗液, 9000 r/min离心1 min, 弃滤液. (4)再15 000 r/min离心2 min, 以彻底去除残余. (5)将吸附柱重新放在一新离心管中, 加入50 μL洗脱液EB. (6)10 000 r/min离心1 min, 收集到管内的溶液即为核酸溶液, 紫外分光光度计测定DNA含量, 吸光度 $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$, 4℃保存备用.

1.2.2 DNA甲基化处理: DNA甲基化处理采用美国Zymo Research公司的EZ DNA Methylation-Gold Kit™试剂盒. 严格按照操作说明, 实验前混匀CT保存试剂, 即加900 μL水M-Dissolving缓冲液和300 μL M-Dilution缓冲液到一个试管. 加130 μL CT保存试剂和20 μL DNA样品混合. 按照以下温度程序步骤操作, 98℃ 10 min, 64℃ 2.5 h, 最后放置4℃备用. 加660 μL M-Binding缓冲液到Zymo-spin IC吸附柱中, 再加样品盖紧盖子, 颠倒混合几分钟. 全速10 000 r/min离心1 min, 倒掉离心液. 加20 μL M-Desulphonation缓冲液到吸附柱中, 放置15-20 min. 全速10 000 r/min离心1 min. 加200 μL M-Wash缓冲液到吸附柱中, 重复这种步骤多次. 加10 μL M-Elution缓冲液直接到吸附柱基质, 放置到1.5 mL试管全速10 000 r/min离心2 min, 直至分离出所需处理DNA.

1.2.3 MSP反应: 甲基化PCR反应体系为10×PCR缓冲液2.5 μL, 2.0 mmol/L 4×dNTP混合物0.5 μL, 引物3 μL, TaKaRa™热启动Taq酶0.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 模板3 μL, 总体积25 μL, 甲基化扩增体系为预变性95℃ 12 min, 随后94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35个循环, 最后延伸72℃ 10 min, 非甲基化扩增体系除了退火温度提高到58℃外其他均相同. 扩增产物1%琼脂糖凝胶电泳, 紫外光照显带.

对进行MSP反应的全部HCC患者进行随访, 生存期计算从治疗开始日起到死亡或2006-03末次随访结束.

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件分析, 卡方检验, $P < 0.05$ 有统计学意义.

■相关报道

Yuan *et al*学者认为DNA甲基化改变是癌变早期发现, 早期预测和癌症风险预后的最可能的指标之一, 大范围硬癌和血液恶性病变DLC-1甲基化的检测是有警示意义的.

2 结果

2.1 不同侵袭组DLC-1甲基化表达 73例HCC临床标本中, 41例高侵袭组中12例DLC-1甲基化表达阳性, 阳性率为29.3%, 32例低侵袭组中3例DLC-1甲基化表达阳性, 阳性率为9.375%; 二者之间有明显的差异($\chi^2 = 4.3567, P < 0.05$, 图1).

2.2 DLC-1甲基化阳性与AFP(+), HBV(+)的关系 73例HCC患者中, 17例DLC-1甲基化阳性占23.3%; 癌旁正常组织组均无1例甲基化阳性. 17例DLC-1甲基化阳性患者中AFP, HBV双阳性者为16例占94.11%; 56例DLC-1甲基化阴性患者中AFP, HBV双阳性者为42例占73.0%; 二者之间有明显的差异($\chi^2 = 4.4224, P < 0.05$).

2.3 DLC-1甲基化与HCC TNM分期 73例HCC患者中, I期14例, 甲基化阳性1例(7.14%); II期18例, 甲基化阳性2例(11.1%); III期20例, 甲基化阳性5例(20.0%); IV期21例, 甲基化阳性7例(33.3%). 因I期, II期甲基化阳性太少需要合并统计处理, 合并后三者之间有明显的差异($\chi^2 = 10.8478, P < 0.05$).

17例甲基化阳性的HCC患者中, 12例复发或转移, 占70.6%; 56例非甲基化阳性者中, 21例复发或转移, 占37.5%, 二者之间有明显的差异($\chi^2 = 5.7641, P < 0.05$). HCC患者生存期1-20(中位生存期11.52) mo, 其中甲基化患者中位生存期9.45 mo, 非甲基化患者中位生存期14.36 mo, DLC-1甲基化的HCC患者中位生存期低于非甲基化患者($P < 0.05$).

3 讨论

DLC-1全称为肝癌缺失基因1, 是一种肿瘤抑制基因; 位于人类染色体8p21.3-22位置, 在人类许多肿瘤中发现在这个位置上是缺失的. DLC-1 cDNA全长为7.5 kb编码1083个氨基酸的分子量122 kDa的一种蛋白, 与大鼠p122 RhoGAP基因有86%的同源, 后者是GTP酶的激动蛋白, 通过刺激GTP酶的活性调控Rho蛋白^[7]. Durkin *et al*^[12]研究认为DLC-1与小鼠p122同源, 与调控细胞增殖和黏附的信号传导通路关系密切. Ng *et al*^[6]在 DLC-1缺失的肝癌细胞系中转染DLC-1 cDNA后发现其明显的抑制了肿瘤细胞的生长并且降低了克隆信息. DLC-1在原发性HCC中发挥抑制癌细胞增殖的功能. Wong *et al*^[7]研究显示Rho GTP酶信号传导通路在HCC的侵袭转移中有重要作用. 现已发现DLC-1基因表达产物为RhoA和Cdc42特异性的GTP酶激活蛋白,

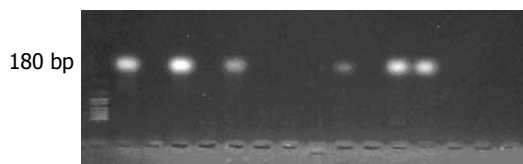


图1 在肝癌组织甲基化的DLC-1基因.

与调控细胞增殖和黏附的信号传导通路关系密切, 主要通过下调Rho的活性而抑制肿瘤. 研究发现DLC-1基因在肝癌、乳腺癌、结直肠癌中常低表达或表达缺失. 而DNA启动子甲基化的改变通常是作为肿瘤抑制基因未被激活的机制. Esteller *et al*^[13]在多种类型的肿瘤中发现了其基因的过甲基化. Kim *et al*^[14]运用Northern和Southern blot研究发现在9例人类消化系统肿瘤细胞系中有7例没有表达DLC-1 mRNA而不是DLC-1基因. 为此该学者使用甲基化特异性PCR(MSP)和Southern blot研究DLC-1的甲基化, 发现在7例中有5例没有表达DLC-1 mRNA的消化系统肿瘤细胞系中DLC-1 CpG岛发生了甲基化. 研究发现甲基化是在肝癌, 乳腺癌, 肠癌, 和前列腺癌中DLC-1表达低下的原因. Goodison *et al*^[18]研究发现DLC作为转移抑制基因, 通过GTP酶活性抑制肿瘤的转移. Ueki *et al*^[15]研究发现在细胞系中抑癌基因DNA发生甲基化的, 其来源的原代细胞中也同样发生了甲基化. Yuan *et al*^[5]认为DNA甲基化改变是癌变早期发现, 早期预测和癌症风险预后的最可能的指标之一, 大范围硬癌和血液恶性病变DLC-1甲基化的检测是有警示意义的. 结合众多学者的研究, 我们推测DLC-1基因甲基化在肝细胞癌侵袭转移中发挥着重要的作用. 目前有关DNA甲基化与肿瘤之间的关系已成为近年来肿瘤学研究的热点. 启动子区CPG岛甲基化可影响基因表达, 对于肿瘤细胞, 甲基化异常可通过多种途径影响基因转录与表达, 导致细胞分化与增殖异常. CpG位点甲基化异常可作为恶变的生物学指标, MPCR为肿瘤研究提供了一种快速、简便、灵敏的方法.

影响肝癌侵袭转移的因素有很多, 目前仍未有较为客观的标准. 本研究采用宋丽洁 *et al*^[9]采取的比较公认的影响肝癌侵袭转移的主要因素门静脉癌栓的有无(或)肝内有无播散结节作为划分标准, 将临床标本划分为高低侵袭组. 本研究发现肝癌组织甲基化的DLC-1大约为180 bp, 且DLC-1甲基化表达率高侵袭组明显高于低侵袭组, 二者之间有明显的差异($P < 0.05$). 此

■应用要点

检测肝癌患者 DLC-1基因甲基化可以预测可能的转移、复发. 技术成熟推广容易, 不需要特殊仪器, 只要开展临床PCR工作的医院均可以使用.

■同行评价

本文提出HCC患者DLC-1基因甲基化可能成为靶向控制肝细胞癌转移和复发的靶点,研究内容具有临床实用意义。

结果提示DLC-1甲基化可能是肝癌侵袭转移的机制之一。采用陈龙邦 *et al*^[10]研究方法研究与AFP(+), HBV(+))的关系分析发现: DLC-1甲基化阳性与DLC-1甲基化阴性患者二者之间有明显的差异($P<0.05$); 说明DLC-1甲基化与AFP(+), HBV(+))有关。研究DLC-1甲基化与HCC TNM分期的关系发现分期越后DLC-1甲基化程度越高。由于随访时间短只能简单说明DLC-1甲基化的HCC 患者中位生存期低于非甲基化患者($P<0.05$)。但长期随访是否支持此结论有待长期观察。

早期发现, 早期预测可能出现的转移复发, 并且给予及时的预防与治疗, 对于肝癌患者至关重要。通过以上研究本文作者认为DLC-1基因甲基化检可作为肝细胞癌复发转移监测指标, 并可作为靶向治疗肝细胞癌复发转移的新的靶点。

4 参考文献

- 1 Yuan BZ, Zhou X, Durkin ME, Zimonjic DB, Gumundsdottir K, Eyfjord JE, Thorgeirsson SS, Popescu NC. DLC-1 gene inhibits human breast cancer cell growth and in vivo tumorigenicity. *Oncogene* 2003; 22: 445-450
- 2 Yuan BZ, Miller MJ, Keck CL, Zimonjic DB, Thorgeirsson SS, Popescu NC. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP. *Cancer Res* 1998; 58: 2196-2199
- 3 Herman JG. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 359-367
- 4 Jones PL, Wolffe AP. Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 339-347
- 5 Yuan BZ, Durkin ME, Popescu NC. Promoter hypermethylation of DLC-1, a candidate tumor suppressor gene, in several common human cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 140: 113-117
- 6 Ng IO, Liang ZD, Cao L, Lee TK. DLC-1 is deleted in primary hepatocellular carcinoma and exerts inhibitory effects on the proliferation of hepatoma cell lines with deleted DLC-1. *Cancer Res* 2000; 60: 6581-6584
- 7 Wong CM, Lee JM, Ching YP, Jin DY, Ng IO. Genetic and epigenetic alterations of DLC-1 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 7646-7651
- 8 Goodison S, Yuan J, Sloan D, Kim R, Li C, Popescu NC, Urquidí V. The RhoGAP protein DLC-1 functions as a metastasis suppressor in breast cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6042-6053
- 9 宋丽杰, 叶胜龙, 王凯峰, 翁永强, 梁春敏, 孙瑞霞, 赵燕, 刘银坤, 汤钊猷. DLC-1基因表达与肝细胞癌复发转移的关系. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 428-431
- 10 陈龙邦, 林勃, 唐永明, 王晶. 原发性肝癌患者血清p16和DAPK基因启动子甲基化的研究. *肿瘤防治研究* 2006; 33: 175-176
- 11 Homma Y, Emori Y. A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C-delta stimulating activities. *EMBO J* 1995; 14: 286-291
- 12 Durkin ME, Yuan BZ, Thorgeirsson SS, Popescu NC. Gene structure, tissue expression, and linkage mapping of the mouse DLC-1 gene (Arhgap7). *Gene* 2002; 288: 119-127
- 13 Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-3229
- 14 Kim TY, Jong HS, Song SH, Dimtchev A, Jeong SJ, Lee JW, Kim TY, Kim NK, Jung M, Bang YJ. Transcriptional silencing of the DLC-1 tumor suppressor gene by epigenetic mechanism in gastric cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 3943-3951
- 15 Ueki T, Walter KM, Skinner H, Jaffee E, Hruban RH, Goggins M. Aberrant CpG island methylation in cancer cell lines arises in the primary cancers from which they were derived. *Oncogene* 2002; 21: 2114-2117

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版。在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/submission@wjgnet.com>, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d。来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。(常务副总编辑: 张海宁 2008-04-18)