

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.07.003

· 专题报道(临床研究) ·

DACT1 基因不同区域异常甲基化对食管鳞癌患者预后的影响

郭艳丽, 周珍, 邝钢, 郭炜, 董稚明, 沈素朋, 梁佳, 郭鑫(河北医科大学第四医院河北省肿瘤研究所病理研究室, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 检测食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)组织标本及细胞株中 β -环连蛋白抑制基因1(dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 1, *DACT1*) CpG 岛旁区域及转录起始点(transcription start site, TSS)区域的甲基化状态, 并进一步探讨 *DACT1* 基因两个不同区域甲基化状态对基因转录及预后的影响。**方法:** 应用甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP)及 RT-PCR 的方法检测 ESCC 细胞株(TE1、TE13、T.Tn 和 Eca109)及河北省上消化道肿瘤高发区 159 例 ESCC 患者癌及相应癌旁组织中 *DACT1* 基因两个不同区域的甲基化状态及 mRNA 的表达情况。**结果:** *DACT1* 基因在 4 株 ESCC 细胞系中均呈弱表达或阴性表达。应用甲基化抑制剂 5-Aza-Dc 处理该细胞株后, *DACT1* mRNA 表达明显增强; 同时, MSP 检测结果显示, 此两区域的甲基化条带均明显减弱或消失; 而应用组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 处理细胞株后, 该基因在各细胞株中的表达无明显改变。*DACT1* mRNA 在 ESCC 组织中的表达较癌旁组织明显下调($P < 0.01$), 且与该基因 TSS 区域异常甲基化状态有关($P < 0.01$); *DACT1* 基因 CpG 岛旁区域的甲基化频率在癌及相应癌旁组织中均较高($P > 0.05$), 不具有肿瘤组织特异性, 且对 *DACT1* 基因的转录抑制无明显影响($P > 0.05$); 生存分析显示, *DACT1* 基因 TSS 区域的甲基化状态与 ESCC 癌患者的生存期相关($P < 0.01$)。**结论:** ESCC 中 *DACT1* 基因 TSS 区域的异常高甲基化状态是引起其表达下调的机制之一, 并有望作为 ESCC 患者预后的甲基化标志物。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; β -环连蛋白抑制基因 1; 甲基化

[中图分类号] R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)07-0708-08

Effect of aberrant methylation of *DACT1* gene different regions on prognosis of the patients with esophageal squamous cell cancer

GUO Yanli, ZHOU Zhen, KUANG Gang, GUO Wei, DONG Zhiming, SHEN Supeng, LIANG Jia, GUO Xin (Pathology Laboratory of Hebei Cancer Institute, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] Objective: To investigate the methylation status of dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 1 (*DACT1*) gene in CpG islands shore and transcription start site(TSS) regions in esophageal squamous cell cancer (ESCC) cell lines and ESCC samples, and to explore the possible effect on gene transcription and the prognosis of ESCC patients. **Methods:** MSP and RT-PCR methods were applied respectively to examine the methylation of *DACT1* gene in two regions and its mRNA expression in ESCC cell lines (TE1, TE13, T.Tn, Eca109) and ESCC samples which from the high risk area of upper digestive tract cancer in Hebei Province. **Results:** The negative or weak expression of *DACT1* mRNA was detected in four ESCC cell lines. After treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC, a demethylation agent), the expression level of *DACT1* mRNA was obviously increased. Meanwhile, The result of MSP showed that the methylation bands were obviously weakened or disappeared. The level of *DACT1* mRNA expression had no obviously change after treated with trichostatin A (TSA). Decreased mRNA expression of

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81472335, No. 81572441), 河北省自然科学基金资助项目(No.H2013206315)。Project supported by the National Nature Science Foundation of China (No.81472335, No. 81572441), and the Nature Science Foundation of Hebei Province (No. H2013206315)

[作者简介] 郭艳丽(1980-), 女, 博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤病理学研究, E-mail: yanli800224@163.com

[通信作者] 郭炜(GUO Wei, corresponding author), 博士, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肿瘤病因学研究, E-mail: guowei7303@163.com

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170707.1519.006.html>

DACT1 was observed in ESCC tumor tissues comparing with non-cancerous tissues($P<0.01$), and associated with the methylation status of TSS region($P<0.01$). The hypermethylation of *DACT1* in CpG islands shore region was observed both in tumor and corresponding adjacent tissues but wasn't related to the transcriptional inhibition of *DACT1*. The result of survival analysis showed that the methylation status of *DACT1* in TSS region was associated with ESCC patients' prognosis($P<0.01$). **Conclusion:** The highpermethylation of *DACT1* in TSS region was one of the mechanisms causing genes silencing in ESCC and may serve as prognostic methylation biomarkers for ESCC patients.

[Key words] esophageal squamous cell cancer (ESCC); dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 1(*DACT1*); methylation

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(7): 708-715. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.07.003]

β -环连蛋白抑制基因 1 (dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 1, *DACT1*)最早是在以爪蟾为模型研究神经管分化时,用酵母双杂交筛选发现的与 Wnt 通路相关因子 Dish 相互作用并且对其产生抑制作用的一种蛋白^[1-2]。研究^[1]指出,*DACT1* 在多种肿瘤中表达异常,但其在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)中的表达情况及其调控机制仍未见报道。Wen 等^[3]报道,中国北部太行山地区(包括河北省磁县、涉县、武安等地)的上消化道肿瘤发生率超过 1/1 000,远高于全国平均水平,为上消化道肿瘤高发区。本研究通过对 ESCC 细胞株及上述地区 ESCC 患者组织标本中 *DACT1* 基因两个不同区域甲基化状态的检测,探讨 ESCC 影响该基因转录及患者预后的关键性 CpG 位点区域,以期为 ESCC 患者的治疗提供精确分子靶点,并为患者预后的评估提供可靠的参考指标。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取河北医科大学第四医院 2005 年至 2009 年收治的河北省上消化道肿瘤高发区食管癌患者 159 例,其中男性 93 例、女性 66 例,平均年龄 57.9 岁(36~79 岁)。全部患者术前均未经化疗和放疗。每例患者取手术切除癌组织原发灶及距癌组织 2~5 cm 处的癌旁组织,标本一部分保存在-80℃低温冰箱用于提取 DNA 及 RNA,另一部分石蜡包埋,常规 H-E 染色,经病理医师确诊癌组织为 ESCC,癌旁组织为正常或增生的黏膜组织。根据美国癌症联合会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)及国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)标准,食管癌患者临床分期 I、II 期 86 例,III、IV 期 73 例;根据 WHO 标准,肿瘤病理分级高分化 50 例,中等分化 48 例,低分化 61 例;此外,淋巴结转移阳性 121 例,

转移阴性 38 例;家族中有 1 名以上一级亲属和/或 2 名以上二级亲属患食管癌/贲门癌/胃癌者定义为上消化道肿瘤(upper gastrointestinal cancers, UGIC)家族史阳性,UGIC 阳性患者 61 例,UGIC 阴性患者 98 例。159 例 ESCC 患者全部进行了随访,共有 14 人失访。本研究方案经医院伦理委员会审查通过,所有入选患者签署知情同意书。

1.2 细胞株和主要试剂

ESCC 细胞株 TE1、TE13、T.Tn 及 Eca109 取自河北医科大学第四医院肿瘤研究所细胞库。实验用 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-Dc)、曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)购自美国 Sigma 公司;亚硫酸氢盐转化试剂盒(Epiect Fast Bisulfite Conversion Kits)购自德国 Qiagen 公司;甲基转移酶(M.SssI)购自北京美科美生物技术开发有限公司;TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒(Reverse Transcription System A3500)购自 Promega 北京生物技术有限公司;引物由北京赛百胜基因技术有限公司合成;兔抗人多克隆抗体 *DACT1*(ab72078)购自英国 Abcam 公司;即用型免疫组织化学 SP 试剂盒(SP-9000)购自北京中杉金桥公司。

1.3 细胞培养及处理

常规培养 ESCC 的 TE1、TE13、T.Tn 及 Eca109 株细胞,待细胞处于指数分裂期时,分别用 5 $\mu\text{mol/L}$ 的甲基化抑制剂 5-Aza-Dc 处理 72 h 或 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 处理 24 h,每 24 h 更换培养液,处理完毕后更换完全培养基继续培养,24 h 后收集细胞,提取 DNA 及 RNA,进行后续检测。以上药物剂量及处理时间依据文献^[4-6]。话未经药物处理的细胞作为对照组。

1.4 甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 检测 *DACT1* 基因的甲基化状态

设计两对 MSP 引物检测 *DACT1* 基因 5' 端 CpG

岛旁区域,即位于 CpG 岛边缘 CpG 位点密度相对较低的区域(region1:-540~-419 bp)和环绕转录起始点 TSS 区域(region2:-16~105 bp)(图 1)甲基化。MSP 引物序列及 PCR 条件见表 1。MSP 法检测 ESCC 及癌旁组织和食管癌细胞株的 *DACT1* 基因甲基化状

态。Sss I 处理基因组 DNA 作为甲基化阳性对照(M-PC)组,无消化系统及其他系统肿瘤的正常人外周血 DNA 作为非甲基化阳性对照(N-PC)组,灭菌双蒸水取代 DNA 模板进行 PCR 作为阴性对照(NC)组。随机选取 10%标本进行重复实验。

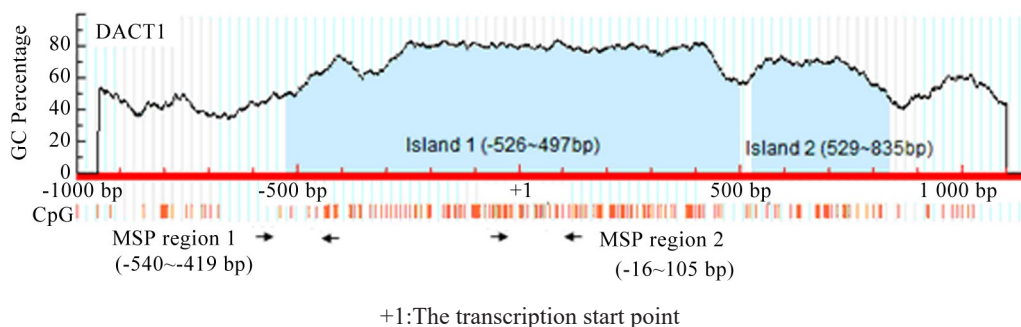


图 1 *DACT1* 基因启动子区 CpG 岛分布图

Fig. 1 Distribution of the CpG islands in promoter of *DACT1* gene

1.5 RT-PCR 方法检测 *DACT1* mRNA 表达

按 TRIzol 试剂盒说明书提取组织及细胞株总 RNA,参照逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA,用于检测 *DACT1* mRNA 的表达。GAPDH 作为内参照,所用引物及退火温度见表 1。PCR 产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳,利用图像分析系统 Gel work-2ID 对 mRNA 进行定量。

1.6 免疫组织化学(immuno histochemistry, IHC)方法检测 *DACT1* 蛋白表达

应用常规 SP 法。石蜡切片常规脱蜡,梯度乙醇水化。3%甲醇过氧化氢封闭后用 EDTA 高压修复 2~5 min,血清封闭,DACT1 抗体孵育过夜,再依次加入

生物素化二抗及辣根过氧化物酶标记的三抗,DAB 显色,苏木精复染。以 PBS 代替一抗做空白对照。以胞浆内出现均匀一致的棕黄色颗粒视为阳性表达,并依据传统的染色评分方法^[7]对结果进行判定。

1.7 统计学处理

数据统计分析采用 SPSS 19.0 统计学软件。各组间甲基化频率差异分析用 χ^2 检验;mRNA 表达数据用表示,差异比较用 *t* 检验;用 Log-rank 检验分析 *DACT1* 基因 CpG 岛旁区域和 TSS 区域甲基化状态对 ESCC 患者生存期的影响。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

表 1 PCR 引物序列、退火温度及产物大小

Tab. 1 Primer sequences, annealing temperature and product size of PCR

Type	Primer sequence	Annealing temperature (<i>t</i> /°C)	Product size(bp)
<i>DACT1</i>			
Region1-methylation	F: 5'-CGGTGTGAGTGGAATGAGGAGTGGTC-3' R: 5'-ACAAAAACCGCGACGAAACGCG-3'	56	121
Region1-unmethylation	F: 5'-TGGTGTGAGTGGAATGAGGAGTGGTT-3' R: 5'-ACAAAAACCACAACAAAAACACA-3'	56	121
Region2-methylation	F: 5'-CGGGATAGTAGTAGTCGGC-3' R:5'-AAACGCTAAAACACTACGACCGCG-3'	59	121
Region2-unmethylation	F: 5'-TGGGATAGTAGTAGTTGGT-3' R: 5'-AAACACTAAAACACTACAACCACA-3'	58	121
RT-PCR	F: 5'-CACAAGCGAACTGACTACCG-3' R: 5'-GTAATTGCTCTGCTCGTCCT-3'	55	237
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' R: 5'-AGGGTCATTGATGGCAACA-3'	56.7	104

2 结果

2.1 5-Aza-Dc 显著上调 ESCC 细胞 *DACT1* mRNA 表达

RT-PCR 检测食管癌 TE1、TE13、T.Tn 和 Eca109 细胞株 *DACT1* 基因 mRNA 表达结果(图 2A),发现甲基化抑制剂 5-Aza-Dc 未处理组 TE13, T.Tn 株细胞 *DACT1* mRNA 表达阴性, TE1, Eca109 株细胞 *DACT1* mRNA 表达呈弱阳性。分别用 5-Aza-Dc 及 TSA 处理细胞株, 5-Aza-Dc 处理组 4 株 ESCC 细胞 *DACT1* mRNA 表达均较未处理组明显上调; 而 TSA 处理组 4 株 ESCC 细胞 *DACT1* mRNA 表达与未处理组相比, 无明显变化。

2.2 5-Aza-Dc 减弱 ESCC 细胞 *DACT1* 基因甲基化

MSP 法检测 ESCC TE1、TE13、T.Tn 及 Eca109 细胞株 *DACT1* 基因 CpG 岛旁区域(region1)和 TSS 区域(region2)甲基化结果(图 2B)显示, 5-Aza-Dc 处理前, 4 株 ESCC 细胞在两个不同区域均可扩增出甲基化条带, 处理后, 甲基化条带减弱或消失, 非甲基化条带出现或增强。

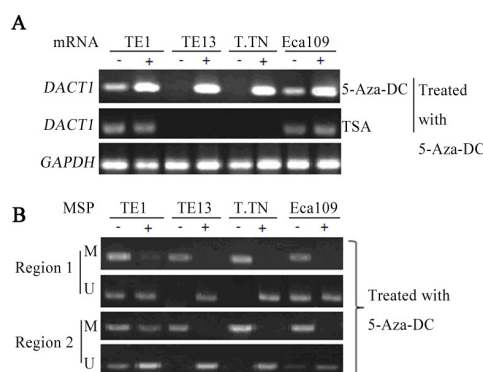


图 2 5-Aza-Dc/TSA 处理前后 ESCC 细胞株 *DACT1* mRNA 表达及甲基化状态

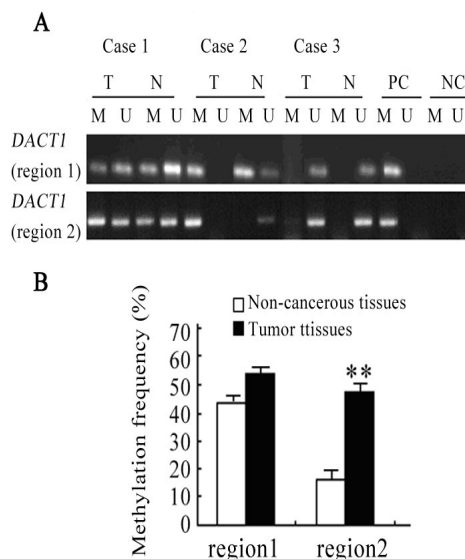
Fig. 2 The mRNA expression and the methylation status of *DACT1* gene in the ESCC cell lines before and after treatment with 5-Aza-Dc/TSA

2.3 ESCC 组织 *DACT1* 基因 TSS 区域甲基化状态与 ESCC 患者上消化道肿瘤家族史显著相关

159 例 ESCC 患者的癌及癌旁组织 MSP 检测结果显示, 癌组织中 *DACT1* 基因 CpG 岛旁区域(re-

gion1)及 TSS 区域(region2)甲基化率分别为 54.1% (86/159)和 47.8% (76/159), 而相应癌旁组织这两个区域的甲基化率分别为 43.4% (69/159)和 16.4% (26/159), 癌组织中两个区域的甲基化率均高于癌旁非肿瘤组织, 但仅有 TSS 区域的差异具有统计学意义 ($\chi^2_{\text{region2}}=32.467, P<0.01$; 图 3)。

2 个区域 *DACT1* 基因甲基化状态与 ESCC 患者上消化道肿瘤家族史及各临床病理参数分析结果(表 2)显示, *DACT1* 基因 TSS 区域甲基化率仅与患者上消化道肿瘤家族史显著有关 ($P<0.05$), 而与肿瘤患者的年龄、性别、病理分级、淋巴结转移及临床分期均无显著关系; *DACT1* 基因 CpG 岛旁区域甲基化状态与 ESCC 患者临床病理参数均无显著关系。



** $P<0.01$ vs non-cancerous tissues

M: Methylated gene; U: Unmethylated gene; PC: Positive control; NC: Negative control; T: Tumor tissue N: non-cancerous tissue

A: MSP results of the *DACT1* gene in the 3 matched tissues pairs

B: The methylation rate of *DACT1* in region 1 and region 2 of the ESCC tissues and corresponding non-cancerous tissues

图 3 ESCC 组织标本中 *DACT1* 基因甲基化状态

Fig.3 The methylation status of *DACT1* gene in ESCC and corresponding adjacent non-cancerous tissues

2.4 ESCC 组织 *DACT1* 基因 TSS 区域甲基化状态与 *DACT1* mRNA 及其蛋白质表达有关

RT-PCR 检测结果(图 4A、4B)显示, ESCC 患者癌组织 *DACT1* mRNA 表达水平显著低于癌旁组织 ($t=16.548, P<0.01$); CpG 岛旁区域(region1)和 TSS 区

域(region2)发生 *DACT1* 基因甲基化 ESCC 组织的 *DACT1* mRNA 表达量均低于非甲基化 ESCC 组织 [region1:(0.541±0.154)倍 vs (0.659±0.160)倍; region2:(0.488±0.116)倍 vs (0.750±0.114)倍],但是仅 TSS 区域(region2)的差异有统计学意义($t=-5.688, P<0.01$) (图 4C), 说明该基因 TSS 区域的甲基化状态与其 mRNA 的表达水平有关。

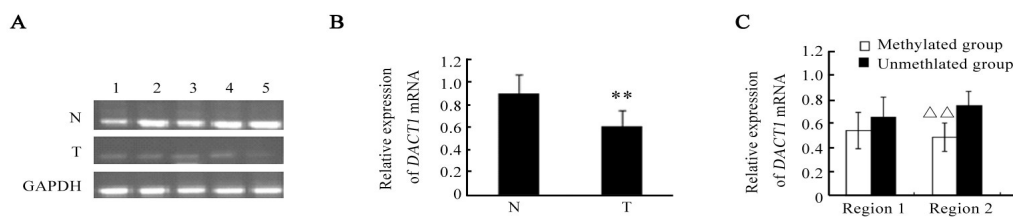
ESCC 组织中 94 例 *DACT1* 蛋白表达呈阳性, 阳性率为 59.1%。在 86 例发生 CpG 岛旁区域(region1)甲基化的食管癌组织中有 53.5% 呈现蛋白表达阳性; 而在 76 例发生 TSS 区域(region2)甲基化的 ESCC 组织中有 30.3% 呈现蛋白表达阳性; 显示 TSS 区域的甲基化状态与 *DACT1* 蛋白表达显著有关($P<0.01$, 表 3)。

表 2 ESCC 组织中 *DACT1* 基因两个不同区域甲基化状态与各临床病理参数及上消化道肿瘤家族史的关系[n(%)]

Tab. 2 The relationship between the methylation status of *DACT1* gene in the two regions of ESCC tissues and the clinicopathologic features as well as UGIC of the patients with ESCC[n(%)]

Group	N	Region 1		Region 2	
		M	P	M	P
Age (t/a)					
<60	74	39(52.7)	0.744	32(43.2)	0.283
≥60	85	47(55.3)		44(51.8)	
Gender					
Male	93	48(51.6)	0.457	40(43.0)	0.151
Female	66	38(57.6)		36(54.5)	
Histological grade					
Well	50	21(42.0)	0.536	16(32.0)	0.676
Moderate	48	28(58.3)		25(52.1)	
Poor	61	37(60.7)		35(57.4)	
Clinical stage					
I + II	86	46(53.5)	0.869	35(40.7)	0.052
III+IV	73	40(54.8)		41(56.2)	
Lymph node					
Positive	121	70(57.9)	0.089	63(52.1)	0.055
Negative	38	16(42.1)		13(34.2)	
Family history of UGIC					
Positive	61	38(62.3)	0.101	36(59.0)	0.025*
Negative	98	48(49.0)		40(40.8)	

M: Methylation rate; * $P<0.05$



** $P<0.01$ vs non-cancerous tissue; $\triangle\triangle P<0.01$ vs Unmethylated group

A: Expressions of *DACT1* mRNA in the ESCC and its para-carcinoma tissues detected by RT-PCR;

B: Expression amounts of *DACT1* mRNA in the ESCC and its para-carcinoma tissues;

C: Expressions of *DACT1* mRNA in the methylated and unmethylated ESCC groups

T: Tumor tissue; N: non-cancerous tissue; GAPDH: Control

图 4 ESCC *DACT1* 基因 mRNA 的表达及其与该基因 2 个区域甲基化状态的关系

Fig.4 The expressions of *DACT1* mRNA in tissues of the patients with ESCC and it's relationship with the methylation status in the two regions of this gene

2.5 *DACT1* 基因 TSS 区域甲基化影响 ESCC 患者的生存期

CpG 岛旁区域(region1) *DACT1* 基因甲基化的

ESCC 患者 5 年存活率为 21.1% (中位生存时间为 34 个月), 非甲基化的 ESCC 患者 5 年存活率为 35.9% (中位生存时间为 37 个月), Log Rank 检验分析差异

无统计学意义($\chi^2=2.190$, $P>0.05$, 图 5A); TSS 区域(region2) *DACT1* 基因甲基化的 ESCC 患者 5 年存活率为 6.3%(中位生存时间为 20 个月), 非甲基化的食管癌患者 5 年存活率为 46.6%(中位生存时间为 50 个月), 差异有统计学意义($\chi^2=64.92$, $P<0.01$, 图 5B)。以上结果提示 *DACT1* 基因 TSS 区域的甲基化状态与 ESCC 患者的生存期显著相关。联合分析临床分期与 *DACT1* 基因两个区域的甲基化状态, 对患者预后的影响, 发现临床 III、IV 期合并 *DACT1* 基因甲基化肿瘤患者预后最差[Region1: $\chi^2=71.23$, $P<0.01$ (图 5F); Region 2: $\chi^2=97.51$, $P<0.01$ (图 5C)]; 将 I、II 期及 III、IV 期肿瘤患者分别进行分析, 发现无论是 I、II 期患者还是 III、IV 期患者, TSS 区域甲基化肿瘤患者生存期均明显低于未发生甲基化的患者[I + II 期患者: $\chi^2=7.00$, $P<0.01$ (图 5D); III + IV 期患者: $\chi^2=4.21$, $P>0.05$ (图 5E)]; 而 CpG 岛旁区域(region1)甲基化和非

甲基化肿瘤患者的生存期无显著差异[I + II 期患者: $\chi^2=3.35$, $P>0.05$ (图 5G); III + IV 期患者: $\chi^2=3.34$, $P>0.05$ (图 5H)]。为排除临床分期及病理分级等混杂因素对实验结果的影响, Cox 回归分析发现, *DACT1* 基因 TSS 区域的甲基化状态是 ESCC 患者独立的预后因素(表 4)。

表 3 ESCC 中 *DACT1* 基因两个区域甲基化状态与其蛋白表达的关系[%(n/N)]

Tab. 3 Association of the methylation status of *DACT1* gene with positive expression of their proteins in the two regions of *DACT1* gene of the patients with ESCC [% (n/N)]

Gene	Positive protein expression (%)		P
	M	U	
<i>DACT1</i> (region 1)	53.5(46/86)	65.8(48/73)	0.117
<i>DACT1</i> (region 2)	30.3(23/76)	85.5(71/83)	<0.01

M: Methylated group; U: Unmethylated group

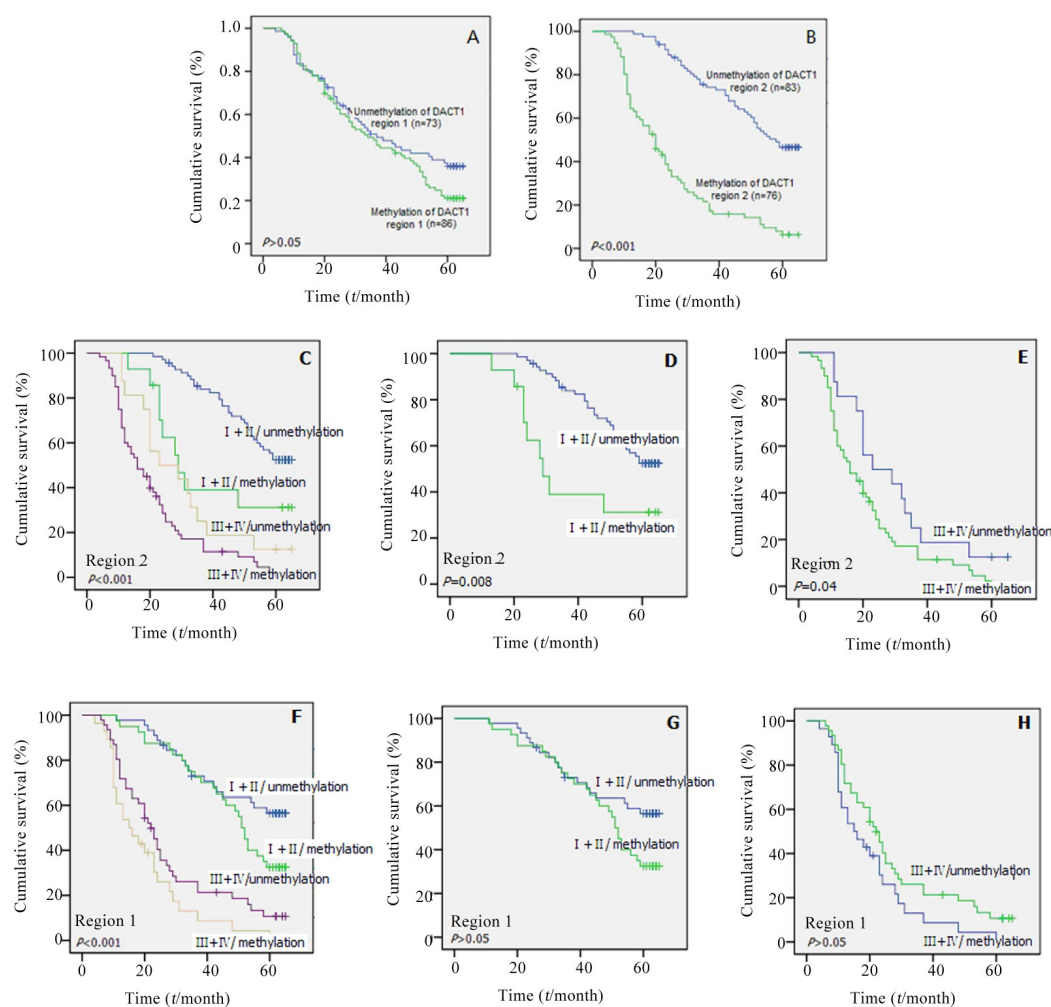


图 5 *DACT1* 基因 2 个区域甲基化状态对 ESCC 患者生存期的影响

Fig. 5 The effect of methylation status of the two regions in *DACT1* gene on the survival of ESCC patients

表4 ESCC患者生存期的多因素分析(Cox's分析)
Tab. 4 Multivariate analysis of survival in the patients with ESCC (Cox's test)

Variable	B	SE	P	Odds ratio (95%CI)
Region 1 methylation	-0.309	0.212	0.146	0.734(0.485-1.113)
Region 2 methylation	1.109	0.262	0.000	3.030(1.814-5.060)
TNM stage	0.855	0.253	0.001	2.351(1.433-3.858)
Histological grade	0.319	0.116	0.006	1.376(1.096-1.728)

3 讨论

DACT1 基因位于人类染色体 14q23.1 区域, 其编码的 Dapper1 蛋白可通过对 Wnt^[8,9], TGF- β ^[10] 及 NF- κ B^[11] 等多种信号转导通路的影响参与肿瘤的发生发展。根据先前的研究^[9,11-13]报道, 在胃癌、乳腺癌、肝细胞癌和膀胱癌等多种恶性肿瘤中均出现 *DACT1* 基因表达下调, 提示其抑癌基因的作用。本研究发现, ESCC 组织 *DACT1* mRNA 的表达明显低于癌旁非肿瘤组织, 与先前的研究报道一致。

抑癌基因启动子区的异常高甲基化引起的表达沉默是肿瘤发生的主要机制之一。肿瘤组织中, DNA 的异常甲基化主要发生在启动子区的 CpG 岛, CpG 岛区域的高甲基化水平可阻碍多种转录因子与启动子的结合, 进而降低或完全抑制基因的转录水平。经 Methprimer 软件预测发现该基因启动子及第一外显子区存在一较大 CpG 岛, 推测基因的高甲基化可能是引起 *DACT1* 基因表达下调的机制之一。研究表明 *DACT1* 基因的高甲基化现象在包括乳腺癌^[9]、肝细胞癌^[12]、胃癌^[11] 及急性淋巴细胞白血病^[14] 等多种肿瘤中均有发生, 但在口腔鳞状细胞癌却罕有发生^[15]。为验证 ESCC 中是否存在 *DACT1* 基因的甲基化失活现象, 本研究分别选取 4 株 ESCC 细胞系用甲基化抑制剂 5-Aza-Dc 处理, 5-Aza-Dc 可通过与 DNA 甲基化酶共价结合而降低其活性, 进而重新激活因高甲基化而抑制的基因表达。结果显示, 经 5-Aza-Dc 处理后, *DACT1* mRNA 在 4 株 ESCC 细胞系中的表达均明显升高; 同时 MSP 结果显示, 5-Aza-Dc 处理后该基因的甲基化条带减弱或消失, 而非甲基化条带则明显增强; 这些结果共同提示 *DACT1* 基因的高甲基化水平可能是引起其表达下调的机制之一。组蛋白乙酰化是表观遗传修饰的另一主要方面, 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 可通过抑制组蛋白的去乙酰化(去除乙酰基), 控制 DNA 缠绕于组蛋白的松紧度而调节基因的表达。本研究应用 TSA 处理细胞株后, 发现 *DACT1* mRNA 表达无明显改变, 初步判定组

蛋白的乙酰化对该基因的表达无明显影响。

有研究^[16-17]指出, 基因启动子区 CpG 岛中每一个 CpG 位点的甲基化频率并不均一, 而与基因转录密切相关的 CpG 位点被称为关键性 CpG 位点。关键性 CpG 位点可位于 CpG 岛内, 也可位于 CpG 岛外区域。DNA 甲基化可以通过直接与非 CpG 岛内的散在 CpG 位点作用而沉默基因表达。Rao 等^[18]对乳腺癌研究发现, 位于 *Cav-1* 基因 CpG 岛边缘区域的高甲基化状态是调节该基因表达的关键性 CpG 位点。Deng 等^[19]研究指出 *DACT1* 基因 5' 端 CpG 岛旁区域的 CpG 位点存在高甲基化现象, 并且该区域发生甲基化位点的个数直接与胃癌患者的预后相关。为明确 ESCC 中与基因转录及患者预后相关的关键性 CpG 位点区域, 本研究分别检测 *DACT1* 基因 5' 端 CpG 岛旁区域及环绕转录起始点的 TSS 区域内 CpG 位点的甲基化状态。结果显示, 肿瘤组织中 *DACT1* 基因 TSS 区域的甲基化状态明显高于癌旁非肿瘤组织, 并且其高甲基化状态与该基因 mRNA 及蛋白质表达的下调有关。*DACT1* 基因 CpG 岛旁区域的甲基化频率在癌及癌旁非肿瘤组织中均较高, 但差异无统计学意义。这些结果提示 *DACT1* 基因 TSS 区域的甲基化状态具有肿瘤特异性, 并且可能是与转录抑制相关的关键性 CpG 位点区域, 而 CpG 岛旁区域的 CpG 位点可能更易发生甲基化, 但其对基因转录的调控作用较小。Endoh 等^[20]研究 *RASSF2* 基因在胃癌中的甲基化状态时, 分别检测了该基因 6 个不同区域的甲基化状态, 同样发现 TSS 区域的甲基化状态最具肿瘤特异性, 与此次研究结果一致。

为了明确 *DACT1* 基因不同区域甲基化状态对 ESCC 患者生存期的影响, 本研究用 Kaplan-Meier 生存曲线绘制了 *DACT1* 基因 CpG 岛旁区域和 TSS 区域甲基化状态与 ESCC 患者累计生存率的关系, 并用 Log-rank 检验分析。结果显示, *DACT1* 基因 TSS 区域的甲基化状态与 ESCC 患者的生存期相关, 这可能与 TSS 区域是 *DACT1* 基因的关键性甲基化位点区域有关, 该区域 CpG 位点高甲基化状态可直接引起基

因表达沉默,进而影响患者的预后。而 CpG 岛旁区域的甲基化状态则与 ESCC 患者的生存期无关。这与先前的研究报道有所差异, Deng 等^[9]的研究指出 *DACT1* 基因该区域 CpG 位点发生甲基化的个数直接与胃癌患者的预后相关。结果的差异可能与肿瘤的特异性有关,或许也和统计方法的差异有关,因为 MSP 检测的 CpG 位点有限,无法具体计算发生甲基化的位点个数。

总之,目前的研究指出 *DACT1* 基因 TSS 区域的高甲基化状态具有肿瘤组织特异性,并且与该基因的转录抑制相关,是该基因的关键性 CpG 位点区域;该区域的甲基化状态与 ESCC 患者的生存期相关,可作为判断 ESCC 患者预后的甲基化标志物之一。

[参 考 文 献]

- [1] KIVIMÄE S, YANG X Y, CHEYETTE B N. All Dact (Dapper/Frodo) scaffoldproteins dimerize and exhibit conserved interactions with Vangl, Dvl, and serine/threonine kinases[J]. *BMC Biochem*, 2011,12:33. DOI:10.1186/1471-2091-12-33.
- [2] KATO H M, KATO H M. Identification and characterization of human DAPPER1 and DAPPER2 genes in silico[J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(4):907-913. PMID:12632086.
- [3] WEN D, ZHANG N, SHAN B, et al. Helicobacter pylori infection may be implicated in the topography and geographic variation of upper gastrointestinal cancers in the Taihang Mountain high-risk region in northern China[J]. *Helicobacter*. 2010, 15(5): 416- 421. DOI: 10.1111/j.1523-5378.2010.00790.x.
- [4] KONDO Y, SHEN L, ISSA J P. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(1): 206-215. DOI:10.1128/MCB.23.1.206-215.2003.
- [5] MENG C F, ZHU X J, PENG G, et al. Re-expression of methylation-induced tumor suppressor gene silencing is associated with the state of histone modification in gastric cancer cell lines[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13:6166-6171. DOI: 10.3748/wjg.v13.i46.6166.
- [6] GUO W, CUI L, WANG C, et al. Decreased expression of RASSF1A and upregulation of RASSF1C is associated with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2014, 31(5):521-533. DOI:10.1007/s10585-014-9646-5.
- [7] UMEMOTO M, YOKOYAMA Y, SATO S, et al. Carbonyl reductase as a significant predictor of survival and lymph node metastasis in epithelial ovarian cancer[J]. *Br J Cancer*, 2001, 85(7):1032- 1036. DOI:10.1038/sj.bjc.6692034.
- [8] HOU J, WEN Y H, FENG K N, et al. *DACT1* is involved in human placenta development by promoting Wnt signaling[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2015, 291(6): 1289- 1296. DOI: 10.1007/s00404- 014- 3557-1.
- [9] YIN X, XIANG T, LI L, et al. *DACT1*, an antagonist to Wnt/ β -catenin signaling, suppresses tumor cell growth and is frequently silenced in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(2): R23. DOI: 10.1186/bcr3399.
- [10] SCHUBERT F R, SOBREIRA D R, JANOUSEK R G, et al. Dact genes are chordate specific regulators at the intersection of Wnt and Tgf- β signaling pathways[J]. *BMC Evol Biol*, 2014, 14(6):157. DOI:10.1186/1471-2148-14-157.
- [11] WANG S, KANG W, GO M Y, et al. Dapper homolog 1 is a novel tumor suppressor in gastric cancer through inhibiting the nuclear factor- κ B signaling pathway[J]. *Mol Med*, 2012,18:1402-1411.DOI: 10.2119/molmed.2012.00243.
- [12] YAU T O, CHAN C Y, CHAN K L, et al. HDPR1, a novel inhibitor of the WNT/ β -catenin signaling, is frequently downregulated in hepatocellular carcinoma: involvement of methylation-mediated gene silencing[J]. *Oncogene*, 2005, 24(9):1607-1614. DOI:10.1038/sj.onc.1208340.
- [13] CHENG H, DENG Z, WANG Z, et al. The role of aberrant promoter hypermethylation of *DACT1* in bladder urothelial carcinoma[J]. *J Biomed Res*, 2012, 26(5): 319- 324. DOI:10.7555/JBR.26. 20110099.
- [14] ROMÁN- GÓMEZ J, CORDEU L, AGIRRE X, et al. Epigenetic regulation of Wnt-signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*. 2007, 109(8):3462- 3469. DOI:10.1182/blood- 2012- 08-450304
- [15] SCHUSSEL J L, KALINKE L P, SASSI L M, et al. Expression and epigenetic regulation of *DACT1* and *DACT2* in oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Biomark*, 2015, 15(1): 11-17. DOI: 10.3233/ CBM-140436.
- [16] DEATON A M, BIRD A. CpG islands and the regulation of transcription[J]. *Genes Dev*, 2011, 25(10): 1010- 1022. DOI:10.1101/gad.2037511.
- [17] HAN H, CORTEZ C C, YANG X, et al. DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(22): 4299-4310.DOI:10.1093/hmg/ddr356.
- [18] RAO X, EVANS J, CHAE H, et al. CpG island shore methylation regulates caveolin- 1 expression in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2013, 32(38): 4519-4528. DOI:10.1038/onc.2012.474.
- [19] DENG J, LIANG H, ZHANG R, et al. Methylated CpG site count of dapper homolog 1 (*DACT1*) promoter prediction the poor survival of gastric cancer[J/OL]. *Am J Cancer Res*, 2014, 4(5): 518-527[2017-05-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4163616/>. PMID:PMC4163616.
- [20] ENDOH M, TAMURA G, HONDA T, et al. RASSF2, a potential tumour suppressor, is silenced by CpG island hypermethylation in gastric cancer[J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(12): 1395- 1399. DOI:10. 1038/sj.bjc.6602854.

[收稿日期] 2017-03-05

[修回日期] 2017-06-10

[本文编辑] 宋美鸿