

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.05.015

HHIP 基因 CpG 岛高甲基化水平参与胃癌的发生

宋宇, 左云, 涂建成, 丰宇芳, 徐志英(张家港市第一人民医院 肿瘤内科, 江苏 张家港 215600)

[摘要] **目的:** 观察人胃癌、癌旁组织与胃癌 AGS 细胞中人音猬因子相互作用蛋白(human hedgehog interacting protein, HHIP)基因启动子区域 CpG 岛的甲基化水平, 探索其与胃癌发生的关系。 **方法:** RT-PCR 检测 30 例人胃癌组织、癌旁组织及 AGS 细胞中 HHIP mRNA 的表达, 免疫组织化学方法和甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP)分别检测胃癌组织和癌旁组织的 HHIP 表达和 HHIP 基因启动子区域甲基化状态。 AGS 细胞予甲基化转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dc)处理前后, RT-PCR、MSP 和硫化测序 PCR(bisulfite sequencing PCR, BSP)分别检测 AGS 细胞中 HHIP mRNA 表达、启动子区域甲基化水平变化、CpG 岛甲基化位点数量的变化; 分析 HHIP 基因启动子区 CpG 岛甲基化水平变化与 HHIP mRNA 表达水平变化之间的相关性。 **结果:** 胃癌组织中的 HHIP mRNA(0.82 ± 0.38 vs 1.60 ± 0.26 , $P = 0.000$)和蛋白(0.51 ± 0.03 vs 0.83 ± 0.27 , $P < 0.05$)的表达均低于癌旁组织, 并且与年龄、性别、TNM 分期、分化程度、淋巴结转移均无显著相关性(均 $P > 0.05$)。癌旁组织中 HHIP 基因启动子区甲基化水平显著低于胃癌和 AGS 细胞[$(17.7 \pm 3.59)\%$ vs $(62.9 \pm 6.14)\%$ ($99.7 \pm 0.67\%$), 均 $P < 0.05$]。 AGS 细胞在 5-Aza-dc 干预后 HHIP mRNA 表达明显增高(4.68 ± 0.22 vs 0.21 ± 0.12 , $P < 0.01$), HHIP 基因启动子区甲基化水平明显下降[$(10.1 \pm 0.21)\%$ vs $(90.2 \pm 0.67)\%$, $P < 0.01$], CpG 岛甲基化位点明显减少, 并且 HHIP 基因启动子区甲基化水平与 mRNA 表达呈负相关($r = -0.693$, $P = 0.00$)。 **结论:** HHIP 基因启动子区 CpG 岛的高甲基化水平可能通过抑制 HHIP 基因表达参与胃癌的发生。

[关键词] 人音猬因子相互作用蛋白基因; 胃癌; 甲基化**[中图分类号]** R735.2; R730.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-385X(2013)05-0590-07

High methylation level of CpG island in HHIP gene participates in the occurrence of gastric cancer

Song Yu, Zuo Yun, Tu Jiancheng, Feng Yufang, Xu Zhiying (Department of medical oncology, First People's Hospital of Zhangjiagang, Zhangjiagang 215600, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the methylation level of CpG island in human hedgehog interacting protein (HHIP) gene in gastric cancer tissues, peritumoral tissues and AGS cells, and to explore the relationship between the methylation level of CpG island and the tumorigenesis of gastric cancer. **Methods:** The expressions of HHIP mRNA in 30 human gastric carcinoma tissues, peritumoral tissues and gastric carcinoma AGS cells were detected by RT-PCR. The expressions of HHIP and the methylation level of promoter region of HHIP gene in gastric carcinoma tissues and peritumoral tissues were detected by immunohistochemical staining and methylation specific PCR (MSP), respectively. Before and after the treatment of methyl transferase inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dc), the HHIP mRNA expression, methylation level of promoter region and methylation sites locus on CpG island in AGS cells were detected by RT-PCR, MSP and bisulfite sequencing PCR(BSP), respectively. The correlation between the methylation status of CpG island at HHIP promoter region and HHIP mRNA expression level was analyzed. **Results:** The expression of HHIP mRNA (0.82 ± 0.38 vs 1.60 ± 0.26 , $P = 0.000$) and HHIP (0.5 ± 0.03 vs 0.8 ± 0.27 , $P < 0.05$) in gastric carcinoma was significantly lower than that in the peritumoral tissues. No significant correlation was observed between the expression of HHIP mRNA or protein and age,

[基金项目] 张家港市 2012 年度社会发展计划资助项目(No. ZKS1211)。 Project supported by the Social Development Plan of Zhangjiagang in 2012(No. ZKS1211)**[作者简介]** 宋宇(1976 -), 女, 江苏张家港人, 博士, 主要从事肿瘤基础及临床研究。 E-mail: sy5449@163.com**[通信作者]** 左云(Zuo Yun, corresponding author), E-mail: zuoyun1@163.com**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130930.1547.001.html>

sex, TNM stage, differentiation degree and lymph node metastasis ($P > 0.05$). The methylation level of *HHIP* gene promoter in the peritumoral tissues was significantly higher than that in the gastric cancer tissues and AGS cells ($[17.7 \pm 3.59]\%$ vs $[62.9 \pm 6.14]\%$, $[99.7 \pm 0.67]\%$; all $P < 0.05$). Compared with that before 5-Aza-dc treatment, the *HHIP* mRNA expression in AGS cells was significantly increased after treatment (4.68 ± 0.22 vs 0.21 ± 0.12 , $P < 0.01$), while the methylation level of AGS cells decreased significantly ($[10.1 \pm 0.21]\%$ vs $[90.2 \pm 0.67]\%$, $P < 0.01$), and the methylation sites in CpG islands were significantly reduced. The degree of *HHIP* methylation showed a negative correlation with the mRNA expression ($r = -0.693$, $P = 0.00$). **Conclusion:** High methylation level of CpG island in *HHIP* gene promoter may increase the expression of *HHIP* gene, and then be involved in the carcinogenesis of gastric cancer.

[**Key words**] human hedgehog interacting protein (*HHIP*) gene; gastric cancer; methylation

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(5): 590-596]

胃癌是常见的恶性肿瘤之一,其发病率居恶性肿瘤第三位,病死率居第二位^[1]。目前根治性手术仍然是胃癌的主要治疗方式,也是唯一有希望治愈的手段。但临床上大多数患者确诊时已是中晚期,手术效果不佳,直接影响预后。因此,深入研究胃癌发生、发展的分子机制,可为胃癌早期诊断提供依据,同时也为临床治疗提供新的、有效的靶点,具有重要意义。研究发现,基因的多种异常甲基化可导致基因失活和表达沉默,从而促进胃癌的发生、发展^[2-4]。人音猬因子相互作用蛋白(human hedgehog interacting protein, *HHIP*)基因位于4q31.21-31.3,能和 *PTCH* 基因竞争性结合 Hedgehog(Hh)蛋白,从而阻断 Hh 信号转导。Hh 信号通路的异常持续激活是许多肿瘤发生、发展的原因之一, *HHIP* 基因是该通路的负反馈因子,可直接抑制 Hh 通路,具有极其重要的抗肿瘤意义^[5-7]。目前,人胃癌中 *HHIP* 表达及其基因启动子区 CpG 岛甲基化状态的关系尚未见报道,本研究探索 *HHIP* 基因甲基化在胃癌发生中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源及主要试剂

收集 2009 年 02 月至 2011 年 9 月在张家港市第一人民医院进行胃癌根治术切除的胃癌及癌旁组织各 30 例,其中男性 17 例、女性 13 例,中位年龄 60 岁(35~72 岁)。癌组织和癌旁组织均经常规病理切片证实后液氮保存。所有患者无其他部位原发肿瘤,手术前未进行任何治疗。

人胃癌 AGS 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究所细胞资料中心。甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dc)购自美国 Sigma 公司,TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司,鼠抗人 *HHIP* 单抗购自美国 Santa Cruz 公司,

DAB 显色剂、纯二甲苯、双氧水甲醇、苏木精液、中性树胶均购自上海实验试剂有限公司。RNA 反转录试剂盒购自上海晶美生物工程有限公司,甲基化转化试剂盒 EZ DNA Methylation-Gold Kit 购自北京天漠科技开发有限公司。

1.2 AGS 细胞培养和 5-Aza-dc 处理

AGS 细胞按每瓶 3×10^5 个细胞接种于 100 ml 培养瓶中,用含 10% 胎牛血清的 Ham's F12K 培养液于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中常规培养约 24 h 后,细胞进入对数生长期,待细胞达 80% 汇合时,加入 5×10^6 mol/L 5-Aza-dc 处理,每 24 h 换液 1 次,72 h 后收集细胞。同时设未加 5-Aza-dc 的平行培养细胞作为对照。

1.3 RT-PCR 检测 AGS 细胞、胃癌组织及癌旁组织中 *HHIP* mRNA 的表达

胃癌组织及癌旁组织各 100 mg 在液氮中研磨成粉末,5-Aza-dc 处理前、后的 AGS 细胞各 1×10^6 个分别用 PBS 冲洗后离心收集,组织和细胞均按常规方法抽提总 RNA,溶解于 50 μ l TE 中。使用 RNA 反转录试剂盒合成 cDNA。RT-PCR 引物序列见表 1。RT-PCR 反应体系:cDNA 2 μ l,上下游引物各 0.5 μ l,10 \times PCR Buffer 10 μ l,10 mmol/L dNTP 混合液 0.5 μ l,无菌水 6.5 μ l 补充总体积至 20 μ l。扩增条件为 95 °C 变性 5 s,55 °C 退火 5 s,72 °C 延伸 30 s,共 45 个循环。相同条件扩增 β -actin。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后用凝胶成像装置进行电泳条带光密度扫描(Image J 软件分析),以 β -actin 作为内参。计算 *HHIP* 基因 RT-PCR 产物光密度值与 β -actin 基因 RT-PCR 产物光密度容积之比值,作为 *HHIP* 基因 mRNA 的相对含量。

1.4 免疫组织化学法检测 *HHIP* 在胃癌、癌旁组织中的表达

组织标本用 10% 甲醛液固定,常规石蜡包埋,

制备 4 μm 连续切片, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烘干 30 min。玻片置二甲苯内 5 min, 依次置于无水酒精与 95%、85%、75% 酒精中各 1 min, ddH₂O 洗 1 min, 20% 火力微波修复 10 min, 室温下放置冷却, ddH₂O 洗 3 次, PBS 洗 3 次, 置于 3% H₂O₂ 中 10 min, PBS 洗 3 次。用 10% 正常山羊血清 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 20 min, 依次加入鼠抗人 HHIP 一抗工作液 (1:100)、生物素标记的即用型二抗和辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 (streptavidin peroxidase, SP)。经 DAB 显色、苏木精复染、中性树胶封片和干燥后显微镜下观察结果。

采用已知阳性切片为阳性对照, 已知阴性切片为阴性对照, 以 PBS 代替一抗为空白对照。采用 Falleni 等^[8]的综合计分法评分, 按细胞染色强度分为 3 级: 浅黄色为弱阳性, 1 分; 棕黄色为中度阳性, 2 分; 棕褐色为强阳性, 3 分。在 400 倍光镜下随机观察 5 个不同视野, 根据阳性细胞占总细胞数的百分率分为 4 个等级: < 5.0% 为 0 分; 5.0% ~ 25% 为 1 分; 26.0% ~ 50.0% 为 2 分; 51.0% ~ 100% 为 3 分。用阳性细胞数分级和染色强度分级的乘积作为判断标准, 若乘积 0 ~ 2 分为阴性, 乘积 3 ~ 9 分为阳性。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequence

Method	Gene	Primer sequence	Length(bp)	Annealing temperature($t/^{\circ}\text{C}$)
RT-PCR	HHIP	5'-CTGCTTCTGTATTCAGGAGGTT-3'	229	55
		5'-GGGATGGAATGCGAGGCTTA-3'		
	β -actin	5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'	184	60
		5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'		
BSP	HHIP	5'-GGGGAGGAGAGAGAGACTTTG-3'	243	60
		5'-CCCRACRACCTCCCTACTAC-3'		
	β -actin	5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'	184	60
		5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'		
MSP	Methylation	5'-GTAGTAGTCGGGTAGTTTCGGAATTTTC-3'	190	60
		5'-AAAAACGACTAACC GCGACG 3'		
	Non-methylation	5'-AGTAGTTGGGTAGTTTTCGGAATTTTGG 3'	188	60
		5'-AAAAACAACCTAACCACAACA-3'		

1.5 重亚硫酸盐转化 DNA

酚/氯仿法抽提胃癌、癌旁组织和 5-Aza-dc 处理前、后的 AGS 细胞总 DNA 并纯化, 采用 EZ DNA Methylation -Gold Kit 甲基化试剂盒进行 DNA 转化, 将 DNA 双链中的“C”转化为“U”, 按说明书操作。转化产物于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存一周备用。

1.6 MSP(methylation specific PCR)检测 HHIP 基因启动子区域甲基化水平

应用 ABI 公司 Methyl Primer Express v1.0 软件设计 HHIP 启动子区域 MSP 引物(表 1), 检测胃癌、癌旁组织和 5-Aza-dc 处理前、后的 AGS 细胞 HHIP 基因启动子区域甲基化水平。反应体系: 10 \times Buffer 5 μl , dNTP 1 μl , 上下游引物各 1.5 μl , Tag 酶 1.0 μl , ddH₂O 32 μl , 重亚硫酸盐处理过的 DNA 8 μl 。循环条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸

50 s, 共 40 个循环。

1.7 BSP(bisulfite sequencing PCR)检测 HHIP 基因甲基化位点

HHIP BSP 引物应用 ABI 公司 Methyl Primer Express v1.0 软件设计(表 1), 鉴定 5-Aza-dc 处理对 AGS 细胞 HHIP 基因启动子区 CpG 岛甲基化位点的甲基化状态的影响。反应体系为: 10 \times Buffer 5 μl , dNTP 1 μl , 上下游引物各 1.5 μl , Tag 酶 1.0 μl , ddH₂O 34 μl , 重亚硫酸盐处理过的 DNA 6 μl 。40 个循环扩增, 循环条件为, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s。BSP 结果送上海华大公司测序, 确定甲基化位点。

1.8 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 采用 χ^2 检验、Spearman 相关分析、 t 检

验,多因素分析采用 COX 比例风险模型。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *HHIP* mRNA 在 AGS 细胞、胃癌组织及癌旁组织中的表达及其与临床病理指标的关系

RT-PCR 检测结果显示,*HHIP* mRNA 在人胃癌组织及癌旁胃组织中均有表达,在 AGS 细胞中无表达(图 1)。胃癌组织中 *HHIP* mRNA 阳性率为 30% (9/30),癌旁组织中的阳性率为 66.67% (20/30)。*HHIP* mRNA 在胃癌组织中的相对表达量显著低于癌旁组织(0.8 ± 0.38 vs 1.6 ± 0.26 , $P = 0.000$)。*HHIP* mRNA 表达与年龄、性别、TNM 分期、分化程度、淋巴结转移均无明显相关性($P > 0.05$) (表 2)。

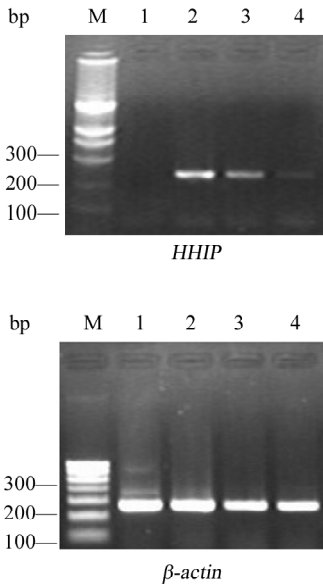


图 1 胃癌、癌旁组织和胃癌 AGS 细胞株中 *HHIP* mRNA 的表达

Fig. 1 The expression of *HHIP* mRNA in gastric cancer tissues, peritumoral tissues and gastric cancer AGS cells

M: Marker; 1: AGS cells; 2, 3: Peritumoral tissues; 4: Gastric cancer tissues

2.2 *HHIP* 蛋白在胃癌及癌旁组织中的表达及其与临床病理指标的关系

免疫组织化学检测结果显示,*HHIP* 蛋白的阳性染色均呈棕黄色或棕褐色颗粒,其阳性表达以细胞核为主,少见胞质、胞膜染色(图 2)。*HHIP* 在胃癌组织中阳性率为 30% (9/30),癌旁正常组织中的阳性率为 53.33% (16/30),在胃癌组织中的表达量低于癌旁组织(0.51 ± 0.03 vs 0.83 ± 0.27 , $P <$

0.05)。Pearson 相关分析结果显示,*HHIP* mRNA 表达与蛋白表达呈正相关($P = 0.000$, $r = 0.935$) (表 3)。*HHIP* 蛋白表达与年龄、性别、TNM 分期、分化程度、淋巴结转移均无明显相关($P > 0.05$) (表 4)。

表 2 *HHIP* mRNA 表达与临床病理特点的关系

Tab. 3 Relationship between expression of *HHIP* mRNA and clinical features

Feature	n	<i>HHIP</i>		
		Relative expression	t	P
Sex				
Male	17	1.3 ± 0.02	0.545	0.596
Female	13	1.3 ± 0.01		
Age (t/a)				
< 50	11	1.3 ± 0.02	0.012	0.991
≥ 50	19	1.3 ± 0.01		
TNM stage				
II	20	1.3 ± 0.01	-0.031	0.976
III	10	1.3 ± 0.01		
Differentiation				
Well and moderate	16	1.3 ± 0.02	0.972	0.394
Poor	14	1.3 ± 0.01		
Lymph node metastasis				
Yes	12	1.3 ± 0.02	0.162	0.875
No	18	1.3 ± 0.01		

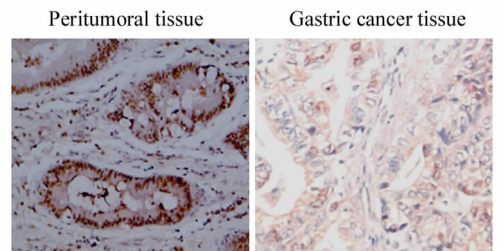


图 2 *HHIP* 蛋白在胃癌和癌旁组织中的表达(×400)

Fig. 2 *HHIP* protein expression in gastric cancer tissue and peritumoral tissue (×400)

表 3 *HHIP* mRNA 与 *HHIP* 蛋白表达的关系

Tab. 3 Relationship between *HHIP* mRNA and *HHIP* protein expression

<i>HHIP</i> mRNA	<i>HHIP</i> protein		r	P
	Positive	Negative		
Positive	26	3	0.935	0.000
Negative	1	30		

表 4 HHIP 蛋白表达与胃癌患者临床病理特点的关系
Tab. 4 Relationship between HHIP protein expression and clinical features of gastric cancer patients

Feature	HHIP		χ^2	P
	Positive	Negative		
Sex				
Male	4	13	0.533	0.465
Female	5	8		
Age(t/a)				
<50	5	6	2.133	0.144
≥50	4	15		
TNM stage				
II	5	15	2.133	0.144
III	4	6		
Differentiation				
Well and moderate	6	10	0.133	0.715
Poor	3	11		
Lymph node metastasis				
Yes	2	10	1.2	0.273
No	7	11		

2.3 胃癌、癌旁组织和 AGS 细胞中 HHIP 基因启动子区域的甲基化水平

MSP 结果显示,胃癌组织中 HHIP 基因启动子区域大部分甲基化,少部分非甲基化,而癌旁组织中情况相反(图 3)。癌旁组织中 HHIP 基因启动子区域甲基化水平显著低于胃癌组织和 AGS 细胞 [(17.7 ± 3.59)% vs (62.9 ± 6.14)%、(99.7 ± 0.67)%, 均 P < 0.05],在胃癌组织与 AGS 细胞中无显著差异(P > 0.05)。

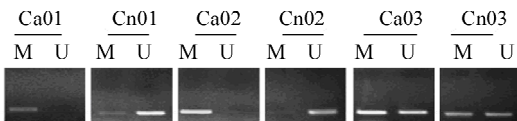


图 3 MSP 检测 HHIP 基因在胃癌组织及癌旁组织中的甲基化水平

Fig. 3 Methylation level of HHIP in gastric cancer tissues and adjacent tissues detected by MSP

Ca: Gastric cancer tissues; Cn: Peritumoral tissues; M: Methylation; U: Unmethylation

2.4 5-Aza-dc 处理对 AGS 细胞 HHIP mRNA 表达

和 HHIP 基因甲基化的影响

RT-PCR 检测 5-Aza-dc 处理前后的人胃癌 AGS 细胞 HHIP mRNA 的表达,结果显示,AGS 细胞在 5-Aza-dc 处理后 HHIP mRNA 表达明显增高(4.68 ± 0.22 vs 0.21 ± 0.12, P < 0.01) (图 4)。

MSP 法检测 5-Aza-dc 去甲基化处理前后 AGS 细胞内 HHIP 基因启动子甲基化水平,处理前为 (90.2 ± 0.67)%, 经处理后甲基化水平为 (10.1 ± 0.21)% (P < 0.01) (图 5)。Spearman 相关分析结果显示,HHIP 基因启动子甲基化水平与 mRNA 表达呈负相关(r = -0.693, P = 0.00)。

BSP 法检测 5-Aza-dc 干预前后 AGS 细胞内启动子区域甲基化状态,结果显示,处理后甲基化明显减少(图 5A)。测序结果(图 5B)表明,HHIP 基因启动子区有 46 个 CpG 岛(图中每个圆圈代表一个 CpG 岛),经 5-Aza-dc 处理后 HHIP 基因启动子区 CpG 岛甲基化位点明显减少。

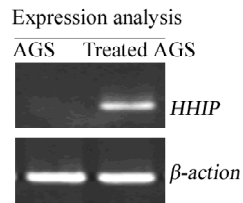


图 4 胃癌细胞株 AGS 在 5-Aza-dc 干预前后 HHIP mRNA 表达

Fig. 4 Expression of HHIP mRNA in gastric cancer AGS cells before and after 5-Aza-dc treatment

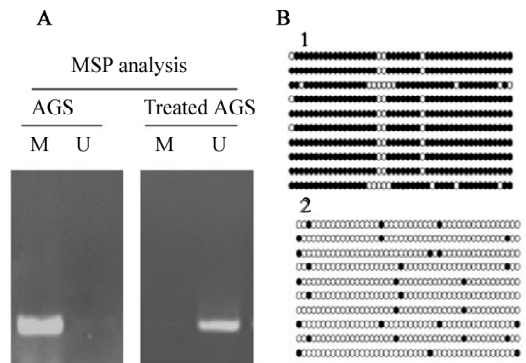


图 5 5-Aza-dc 干预前后胃癌细胞株 AGS HHIP 甲基化状态的差异

Fig. 5 Differences of methylation status of HHIP in gastric cancer AGS cell line before and after the intervention of 5-Aza-dc

A: BSP analysis; B: Sequencing analysis
1: Before 5-Aza-dc treatment; 2: After 5-Aza-dc treatment; ○: Unmethylation; ●: Methylation

3 讨论

抑癌基因的甲基化被认为是很多肿瘤发生的原因,是近年肿瘤研究的热点。人类后成论学说认为,DNA 甲基化是主要的修复后修饰方式。在多种人类肿瘤基因中,DNA 甲基化水平总的特征是广泛低甲基化和部分区域高甲基化共存。研究^[9-11]表明,5'-端 CpG 岛局部高甲基化导致抑癌基因失活是引起细胞恶性转化的重要原因。用去甲基化药物作用于肿瘤细胞株,可使抑癌基因重新表达从而产生抑癌作用,如用 5-Aza-dc 作用于启动子高度甲基化的肿瘤细胞,能恢复其相应 mRNA 和蛋白的表达,证实启动子甲基化是引起基因表达抑制的主要原因^[12-14]。有学者甚至提出^[15]可以针对某一特定肿瘤建立一个涉及多个肿瘤相关基因的 DNA 甲基化谱式,以利于肿瘤的早期诊断或鉴别。Hh 通路是编码一系列分泌蛋白的基因家族,研究^[16-18]发现其参与多种肿瘤发生,其中 *HHIP* 能与 *PTCH* 竞争性抑制 Hh 蛋白,从而阻断 *Hh* 信号通路,因此 *HHIP* 基因是 *HH* 通路的负调控因子,为一种抑癌基因。本研究同样发现,在胃癌组织中 *HHIP* mRNA 和蛋白的表达明显低于和癌旁组织 ($P < 0.05$),再次佐证了以上观点。

越来越多的证据表明,DNA 甲基化与胃癌之间关系密切,胃癌的各个阶段与癌前病变阶段都能检测到基因异常甲基化的存在。Lee 等^[19]发现,抑癌基因 *PI6* 的甲基化水平与胃癌的发展呈正相关,甲基化平均指数从慢性胃炎、肠化生、息肉样腺瘤到腺癌逐渐提高。Berman 等^[20]报道,81% 的消化道(包括食管、胃、胆管和胰腺)来源的肿瘤细胞系都表达 *SHH* 及其受体 *PTCH*。Shahi 等^[21]研究发现,在胰腺癌细胞株中 *HHIP* 基因高甲基化。说明 Hedgehog 通路参与胃癌的发生发展,但既往研究未见胃癌中 *HHIP* 基因的缺失和突变的报道,而且对 *HHIP* 基因甲基化分析的研究报道较少,本实验探索性研究 *HHIP* 基因甲基化参与胃癌发生的作用。

本研究发现,*HHIP* 基因启动子区域甲基化水平从癌旁正常组织、胃癌组织到胃癌细胞株逐步提高,推测 *HHIP* 基因启动子区域的甲基化参与了胃癌的发生。AGS 细胞株在 5-Aza-dc 处理后,*HHIP* 基因启动子区域甲基化水平明显下降,甚至表现为无甲基化,CpG 岛甲基化位点明显减少,而 *HHIP* mRNA 表达明显增高。分析结果显示,*HHIP* 基因启动子区域甲基化水平与 mRNA 表达之间呈负相关,说明

HHIP 基因 CpG 岛的高甲基化可能降低 *HHIP* 的表达,从而参与胃癌的发生。因此 *HHIP* 基因 CpG 岛的甲基化水平有望成为胃癌的检测指标。

综上所述,*HHIP* 基因启动子区 CpG 岛异常甲基化可能与胃癌的发生相关,因此 *HHIP* 基因启动子区甲基化水平可成为临床新的胃癌早期诊断的潜在标志物。

[参考文献]

- [1] de Martel C, Forman D, Plummer M. Gastric cancer: Epidemiology and risk factors [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2013, 42(2): 219-240.
- [2] Sheikh A, Alvi AA, Aslam HM, et al. Hedgehog pathway inhibitors-current status and future prospects [J]. *Infect Agent Cancer*, 2012, 7(1): 29.
- [3] Gerardo Valadez J, Grover VK, Carter MD, et al. Identification of Hedgehog pathway responsive glioblastomas by isocitrate dehydrogenase mutation [J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(2): 297-306.
- [4] Yun JI, Kim HR, Park H, et al. Small molecule inhibitors of the hedgehog signaling pathway for the treatment of cancer [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(8): 1317-1333.
- [5] Queiroz KC, Spek CA, Peppelenbosch MP. Targeting Hedgehog signaling and understanding refractory response to treatment with Hedgehog pathway inhibitors [J]. *Drug Resist Updat*. 2012, 15(4): 211-222.
- [6] Cobourne MT, Green JB. Hedgehog signaling in development of the secondary palate [J]. *Front Oral Biol*, 2012, 16: 52-59.
- [7] Büller NV, Rosekrans SL, Westerlund J, et al. Hedgehog signaling and maintenance of homeostasis in intestinal epithelium [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2012, 27(3): 148-155.
- [8] Falleni A, Lucchesi P, Ghezzi C, et al. The female gonad in two species of Microplana (Platyhelminthes, Tricladida, Rhyncodemidae): Ultra- structural and cytochemical investigations [J]. *J Morphol*, 2009, 270(9): 1042-1054.
- [9] Viatte S, Plant D, Raychaudhuri S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(3): 141-153.
- [10] Eising E, Datsun NA, van den Maagdenberg AM, et al. Epigenetic mechanisms in migraine: A promising avenue [J]. *BMC Med*, 2013, 11(1): 26.
- [11] Hodes GE. Sex, stress, and epigenetics: Regulation of behavior in animal models of mood disorders [J]. *Biol Sex Differ*, 2013, 4(1): 1.
- [12] Torano EG, Petrus S, Fernandez AF, et al. Global DNA hypomethylation in cancer: Review of validated and clinical significance [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2012, 50(10): 1733-1742.
- [13] Savio AJ, Lemire M, Mrkonjic M, et al. MLH1 region polymorphisms show a significant association with CpG island shore methylation in a large cohort of healthy individuals [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51531.
- [14] Kim JG, Takeshima H, Niwa T, et al. Comprehensive DNA methylation and extensive mutation analyses reveal an association be-

tween the CpG island methylator phenotype and oncogenic mutations in gastric cancers [J]. *Cancer Lett*, 2013, 330(1): 33-40.

[15] Anastasiadou C, Malousi A, Maglaveras N, et al. Human epigenome data reveal increased CpG methylation in alternatively spliced sites and putative exonic splicing enhancers [J]. *DNA Cell Biol*, 2011, 30(5): 267-275.

[16] Lu JT, Zhao WD, He W, et al. Hedgehog signaling pathway mediates invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma via ERK pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(5): 691-700.

[17] Yun JI, Kim HR, Park H, et al. Small molecule inhibitors of the hedgehog signaling pathway for the treatment of cancer [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(8): 1317-1333.

[18] Pan JY, Zhou SH. The hedgehog signaling, a new therapeutic target for treatment of ischemic heart disease [J]. *Pharmazie*, 2012, 67(6): 475-481.

[19] Lee JH, Park SJ, Abraham SC, et al. Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas [J]. *Oncogene*, 2004, 23(26): 4646-4654.

[20] Berman A, Mezey M, Kobayashi M, et al. Gerontological nursing content in baccalaureate nursing programs: Comparison of findings from 1997 and 2003 [J]. *J Prof Nurs*, 2005, 21(5): 268-275.

[21] Shahi MH, Lorente A, Castresana JS. Hedgehog signalling in medulloblastoma, glioblastoma and neuroblastoma [J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(3): 681-688.

[收稿日期] 2013 -03 -22 [修回日期] 2013 -07 -15

[本文编辑] 韩丹, 周玲琳

· 读者 · 作者 · 编者 ·

常见参考文献著录格式示例

1 专著

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 其他责任者(例如翻译者). 版本项(1 版不著录). 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

[1] Abrams WB, Beers MH, Berkow R. 默克老年病手册 [M]. 陈灏珠, 王赞舜, 刘厚钰, 等. 译. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 22-25.

2 专著析出文献

著录格式: 析出文献主要责任者. 文献题名[文献类型标志]// 专著主要责任者. 专著题名. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

[1] Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms [M]// Soderman WA Jr, Soderman WA. *Pathologic physiology: Mechanisms of disease*. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-472.

3 期刊文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页.

[1] Nobles KN, Guan Z, Xiao K, et al. The active conformation of beta-arrestin 1: Direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins 1 and -2 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (29): 21370-21381.

4 专利文献

著录格式: 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号[文献类型标志]. 公告日期或公开日期.

[1] 钱其军, 李琳芳, 吴红平, 等. 一种多功能免疫杀伤转基因细胞(PIK)、其制备方法及应用: 中国, 2010101496839 [P]. 2010-10-14.

5 学位论文

著录格式: 责任者. 题名[文献类型标志]. 学位授予单位所在地: 学位授予单位, 年.

[1] 曹新广. Cathepsin L 和 Cystatin B 的表达与大肠癌生物学行为的关系 [D]. 郑州, 郑州大学, 2007.

6 电子文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志/ 文献载体标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页(更新或修改日期) [引用日期]. 获取和访问路径.

[1] Christine M. *Plant physiology: Plant biology in the genome era* [J/OL]. *Science*, 1998, 281: 331-332. [1998-09-23]. <http://www.sciencemag.org/cgi/collection/anatmorp>.

[2] Hopkinson A. UNIMARC and metadata: Dublin core [EB/OL]. [1999-12-08]. <http://www.ifla.org/IV/ifla64/138-161e.htm>.