

肝细胞癌 *ZIC1* 基因启动子区甲基化与临床病理特征的关系

Relationship between promoter methylation of the *ZIC1* gene and clinical pathological characteristics of the patients with hepatocellular carcinoma

笄晨星, 顾勇, 段炜(武警陕西总队医院 消化内分泌科, 陕西 西安 710054)

[摘要] **目的:** 探讨肝细胞癌 *ZIC1* 基因启动子区甲基化与临床病理特征的关系。**方法:** 采集 2008 年 8 月至 2014 年 8 月武警陕西总队医院 63 例肝细胞癌患者手术切除的肿瘤组织标本, 通过 Real-time PCR 法检测肝细胞组织及癌旁组织中 *ZIC1* mRNA 表达水平; 用甲基化特异性 PCR (methylation specific polymerase chain reaction, MSP) 法检测癌组织及癌旁组织中 *ZIC1* 基因启动子区甲基化状态。**结果:** *ZIC1* mRNA 在肝细胞癌组织中呈低表达与其启动子区甲基化有关; *ZIC1* 基因在肝细胞癌中频发甲基化 ($P < 0.05$), 并与肿瘤分化程度及分级显著相关 (均 $P < 0.05$)。**结论:** 启动子区甲基化是 *ZIC1* 基因失活的重要机制, *ZIC1* 基因启动子区异常甲基化可能参与了肝细胞癌的发生发展。

[关键词] *ZIC1* 基因; 甲基化; 肝细胞癌

[中图分类号] R735.7; R730.23

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)03-0416-03

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 发病率在全世界范围内位居第 6 位, 死亡率则位居第 3 位, 并且发病率呈逐年上升趋势^[1-2]。研究^[3]发现, HCC 发生涉及多基因、多步骤的复杂过程, 相关癌基因的激活以及抑癌基因失活的致癌模式逐渐被人们所认识。DNA 甲基化等表观遗传学改变是多种抑癌基因在肿瘤中失活的重要机制。小脑锌指蛋白 (zinc finger protein in cerebellum, ZIC) 转录因子家族成员 *ZIC1* 是胚胎发育, 尤其是神经发育中重要的转录因子^[4-6]。近来发现 *ZIC1* 在髓母细胞瘤、脑膜瘤、脂肪肉瘤中表达增高扮演癌基因角色^[7-9], 但同时其作为抑癌基因在胃癌、结直肠癌等肿瘤中发挥抑癌功能, 并通过启动子区异常甲基化表达沉默^[10-11]。因此, 本课题通过检测肝癌组织中 *ZIC1* 启动子区甲基化状态, 并对临床病理特征进行分析, 旨在探讨 *ZIC1* 启动子区甲基化状态与肝癌发生发展的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

采集 2008 年 8 月至 2014 年 8 月武警陕西总队医院 63 例肝癌患者手术切除的标本, 术后病理诊断为肝细胞癌。其中男 42 例, 女 21 例, 年龄 22 ~ 65 岁, 平均年龄 (42.3 ± 12.1) 岁, 所有患者术前均未行任何治疗。每例组织标本分别由本院两位高年资医师独立诊断, 依照 UICC 2002 年 TNM 分期标准及 Edmondeon 病理分级标准进行组织学分级。每例均

取癌及对应癌旁肝组织 (距肿瘤边缘至少 2 cm), 部分标本快速入液氮速冻, 之后移至 -80 °C 冰箱冻存, 用于 DNA 的提取及甲基化特异性 PCR (methylation specific polymerase chain reaction, MSP) 检测。患者术前签订知情同意书, 研究方案经医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂

TaqDNA 聚合酶购自 Invitrogen, SYBR Green Master Mix Kit、TRIzol 购自 TaKaRa, Real-time PCR 引物、MSP 引物及 18S 引物均购自上海生工生物技术有限公司。

1.3 Real-time PCR 法检测组织中 *ZIC1* mRNA 水平

按照试剂说明书用 TRIzol 试剂提取肝癌组织及相应癌旁组织 RNA, 并逆转录为 cDNA, 按照 SYBR Green Master Mix Kit 说明书操作 PCR, 并以 18S 作为内参。反应体系 20 μl, 反应条件: 95 °C 变性 2 min, 然后变性 95 °C 30 s, 退火 59 °C 30 s, 延伸 72 °C 30 s, 共 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。59 °C 到 95 °C 温度递增测定溶解曲线。PCR 反应引物设计: *ZIC1* 正义: 5'-GCGCTCCGAGAATTTAAAGA-3', 反义: 5'-CAAAGATAGGGCTTGTCGCT-3'; 18S 正义: 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3', 反义: 5'-

[作者简介] 笄晨星 (1982 -), 女, 江苏省句容市人, 博士生, 主要从事消化系统肿瘤临床研究, E-mail: dachenxing@126.com

[通信作者] 顾勇 (GU Yong, corresponding author), E-mail: 13259800503@126.com

CTTTTCG-CTCTGGTCCGTCTT-3'。

1.4 MSP 法检测组织中 *ZIC1* 基因启动子区甲基化状态

提取肝癌组织及癌旁组织的 DNA,取 4 μg DNA 进行亚硫酸氢盐处理,取处理后的 DNA 2 μl 作为模板,使用 TaqGold DNA 聚合酶进行甲基化特异性 PCR 扩增,反应体系 20 μl。反应条件:95 °C 变性 5 min,后变性 95 °C 45 s,退火 63 °C 45 s,63 °C 起始,每个循环降 1 °C,延伸 72 °C 45 s,共 6 个循环,退火 57 °C 45 s,延伸 72 °C 45 s,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。MSP 引物设计:*ZIC1*-M:正义 5'-TTTCGGGTAGTTTTGACGC-3',反义:5'-ATAACGCAAACCTCCAACGC-3';*ZIC1*-U:正义:5'-TTTTGGGTAGTTTTGATGT-3',反义:5'-CAAATAACACAAACTCCAAC-3'。

1.5 Real-time PCR 检测 5-Aza-dC 处理对肝细胞癌细胞系中 *ZIC1* mRNA 表达的影响

常规培养肝细胞癌细胞系 HepG2、SWCC7721 至对数生长期,接种于 6 孔板,每种细胞 2 孔,分别标记为对照组、5-Aza 处理组。细胞汇合 40% 时加 5-Aza 5 μmol/L,空白对照组加等体积的 PBS 缓冲液,连续加药 5 d,每日更换培养基,观察细胞状态,至 5 d 时提取 RNA,Real-time PCR 检测 *ZIC1* mRNA 的表达。

1.6 统计学处理

使用 GraphPad Prism 5.0 数据分析软件进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用 Student's *t* 检验,*ZIC1* 基因启动子区甲基化与临床病理资料关联性应用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌组织中 *ZIC1* mRNA 低表达

以 18 S 作为内参照,Real-time PCR 结果(图 1)显示:肝细胞癌组织中 *ZIC1* mRNA 的表达明显低于癌旁正常组织($P < 0.05$)。

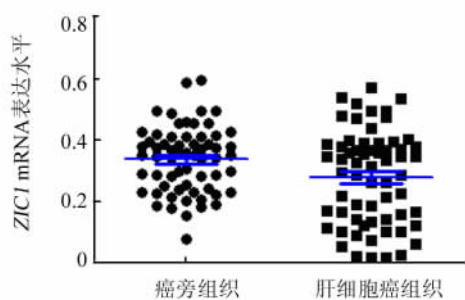


图 1 肝癌组织及癌旁组织中 *ZIC1* mRNA 的表达

2.2 肝癌组织中 *ZIC1* 基因启动子高甲基化

MSP 检测结果(图 2)显示,肝细胞癌组织中 *ZIC1* 甲基化阳性率高于癌旁组织(53.9% vs 19.4%, $P < 0.01$)。

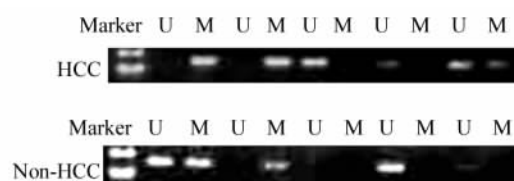


图 2 肝癌组织中 *ZIC1* 基因启动子高甲基化
M:甲基化引物;U:非甲基化引物

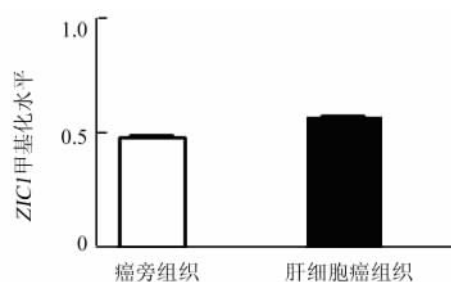


图 3 肝癌组织及癌旁组织中 *ZIC1* 甲基化的表达

2.3 5-Aza-dC 处理肝细胞癌细胞后 *ZIC1* 表达恢复

5-Aza-dC 在肝细胞癌细胞系 HepG2、SWCC7721 可引起不同程度的 *ZIC1* 表达恢复(图 4)。

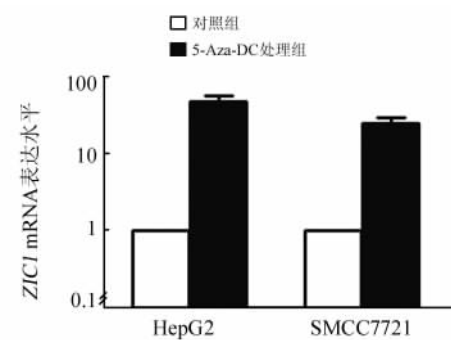


图 4 5-Aza-dC 处理肝癌细胞后 *ZIC1* 表达恢复

2.4 *ZIC1* 启动子区甲基化与临床病理特征的关系

肝细胞癌组织中 *ZIC1* 基因启动子甲基化与临床病理特征进行相关性分析结果(表 1)显示,*ZIC1* 启动子区甲基化与肿瘤分化程度($P = 0.02$)及分级($P = 0.021$)相关($P < 0.05$)。

3 讨论

Aruga 等于 1994 年在筛选鼠小脑 cDNA 文库时

发现 *ZIC1* 基因, 其位于 3q24, 是重要的转录因子, 近年来其在肿瘤中的潜在作用亦被初步探索。*ZIC1* 在髓母细胞瘤、脑膜瘤、硬纤维瘤、脂肪肉瘤及子宫内膜癌等肿瘤呈高表达, 功能研究发现其促进脂肪肉瘤细胞增殖及侵袭。启动子甲基化在胃癌及结直肠癌中表达下调, 过表达 *ZIC1* 可诱导肿瘤细胞发生周期阻滞及凋亡, 并可抑制肿瘤细胞的增殖及侵袭行为。

表 1 *ZIC1* 甲基化与 HCC 患者病理特征相关性分析 (n)

临床病理资料	N	<i>ZIC1</i>		χ^2	P
		未甲基化	甲基化		
性别					
男性	42	20	22	0.128	0.721
女性	21	9	12		
年龄(t/a)					
<45	35	15	20	0.716	0.397
≥45	28	15	13		
HBsAg					
阳性	45	20	25	0.162	0.687
阴性	18	7	11		
肿瘤大小(d/cm)					
<5	33	18	15	2.022	0.155
≥5	30	11	19		
组织分化					
高分化/中分化	25	16	9	5.387	0.02
低分化/未分化	38	13	25		
TNM 分期					
I、II期	23	15	8	5.367	0.021
III、IV期	40	14	26		

实验证明, 肝癌 *ZIC1* 基因启动子 CpG 岛频发甲基化^[12]。本研究采用 Real-time PCR 法检测发现 *ZIC1* 在肝细胞癌组织的 mRNA 表达水平较癌旁组织显著下调, 提示 *ZIC1* 在肝细胞癌中可能发挥抑癌基因的作用, 并推测其低表达可能与启动子区甲基化有关。据此, 应用 MSP 法对 *ZIC1* 启动子区甲基化情况进行检测, 结果发现肝癌组织中 *ZIC1* 的启动子区频发甲基化, 同样, 通过分析 TCGA 数据库可以得到类似的结果, 且肝细胞癌组织中 *ZIC1* 甲基化水平显著高于癌旁组织, 提示启动子区甲基化可能为 *ZIC1* 在肝细胞癌表达沉默的重要机制。同时, DNMT 抑制剂 5-Aza-dC 处理后的肝癌细胞系的 *ZIC1* 表达不同程度恢复, 证实了上述推测。此外, 本研究还发现 *ZIC1* 启动子区甲基化与肿瘤分化程

度及分级显著相关, 提示 *ZIC1* 启动子区甲基化可作为肝细胞癌诊断及判断预后的潜在预测指标。

[参考文献]

[1] VENOOK A P, PAPANDREOU C, FURUSE J, et al. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective [J]. *Oncologist*, 2010, 15(Suppl 4): 5-13. DOI: 10.1634/theoncologist.2010-S4-05.

[2] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90. DOI: 10.3322/caac.20107.

[3] SCHNEIDER B G, MERA R, Piazuolo M B, et al. DNA Methylation predicts progression of human gastric lesions [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2015, 24(10): 1607-13. DOI: 10.1158/1055-9965.

[4] MERZDORF C S. Emerging roles for zic genes in early development [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236(4): 922-940.

[5] FRANK C L, LIU F, WIJAYATUNGE R, et al. Regulation of chromatin accessibility and Zic binding at enhancers in the developing cerebellum [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(5): 647-656. DOI:10.1038/nn.3995.

[6] BLANK M C, GRINBERG I, ARYEE E, et al. Multiple developmental programs are altered by loss of Zic1 and Zic4 to cause Dandy-Walker malformation cerebellar pathogenesis [J]. *Development*, 2011, 138(6): 1207-1216. DOI:10.1242/dev.054114.

[7] YOKOTA N, ARUGA J, TAKAI S, et al. Predominant expression of human zic in cerebellar granule cell lineage and medulloblastoma [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(2): 377-383.

[8] ARUGA J, NOZAKI Y, HATAYAMA M, et al. Expression of ZIC family genes in meningiomas and other brain tumors [J/OL]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 79 [2015-11-20]. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-79>. DOI: 10.1186/1471-2407-10-79.

[9] BRILL E, GOBBLE R, ANGELES C, et al. ZIC1 overexpression is oncogenic in liposarcoma [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(17): 6891-6901. DOI: 10.1158/0008-5472.

[10] CHEN X, LIN Z, XUE M, et al. Zic1 promoter hypermethylation in plasma DNA is a potential biomarker for gastric cancer and intra-epithelial neoplasia [J/OL]. *PLoS ONE*, 2015, 10(7): e0133906 [2015-11-20]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0133906>. DOI: 10.1371/journal.pone.0133906.

[11] GAN L, CHEN S, ZHONG J, et al. ZIC1 is downregulated through promoter hypermethylation, and functions as a tumor suppressor gene in colorectal cancer [J/OL]. *PLoS ONE*, 2011, 6(2): e16916 [2015-11-20]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0016916>. DOI:10.1371/journal.pone.0016916.

[12] SHIN S H, KIM B H, JANG J J, et al. Identification of novel methylation markers in hepatocellular carcinoma using a methylation array [J]. *J Korean Med Sci*, 2010, 25(8): 1152-1159. DOI:10.3346/jkms.2010.25.8.1152.

[收稿日期] 2015-11-24 [修回日期] 2016-03-29
[本文编辑] 党瑞山