

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.01.012

· 临床研究 ·

Atrogin-1 基因在贲门腺癌组织中的表达及其异常甲基化

马洪亮¹, 韩立杰², 郭炜¹, 张明慧¹, 郭艳丽¹, 邝钢¹, 董稚明¹(1. 河北医科大学第四医院暨河北省肿瘤研究所 病理研究室, 河北 石家庄 050011; 2. 沧州市中心医院放疗科, 河北 沧州 061001)

[摘要] 目的: 探讨 atrogin-1 基因在贲门腺癌(gastric cardia adenocarcinoma, GCA)中的异常甲基化及表达, 并分析其临床意义。方法: 选用河北医科大学第四医院 2004—2008 年间的贲门腺癌患者手术标本共 139 例, 分别应用亚硫酸氢盐转换-甲基化特异性 PCR(bisulfite conversion-methylation specific polymerase chain reaction, BS-MSP)、RT-PCR 和免疫组织化学法检测贲门腺癌组织及相应癌旁(距癌灶边缘 3~5 cm)组织中 atrogin-1 基因的甲基化、mRNA 和蛋白表达情况, 应用免疫组织化学法检测相应组织中 Smad4 蛋白的表达。结果: 贲门腺癌组织中 atrogin-1 基因启动子区的甲基化率[44.6%(62/139)]显著高于癌旁组织[3.6%(5/139)]($\chi^2=63.891, P=0.001$), 且 atrogin-1 基因的甲基化与 TNM 分期及肿瘤的组织学分化程度密切相关($\chi^2=6.144, P<0.05$)。贲门腺癌组织中 atrogin-1 基因的 mRNA 和蛋白表达水平显著低于癌旁组织[(0.4825 ± 0.1754) vs (0.8969 ± 0.2901), $t=10.62, P=0.01$; 34.5% vs 82.0%, $\chi^2=4.441, P=0.001$], 且与其启动子区的甲基化状态之间有明显的相关性($r=-0.256, P=0.001$)。贲门腺癌组织中 Smad4 蛋白表达的阳性率显著低于癌旁组织(46.0% vs 95.7%; $\chi^2=2.945, P=0.001$), 且与 atrogin-1 蛋白表达之间呈明显的正相关($r=0.604, P=0.001$)。结论: Atrogin-1 基因启动子区高甲基化导致的基因沉默可能是贲门癌组织中此基因表达降低的机制之一。

[关键词] 贲门腺癌; atrogin-1; 甲基化; 表达

[中图分类号] R735.1; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)01-0067-06

Expression and aberrant methylation of atrogin-1 gene in gastric cardia adenocarcinoma tissue

Ma Hongliang¹, Han Lijie², Guo Wei¹, Zhang Minghui¹, Guo Yanli¹, Kuang Gang¹, Dong Zhiming¹(1. Laboratory of Pathology, Hebei Cancer Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Radiotherapy, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061001, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and aberrant methylation of the atrogin-1 gene in gastric cardia adenocarcinoma (GCA). **Methods:** Tumor and normal tissue samples were collected from GCA patients ($n=139$) undergoing surgical treatment in the Fourth Hospital of Hebei Medical University between 2004 and 2008. DNA methylation in the atrogin-1 promoter was analyzed by bisulfite conversion-methylation specific polymerase chain reaction (BS-MSP), atrogin-1 mRNA abundance by RT-PCR, and density of immunoreactive signals for atrogin-1 and Smad4 by immunohistochemical staining. **Results:** The frequency of aberrant DNA methylation in the promoter region of atrogin-1 was significantly higher in GCA than in normal tissues (44.6% vs 3.6%, $P<0.05$). The methylation status of atrogin-1 in tumor tissues was associated with TNM stage and the degree of histological differentiation of the tumor ($P<0.05$). The mRNA and protein levels of atrogin-1 were significantly decreased in tumor tissues as compared with normal tissues (0.4825 ± 0.1754 vs 0.8969 ± 0.2901 and 34.5% vs 82.0%, respectively, $P<0.01$). there was a negative correlation between atrogin-1 methylation and atrogin-1 mRNA and protein levels ($r=-0.256, P<0.01$). Smad4 protein was detected in 46.0% of tumor tissues but in 95.7% of non-tumor tissue ($P<0.01$) and the protein level of smad4 was positively associated with that of atrogin-1 ($r=0.604, P<0.01$). **Conclusion:** Hypermethylation in the promoter region of the atrogin-1 gene and

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81101854)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81101854)

[作者简介] 马洪亮(1969-),男,硕士,河北省景县人,副教授,主要从事肿瘤疾病诊治。E-mail: mhlcpb@aliyun.com

[通信作者] 董稚明(Dong Zhiming, corresponding author), E-mail: dongzhiming2000@gmail.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140218.1108.007.html>

the resultant decrease in atrogen-1 protein synthesis may play an important role in the pathogenesis of gastric cardia adenocarcinoma.

[**Key words**] gastric cardia adenocarcinoma; atrogen-1; methylation; expression

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(1): 67-72]

肌肉萎缩相关基因 1 (atrogen-1) 位于染色体 8q24.13, 是构成泛素蛋白连接酶复合体四个亚单位中的一员^[1]。atrogen-1 基因最初在肌肉萎缩疾病的研究中被发现并逐渐引起研究者的关注, 其过表达可以使培养的肌细胞皱缩, 加速肌细胞蛋白的分解, 在肌肉萎缩发生之前, 即在骨骼肌细胞中可检测到其 mRNA 表达增高^[2-3]。研究^[4-6]表明, atrogen-1 有可能是一个重要的凋亡调节因子, 且是 TGF- β /Smad 信号通路的靶基因, 在乳腺癌和卵巢癌中表达降低, 其异常表达可能与该基因的异常高甲基化密切相关。有关 atrogen-1 在贲门腺癌 (gastric cardia adenocarcinoma, GCA) 中表达及甲基化状态的研究目前尚很少见报道。本研究拟检测 atrogen-1 基因在贲门腺癌中的异常甲基化及表达情况, 探讨其异常甲基化及表达与贲门腺癌的浸润、转移和分化程度之间的相关性, 为确定 atrogen-1 基因在贲门腺癌发生、发展中的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

蛋白酶 K 为德国 Merck 公司产品, 氢醌为美国 Sigma 公司产品, 亚硫酸氢钠为美国 Sigma 公司产品, Wizard DNA 纯化试剂盒为美国 Promega 公司产品, 甲基化酶 (Sss I) 为美国 New England BioLabs 公司产品, TRIzol 为美国 Invitrogen 公司产品, 逆转录试剂盒 (reverse transcription system A3500) 为美国 Promega 公司产品。兔抗人 atrogen-1 多克隆抗体 (dilution 1:500) 为美国 abcam 公司产品, 鼠抗人 Smad4 单克隆抗体 (dilution 1:200) 为美国 Santa Cruz 公司产品, 即用型 SP 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 2004—2008 年间的贲门腺癌手术患者, 共 139 例, 其中男性 109 例、女性 30 例, 年龄范围 39~74 岁, 中位年龄 58.4 岁。每例患者均取距离癌灶边缘 3~5 cm 的癌旁黏膜组织及贲门癌原发灶组织, 全部患者术前均未经化疗和放疗。手术切除标本一部分于 -80℃ 冻存用于 DNA 和 RNA 的提取, 一部分以 10% 中性甲醛溶液固定, 常规制作蜡块保存, 用于免

疫组织化学染色。肿瘤组织及癌旁组织均经常规 H-E 染色病理诊断证实。按照国际抗癌联盟 (International Union Against Cancer, UICC) 标准进行 TNM 分期, 其中 I 期有 5 例 (3.6%)、II 期有 56 例 (40.3%)、III 期有 62 例 (44.6%)、IV 期有 16 例 (11.5%)。按照世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 肿瘤的病理学分级标准进行组织学分级, 其中高分化 57 例 (41.0%)、中等分化 51 例 (36.7%)、低分化 31 例 (22.3%)。所有贲门癌标本取材均经河北医科大学第四医院医学伦理委员会批准, 并获患者知情同意。

1.3 亚硫酸氢盐转换-甲基化特异性 PCR (bisulfite conversion-methylationspecific PCR, BS-MSP) 检测 atrogen-1 的甲基化

每个标本均取米粒大小新鲜组织, 蛋白酶 K 消化, 酚/氯仿抽提法提取癌组织和癌旁组织基因组 DNA。每个样本均取 5 μ g DNA 进行亚硫酸氢盐处理, 具体处理见文献^[7]。由于基因甲基化多发生在启动子区及第 1 外显子区富含 CpG 岛的部位, 在检索文献及比对 Genbank 库的基础上, 经 MethPrimer 软件进行预测, 发现 atrogen-1 基因在启动子区及第一外显子区含 2 个 CpG 岛 (图 1), 分别位于 -580~-420 bp 处及 -354~+517 bp 处。实验对启动子区 (-475 至 -288 bp) 富含 CpG 位点的部位进行了甲基化分析^[6]。为了降低实验的假阳性, 本研究应用 BS-MSP 对选取位点进行甲基化分析^[8]。首先扩增 100 ng 经亚硫酸氢盐处理过的 DNA, 此第一轮 PCR 的上下游引物分别在 MSP 上下游引物的外端, 且第一轮 PCR 的上下游引物中不含 CG 位点, 如此片段扩增成功, 则说明样本 DNA 的亚硫酸氢盐处理完全; 然后再以第一轮扩增的片段作为模板, 进行第二轮的 MSP 扩增, 具体的引物及反应条件见表 1。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 阳性对照将基因组 DNA 经 Sss I 处理后进行 PCR, 阴性对照用灭菌双蒸水取代 DNA 进行 PCR。为 MSP 的质量控制, 随机选取 10% 标本进行重复实验, 重复性可达到 95% 以上。

1.4 RT-PCR 检测 atrogen-1 基因 mRNA 的表达

按 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA, 参照逆转录

试剂盒说明书比例加样,将 RNA 逆转录成 cDNA。RT-PCR 的引物及内参照 GAPDH 的引物及反应条件见表 1。

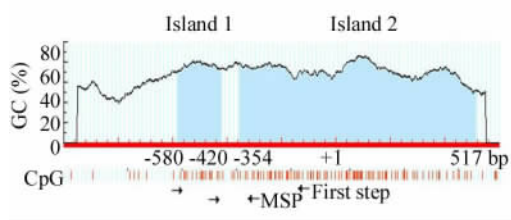


图 1 atrogin-1 基因的
CpG 岛分布及 BS-MSP 引物位置

Fig. 1 CpG island of atrogin-1 and locations
of BS-MSP primers

1.5 免疫组织化学法检测 atrogin-1 和 Smad4 蛋白的表达

石蜡切片经常规脱蜡至水,用含 3% H₂O₂ 的甲

醇溶液封闭内源性过氧化物酶,微波修复 15 min。依次加入一抗及相应的即用型生物素化二抗和即用型辣根过氧化物酶标记的三抗,DAB 显色,苏木精对比染色细胞核,常规脱水,透明,中性树胶封固。PBS 取代一抗作为空白对照,其余步骤同上。正常胃黏膜组织作为 atrogin-1 和 Smad4 表达的阳性对照。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% 计为 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判定结果。本研究判定时,以“++”和“+++”定义为阳性表达,“-”和“+”定义为阴性表达。

表 1 Atrogin-1 和 Smad4 的 RT-PCR 及 BS-MSP 引物序列及其反应条件

Tab. 1 Primer sequences and reaction conditions of atrogin-1 and Smad4 in RT-PCR and BS-MSP

| PCR type | Gene | Primer | Annealing temperature (t/°C) | Product size (bp) |
|-----------------------------------|---------------|-------------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| RT-PCR | Atrogin-1 | F:5'- AAGTCTGTGCTGCTCGGGAA -3' | 57 | 123 |
| | | R:5'- AGTGAAGGTGAGGCCTTTGAAG -3' | | |
| | Smad4 | F: 5'- ATCTGAGTCTAATGCTACC-3' | 58 | 452 |
| | | R: 5'- CGTATCCATCAACAGTAAC-3' | | |
| | GAPDH | F:5'- GGGAAACTGTGGCGTGAT -3' | 57 | 342 |
| | | R:5'- GTGGTCGTTGAGGGCAAT -3' | | |
| BS-MSP | First-step | F:5'- TTGGTTAGTGATAGTTAAGG -3' | 54 | 519 |
| | | R:5'- TAACTTTATTATAAACT -3' | | |
| | Second-step | | | |
| | Methylation | F:5'- TTAGTTTTGCGGACGGTTCGGGAGG -3' | 55 | 188 |
| | | R:5'- ACGCTTAAAAAATACGCCCCGATC -3' | | |
| | Unmethylation | F:5'- TTAGTTTTGTGGATGTTTGGGAGG -3' | 55 | 188 |
| R:5'- ACCTTAAAAAATACACCCCAATC -3' | | | | |

1.6 统计学处理

采用 SPSS11.5 软件,计数资料采用 χ^2 和校正 χ^2 检验,计量资料采用 *t* 检验,相关性分析采用 Spearman 分析,双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GCA 组织中 atrogin-1 甲基化率明显增高

全部 139 例 GCA 组织及相应癌旁组织 BS-MSP 检测结果(图 2)显示,GCA 组织中 atrogin-1 甲基化率(44.6%, 62/139)显著高于癌旁组织(3.6%, 5/139)($\chi^2 = 3.891, P = 0.001$)。atrogin-1 甲基化的高低与年龄、性别无关,但 III 期和 IV 期 GCA 组织

中 atrogin-1 甲基化率显著高于 I 期和 II 期肿瘤组织 ($\chi^2 = 6.144, P = 0.013$), 低分化组织中 atrogin-1 甲基化率显著高于高、中分化组织 ($\chi^2 = 6.402, P = 0.011$) (表 2)。

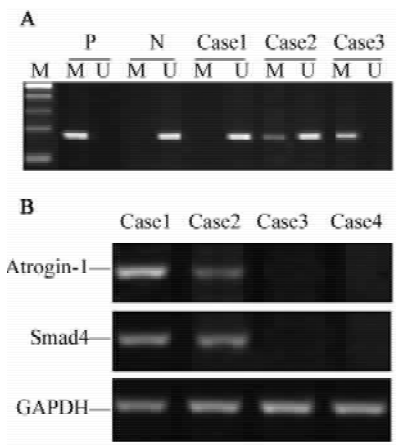


图 2 GCA 组织中 atrogin-1 甲基化及 atrogin-1 与 Smad4 mRNA 的表达

Fig. 2 Methylation status of atrogin-1 and mRNA expression of atrogin-1 and Smad4 in GCA tissues

A: Methylation status of atrogin-1. M: marker; P: Positive control; N: Negative control; U: Indicates the presence of unmethylated genes; M: Indicates the presence of methylated genes. Case 1: Unmethylation, Case 2: The tumor is partly methylated, Case 3: The tumor is fully methylated. B: mRNA expression of atrogin-1 and Smad4. Case 1 and 2: Positive mRNA expression of atrogin-1 and Smad4; Case 3 and 4: Negative mRNA expression of atrogin-1 and Smad4

2.2 GCA 组织中 atrogin-1 和 Smad4 的 mRNA 表达明显降低

GCA 组织中 atrogin-1 基因的 mRNA 表达显著低于相应的癌旁组织 (0.4825 ± 0.1754 vs 0.8969 ± 0.2901 ; $t = 10.62, P = 0.001$) (图 2), 且与 TNM 分期及肿瘤组织的分化程度密切相关; atrogin-1 基因发生甲基化的 GCA 组织其 mRNA 表达显著低于未发生甲基化的 GCA 癌组织 (0.2812 ± 0.0901 vs 0.6525 ± 0.2914 ; $t = 11.28, P = 0.001$)。Smad4 基因的 mRNA 表达水平显著低于癌旁组织 (0.5201 ± 0.2056 vs 0.9114 ± 0.2817 ; $t = 9.86, P = 0.001$) (图 2); 与 TNM 分期及肿瘤组织的分化程度分组进行统计, Smad4 的 mRNA 表达差异均不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 GCA 组织中 atrogin-1 蛋白的表达

GCA 组织中 atrogin-1 的免疫组化染色主要为细胞质着色 (图 3), atrogin-1 蛋白表达阳性率为 34.5% (48/139), 相应癌旁组织中阳性率为 82.0% (114/139), 两者差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.441, P = 0.001$)。Atrogin-1 在 GCA 中的蛋白表达与患者的年龄、性别无关, 但 III 期和 IV 期 GCA 患者 atrogin-1 蛋白表达水平显著低于 I 期和 II 期患者 ($\chi^2 = 4.552, P = 0.033$), 低分化组织中 atrogin-1 蛋白表达水平显著低于高中分化组织 ($\chi^2 = 4.065, P = 0.044$) (表 2)。发生 atrogin-1 启动子区高甲基化的 62 例 GCA 组织有 49 例蛋白表达为阴性, atrogin-1 的甲基化与其蛋白表达缺失之间有明显的相关性 ($r = -0.256, P = 0.03$) (表 3)。

表 2 Atrogin-1 和 Smad4 在 GCA 组织中的甲基化及蛋白表达

Tab. 2 Methylation status of atrogin-1 and expressions of atrogin-1 and Smad4 in GCA tissues

| Group | N | Atrogin-1 methylation frequency | | | Atrogin-1 protein expression | | | Smad4 protein expression | | |
|---------------------------------------|-----|---------------------------------|----------|-------|------------------------------|----------|-------|--------------------------|----------|-------|
| | | n (%) | χ^2 | P | n (%) | χ^2 | P | n (%) | χ^2 | P |
| Age (t/a) | | | | | | | | | | |
| <50 | 26 | 12 (46.1) | 0.031 | 0.860 | 8 (30.8) | 0.200 | 0.654 | 11 (42.3) | 0.180 | 0.672 |
| ≥ 50 | 113 | 50 (44.2) | | | 40 (35.4) | | | 53 (46.9) | | |
| Gender | | | | | | | | | | |
| Male | 109 | 50 (45.9) | 0.328 | 0.567 | 37 (33.9) | 0.077 | 0.781 | 50 (45.8) | 0.006 | 0.938 |
| Female | 30 | 12 (40.0) | | | 11 (36.7) | | | 14 (46.7) | | |
| TNM stage | | | | | | | | | | |
| I + II | 61 | 20 (32.8) | 6.144 | 0.013 | 27 (44.3) | 4.552 | 0.033 | 35 (57.4) | 5.62 | 0.018 |
| III + IV | 78 | 42 (53.8) | | | 21 (26.9) | | | 29 (37.2) | | |
| Pathological differentiation of tumor | | | | | | | | | | |
| Well/Moderate | 108 | 42 (38.9) | 6.402 | 0.011 | 42 (38.9) | 4.065 | 0.044 | 53 (49.1) | 1.791 | 0.181 |
| Poor | 31 | 20 (64.5) | | | 6 (19.4) | | | 11 (35.4) | | |

2.4 GCA 组织中 Smad4 蛋白的表达

GCA 组织中 Smad4 的免疫组化染色主要为细胞核和细胞质着色, Smad4 蛋白表达阳性率为 46.0% (64/139), 而相应癌旁组织的蛋白表达阳性率为 95.7% (133/139), 两者差异有统计学意义 ($\chi^2 = 2.945, P = 0.001$)。Smad4 蛋白在 GCA 中的表达与患者的年龄、性别和组织学分化程度无关, 但 III 期和 IV 期 GCA 患者 Smad4 蛋白表达水平显著低于 I 期和 II 期患者 ($\chi^2 = 5.621, P = 0.018$) (表 2)。48 例 atrogin-1 阳性表达的 GCA 组织中 42 例 Smad4 蛋白表达呈阳性, atrogin-1 与 Smad4 的蛋白表达之间呈明显的正相关 ($r = 0.604, P = 0.001$) (表 3)。64 例 Smad4 蛋白表达阳性的 GCA 组织中 34.38% (22/64) atrogin-1 呈甲基化状态, 65.62% (42/64) atrogin-1 基因呈非甲基化状态, Smad4 蛋白表达与 atrogin-1 基因甲基化之间呈明显负相关 ($r = 0.264, P = 0.025$) (表 4)。

表 3 GCA 组织中 atrogin-1 的蛋白表达与其甲基化及 Smad4 蛋白表达之间的相关性

Tab. 3 Association of atrogin-1 protein expression and methylation status, protein expression of Smad4 in GCA tissues

| Atrogin-1 protein expression | Atrogin-1 methylation | | | Smad4 expression | | |
|------------------------------|-----------------------|----|-------|------------------|----|-------|
| | M | U | P | + | - | P |
| + | 13 | 35 | | 42 | 6 | |
| - | 49 | 42 | 0.003 | 22 | 69 | 0.001 |

M: Methylated; U: Unmethylated

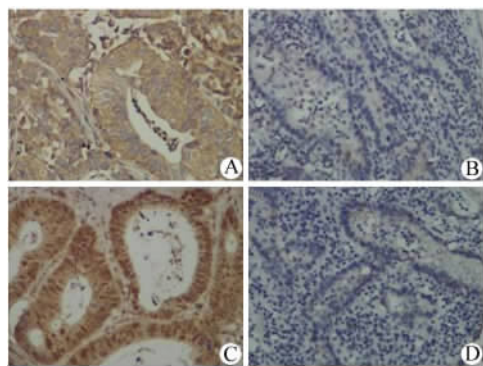


图 3 GCA 组织中 atrogin-1 及 Smad4 蛋白的表达 (SP 染色 $\times 400$)

Fig. 3 Protein expression of atrogin-1 and Smad4 in GCA tissues (SP $\times 400$)

- A: Positive staining of atrogin-1 in GCA tumor tissue;
 B: Negative staining of atrogin-1 in GCA tumor tissue;
 C: Positive staining of Smad4 in GCA tumor tissue;
 D: Negative staining of Smad4 in GCA tumor tissue

表 4 GCA 组织中 Smad4 蛋白表达与 atrogin-1 基因甲基化状态之间的相关性

Tab. 4 Association of Smad4 protein expression and atrogin-1 methylation status in GCA tissues

| Smad4 protein expression | Atrogin-1 methylated | Atrogin-1 unmethylated | P |
|--------------------------|----------------------|------------------------|-------|
| + | 22 (34.38%) | 42 (65.62%) | |
| - | 40 (53.33%) | 35 (46.67%) | 0.025 |

3 讨论

目前认为, 恶性肿瘤的发生主要通过两大类机制: 一是遗传学机制, 另一个是表观遗传学机制。DNA 甲基化作为表观遗传改变的主要方式, 与肿瘤的发生发展密切相关。GCA 的发生与营养缺乏、环境致癌物、不健康生活方式 (如吸烟饮酒以及微生物感染等) 有关, 但并不是所有暴露于这些危险因素的个体均发病, 表观遗传学机制在 GCA 的发生、发展中可能有重要的作用, 而 DNA 甲基化作为表观遗传学改变最主要的形式, 近年来已成为肿瘤研究的热点。

Atrogin-1 是 F-box 蛋白家族的一员, 与 Skp1、Cullin 1 和 Roc1/Rbx1/Hrt1 一起构成泛素蛋白连接酶复合体的四个亚单位^[9]。F-box 蛋白通过蛋白质相互作用区域与特殊的底物连接, 它通过 F-box 区域与 Skp1 捆绑再与复合体相连^[10], 参与多种细胞生物过程, 例如信号转导、转录、细胞周期进程、分化、凋亡、肿瘤形成和细胞泛素化。Atrogin-1 最初在肌肉萎缩的研究中被发现, Gomes 等^[11]报道 atrogin-1 在肌肉萎缩发生的早期即可高表达, 并且小鼠缺少该基因可抵抗肌肉萎缩的发生。

最近的研究表明, atrogin-1 作为候选抑癌基因可能在肿瘤的发生、发展中起重要作用。Tan 等^[4]在乳腺癌 MCF-7 细胞研究中发现, atrogin-1 基因可通过表遗传机制导致其转录抑制。Chou 等^[6]发现, 在晚期卵巢肿瘤中 atrogin-1 甲基化率高达 29.3%, 且其甲基化可能与不良预后有关。本研究发现, atrogin-1 启动子区的 CpG 岛在贲门腺癌组织中可发生高甲基化, 相应的蛋白表达缺失, 结果提示, 由于 atrogin-1 启动子区的 CpG 岛发生甲基化导致的基因沉默可能是贲门腺癌中此基因失活的重要原因之一。

最近研究^[12]表明, 上游信号通路的异常可能导致下游靶基因通过表遗传机制使其转录受到抑制。Chan 等^[13]发现, 卵巢癌中 TGF- β /Smad 信号通路的

转导异常可导致通路下游靶基因 ADAM19 的表观遗传学失活, 并伴随 Smad4 的核转位异常。Qin 等^[5]研究发现, atrogen-1 是 TGF-β/Smad 信号通路的靶基因。随后的研究^[6]发现, TGF-β/Smad 信号通路的转导异常可能导致 atrogen-1 在卵巢癌中的异常甲基化。本研究也发现, Smad4 在 GCA 中的表达明显降低, 且与 atrogen-1 的蛋白表达呈明显的正相关, Smad4 蛋白表达与 atrogen-1 甲基化之间呈负相关, 进一步证明了 TGF-β/Smad 通路的异常可影响 atrogen-1 基因的甲基化状态。本研究还发现, Smad4 蛋白主要表现为细胞核和细胞质着色, 但是在正常组织中 Smad4 在细胞质中合成转移至细胞核中行使功能, 免疫组化染色以细胞核着色为主。研究^[14]发现, Smad4 在肾透明细胞癌中出现核表达降低、表达异位现象, 是预后不良的指标。本研究也发现, GCA 组织中 Smad4 以细胞质着色为主, 提示在贲门腺癌的发生中 Smad4 蛋白可能发生了核转位异常, 并同时影响下游靶基因的表达及甲基化, 其具体机制尚有待进一步研究。

总之, 本研究结果提示 atrogen-1 基因启动子区 CpG 岛的高甲基化及其表达降低在 GCA 的发生发展中具有重要作用, 此研究结果将有助于从分子水平揭示 GCA 的病因, 可为 GCA 的分子靶向治疗提供有价值的实验数据。

[参 考 文 献]

[1] Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy [J]. Science, 2001, 294(5547): 1704-1708.

[2] Hanai J, Cao P, Tanksale P, et al. The muscle-specific ubiquitin ligase atrogen-1/MAFbx mediates statin-induced muscle toxicity [J]. J Clin Invest, 2007, 117(12): 3940-3951.

[3] Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors [J]. Mol Cell, 2004, 14(3): 395-403.

[4] Tan J, Yang X, Zhuang L, et al. Pharmacologic disruption of

Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells [J]. Genes Dev, 2007, 21(9): 1050-1063.

[5] Qin H, Chan MW, Liyanarachchi S, et al. An integrative ChIP-chip and gene expression profiling to model SMAD regulatory modules [J]. BMC Syst Biol, 2009, 3(1): 73.

[6] Chou JL, Su HY, Chen LY, et al. Promoter hypermethylation of FBXO32, a novel TGF-β/SMAD4 target gene and tumor suppressor, is associated with poor prognosis in human ovarian cancer [J]. Lab Invest, 2010, 90(3): 414-425.

[7] 张清泉, 董稚明, 郭炜, 等. GADD45A 基因在人贲门腺癌组织中的异常甲基化和表达及其临床意义 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(3): 317-322.

[8] Sasaki M, Anast J, Bassett W, et al. Bisulfite conversion-specific and methylation-specific PCR: A sensitive technique for accurate evaluation of CpG methylation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 309(2): 305-309.

[9] Li HH, Kedar V, Zhang C, et al. Atrogen-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex [J]. J Clin Invest, 2004, 114(8): 1058-1071.

[10] Li JJ, Zhang TP, Meng Y, et al. Stability of F-box protein atrogen-1 is regulated by p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cardiac H9c2 cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2011, 27(5): 463-470.

[11] Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, et al. Atrogen-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(25): 14440-14445.

[12] Zhu H, Wu K, Yan W, et al. Epigenetic silencing of DACH1 induces loss of transforming growth factor-β1 antiproliferative response in human hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2013, 58(6): 2012-2022.

[13] Chan MW, Huang YW, Hartman-Frey C, et al. Aberrant transforming growth factor beta1 signaling and SMAD4 nuclear translocation confer epigenetic repression of ADAM19 in ovarian cancer [J]. Neoplasia, 2008, 10(9): 908-919.

[14] Park JH, Lee C, Suh JH, et al. Nuclear expression of Smad proteins and its prognostic significance in clear cell renal cell carcinoma [J]. Hum Pathol, 2013, 44(10): 2047-2054

[收稿日期] 2013 - 10 - 30 [修回日期] 2013 - 12 - 05
 [本文编辑] 韩丹

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司 封二

德国美天旎生物技术有限公司 封三

碧迪医疗器械有限公司 封四

上海白泽生物基因发展有限公司 插页