

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.06.012

· 临床研究 ·

人贲门腺癌组织中 *IGFBP7* 基因的甲基化状态

沈素朋,董稚明,郭炜,郭艳丽,邝钢,杨植彬(河北医科大学第四医院肿瘤研究所,河北石家庄 050011)

[摘要] **目的:**探讨人贲门腺癌(gastric cardia adenocarcinoma, GCA)组织中胰岛素样生长因子结合蛋白-7(insulin-like growth factor binding protein 7, *IGFBP7*)基因启动子区及第1外显子区甲基化状态及其与*IGFBP7*蛋白表达之间的关系。**方法:**选取河北医科大学第四医院2009年4月至2011年12月间收治的85例GCA患者癌组织标本和67例癌旁组织标本。采用甲基化特异性聚合酶链式反应(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)方法、RT-PCR及免疫组织化学法检测*IGFBP7*基因在GCA组织及癌旁组织中的甲基化情况、*IGFBP7* mRNA及蛋白的表达。**结果:**GCA组织中*IGFBP7*基因启动子区甲基化率为52.9%(45/85),第1外显子5'非翻译区的甲基化率为35.3%(30/85),相应癌旁组织*IGFBP7*基因启动子区及第1外显子5'非翻译区的甲基化率分别为35.8%(24/67)和19.4%(13/67);癌组织*IGFBP7*基因启动子区及第1外显子5'非翻译区的甲基化率明显高于癌旁组织($P < 0.05$),且GCA组织中*IGFBP7*基因启动子区甲基化率显著高于第1外显子区($P < 0.05$)。GCA组织中*IGFBP7* mRNA和蛋白表达显著低于癌旁组织($P < 0.05$),且与其启动子区甲基化状态呈负相关。**结论:**GCA组织中*IGFBP7*基因启动子区比第1外显子区更易发生甲基化而导致*IGFBP7*表达缺失,*IGFBP7*基因启动子区异常高甲基化可能是GCA发生的机制之一。

[关键词] 贲门腺癌;胰岛素样生长因子结合蛋白-7;DNA甲基化

[中图分类号] R735.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)06-0632-07

Methylation status of *IGFBP7* gene in human gastric cardia adenocarcinoma tissues

SHEN Su-peng, DONG Zhi-ming, GUO Wei, GUO Yan-li, KUANG Gang, YANG Zhi-bin (Cancer Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the promoter and exon1 methylation of insulin-like growth factor binding protein 7 (*IGFBP7*) gene and its correlation with the expression of *IGFBP7* protein in gastric cardia adenocarcinoma (GCA) tissues. **Methods:** Eighty-five GCA samples and 67 paracancerous tissues from GCA patients (who had been diagnosed in the Forth Hospital of Hebei Medical University, from April, 2009 to December, 2011) were included in the present study. Methylation specific polymerase chain reaction (MSP), RT-PCR and immunohistochemistry methods were respectively used to examine the methylation status, mRNA and protein expressions of *IGFBP7* in GCA tissues and paracancerous tissues. **Results:** For the promoter site, the methylation frequency of *IGFBP7* gene in the GCA specimens (52.9%, 45/85) was significantly higher than that in the paracancerous tissues (35.8%, 24/67) ($P < 0.05$). For the 5' UTR of exon1, the methylation frequency of *IGFBP7* gene in the GCA specimens (35.3%, 30/85) was significantly higher than that in the paracancerous tissues (19.4%, 13/67) ($P < 0.05$). The methylation frequency of *IGFBP7* gene in the promoter site was significantly higher than that in the 5' UTR of exon1 ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of *IGFBP7* in the GCA tissues were significantly higher than those in the paracancerous tissues ($P < 0.05$) and were inversely correlated with the methylation status of promoter. **Conclusion:** Compared to the exon1, *IGFBP7* promoter site is more likely to be methylated in GCA tissues and may play an important role in the down-regulation of *IGFBP7* in GCA tumori-

[基金项目] 河北省科技厅科技支撑课题资助(No. 072761223)。Project supported by the Science and Technology Program of Hebei Department of Science and Technology (No. 072761223)

[作者简介] 沈素朋(1984-),女,河北省鹿泉市人,硕士,主要从事病理及肿瘤病因学的研究工作。E-mail:shensupeng273@sina.com

[通信作者] 董稚明(DONG Zhi-ming, corresponding author), E-mail:dddzzmmm@yahoo.com.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20121210.1508.001.html>

genesis. Hypermethylation of *IGFBP7* in promoter site may be one of the mechanisms leading to the occurrence of GCA.

[**Key words**] gastric cardia adenocarcinoma; insulin-like growth factor binding protein 7; DNA methylation

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(6): 632-638]

胰岛素样生长因子结合蛋白(insulin-like growth factor binding protein, IGFBP)是一组同源蛋白质^[1],主要来源于肝脏^[2]。IGFBP7(IGFBP-rP1)是通过抑制性差减杂交法从结肠腺癌—正常黏膜的差减 cDNA 文库中筛选出并在结肠腺癌中高表达的一个基因^[3]。IGFBP7 与肿瘤关系复杂,其作用机制尚不明确。不同肿瘤组织中 IGFBP7 的表达情况不同:在白血病^[4]、前列腺癌^[5]、胃癌^[6]、乳腺癌^[7]等肿瘤中 IGFBP7 表达下调,而在胰腺癌^[8-9]、结肠癌细胞^[10]中表达升高。并且有研究^[11]表明, *IGFBP7* 基因 CpG 岛的甲基化状态可能是影响其在肿瘤中表达的重要机制,且甲基化 CpG 位点区段不同对基因表达的影响也不同。在结肠癌细胞中, *IGFBP7* 基因表达调控的主要机制可能是其第 1 外显子的异常甲基化^[10]。在胃癌^[6]和乳腺癌^[12]中可发生 *IGFBP7* 基因启动子区高甲基化,导致 *IGFBP7* 基因失活。但 *IGFBP7* 在贲门腺癌(gastric cardia adenocarcinoma, GCA)中的甲基化状态尚未见报道。本研究检测贲门腺癌及癌旁组织中 *IGFBP7* 基因启动子区和第 1 外显子区的甲基化状态及其与蛋白表达的关系,并结合临床资料探讨其与肿瘤分化、淋巴结转移的关系,进一步阐明贲门腺癌发生的分子机制,为贲门腺癌的发生、发展机制研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

蛋白酶 K 购于 Merck 公司,亚硫酸氢钠和氢醌购于 Sigma 公司,Wizard DNA 纯化试剂盒购于 Promega 公司,TRIzol 购于 Invitrogen 公司,逆转录 PCR 试剂盒购于 Fomentas 公司,甲基化酶购于 New England BioLabs 公司。所有引物均在北京赛百盛公司合成,IGFBP7 多克隆羊抗人抗体(sc-6064)购于 Santa Cruz 公司,PV 法免疫组织化学试剂盒购于北京中杉金桥生物技术公司。

1.2 研究对象和标本来源

研究对象均来自河北医科大学第四医院 2009 年 4 月至 2010 年 12 月间的贲门癌手术患者,其中男性 64 例,女性 21 例,年龄为 39~81 岁,中位年龄为 62 岁。全部患者均未经化疗和放疗,该研究中所有标本都签署知情同意书,上报院伦理委员会批准同意。本研究共获取了 85 例贲门腺癌组织和 67 例

癌旁组织(距癌组织边缘 ≥ 2 cm 贲门腺黏膜组织)。手术切除采集的标本一部分于液氮保存用于 DNA 和 RNA 的提取,一部分以 10% 中性甲醛溶液固定,用于制作蜡块保存,以进行免疫组织化学染色。肿瘤组织及癌旁组织均经常规病理诊断证实。标本按照肿瘤病理学分级,高分化 21 例,中低分化 64 例;按淋巴结转移情况分组,有淋巴结转移组 52 例,无淋巴结转移组 33 例。由于标本限制,在全部 85 例贲门腺癌及 67 例癌旁组织中检测了 *IGFBP7* 的甲基化状态,仅在 56 例癌组织和 30 例癌旁组织中检测了该基因的 mRNA 和蛋白表达情况。

1.3 甲基化特异性 PCR(methylmion specific PCR, MSP)法检测 *IGFBP7* 基因 CpG 岛的甲基化状态

标本经常规蛋白酶 K 消化,采用酚/氯仿抽提法抽取癌及癌旁组织中 DNA,每个样本中均取 2 μ g DNA,用 2 mol/L NaOH 变性处理,于 10 mmol/L 氢醌和 3 mol/L 亚硫酸氢钠中 50 $^{\circ}$ C 反应 12~16 h,处理后的 DNA 用 Wizard DNA 纯化试剂进行纯化。经亚硫酸氢盐处理后,DNA 中的 C 转变为 U,而基因的 CpG 岛发生甲基化后,则不能发生这种改变,根据此原理设计相应的引物,检测该基因是否发生甲基化。运用在线软件 Meth Primer 预测 *IGFBP7* 基因 5'端 CpG 岛情况,进而选取 *IGFBP7* 基因的启动子区和第 1 外显子区两个富含 CpG 岛的部位进行分析。并用 AliBaba 2.1 软件预测与 MSP 上下游引物中 CpG 位点结合的转录因子,以帮助分析 DNA 甲基化后对转录水平的影响。用甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物进行 PCR 扩增,引物序列、退火温度及产物大小见表 1。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min 后,95 $^{\circ}$ C 变性 45 s、退火 45 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。MSP 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,用 UV 凝胶电泳成像及图像分析系统进行图像分析。MSP 阳性对照采用基因组 DNA 经甲基化酶 Sss I 处理以后进行 PCR,阴性对照用灭菌双蒸水取代 DNA 模板进行 PCR。为进行 MSP 检测的质量控制,随机选取 10% 的标本进行重复实验。

1.4 RT-PCR 法检测 *IGFBP7* mRNA 的表达

TRIzol 提取组织总 RNA,并参照反转录试剂盒说明书加样,将 RNA 反转录成 cDNA。以 *GAPDH* 作为内参照,引物及退火温度见表 1。反应条件为:

95 °C 预变性 5 min 后, 95 °C 变性 45 s、退火 45 s、72 °C 延伸 30 s, 35 个循环后, 72 °C 延伸 7 min。PCR 反应产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 并应用凝胶成

像分析软件 Gel Pro Analyzer 3.1 测定条带灰度值, 以目的基因的灰度值/内参的灰度值表示相对含量。重复 3 次实验, 取平均值。

表 1 *IGFBP7* 基因 MSP 及 RT-PCR 引物及反应条件
Tab.1 Primer sequences and reaction conditions of MSP and RT-PCR for *IGFBP7* gene

Type	Primer sequence	Annealing temperature(t/°C)	Product size(bp)
MSP			
Promoter			
Methylation	F: 5'-AGAAATTAGAGGGTGAAGAGTCGT-3'	61	173
	R: 5'-CTACTAACGTCGAAAAATAAACGAA-3'		
Unmethylation	F: 5'-AGAAATTAGAGGGTGAAGAGTTG-3'	58	173
	R: 5'-CTACTAACATCAAAAAATAAACAAA-3'		
Exon1			
Methylation	F: 5'-TTGGGCGAGATTCGCGACGC-3'	62	273
	R: 5'-GACCCTCTAACTAACGACGCG-3'		
Unmethylation	F: 5'-TTGTTGGGTGAGATTTGTGATGT-3'	58	278
	R: 5'-TCAACCCTCTAACTAACACACA-3'		
RT-PCR			
<i>IGFBP7</i>	F: 5'-CACTGGTGCCAGGTGTACT-3'	52	240
	R: 5'-TTGGATGCATGGCACTCATA-3'		
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'	57	104
	R: 5'-AGGGGTCATTGATGGCAACA-3'		

F: Forward primer R: Reverse primer

1.5 免疫组织化学法检测 *IGFBP7* 蛋白的表达

石蜡标本常规 4 μm 连续切片, 平铺于经 APES (aminopropyltriethoxy silane) 处理的载玻片上, 67 °C 烤箱过夜。二甲苯、梯度酒精脱蜡、水化组织切片, 3% 甲醇过氧化氢封闭内源性过氧化物酶, 高压热修复 5 min。免疫组化 P-V 法按试剂盒操作说明进行, 所用一抗 *IGFBP7* (多克隆羊抗人抗体) 的稀释浓度为 1:200, DAB 显色, 自来水冲洗, 复染、脱水、透明、中性树胶封片。PBS 取代一抗作为空白对照, 其余步骤同上。正常贲门黏膜作为阳性对照。随机选取 5 个高倍视野 (×400) 计数肿瘤细胞总数和阳性细胞数, 得出阳性细胞百分率; 阳性细胞率 ≤25% 记为 0 分, 26% ~ 50% 为 1 分, 51% ~ 75% 为 2 分, >75% 为 3 分; 再按多数阳性细胞呈现的染色强度予以记分, 无显色为 0 分, 浅棕黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。将上述 2 项得分相加, 0 分

判为“-”, 1~2 分判为“+”, 3~4 分判为“++”, 5~6 分判为“+++”。由 3 名有经验的临床病理医师阅片, 采用双盲评估的方法, 根据其评分的平均值来确定判定结果。本研究进行结果分析时, 以“++”和“+++”定义该蛋白为阳性表达, “-”和“+”定义为阴性表达。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 软件包 (13.0 版), 计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料采用 *t* 检验, 并作双侧检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *IGFBP7* 基因 CpG 岛的预测结果

经在线软件 Meth primer 分析发现, *IGFBP7* 基因 5' 端有两个 CpG 岛存在, 分别长 462 bp 和 357 bp, 这两个 CpG 岛跨越了启动子区和第 1 外显子区

域,其中包括 103 个 CpG 位点(图 1)。

2.2 贲门腺癌组织中 *IGFBP7* 基因启动子区的甲基化状态高于第 1 外显子区

对 85 例贲门腺癌组织及 67 例癌旁组织进行了 MSP 分析,结果(图 2)显示,*IGFBP7* 基因启动子区在贲门腺癌和癌旁组织中的甲基化率分别为 52.9%(45/85)和 35.8%(24/67),癌组织 *IGFBP7* 基因启动子区甲基化率显著高于癌旁组织($\chi^2 = 4.430, P = 0.035$)。贲门腺癌组织中 *IGFBP7* 基因启动子区甲基化发生率与肿瘤分化程度和淋巴结转

移相关($P < 0.05$)。贲门腺癌组织的 *IGFBP7* 基因第 1 外显子区甲基化率为 35.3%(30/85),癌旁组织中此区域的甲基化率为 19.4%(13/67),其差异具有统计学意义($P < 0.05$),但分组分析显示贲门腺癌组织中 *IGFBP7* 基因第 1 外显子区甲基化状态与肿瘤分化程度和淋巴结转移等临床病理资料无关($P > 0.05$)。贲门腺癌组织中 *IGFBP7* 基因启动子区甲基化率显著高于其第 1 外显子区甲基化率($\chi^2 = 5.368, P = 0.021$,表 2)。

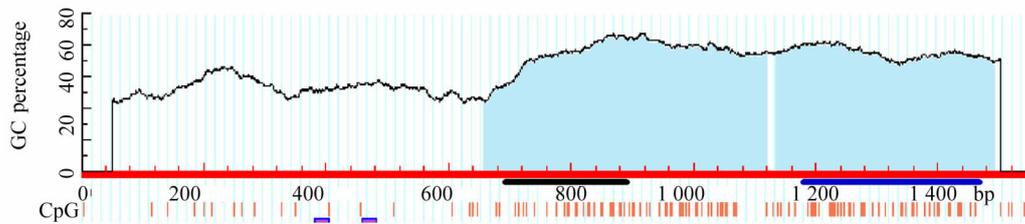


图 1 Meth primer 预测 *IGFBP7* 基因 CpG 岛的分布

Fig. 1 Prediction of *IGFBP7* CpG island distribution by Meth primer

Blue region: Position of CpG island (Island 1: -342 bp ~ 119 bp; Island 2: 136 bp ~ 492 bp);
Red long string: Locus of CpG; Black underline: Promoter region; Blue underling: Exon1 region

表 2 贲门腺癌组织 *IGFBP7* 基因甲基化状态与临床病理特征的关系 (n)

Tab. 2 Methylation status of *IGFBP7* gene in GCA and its relationship with clinicopathologic features of GCA (n)

Characteristic	N	Methylation status of promoter			Methylation status of exon1		
		M	U	P	M	U	P
Age							
<62	31	14	17		10	21	
≥62	54	31	23	0.276	20	34	0.657
Gender							
Male	64	31	33		22	42	
Female	21	14	7	0.146	8	13	0.757
Differential degree							
Well-moderately	21	7	14		7	14	
Poorly	64	38	26	0.038	23	41	0.828
Lymph node status							
Positive	52	33	19		21	31	
Negative	33	12	21	0.015	9	24	0.218

M: Methylation tumor tissues; U: Unmethylation tumor tissues

2.3 贲门腺癌低表达 *IGFBP7* mRNA 和蛋白

在 56 例贲门腺癌组织及 30 例癌旁组织中检测了 *IGFBP7* mRNA 的表达情况(图 3)。贲门腺癌组织中 *IGFBP7* mRNA 表达量(0.50 ± 0.33)显著低于癌旁组织的表达量(0.90 ± 0.29) ($P < 0.05$)。

IGFBP7 蛋白免疫组化阳性染色定位在细胞质(图 4), 贲门腺癌组织中 *IGFBP7* 蛋白表达阳性率为 26.8%(15/56), 显著低于癌旁组织中蛋白表达阳性率 80.0%(24/30) ($P < 0.01$)。在贲门腺癌中, 高分化组 *IGFBP7* 蛋白表达高于中低分化组($\chi^2 = 10.957, P = 0.001$), 而与淋巴结转移情况无关($P > 0.05$)。此外 *IGFBP7* 基因的蛋白表达水平与其 mRNA 表达之间呈正相关($r = 0.326, P < 0.05$)。

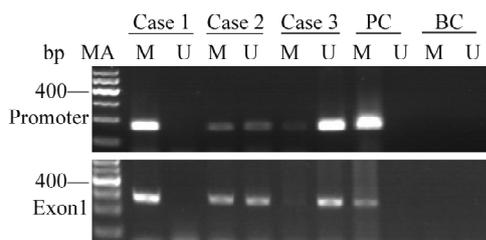


图 2 MSP 检测贲门腺癌组织中 *IGFBP7* 基因的甲基化状态

Fig. 2 Methylation status of *IGFBP7* gene in GCA tissues detected by MSP

Case1: Methylated; Case2: Hemi-methylated; Case3: Unmethylated; PC: Positive control; BC: Blank control; M: Methylated; U: Unmethylated; MA: 100bp DNA marker

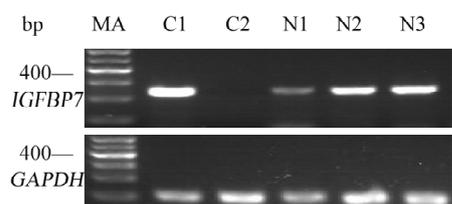


图 3 RT-PCR 检测贲门腺癌组织中 *IGFBP7* mRNA 的表达

Fig. 3 Expression of *IGFBP7* mRNA in GCA tissues detected by RT-PCR

MA: 100 bp DNA marker; C1, C2: GCA tissues; N1, N3: Paracancerous tissues

2.4 贲门腺癌中 *IGFBP7* 基因的甲基化与其 mRNA 和蛋白表达呈负相关

对于启动子区, *IGFBP7* 基因甲基化阳性的贲门腺癌组织 *IGFBP7* mRNA 的表达显著低于未发生甲基化的贲门腺癌组织(0.27 ± 0.06 vs 0.80 ± 0.28,

$P < 0.05$)。对于第 1 外显子区, *IGFBP7* 基因甲基化阳性的贲门腺癌组织 *IGFBP7* mRNA 表达与未发生甲基化的贲门腺癌组织相比没有显著性差异(0.43 ± 0.29 vs 0.53 ± 0.35, $P > 0.05$)。

对于启动子区, 发生 *IGFBP7* 启动子区高甲基化的 30 例癌组织中仅有 3 例 *IGFBP7* 蛋白表达为阳性, *IGFBP7* 基因启动子区甲基化与其蛋白表达之间呈明显的负相关($r = 0.509, P < 0.05$)。而 *IGFBP7* 基因第 1 外显子区高甲基化与 *IGFBP7* 蛋白表达无关($P > 0.05$, 表 3)。

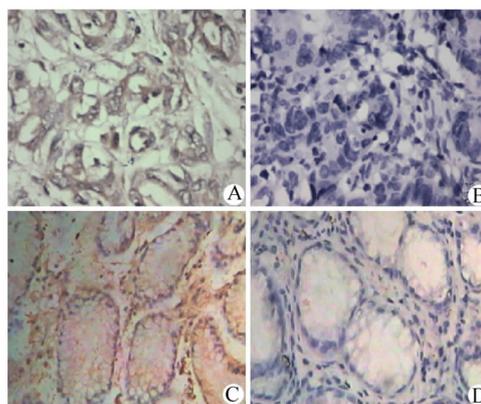


图 4 贲门腺癌组织中 *IGFBP7* 蛋白的表达 (PV, ×400)

Fig. 4 Expression of *IGFBP7* protein in GCA tissues (PV, ×400)

A: Positive staining of *IGFBP7* in GCA tissues; B: Negative staining of *IGFBP7* in GCA tissues; C: Positive staining of *IGFBP7* in paracancerous tissues; D: Negative staining of *IGFBP7* in paracancerous tissues

表 3 贲门癌组织 *IGFBP7* 基因启动子甲基化与 *IGFBP7* 蛋白表达的关系

Tab. 3 Relationship between *IGFBP7* methylation status and *IGFBP7* protein expression in GCA tissues

IGFBP7 protein expression	Methylation in promoter			Methylation in exon 1		
	M	U	P	M	U	P
+	3	12		7	8	
--	27	9	0.000	23	10	0.127

3 讨论

IGFBP7 是一个分泌蛋白, 广泛分布于人体的多种组织和器官, 具有促进细胞凋亡、抗增殖等生物学功能。 *IGFBP7* 与肿瘤关系复杂, 其作用机制尚不完

全明确。基因突变不再是基因在肿瘤中失活的唯一机制,表观遗传学的改变,如基因 5'端 CpG 岛甲基化,也可能是一个非常重要的机制。有研究^[5-7]表明,*IGFBP7* 基因在前列腺癌^[13]、胃癌、乳腺癌、肺癌等多种人类肿瘤中表达下调,且在前列腺癌、乳腺癌和肺癌^[14]中 *IGFBP7* 基因发生高甲基化引起转录抑制而导致其表达沉默,并且甲基化 CpG 位点区段不同对基因转录抑制作用也不同。在结肠癌细胞中 *IGFBP7* 基因表达调控的主要机制可能是其第 1 外显子的异常甲基化^[10]。在胃癌^[6]和乳腺癌^[12]中可发生 *IGFBP7* 基因启动子区高甲基化而导致 *IGFBP7* 基因失活。但 *IGFBP7* 在贲门腺癌中的甲基化状态迄今尚未见报道。本研究通过预测 *IGFBP7* 基因 5'端 CpG 岛情况同时选取启动子区和第 1 外显子区进行研究,发现 *IGFBP7* 基因启动子区比第 1 外显子区更易发生高甲基化而使 *IGFBP7* 基因在贲门腺癌中表达缺失。

Lin 等^[10]在研究中发现,*IGFBP7* 基因的启动子区和 5 个外显子区不存在序列突变,提示遗传学改变可能不是此基因转录调控的主要机制。用亚硫酸氢盐-测序法(bisulfite genomic sequencing, BGS)研究 *IGFBP7* 基因 5'端 CpG 岛的所有 CpG 位点甲基化情况,结合其蛋白表达和细胞系相关 CpG 岛甲基化情况,发现与 *IGFBP7* 基因表达相关的甲基化特异位点可能位于第一外显子,这一结果在体内实验也得到验证。赵丹瑜等^[15]发现,胃癌细胞株中存在 *IGFBP7* 基因启动子区和第 1 外显子的甲基化,用不同浓度的 5'-zaz-dc 处理细胞株后, *IGFBP7* mRNA 的表达量与 5'-zaz-dc 剂量基本呈依赖性增加,从而推测 *IGFBP7* 基因表达缺失的分子机制可能是 *IGFBP7* 启动子区甲基化改变所导致的。Rice 等^[12]采用 BSP 法对 *BRCA1* 基因 -576 ~ +44 序列内的 30 个 CpG 位点在乳腺癌中的甲基化状态进行分析,发现启动子区甲基化与此基因转录水平下降有关。这些结果与先前关于引起转录抑制的甲基化 CpG 位点有位点区段特异性假说相一致。在同一肿瘤,不同的 CpG 位点甲基化发生频率可能并不完全相同。本研究结果显示,贲门腺癌组织中 *IGFBP7* 基因启动子区甲基化率显著高于第 1 外显子 5'非翻译区,提示对基因甲基化进行研究时应该考虑到不同 CpG 位点的差异和作用。

IGFBP7 基因在不同肿瘤组织中的甲基化率并不完全相同。Lin 等^[10]发现,在结肠癌中 *IGFBP7* 基因甲基化率为 60.9%,在胃癌和乳腺癌细胞株的甲基化情况也不完全相同。*IGFBP7* 基因在不同肿

瘤类型中的甲基化发生率不同可能由于以下原因:(1)不同的肿瘤可能其甲基化程度不同,维持细胞内甲基化水平对 DNMT1 的依赖程度不同^[16]。(2)使用的甲基化检测方法不同,常用的方法有酶切法、BSP 法、MSP 法等。Lin 等^[10]检测结肠癌中 *IGFBP7* 甲基化应用的是 BSP 法,而本实验中应用的是敏感度较高的 MSP 法。(3)选择的甲基化位点不同。Lin 等^[10]在结肠癌研究中选择的是第 1 外显子和第 1 内含子,赵丹瑜等^[15]在胃癌中的研究选取的是启动子区。在本研究中这两个位点的甲基化率也有差异。本研究中运用 AliBaba 2.1 软件预测与 MSP 上下游引物中 CpG 位点结合的转录因子,发现启动子区 MSP 上下游引物中 CpG 位点均在转录因子 Sp1 的结合区域。结合本研究结果分析,*IGFBP7* 基因启动子区 CpG 位点发生高甲基化后,有可能影响转录因子 Sp1 与启动子区的结合,直接或间接抑制转录,从而影响 *IGFBP7* 蛋白表达^[17]。而第 1 外显子区 CpG 位点可能多为不完全甲基化,或尽管其上游引物区域有一个 CpG 位点位于转录因子 Sp1 结合区域,但可能结合作用较弱或受其他分子的影响,不足以抑制转录而影响蛋白表达,提示在贲门腺癌组织中 *IGFBP7* 基因启动子区比第 1 外显子区更容易发生甲基化而使基因失活。

本研究结果还显示,在贲门腺癌组织中 *IGFBP7* 蛋白表达明显低于癌旁正常组织,并且与其启动子区的甲基化状态呈负相关,但发生甲基化的肿瘤组织中并非所有 *IGFBP7* 蛋白表达都缺失,仍有部分肿瘤组织中 *IGFBP7* 蛋白表达呈阳性。一个等位基因发生甲基化或基因异质性甲基化可能是主要原因,本实验中也发现在部分组织中 *IGFBP7* 蛋白表达呈阳性同时又发生甲基化,其甲基化表现为不完全甲基化。除此之外,目前有研究^[18]认为,DNA 甲基化抑制基因的表达主要表现在转录水平,其对转录的抑制程度与基因 CpG 岛甲基化的密度有关。朱益民等^[19]在 Rice 等^[12]对 *BRCA1* 基因研究数据的基础上,对其 CpG 岛区域不同位点的甲基化与该基因转录水平的关系进行研究,发现转录抑制作用随区段甲基化位点的增加而增强。密度较低的甲基化可以完全抑制弱的启动子,但是当启动子被增强子增强时,其转录功能可以得到恢复。部分肿瘤组织中可能 *IGFBP7* 基因启动子区不足以抑制其转录功能,致使发生 DNA 甲基化的组织其蛋白表达仍出现阳性。除上述结果外,本实验还发现部分未发生 *IGFBP7* 基因甲基化的贲门腺癌组织中 *IGFBP7* 蛋白表达呈阴性,其原因可能是基因突变或杂合缺失

等其他遗传学或表遗传学因素引起其蛋白表达降低,这也说明 *IGFBP7* 基因在肿瘤组织中表达下调可能是多因素共同作用的结果。

[参 考 文 献]

[1] van Breevoort D, van Agtmaal EL, Dragt BS, et al. Proteomic screen identifies IGFBP7 as a novel component of endothelial cell-specific Weibel-Palade bodies [J]. J Proteome Res, 2012, 11 (5): 2925-2936.

[2] Chen D, Yoo BK, Santhekadur PK, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-7 functions as a potential tumor suppressor in hepatocellular carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(21): 6693-6701.

[3] Ruan W, Xu E, Xu F, et al. IGFBP7 plays a poteitial tumor suppressor role in colorectal carcinogenesis [J]. Cancer Biol Ther, 2007, 6(3): 354-359.

[4] 满孝蕊, 胡绍燕, 吴水燕, 等. *IGFBP7* 基因表达下调对急性髓系白血病细胞的影响 [J]. 中华血液学杂志, 2012, 33 (4): 307-310.

[5] Sato Y, Chen Z, Miyazaki K, et al. Strong suppression of tumor growth by insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1/tumor-derived cell adhesion factor/mac25 [J]. Cancer Sci, 2007, 98(7): 1055-1063.

[6] Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, et al. Chemical genomic screening for methylation-silenced gene in gastric cancer cell line using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray [J]. Cancer Sci, 2006, 97(1): 64-71.

[7] Zuo S, Liu C, Wang J, et al. IGFBP-rP1 induces p21 expression through a p53-independent pathway, leading to cellular senescence of MCF-7 breast cancer cells [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(6): 1045-1055.

[8] Mauri P, Scarpa A, Nasseimbeni AC, et al. Identification of proteins released by pancreatic cancer cells by multidimensional protein identification technology: A strategy for identification of novel cancer markers [J]. FASEB J, 2005, 19(9): 1125-1127.

[9] An W, Ben QW, Chen HT, et al. Low expression of IGFBP7 is associated with poor outcome of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(12): 3971-3978.

[10] Lin J, Lai M, Huang Q, et al. Methylation patterns of IGFBP7 in colon cancer cell lines are associated with levels of gene expression [J]. J Pathol, 2007, 212(1): 83-90.

[11] Ye F, Chen Y, Knösel T, et al. Decreased expression of insulin-like growth factor binding protein 7 in human colorectal carcinoma is related to DNA methylation [J]. Cancer Res Clin Oncol, 2007, 133(5): 305-314.

[12] Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P, et al. Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens [J]. Carcinogenesis, 2000, 21(9): 1761-1765.

[13] Sullivan L, Murphy TM, Barrett C, et al. IGFBP7 promoter methylation and gene expression analysis in prostate cancer [J]. J Urol, 2012, 188(4): 1354-1360.

[14] Chen Y, Pacyna-Genqelbach M, Ye F, et al. Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1) has potential tumor-suppressive activity in human lung cancer [J]. J Pathol, 2007, 211(4): 431-438.

[15] 赵丹瑜, 李霞, 钟捷, 等. 胰岛素样生长因子结合蛋白 7 基因在胃癌细胞中的表达及甲基化调控 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2009, 29(9): 1062-1064.

[16] Song J, Teplova M, Ishibe-Murakami S, et al. Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation [J]. Science, 2012, 335(6069): 709-712.

[17] Huang SK, Scruggs AM, Donaghy J, et al. Prostaglandin E₂ increases fibroblast gene-specific and global DNA methylation via increased DNA methyltransferase expression [J]. FASEB J, 2012, 26(9): 3703-3714.

[18] Selvi BR, Mohankrishna DV, Ostwal YB, et al. Small molecule modulators of histone acetylation and methylation: A disease perspective [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1799(10/11/12): 810-828.

[19] 朱益民, 来茂德. 启动子 CpGs 位点甲基化所致 BRCA1 基因转录抑制作用的位点特异 [J]. 实用肿瘤杂志, 2003, 18(6): 444-447.

[收稿日期] 2012 - 07 - 16 [修回日期] 2012 - 10 - 23
[本文编辑] 王莹

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司 封二

上海医元生物基因发展有限公司 封三

碧迪医疗器械有限公司 封四