

新疆哈萨克族胃癌中*Smad4*基因启动子的甲基化状态

刘玺, 陈卫刚, 李睿, 刘芳, 刘晓燕, 康雪, 马聪, 窦玉琴, 郑勇

刘玺, 陈卫刚, 李睿, 刘芳, 刘晓燕, 康雪, 郑勇, 石河子大学医学院第一附属医院消化内科 新疆维吾尔自治区石河子市 832000

马聪, 新疆伊犁州友谊医院 新疆维吾尔自治区伊宁市 835000

窦玉琴, 新疆生产建设兵团农四师医院 新疆维吾尔自治区伊宁市 835000

刘玺, 主要从事消化系统肿瘤的相关研究。

石河子大学医学院基础与临床医学联合科研基金资助项目, No. LHJJ2010BO4; 十一五国家科技支撑计划基金资助项目, No. 2009BAI82B05

作者贡献分布: 此课题由郑勇、陈卫刚、李睿及刘芳设计; 研究过程由刘玺、刘晓燕及康雪操作完成; 研究所用部分标本由马聪与窦玉琴提供; 数据分析由刘玺完成; 本论文写作由刘玺与郑勇完成。

通讯作者: 郑勇, 教授, 主任医师, 博士生导师, 国务院“政府特殊津贴”专家, 国家科技支撑计划项目首席科学家, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市北二路32小区, 石河子大学医学院第一附属医院消化内科。55487726@qq.com

收稿日期: 2013-01-06 修回日期: 2013-05-08

接受日期: 2013-07-01 在线出版日期: 2013-07-18

DNA methylation of *Smad4* promoter in gastric cancer in Xinjiang Kazak patients

Xi Liu, Wei-Gang Chen, Rui Li, Fang Liu, Xiao-Yan Liu, Xue Kang, Cong Ma, Yu-Qin Dou, Yong Zheng

Xi Liu, Wei-Gang Chen, Rui Li, Fang Liu, Xiao-Yan Liu, Xue Kang, Yong Zheng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical School, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Cong Ma, Friendship Hospital of Yili, Yining 835000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Yu-Qin Dou, the Fourth Hospital of Xinjiang Production and Construction Corps, Yining 835000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: the Joint Basic and Clinical Medicine Research Fund of Shihezi University School of Medicine, No. LHJJ2010BO4; the National Science and Technology Support Program during the Eleventh “Five-year Plan” Period, No. 2009BAI82B05

Correspondence to: Yong Zheng, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical School, 32 Xiaoku Beier Road, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. 55487726@qq.com

Received: 2013-01-06 Revised: 2013-05-08

Accepted: 2013-07-01 Published online: 2013-07-18

Abstract

AIM: To determine the relationship between methylation of the *Smad4* promoter and the incidence of gastric cancer (GC) in Kazakh Chinese in

Xinjiang Uygur Autonomous Region of China.

METHODS: Thirty patients with gastric cancer and 30 normal individuals were recruited from Kazak Autonomous Prefecture, an area with a high prevalence of gastric cancer. MassARRAY was used to detect *Smad4* promoter methylation in samples taken from both GC patients and healthy controls.

RESULTS: The mean CpG methylation rate in GC was higher than that in normal gastric tissue (26.5% vs 21.7%). The mean methylation rates in CpG 3-4 and CpG 10-11 in GC were significantly higher than those in normal controls (19.1% vs 10.9%; 20.3% vs 11.5%, both $P < 0.05$).

CONCLUSION: The *Smad4* promoter methylation status is correlated with the presence of GC in Kazakh Chinese. Changes in the methylation of CpG 3-4 and/or CpG 10-11 of the *Smad4* gene may lead to the development of GC.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Gastric cancer; *Smad4* gene; Methylation; Kazakh patients; MassARRAY

Liu X, Chen WG, Li R, Liu F, Liu XY, Kang X, Ma C, Dou YQ, Zheng Y. DNA methylation of *Smad4* promoter in gastric cancer in Xinjiang Kazak patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(20): 1907-1913 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1907.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i20.1907>

摘要

目的: 探讨*Smad4*基因启动子甲基化在新疆哈萨克族胃癌发病中的作用。

方法: 收集新疆哈萨克族胃癌组织30例及哈萨克族正常胃黏膜组织30例作为研究对象, 哈萨克族胃癌及哈萨克族正常胃黏膜组织均取自新疆新源县哈萨克族胃癌研究现场。运用MassARRAY技术平台检测*Smad4*基因启动子的甲基化状态。

结果: (1)哈萨克族胃癌组与对照组中*Smad4*基因启

■背景资料

胃癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 据世界卫生组织公布的报告, 世界胃癌年发病率为13.86/10万例。我国每年胃癌患者数占全球胃癌发病总人数的1/3以上, 是胃癌的高发区, 且胃癌年患病率和死亡率均高出世界平均水平2倍多。目前我国胃癌死亡率为24.71/10万, 居各类癌症死亡率的第1位。资料显示, 在我国少数民族中, 哈萨克族胃癌死亡率居第1位; 另据最新流行病学研究调查结果显示, 在新疆哈萨克族人群中胃癌死亡率为41.3/10万, 高于我国胃癌死亡率的平均水平, 同时也高于同地区汉族和维吾尔族胃癌死亡率(18.5/10万, 14.2/10万), 居新疆少数民族之首。

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)总医院消化内科

■ 研发前沿

近年来,随着甲基化研究水平的提高和技术的快速发展,已经有一些高通量、快速检测基因单个或者多个CpG位点的技术,方便研究出甲基化导致基因沉默的机制,其中一个技术是基质辅助激光解吸电离时间飞行质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS).此方法已经成为国内外检测基因甲基化的金标准。

动子的CpG单位平均甲基化率分别为26.5%和21.7%,哈族胃癌组*Smad4*基因启动子平均甲基化率要明显高于哈族正常组;(2)*Smad4*基因在哈族胃癌中CpG单位3-4与CpG单位10-11平均甲基化水平分别为19.1%和20.3%,两者的平均甲基化水平明显高于正常对照的10.9%和11.5%,两者的平均甲基化率在哈族癌组和对照组中有显著差异($P<0.05$)。

结论: (1)哈萨克族胃癌的发生可能与*Smad4*基因启动子区的甲基化状态有关;(2)*Smad4*基因启动子区CpG单位3-4与CpG单位10-11这两个CpG单位甲基化状态的改变可能导致胃癌的发生。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 胃癌; *Smad4*基因; 甲基化; 哈萨克族; MassARRAY

核心提示: 哈族胃癌组和哈族正常胃黏膜组中*Smad4*基因启动子区均发生不同程度的甲基化,且该基因的12个CpG单位的平均甲基化率哈族胃癌组高于正常对照组,表明*Smad4*基因启动子区发生甲基化可能是导致新疆哈萨克族胃癌中*Smad4*蛋白表达下降的主要机制。

刘玺, 陈卫刚, 李睿, 刘芳, 刘晓燕, 康雪, 马聪, 窦玉琴, 郑勇. 新疆哈萨克族胃癌中*Smad4*基因启动子的甲基化状态. 世界华人消化杂志 2013; 21(20): 1907-1913 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1907.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i20.1907>

0 引言

胃癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,据世界卫生组织公布的报告,世界胃癌年发病率为13.86/10万例。我国每年胃癌发患者数占全球胃癌发病总人数的1/3以上,是胃癌的高发区,且胃癌年患病率和死亡率均高出世界平均水平2倍多。目前我国胃癌死亡率为24.71/10万,居各类癌症死亡率的第1位^[1]。资料显示,在我国少数民族中,哈萨克族胃癌死亡率居第1位;另据最新流行病学研究调查结果显示,在新疆哈萨克族人群中胃癌死亡率为41.3/10万,高于我国胃癌死亡率的平均水平,同时也高于同地区汉族和维吾尔族胃癌死亡率(18.5/10万,14.2/10万),居新疆少数民族之首。转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)/*Smad*信号通路是目前热点研究,研究表明TGF- β /*Smad*信号通路中*Smad4*基因甲基化与多种肿瘤

的发生、发展有关,如:胰腺癌^[2]、结直肠癌^[3]、胃癌^[4-6]、宫颈癌^[7]、肝癌等^[8],*Smad4*基因作为TGF- β 信号传导系统的重要中间环节,对其信号传导具有重要影响^[9]。目前的研究表明*Smad4*基因异常甲基化在胃癌中较常见,*Smad4*甲基化可能是一个早期胃癌检测的良好的分子生物学指标^[10]。然而,目前关于新疆哈萨克族胃癌高发与该基因启动子区甲基化的关系知之尚少,也未见与哈族胃癌相关的*Smad4*甲基化位点的相关报道。本研究为进一步探讨新疆哈萨克族胃癌高发的原因,有效开展胃癌的早期防治工作,采用新疆哈萨克族自治州新源县胃癌研究现场经内窥镜收集的胃黏膜标本,首次应用MassARRAY方法研究*Smad4*基因启动子区甲基化状态与新疆哈萨克族胃癌的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 哈萨克族胃癌及哈萨克族正常胃黏膜组织均取自新疆新源县哈萨克族胃癌研究现场,收集新疆哈萨克族胃癌组织30例及哈萨克族正常胃黏膜组织30例作为研究对象。所有病例均未作任何化学、放射治疗及手术治疗,经病理确定肿瘤标本由胃癌肿瘤组织构成,正常组织没有肿瘤细胞浸润。病理确定后标本即冷冻于液氮之中,并保存在-80℃条件下备用。以上胃黏膜活检标本均征得受检者知情同意,并有相应的病理和临床资料。DNA提取试剂盒:QIAamp DNA Mini Kit试剂盒购自QIAGEN公司;GelDoc凝胶成像分析仪(Bio-Rad, 美国);分光光度计、自亚硫酸盐修饰至质谱分析均委托北京博奥生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 组织DNA的提取及质检: 提取DNA在新疆地方病重点实验室完成,共收集约50 μ L DNA溶液,所有DNA应用分光光度计进行质检,以浓度高于75 ng/ μ L,总量高于1 μ g,电泳主带明显没有降解, $A_{260/280} = 1.7-2.1$ 的样品为合格样品。本实验所有样本均合格。提取的DNA置于-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 样品亚硫酸盐处理、引物及甲基化分析: 采用QIAGEN生产的EpiTect Bisulfite Kit试剂盒。完善实验前的准备工作,进行样品处理。引物序列包含33个CpG位点,引物序列扩增长度见表1。

1.2.3 样本处理、芯片点样及质谱检测: 应用MassCLEAVE Kit试剂盒进行碱性磷酸酶处理,然后应用Spectro CHIP® Arrays and Clean Resin

表 1 *Smad4*甲基化引物序列

基因	引物序列	扩增片段长度
<i>SMAD4</i> -F	aggaagagagAGTTTAGGGGAGAGTAGGAAGGGT	320 bp
<i>SMAD4</i> -R	cagtaatacagactcactataggagaaggctAAACCCAAATCCAAATTCAAAAC	

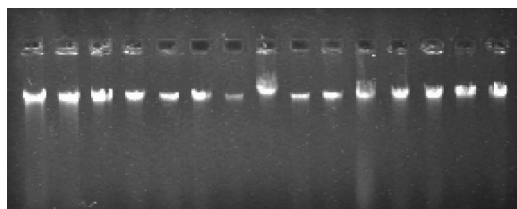


图 1 提取DNA电泳图.

Kit试剂盒进行纯化, 使用MassARRAY Nanodispenser RS1000点样仪(SEQUENOM)将纯化后产物点至384孔SpectroCHIP(SEQUENOM)芯片上, 将点制好的芯片放入MassARRAY Compact System(SEQUENOM)进行检测. SpectroCHIP芯片使用MALDI-TOF技术, 检测数据通过EpiTYPER软件(SEQUENOM)分析并输出结果.

统计学处理 检测数据通过EpiTYPER软件(SEQUENOM)分析并输出结果, 使用SPSS13.0软件进行数据处理, 统计学方法采用Wilcoxon秩和检验及 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 *Smad4*基因DNA的提取及在哈族胃癌及正常对照中的甲基化情况 本研究采用的是1:1病例对照研究, 共收集新疆伊犁哈萨克自治州新源县当地长期居住的哈族胃癌组织30例及同地区正常胃黏膜组织30例. 提取DNA电泳情况见图1. 本实验60例样本, 甲基化检测实验结果显示在哈族胃癌组织与哈族正常胃黏膜组织对照中*Smad4*基因启动子CpG单位平均甲基化水平分别为26.5%和21.7%, 哈族癌组*Smad4*基因启动子CpG单位平均甲基化率明显高于对照族(表2).

2.2 应用两独立样本比较的Wilcoxon秩和检验检测*Smad4*启动子19个CpG单位甲基化情况 应用Wilcoxon秩和检验对胃癌组和正常对照组*Smad4*启动子区甲基化的状态进行比较, 我们发现胃癌组*Smad4*基因启动子区CpG单位3-4与CpG单位10-11这两个位点的甲基化率均高于正常对照组, 这两个CpG单位平均甲基化水平在胃癌组分别为19.1%和20.3%, 在正常对照组分别为10.9%和11.5%; 癌组中CpG单位3-4与CpG单

位10-11的平均甲基化水平明显高于对照组, 具有显著差异, 有统计学意义($P<0.05$)(表3).

3 讨论

胃癌位居中国癌症死亡率第3位^[11], 且恶性程度很高. 研究显示自1987-2009年中国胃癌的发病率呈下降趋势^[12-15], 据2008年全球癌症报告^[16](GLOBOCAN2008)的统计2008年约有989000患者新患胃癌, 中国为463000例, 占46.8%. 同期全球死于胃癌的病例共737000例, 中国为352000例, 占47.8%, 且全球不同地区人群以及不同种族胃癌的发病率也不同. 据研究显示胃癌发病率男性高于女性约2倍以上^[17]. 在中国新疆维吾尔自治区, 居住13种少数民族包括汉族、维吾尔族、哈萨克族、塔吉克族、回族、乌兹别克、柯尔克孜族、满族、蒙古族、锡伯族、俄罗斯族等, 自古长期居住新疆的民族主要是维吾尔族、哈萨克族, 人口数分别为800万、200万. 虽然他们均信仰伊斯兰教、生活方式相似, 但是, 其胃癌的发病率相差很大, 新疆哈萨克族胃癌的发病率最高, 死亡率达41.3/100000, 显著高于维吾尔族(14.2/100000). 目前资料显示哈萨克族胃癌的发病率仅次于哈萨克族食管癌的发病率, 居哈萨克族肿瘤发病的第2位. 河南林县地区是我国食管癌高发区, 最新研究显示: 河南林县胃癌的发病率实质上高于食管癌发病率, 其原因是既往将食管-胃交界癌划分为食管癌造成. 研究显示: 从20世纪80年代后期胃癌的发病率已经超过了食管癌, 而食管-胃交界癌占胃癌比例的54.7%^[18]. 目前哈萨克族恶性肿瘤第1位是食管鳞癌, 第2位是胃癌, 但未指出胃癌的亚部位. 因此, 有关在新疆哈萨克族食管癌发病率居新疆少数民族肿瘤发病率第1位结论也值得商榷. 目前胃癌的发病机制及分子学机制尚不明确. 近年来, 很多研究集中在信号系统中基因甲基化导致肿瘤的表现遗传学改变, 抑癌基因启动子区CpG岛的异常甲基化导致其功能失活是参与肿瘤发生的重要机制之一, 而*Smad4*基因作为抑癌基因, 是TGF- β 信号传导系统的关键组成原件, 对其信号传导具有关键作用^[19], 其甲基化

■ 相关报道

近年来, 很多研究集中在信号系统中基因甲基化导致肿瘤的表现遗传学改变. 抑癌基因启动子区CpG岛的异常甲基化导致其功能失活是参与肿瘤发生的重要机制之一, 而*Smad4*基因作为抑癌基因, 是转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)信号传导系统的关键组成原件, 对其信号传导具有关键作用, 其甲基化与多种肿瘤的关系已经成为近年的研究热点. 郭炜等研究表明*Smad4*基因高甲基化与胃癌相关.

■创新盘点

新疆哈萨克族是一个存在特殊生活习惯、遗传学背景、种族差异的民族,目前尚无应用高通量方法MALDI-TOF MS研究*Smad4*基因启动子区甲基化与新疆哈萨克族胃癌发生关系的报道,也无新疆哈萨克族胃癌发生过程中相关的*Smad4*基因高频特异性甲基化位点的相关报道。

表 2 哈族胃癌和哈族正常组织12组*Smad4*基因CpG片段的甲基化率

分组	CpG片段	哈族胃癌组	哈族正常组
1	Smad4-1_2_CpG_1	0.01030303	0.00378378
2	Smad4-1_2_CpG_3.4	0.01918919	0.01090909
3	Smad4-1_2_CpG_6	0.01181818	0.01594595
4	Smad4-1_2_CpG_7.8	0.03333333	0.01945946
5	Smad4-1_2_CpG_10.11	0.02033748	0.01152850
6	Smad4-1_2_CpG_14	0.07181818	0.06729730
7	Smad4-1_2_CpG_15	0.01939394	0.02594595
8	Smad4-1_2_CpG_16.17.18.19	0.02696970	0.02648649
9	Smad4-1_2_CpG_20	0.00878788	0.00513514
10	Smad4-1_2_CpG_27.28	0.03606061	0.02702703
11	Smad4-1_2_CpG_29	0.00878788	0.00513514
12	Smad4-1_2_CpG_31.32.33	0.05121212	0.04216216
总甲基化率(%)		0.31801152	0.26081599
平均甲基化率(%)		0.02650096	0.02173467

表 3 胃癌组织和正常组织的12个*Smad4*基因CpG片段的Wilcoxon W秩和检验值

序号	基因片段	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	P值
1	Smad4-1_2_CpG_1	548.000	1251.000	0.317
2	Smad4-1_2_CpG_3.4	438.500	999.500	0.035
3	Smad4-1_2_CpG_6	544.000	1247.000	0.410
4	Smad4-1_2_CpG_7.8	487.000	1190.000	0.139
5	Smad4-1_2_CpG_10.11	438.500	999.500	0.035
6	Smad4-1_2_CpG_14	548.000	1251.000	0.452
7	Smad4-1_2_CpG_15	480.500	1041.500	0.118
8	Smad4-1_2_CpG_16.17.18.19	598.000	1159.000	0.881
9	Smad4-1_2_CpG_20	501.500	1204.500	0.158
10	Smad4-1_2_CpG_27.28	497.500	1200.500	0.175
11	Smad4-1_2_CpG_29	501.500	1204.500	0.158
12	Smad4-1_2_CpG_31.32.33	504.000	1207.000	0.198

与多种肿瘤的关系已经成为近年的研究热点。*Smad4*基因甲基化指在DNAC5胞嘧啶甲基转移酶(DNA methyltransferase, Dnmt)的催化作用下,以S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)为甲基供体,在胞嘧啶第五位碳原子上加一甲基基团。有研究^[20]表明甲基化对基因表达的抑制机制分为两种方式:直接方式为基因启动子区CpG岛甲基化会影响到转录激活因子和其识别序列的结合,从而直接抑制基因的正常表达;间接方式是甲基结合蛋白家族可以识别甲基化的CpG双核苷酸序列,而甲基结合蛋白家族可通过补充组蛋白甲基化转移酶和组蛋白去乙酰化酶等组蛋白修饰蛋白质来改变染色质的活性,从而间接影响基因的正常表达。近年研究表明,DNA甲基化和组蛋白的化学修饰,如磷酸化、

乙酰化、甲基化、ADP核糖基化等相互作用,共同调节基因的转录^[21]。还有研究证实DNA甲基化可直接影响基因组甲基化状态和组蛋白乙酰化。近年来研究显示DNA甲基化和组蛋白修饰是可逆的调节过程^[22],因此,抑制DNA甲基转移酶的性能已成为研究抗肿瘤作用的新方法。

虽然对*Smad4*基因甲基化生物学意义的认识已长达半个世纪,但是,近几年针对DNA甲基化检测方法的研究才得以重视。早期的甲基化分析技术,如免疫学抗体等技术、氯乙醛反应法及*Sss* I 甲基转移酶分析法^[23],不能满足目前研究肿瘤表观遗传学的需要。近几年研究表明*Smad4*基因甲基化的分析有基因组的甲基化分析方法和特定DNA片段甲基化的检测方法。MSP(methylation specific PCR)法是近几年国内

外学者最常用的经典方法, 检测*Smad4*甲基化最常用的方法是MSP法, MSP是Dobaczewski等^[9]首先提出的一种检测基因甲基化的经典方法. MSP法原理^[9,19]是先使用亚硫酸氢钠试剂修饰处理基因组DNA, 未发生甲基化的C(胞嘧啶)会被转化为U(尿嘧啶), 发生甲基化的C不改变. 再分别针对非甲基化和甲基化序列设计包含多个CpG位点的引物, 再用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增, 最后应用琼脂糖凝胶电泳进行分析, 确定与引物互补的DNA序列的甲基化状态. Wang等^[6]在研究*Smad4*基因甲基化与胃癌相关性研究时应用MSP法, 该方法的优点是避免了原来由限制性内切酶区分甲基化和非甲基化的DNA的PCR方法所引起的假阳性, 并且灵敏度较高, 应用范围广. 然而不足之处是, 修饰后的样本DNA应在尽可能短的时间进行PCR扩增, 以防样本DNA降解而使扩增效率降低, 而且此法对引物要求非常重要, 引物所包含的CpG位点有限, 只能做定性检测, 修饰处理过程不完全, 容易引起假阳性.

随着科学发展, 许多问题有待进一步解决, 例如: 不同肿瘤是否存在其特异的甲基化位点, 是否可以通过微量标本方便、快捷的检测甲基化状态等. MALDI-TOF质谱技术应运而生, 该技术不仅可以应用于定量甲基化检测, 还可以应用于DNA、蛋白、组织等不同平台分析, 而且可以在患者外周血、尿、唾液, 甚至微创样品中检测甲基化状态. MALDI-TOF MS的优点: (1)高通量、快速、简单和一次可以检测多个CpG位点; (2)可以通过EpiTYPER软件快速的计算出每个甲基化位点的甲基化率, 是一种定量检测甲基化的方法; (3)该方法可在DNA水平及蛋白质水平研究肿瘤的发生规律, 并且可在患者外周血、尿、痰、唾液、乳头分泌液、脑脊髓液等微创或微创样品中寻找肿瘤特异分子标志已经成为研究热点^[24-28]. 缺点: (1)实验结果与所设计引物包含CpG岛数量有关; (2)成本较高, 要想检测*Smad4*基因的所有位点就需要多对引物, 多个反应体系. 所以一般就用来检测富含CpG岛较高的区域, 例如*Smad4*基因的启动子区. 另外, MALDI-TOF质谱技术是一种无标记的检测方法, 既能减少检测成本, 又具有高通量和高灵敏度的检测能力, 因此该方法是肿瘤标志物应用于临床的理想平台, 在肿瘤早期筛查, 早期诊断和个体化诊治等多个领域中必将发挥重要作用. 本课题组前期针对*Smad4*基因的表达产物

*Smad4*蛋白进行研究, 发现癌族*Smad4*蛋白表达明显低于正常对照组, 该蛋白的下降可能由于*Smad4*基因表达失调所导致, 相关报道表明基因甲基化是导致*Smad4*蛋白表达量下降的主要原因^[29]. 由于*Smad4*基因的甲基化主要位于启动子区, 因此近年来设计引物及检测*Smad4*基因甲基化的主要位点是其启动子区. 至今尚未见到*Smad4*基因启动子区甲基化与新疆哈萨克族胃癌的相关报道. 因此, 本次研究针对*Smad4*基因的表达, 我们采用MassARRAY技术平台检测了新疆哈萨克族胃癌组织和正常对照组织中甲基化的状态, 期望发现与新疆哈萨克族胃癌相关的CpG位点.

本文应用MassARRAY技术平台检测了*Smad4*基因启动子区的19个CpG单位, 其中CpG_2, CpG_5, CpG_9, CpG_12.13, CpG_21.22.23, CpG_24.25.26和CpG_30单位未被检测到, 考虑可能与这7个单位分子量过小或者与下个CpG单位聚集较近所致. 因此, 本实验检测了该基因的12个CpG单位, 通过分析显示*Smad4*基因在胃癌中的甲基化率明显高于对照组, 初步提示*Smad4*基因高甲基化可能与新疆哈萨克族胃癌发生相关, 这与国内外关于*Smad4*基因甲基化与胃癌发生相关的研究结果相似. 相比国内外定性检测*Smad4*基因甲基化率与胃癌的关系, 本次实验还发现在CpG3-4与CpG10-11单位上胃癌组甲基化率分别为19.1%、20.3%明显高于正常对照组10.9%和11.5%, 说明*Smad4*基因CpG 3-4与CpG 10-11位点的高甲基化可能与新疆哈萨克族胃癌具有相关性, 其高甲基化可能导致胃癌的发生及发展.

然而, 与郭炜等应用MSP法检测胃癌组中*Smad4*基因甲基化率为5.5%^[30], 及国内外报道正常胃黏膜未检测到*Smad4*基因甲基化相比^[6], 其研究结果与本研究不一致. 首先, 本研究显示在新疆哈萨克族正常胃黏膜对照组织中CpG位点存在一定的甲基化率, 甲基化率相对较低, 考虑可能*Smad4*基因的低甲基化与细胞的增殖及凋亡调节有关; 其次, 结合本实验显示的新疆哈萨克族胃癌*Smad4*基因甲基化率, 相比国内外报道较高及哈萨克族胃癌发病及死亡率水平相对其他种族较高, 考虑可能与种族差异及检测DNA甲基化方法不同有关.

近年来常用(methylation-specific PCR, MSP)MSP法检测肿瘤中*Smad4*基因的甲基化率, 该方法灵敏度较高, 应用范围广. 但是, 此法引物所包含的CpG位点有限, 只能做定性检测, 修

■应用要点

本研究拟在对新疆哈萨克族胃癌危险因素进行流行病学调查的基础上, 收集新疆哈萨克族胃癌组织、同地区汉族胃癌组织以及其对照组织, 运用MALDI-TOF MS方法对*Smad4*基因启动子区甲基化位点的甲基化状态进行检测, 筛选出与新疆哈萨克族胃癌发生密切相关的*Smad4*基因异常甲基化的位点, 初步探讨其与新疆哈萨克族胃癌的关系, 并运用Western blot法检测*Smad4*蛋白的表达状态, 为新疆哈萨克族胃癌高发的原因及寻找胃癌早期诊断的分子标志物提供理论依据.

同行评价

本文探讨了*Smad4*基因启动子甲基化与新疆哈萨克族胃癌的关系,对于揭示该族群胃癌高发率的分子生物学机制有一定的参考价值。

饰处理过程不完全,容易引起假阳性^[31]。相对于既往进行DNA甲基化方法,MassARRAY技术既简单又快捷。该方法的优点是高通量、快速、简单和一次可以检测多个CpG位点^[32],并且可以计算出每个甲基化位点的甲基化率,通过Epi-TYPER软件分析系统,可以直观看到每个样本中每个CpG位点甲基化率及每组数据的特点,是一种定量的检测*Smad4*甲基化的方法。

总之,正常哈族中*Smad4*基因启动子区低甲基化可能与细胞的增殖凋亡调节相关。本实验应用MassARRAY技术发现*Smad4*基因启动子区CpG 3-4与CpG 10-11位点高甲基化可能是新疆哈萨克族胃癌发生的早期事件之一,可作为胃癌的分子生物学指标之一。我国少数民族中,新疆哈萨克族胃癌死亡率居第1位,且其聚居区地处我国新疆北部,以游牧生活为主,流行病学调查存在一定难度,同时当地基层医务人员对胃癌疾病的诊断和治疗研究比较薄弱,技术相对落后,因此有关肿瘤早期诊断、流行病学研究及开展胃癌发病机制的研究就显得尤为重要。虽然我们的研究表明TGF- β /Smads信号通路中*Smad4*抑癌基因的甲基化水平较高同新疆哈萨克族胃癌的高发密切相关,但是,细胞增殖、分化及凋亡相关的信号通路及生物因子还有许多,TGF- β /Smads信号通路及其*Smad4*抑癌基因在该信号通路与其他通路交叉中,是否起主导作用,还是与其他通路及生物因子协同发挥作用,这都需要更加深入的研究。

参考文献

- 张伟东, 苗树军. 我国恶性肿瘤死亡率流行病学特征分析. 中国健康教育 2009; 25: 246-248
- Zhao S, Venkatasubbarao K, Lazor JW, Sperry J, Jin C, Cao L, Freeman JW. Inhibition of STAT3 Tyr705 phosphorylation by Smad4 suppresses transforming growth factor beta-mediated invasion and metastasis in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 4221-4228 [PMID: 18519681 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5123]
- Wang H, Rajan S, Liu G, Chakrabarty S. Transforming growth factor beta suppresses beta-catenin/Wnt signaling and stimulates an adhesion response in human colon carcinoma cells in a Smad4/DPC4 independent manner. *Cancer Lett* 2008; 264: 281-287 [PMID: 18367323 DOI: 10.1016/j.canlet.2008.01.039]
- Barros R, Pereira B, Duluc I, Azevedo M, Mendes N, Camilo V, Jacobs RJ, Paulo P, Santos-Silva F, van Seuningen I, van den Brink GR, David L, Freund JN, Almeida R. Key elements of the BMP/SMAD pathway co-localize with CDX2 in intestinal metaplasia and regulate CDX2 expression in human gastric cell lines. *J Pathol* 2008; 215: 411-420 [PMID: 18498120 DOI: 10.1002/path.2369]
- Kundu J, Wahab SM, Kundu JK, Choi YL, Erkin OC,

- Lee HS, Park SG, Shin YK. Tob1 induces apoptosis and inhibits proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by activating Smad4 and inhibiting β -catenin signaling. *Int J Oncol* 2012; 41: 839-848 [PMID: 22710759 DOI: 10.3892/ijo.2012.1517]
- Wang LH, Kim SH, Lee JH, Choi YL, Kim YC, Park TS, Hong YC, Wu CF, Shin YK. Inactivation of SMAD4 tumor suppressor gene during gastric carcinoma progression. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 102-110 [PMID: 17200344]
 - Baldus SE, Schwarz E, Lohrey C, Zapatka M, Landsberg S, Hahn SA, Schmidt D, Dienes HP, Schmiegel WH, Schwarte-Waldhoff I. Smad4 deficiency in cervical carcinoma cells. *Oncogene* 2005; 24: 810-819 [PMID: 15531914]
 - Ikeguchi M, Iwamoto A, Taniguchi K, Katano K, Hirooka Y. The gene expression level of transforming growth factor-beta (TGF-beta) as a biological prognostic marker of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24: 415-421 [PMID: 16270528]
 - Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51: 600-606 [PMID: 21059352 DOI: 10.1016/j.jmcc.2010.10.033]
 - Guo W, Dong Z, Guo Y, Kuang G, Yang Z, Shan B. Concordant repression and aberrant methylation of transforming growth factor-beta signaling pathway genes occurs early in gastric cardia adenocarcinoma. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 9453-9462 [PMID: 22722999 DOI: 10.1007/s11033-012-1810-x]
 - 张思维, 陈万青, 郑荣寿. 2003-2007年中国癌症死亡分析. 中国肿瘤 2012; 21: 171-178
 - 陈竺. 全国第三次死因回顾抽样调查报告. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008: 10
 - 邹小农, 段纪俊. 2004-2005年全国死因回顾抽样调查胃癌死亡率分析. 中华预防医学杂志 2010; 44: 390-396
 - 赵平. 中国肿瘤死亡报告-全国第三次死因回顾抽样调查. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 52-62
 - 赵平, 陈万青. 2010中国肿瘤登记年报. 北京: 军事医学科学出版社, 2011: 192-196
 - Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-2917 [PMID: 21351269 DOI: 10.1002/ijc.25516]
 - 邹小农, 孙喜彬, 陈万青. 2003-2007年中国胃癌发病与死亡情况分析. 肿瘤 2012; 32: 109-114
 - 陈志峰. WHO肿瘤新分类与食管癌高发区变化的思考. 中国肿瘤临床 2005; 32: 1201-1203
 - Zhang Y, Fan KJ, Sun Q, Chen AZ, Shen WL, Zhao ZH, Zheng XF, Yang X. Functional screening for miRNAs targeting Smad4 identified miR-199a as a negative regulator of TGF- β signalling pathway. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 9286-9297 [PMID: 22821565 DOI: 10.1093/nar/gks667]
 - 鲍萍萍, 陶梦华, 刘大可, 高立峰, 金凡. 吸烟、饮酒与胃癌关系的病例对照研究. 肿瘤 2001; 21: 334-338
 - Liu BQ, Peto R, Chen ZM, Boreham J, Wu YP, Li JY, Campbell TC, Chen JS. Emerging tobacco hazards in China: 1. Retrospective proportional mortality study of one million deaths. *BMJ* 1998; 317: 1411-1422 [PMID: 9822393]
 - 唐素贞, 胡荣华, 罗好曾. 胃癌高、低发区居民膳食对比调查. 肿瘤 1989; 9: 228
 - Hancock SM, Gopal DV, Frick TJ, Pfau PR. Dilation of malignant strictures in endoscopic ultrasound

- staging of esophageal cancer and metastatic spread of disease. *Diagn Ther Endosc* 2011; 2011: 356538 [PMID: 22203779 DOI: 10.1155/2011/356538]
- 24 Chun N, Ford JM. Genetic testing by cancer site: stomach. *Cancer J* 2012; 18: 355-363 [PMID: 22846738 DOI: 10.1097/PPO.0b013e31826246dc]
- 25 Shiou SR, Singh AB, Moorthy K, Datta PK, Washington MK, Beauchamp RD, Dhawan P. Smad4 regulates claudin-1 expression in a transforming growth factor-beta-independent manner in colon cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 1571-1579 [PMID: 17308096]
- 26 Xiao DS, Wen JF, Li JH, Hu ZL, Zheng H, Fu CY. Effect of deleted pancreatic cancer locus 4 gene transfection on biological behaviors of human colorectal carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 348-352 [PMID: 15637742]
- 27 Kim YH, Lee HS, Lee HJ, Hur K, Kim WH, Bang YJ, Kim SJ, Lee KU, Choe KJ, Yang HK. Prognostic significance of the expression of Smad4 and Smad7 in human gastric carcinomas. *Ann Oncol* 2004; 15: 574-580 [PMID: 15033661]
- 28 王秀文, 辛明霞, 李来. 承德市胃癌危险因素病例对照研究. *现代预防医学* 2007; 34: 3081-3082
- 29 Kang HJ, Kim EJ, Kim BG, You CH, Lee SY, Kim DI, Hong YS. Quantitative analysis of cancer-associated gene methylation connected to risk factors in Korean colorectal cancer patients. *J Prev Med Public Health* 2012; 45: 251-258 [PMID: 22880157 DOI: 10.3961/jpmph.2012.45.4.251]
- 30 郭炜, 董稚明, 郭艳丽, 杨植彬, 卞刚. 贲门腺癌中 Smad4 基因甲基化状态分析. *肿瘤防治研究* 2011; 05: 269-274
- 31 Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 1994; 8: 23-26 [PMID: 7987388]
- 32 Smith E, Jones ME, Drew PA. Quantitation of DNA methylation by melt curve analysis. *BMC Cancer* 2009; 9: 123 [PMID: 19393074 DOI: 10.1186/1471-2407-9-123]

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.775

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果2012-12-07由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2011年《世界华人消化杂志》总被引频次3871次, 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第5位、第7位、第5位, 分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第65位、第238位、第138位; 其他指标: 即年指标0.081, 他引率0.82, 引用刊数526种, 扩散因子13.59, 权威因子1260.02, 被引半衰期4.3, 来源文献量642, 文献选出率0.93, 地区分布数29, 机构分布数302, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技核心期刊”(《世界华人消化杂志》编辑部)。