

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.06.002

· 研究快报 ·

SHP-1 在食管鳞状细胞癌组织中异常低表达的表现遗传学调节机制及其临床意义

刘磊, 张少为, 刘新波, 刘俊峰(河北医科大学 第四医院 胸外科, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 探讨食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织中蛋白酪氨酸磷酸酶 1 (protein tyrosin phosphatase 1, SHP-1) 基因异常低表达的表现遗传学调节机制及其临床意义。**方法:** 所用组织标本均来自河北医科大学第四医院 2008-2011 年行食管癌根治术并且病理诊断为 ESCC 患者的癌组织及相应癌旁组织(距癌灶边缘 2 cm 以上), 共 71 例。ESCC 细胞株(Eca109、Kyse170、Yes-2)培养完成后, 进行甲基化抑制剂 5-Aza-dC 或组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 处理, qPCR 和 Western blotting 实验检测 ESCC 组织和细胞系中 SHP-1 mRNA 和蛋白的表达变化, 亚硫酸氢盐基因组测序(bisulfite genome sequencing, BGS)法检测 ESCC 细胞系中 SHP-1 基因启动子区 CpG 位点的甲基化频率, 甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP)技术检测 ESCC 组织和细胞系中 SHP-1 启动子区的甲基化状态, 应用双荧光素酶报告基因实验检测 SHP-1 启动子区 CpG 岛甲基化对其转录活性影响。分析 ESCC 组织中 SHP-1 甲基化状态分别与临床病理特征和 SHP-1 mRNA 表达的关系, 对组织 SHP-1 甲基化水平与 ESCC 患者生存率进行 Kaplan-Meier 生存分析和 Log-Rank 检验。**结果:** 5-Aza-dC 处理后, SHP-1 mRNA 蛋白在 3 种细胞株中的表达显著上调(均 $P < 0.05$), 同时其启动子区的甲基化程度均明显降低(均 $P < 0.05$); 应用 TSA 处理细胞株后, SHP-1 在各细胞株中的表达情况及甲基化状态无明显改变($P > 0.05$); 甲基转移酶处理细胞荧光素报告载体活性显著低于未处理细胞荧光素报告载体活性($P < 0.05$), 表明 SHP-1 的甲基化可抑制自身的转录。ESCC 组织中启动子区的甲基化率明显高于癌旁组织($P < 0.05$), 并与 TNM 分期、病理分级及淋巴结转移密切相关($P < 0.05$); 与癌旁组织相比, ESCC 组织中 SHP-1 mRNA 相对表达量显著降低($P < 0.05$), 并与启动子区甲基化有关($P < 0.05$); Kaplan-Meier 分析显示, 启动子区高甲基化与 ESCC 患者的不良预后有关($P < 0.05$)。**结论:** ESCC 组织和细胞株中 SHP-1 基因启动子区高甲基化状态可抑制其自身的转录活性, 进而导致该基因表达沉默; SHP-1 的高甲基化与 ESCC 患者预后不良有关, SHP-1 的甲基化状态可能成为 ESCC 患者预后的评估指标。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; 蛋白酪氨酸磷酸酶 1 基因; 启动子; 甲基化; 预后评估

[中图分类号] R730.54; R735 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)06-0602-07

Epigenetic regulation mechanism of abnormally low expression of SHP-1 and its clinical significance in ESCC

LIU Lei, ZHANG Shaowei, LIU Xinbo, LIU Junfeng (Department of Thoracic Surgery, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** This study aimed at investigating the epigenetic regulation mechanism of abnormally low expression of SHP-1 gene in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods:** A total of 71 cases of ESCC tissues and corresponding para-cancer tissues (2 cm from the edge of the cancer) resected during surgery at the Department of thoracic surgery of Hebei Province, the Fourth Hospital of Hebei Medical University from 2008 to 2011 were collected for this study. The expression level of SHP-1 mRNA and protein was detected in esophageal cancer cell lines (Eca109, Kyse170, Yes-2) before and after 5-Aza-dC or TSA treatment by RT-qPCR and Western blotting methods respectively. The methylation status of CpG sites in promoter region of SHP-1 was analyzed by bisulfite genome sequencing (BGS) in three esophageal cancer cell lines before and after 5-Aza-dC treatment. The methylation status of SHP-1 was studied by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) method in esophageal cancer cell lines, ESCC tissues and para-cancer tissues. The association between the SHP-1 promoter methylation status and clinic pathological parameters were analyzed

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81572441); 河北省医学科学研究重点课题资助项目(No. 20180588, 20170700)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81572441), and the Key Research Projects of Medical Science in Hebei Province (No. 20180588, 20170700)

[作者简介] 刘磊(1978-), 男, 博士, 医师, 主要从事上消化道肿瘤病因学的研究。E-mail: abchbmu525@163.com

[通信作者] 刘俊峰(LIU junfeng, corresponding author), 教授, 主要从事上消化道肿瘤的研究。E-mail: abchbmu525@163.com

in ESCC patients. Dual-luciferase reporter assay systems method was applied to detect the impacts of methylation status of CpG island in SHP-1 promoter region on gene transcription activity. For prognostic analysis of SHP-1 methylation, survival curves were constructed using the Kaplan-Meier method and the log-rank. **Results:** After treated with 5-Aza-dC, the expression level of SHP-1 mRNA and protein was significantly up-regulated in Eca109, Kyse170 and Yes-2 cells, meanwhile the methylation status of SHP-1 was decreased ($P<0.05$). The expression level of SHP-1 had no obviously change after treated with trichostatin A(TSA). The methylation frequency of promoter in ESCC tumor tissues was significantly higher than that in corresponding para-cancer tissues ($P<0.05$). When stratified for clinic pathologic characteristics, methylation frequency of SHP-1 was associated with TNM stage, pathological differentiation, and LN metastasis ($P<0.05$). The mRNA expression level of SHP-1 in the ESCC tissues with SHP-1 methylation was significantly decreased compared to the ESCC tissues with unmethylation of SHP-1 ($P<0.05$). It was associated with methylation of promoter ($P<0.05$). The activity of fluorescein reporter vector in methylase treatment group was significantly lower than that in untreated group ($P<0.05$), indicating that SHP-1 expression can be silenced by methylation of SHP-1 promoter. The result of Kaplan-Meier shown that SHP-1 promoter methylation was correlated with ESCC patients' poor survival. **Conclusion:** The transcriptional activity of SHP-1 can be inhibited with hypermethylated SHP-1 promoter region. The hypermethylated SHP-1 promoter induced the silencing of SHP-1. Therefore, SHP-1 gene may serve as one of prognostic methylation biomarkers for ESCC patients.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); protein tyrosin phosphatase 1 (SHP-1); promoter; methylation; prognostic evaluation

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(6): 602-608. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.06.002]

表现遗传学是指 DNA 核苷酸序列不变, 通过碱基修饰的改变(如 DNA 甲基化和组蛋白修饰等), 导致蛋白质的质与量的变化。研究^[1-2]显示, 表现遗传学改变可能是一些基因功能失活而使肿瘤发生的更为主要的原因。蛋白酪氨酸磷酸酶 1 (protein tyrosine phosphatase 1, SHP-1) 基因位于人染色体 12p13 上, 常作为候选肿瘤抑制因子。研究^[3-5]发现, SHP-1 基因在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中表达下调。为明确表现遗传学的两大机制(甲基化及组蛋白乙酰化)是否对 SHP-1 基因的表达有影响, 本课题分别应用甲基化酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-decytidine, 5-Aza-dC) 及组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA) 处理 ESCC 细胞 Eca109、Kyse170 和 Yes-2, 观察细胞中 SHP-1 mRNA 和蛋白表达水平的改变; 进一步检测 5-Aza-dC 处理前后细胞中 SHP-1 基因启动子区 CG 位点甲基化频率的改变, 并在该区域设计甲基化引物进行扩增, 应用双荧光素酶报告基因实验进一步验证 SHP-1 表达与启动子区 DNA 甲基化的关系; 其后分析其作为预后评估的可行性, 为探索 ESCC 患者预后评估指标提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验用细胞株、主要试剂及组织标本

食管癌细胞株 Eca109、Kyse170、Yes-2 均由河北医科大学第四医院生物标本库保留并传代。TRIzol 试剂购自美国 SBS 公司, 5-Aza-dC 和 TSA 购自北京索莱宝科技有限公司, 逆转录 PCR 试剂盒购自瑞士 Roche 公司, RPMI 1640 购自美国 Gibico 公司, 胎牛血清购自美国 BI 公司, qPCR 试剂盒、双荧光素酶报告

基因试剂盒和 T4 连接酶购自美国 Promega 公司, 亚硫酸氢盐转化试剂盒购自德国 Qiagen 公司, 蓝色体系购自北京市康为试剂有限公司, 甲基转移酶 (M.SssI) 购自北京美科美生物公司, ACTB 鼠抗人单克隆抗体及 SHP-1 兔抗人单克隆抗体购自美国 Abcam 公司, Xho I 内切酶、Hind III 内切酶和转染试剂 Lipo2000 均购自美国 Thermo 公司, PGL3-Basic 和 pRL-TK(海肾)质粒购于上海捷瑞有限公司(并附送菌液), 无内毒素质粒大/小提取试剂盒购自北京市天根生化科技有限公司。所有 PCR 用引物均在上海捷瑞生物工程有限公司合成。

所用组织标本均来自河北医科大学第四医院 2008-2011 年行食管癌根治术且病理诊断为 ESCC 的组织及相应癌旁组织(距癌组织边缘 2 cm 以上), 共 71 例。其中男性 51 例, 女性 20 例; 年龄 39~78 岁, 中位年龄 62 岁。采集的每例组织标本一部分置于液氮保存, 用于 DNA 和 RNA 的提取。根据国际抗癌联盟 (Union for International Cancer Centre, UICC) 的标准进行 TNM 分期, I 期 4 例 (5.64%)、II 期 24 例 (33.80%)、III 期 38 例 (53.52%)、IV 期 5 例 (7.04%)。按照 WHO 肿瘤病理学分级标准 (2010 年版) 进行分级, 高分化 7 例 (9.86%)、中分化 30 例 (42.25%)、低分化 34 例 (47.89%)。全部患者术前均未进行化疗和放疗。所有研究对象对本研究均签署知情同意书, 研究方案经河北医科大学第四医院伦理委员会批准。

1.2 细胞培养

常规培养 Eca109、Kyse170、Yes-2 食管癌细胞株, 待细胞密度较低且处于对数生长期时, 分别用 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-Aza-dC 处理 72 h 或 0.3 $\mu\text{mol/L}$ TSA 处理 24 h, 期间每 24 h 更换一次培养液, 处理完毕后更换为完全培养基继续

培养, 24 h后收集细胞, 提取DNA及RNA进行后续检测。未经药物处理的细胞作为对照组。

1.3 qPCR检测ESCC细胞以及组织中SHP-1 mRNA的表达水平

按照TRIzol试剂说明书提取细胞系及组织中总RNA, 之后将以提取的总RNA为模板, 反转录成cDNA, 储存备用。按照qPCR试剂盒进行加样, 以GAPDH作为内参, 引物序列及反应条件见表1。反应条件为94 °C预变性30 s, 94 °C 10 s, 60 °C 30 s, 扩增40个循环, 检测溶解曲线, 每个样本设3个重复。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来计算SHP-1 mRNA的相对表达量。

1.4 Western blotting(WB)检测ESCC细胞及组织中SHP-1蛋白的表达水平

收集细胞, 按照蛋白提取试剂盒操作流程抽提细胞总蛋白。按照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度。取适量蛋白样品以10% SDS-PAGE分离蛋白样品。将分离后的蛋白转至PVDF膜上, 取出后放入3%BSA封闭液室温孵育1 h。加入稀释后的一抗(兔抗人SHP-1和鼠抗人ACTB单克隆抗体), 在摇床上室温孵育1 h并4 °C过夜后, 用TBST清洗3次, 每次5 min。加入按1:2 000比例稀释的二抗, 室温孵育1 h后, 用TBST清3洗, 在PVDF膜上滴入ECL发光剂, 迅速曝光, 凝胶成像显影, 以Gel Pro分析软件测定条带灰度值。

1.5 甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)法检测SHP-1基因启动子区的甲基化状态

采用常规酚/氯仿法抽提细胞系和组织中DNA, 用紫外分光光度法定量。每个样本中均取2 μ g DNA, 按照EpiTect Fast DNA纯化试剂盒说明书对样本进行转化及纯化, 在测序范围内设计引物, 引物扩增区域为-326至-167bp(引物序列见表1)。反应条件为95 °C预变性10 min后, 95 °C变性45 s, 60 °C退火45 s, 72 °C延伸1 min, 共35个循环。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳, 以分析系统进行图像分析。甲基化结果的判定方法为:(1)完全甲基化, 甲基化特异引物扩增出目的条带, 而非甲基化特异引物未扩增出目的条带;(2)非甲基化, 非甲基化特异引物扩增出目的条带, 而甲基化引物未扩增出目的条带;(3)不完全甲基化, 甲基化特异引物和非甲基化特异引物均扩增出目的条带, 统计时将不完全甲基化归入甲基化。阳性对照采用基因组DNA经甲基化酶SssI处理后进行PCR, 阴性对照用灭菌双蒸水取代DNA模板进行PCR。随机选取10%的标本进行重复实验。

1.6 亚硫酸氢盐基因组测序(bisulfite genome sequencing, BGS)法检测SHP-1基因甲基化频率

首先通过在线软件UCSC(genome.ucsc.edu)和

NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)查找SHP-1基因的碱基序列及启动子区, Methprimer软件(<http://www.urogene.org/methprimer/>)预测SHP-1基因的启动子区的CpG岛分布情况。结果显示, 在SHP-1启动子区有一CG富集区域形成CpG岛。在-361到-139bp区域不含有CG位点的部分设计通用引物(引物序列见表1), 对该区域内11个CpG位点的甲基化状态进行测序。

选取5-Aza-dC处理前后的Eca109、Kyse170和Yes-2三株食管癌细胞, PCR产物进行切胶回收后, 与pGEM-T载体进行连接并在人感受态菌株中转化, 挑选蓝白斑筛出的白色克隆接种于LB培养基过夜, 每组挑取10个白色克隆进行测序, 应用Chromas软件将测序结果与目的片段亚硫酸氢盐转换序列比对(Blast), 并计算其CpG位点的甲基化阳性率。按文献[6]的方法计算: 单个CpG位点甲基化阳性频率=[该位点甲基化的CpG克隆数/总克隆数(10)] \times 100%; 扩增的启动子区CpG位点甲基化的总阳性频率=甲基化的CpG位点数/总CpG位点数 \times 100%。

1.7 双荧光素酶报告基因载体构建及其检测SHP-1甲基化状态和其转录活性的关系

以基因组DNA为模板, 应用PCR的方法扩增SHP-1基因近端启动子区-331 bp~-153 bp片段。引物序列见表1。将此片段切胶回收后, 产物连接T载体扩增, 4 °C过夜, 测序。以XhoI和HindIII分别为上下游引物酶切位点, 将测序产物双酶切, 将酶切产物分为两组: 一组直接连入pGL3-Basic质粒; 另一组进行甲基转移酶处理, 即将1 μ g DNA加入SAM、1 \times NE Buffer 2和M.SssI混合液中, 使其总体积为20 μ l, 37 °C温育、65 °C加热20 min热失活, 随后将产物连入pGL3-Basic质粒。转化感受态细胞DH5 α , 扩增并提取重组质粒。将甲基转移酶处理组和未处理组各150 ng重组质粒分别与50 ng pRL-TK瞬时共转染到293 T细胞中, 然后在37 °C下孵育48 h, 应用双荧光素酶报告基因系统测定荧光素酶活性。

1.8 统计学处理

数据分析采用SPSS22.0软件, 药物处理前后的ESCC细胞中SHP-1表达量比较采用 t 检验, MSP检测结果及其与临床病理资料间的关系采用 χ^2 和校正 χ^2 检验, SHP-1甲基化的水平与预后的分析应用Kaplan-Meier分析。以上均为双侧检验, 以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-Aza-dC和TSA对ESCC细胞SHP-1 mRNA和蛋白表达的影响

qPCR检测结果(图1)显示, SHP-1 mRNA在3株

食管癌细胞株中表达较低,应用 5-Aza-dC 处理后, SHP-1 mRNA 表达增强或恢复为阳性表达(均 $P<0.05$); 而应用 TSA 处理细胞后, SHP-1mRNA 在 3 株食管癌细胞株中的表达无明显变化($P>0.05$)。

WB 实验检测结果显示,应用 5-Aza-dC 处理后 SHP-1 蛋白表达也明显升高($P<0.05$), 而应用 TSA 处理细胞后 SHP-1 蛋白在 3 株食管癌细胞株中的表达无明显变化($P>0.05$)。

表1 PCR引物序列和大小
Tab.1 Primer sequences and size of PCR product

Gene	Primer sequence	Product size(bp)
SHP-1	F:5'-GGCCTGGACTGTGACATTGA-3'	188
	R:5'-ATGTTCCCGTACTCCGACTC-3'	
GAPDH	F: 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'	104
	R: 5'-AGGGGTCATTGATGGCAACA-3'	
BGS	F: 5'-AGGGTTGTGGTGAGAAATTAATTAG-3'	222
	R: 5'-TTACACACTCCAAACCCAAATAATAC-3'	
BG-MSP		
	Methylation	F: 5'-GAACGTTATTATAGTATAGCGTTC-3' R: 5'-TCACGCATACGAACCCAAACG-3'
Unmethylation	F: 5'-GTGAATGTTATTATAGTATAGTGTGG-3'	161
	R: 5'-TTCACACATACAAACCCAAACAAT-3'	
Promoter region	F: 5'-CCCTCGAGGCATGTGAACGCCATTATAG-3'	178
	R:5'-CCAAGCTTCCCAGATAATACTTCACGCA-3'	

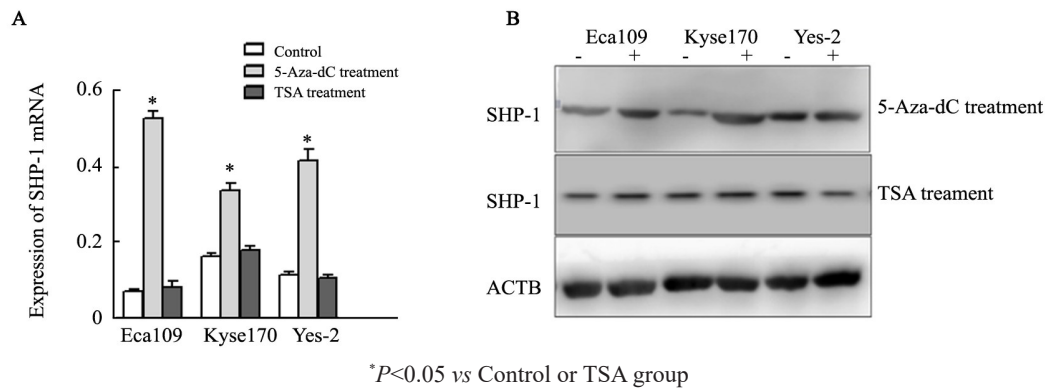


图1 5-Aza-dC及TSA处理前后不同细胞系中SHP-1 mRNA(A)和蛋白(B)的表达
Fig.1 The mRNA(A) and protein(B) expression of SHP-1 gene in different cell lines before and after treatment with 5-Aza-dC or TSA

2.2 5-Aza-dC处理可降低ESCC细胞中SHP-1基因启动子区甲基化程度

在BGS测序片段范围内设计MSP引物进行PCR扩增,结果(图2A)显示,5-Aza-dC处理后ESCC细胞中SHP-1甲基化程度均降低,Eca109和Yes-2细胞表现为非甲基化状态。

选取5-Aza-dC处理前后的Eca109、Kyse170和Yes-2等3株食管癌细胞,BGS测序结果制图,如图3所示,图中实心圆圈代表发生甲基化的CG位点(甲基化频率按该位点甲基化的CpG克隆数/总克隆数10计算,以颜色深度不同代表频率),空心圆代表未发生甲基化的CG位点。5-Aza-dC处理前Eca109中11个CpG位点的甲基化频率分别100%、100%、90%、30%、60%、80%、30%、60%、60%、90%、0,扩增的

启动子区CpG位点甲基化的总频率90.91%(10/11);5-Aza-dC处理后扩增的启动子区无甲基化发生。5-Aza-dC处理前Kyse170中11个CpG位点的甲基化频率分别100%、70%、80%、60%、50%、60%、0、30%、90%、60%、0,扩增的启动子区CpG位点甲基化的总阳性率为81.82%(9/11);5-Aza-dC处理后扩增的启动子区CpG位点甲基化的总阳性率为9.09%(1/11)。5-Aza-dC处理前Yes-2细胞中11个CpG位点的甲基化频率分别为100%、100%、90%、90%、40%、80%、10%、80%、60%、30%、0,扩增的启动子区CpG位点甲基化的总阳性率为90.91%(10/11);5-Aza-dC处理后扩增的启动子区无甲基化发生。结果提示,5-Aza-dC处理后3种ESCC细胞中SHP-1基因启动子区甲基化率均明显降低。

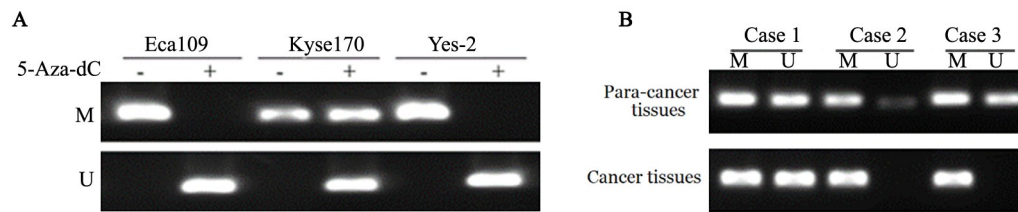


图2 ESCC细胞系(A)和组织(B)中 SHP-1 基因启动子区的甲基化状态

Fig.2 The methylation status in promoter of SHP-1 gene in different ESCC cell lines (A) and ESCC tissues (B)

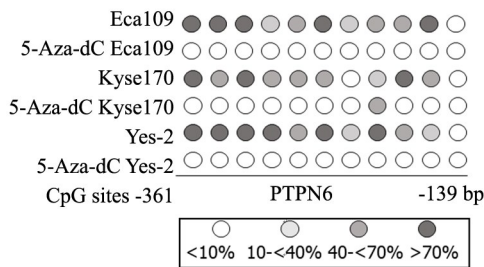


图3 BGS 法检测 5-Aza-dC 处理前后 ESCC 细胞系中 SHP-1 基因启动子区每个 CpG 位点的甲基化状态

Fig.3 The methylation status of every CpG sites in promoter of SHP-1 gene by BGS method in different ESCC cell lines before and after treatment with 5-Aza-dC

2.3 SHP-1 基因启动子区甲基化可抑制基因自身的转录活性

双荧光素酶报告基因检测结果显示, SHP-1 基因启动子区应用甲基转移酶处理组的荧光活性显著低于未处理组[(0.479±0.032) vs (1.038±0.041), $t=10.830, P<0.05$], 结果表明 SHP-1 基因启动子区甲基化可抑制基因自身的转录活性。

2.4 ESCC 组织中 SHP-1 启动子区甲基化状态及其与临床病理特征的关系

MSP 检测结果(图 2B)显示, SHP-1 基因启动子区在 ESCC 组织中的甲基化率为 63.4%(45/71), 显著高于相应癌旁组织的 16.9%(12/71)($\chi^2=31.917, P<0.05$)。分析 SHP-1 基因启动子区甲基化率与患者各临床病理参数的关系, 结果(表 2)显示, SHP-1 基因启动子区甲基化与患者 TNM 分期、病理分级及淋巴结转移有关(均 $P<0.05$), 而与年龄、性别、浸润深度及上消化道肿瘤家族史无关(均 $P>0.05$)。

表 2 ESCC 组织中 SHP-1 的甲基化状态与病理特征的关系

Tab.2 Relationship methylation status of SHP-1 and the clinical features in ESCC tissues

Clinical feature	Case (N)	Methylation (n)	χ^2	P
Age(t/a)				
<62	30	17		
≥62	41	28	1.009	0.315
Gender				
Male	51	35		
Female	20	10	2.148	0.143
TNM stage				
I+II	28	12		
III+IV	43	33	12.930	0.004
Pathological differentiation				
Well/Moderate	37	18		
Poor	34	27	7.225	0.007
Depth of invasion				
T1/2	28	14		
T3/4	43	31	3.566	0.059
LN metastasis				
Negative (N0)	22	9		
Positive (N1-3)	49	36	6.935	0.008
Family history of UGIC				
Negative	47	30		
Positive	24	15	0.012	0.912

2.5 ESCC 组织中 SHP-1 mRNA 低表达与 SHP-1 启动子区高甲基化相关

71 例 ESCC 组织中 SHP-1 基因 mRNA 的表达量

显著低于相应癌旁组织(1.000±0.001 vs 1.815±0.386, $t=13.533, P<0.05$; 图 4)。启动子区甲基化阴性组的 ESCC 患者肿瘤组织其 SHP-1 mRNA 表达量显著高

于甲基化阳性组患者(0.121 ± 0.022 vs 0.047 ± 0.009 , $P < 0.05$)。

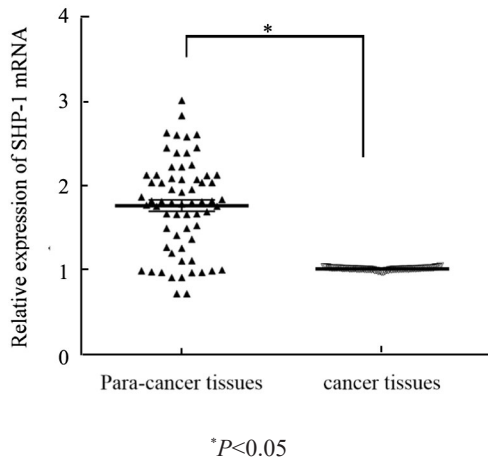


图4 ESCC及相应癌旁组织中SHP-1 mRNA的表达

Fig.4 The expression of SHP-1 mRNA in ESCC and corresponding para-cancer tissue

2.6 SHP-1基因启动子区甲基化与ESCC患者不良预后相关

对71例ESCC患者进行随访,共13人失访,失访率为18.3%。结果显示(图5),SHP-1基因启动子区甲基化与ESCC患者的生存期有关,在SHP-1基因启动子区发生甲基化的随访ESCC患者的5年生存率仅为15.2%,中位生存时间为31个月;而该基因启动子区甲基化阴性组患者的5年生存率为42.3%,中位生存时间为37个月,两组差异具有统计学意义($\chi^2=5.383$, $P < 0.05$;图5)

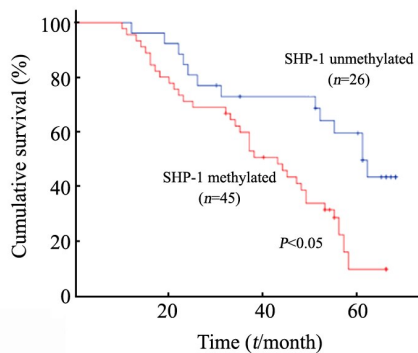


图5 ESCC患者中SHP-1基因启动子区甲基化的Kaplan-Meier生存分析

Fig.5 Kaplan-Meier survival analysis of methylation in promoter region of SHP-1 gene in ESCC patients

3 讨论

近几年来,表观遗传学研究得到了突飞猛进的发展,是目前国内外研究的热点。表观遗传学改变

主要包括DNA甲基化和组蛋白乙酰化,对基因的表达调控有重要作用。组蛋白去乙酰化和DNA高甲基化可抑制基因表达,而组蛋白乙酰化和DNA低甲基化可促进基因表达^[7-8]。抑癌基因启动子区发生异常高甲基化可能抑制转录因子与之结合,进而降低基因的转录水平,最终导致肿瘤的发生^[9-11]。

SHP-1基因位于人染色体12p13上,编码分子量为68 000的非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶^[12-13],其在慢性粒细胞白血病^[3]、乳腺癌^[4]、肝癌^[5]等多种恶性肿瘤中表达低于正常组织,提示其具有抑癌基因的作用。在许多造血细胞系疾病,如白血病和淋巴瘤中研究发现,SHP-1的转录沉默可能是由于其启动子区高甲基化导致的^[14-15]。SHENG等^[16]在子宫内膜癌中也发现了SHP-1基因启动子区的高甲基化,并且与年龄和肿瘤分化有关。在子宫内膜癌细胞系中检测到SHP-1启动子完全甲基化,并通过5-Aza-dC处理逆转其表达状态。

本课题组前期研究^[17]发现,SHP-1基因在ESCC中表达下调。为进一步明确SHP-1在ESCC中引起其异常低表达的可能的表观遗传学机制,本研究首先检测了3株ESCC细胞株中应用甲基化酶抑制剂5-Aza-dC或组蛋白去乙酰化酶抑制剂TSA处理前后SHP-1基因mRNA和蛋白的表达情况,结果显示,处理后3株ESCC细胞系SHP-1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。应用组蛋白去乙酰化酶抑制剂(TSA)处理细胞株后,SHP-1在各细胞株中的表达情况及甲基化状态无明显改变。以上结果共同提示,ESCC中SHP-1基因的高甲基化水平可能是引起基因自身表达下调的机制之一。对ESCC组织标本的检测发现,癌组织中SHP-1基因的甲基化水平明显高于癌旁组织,且与SHP-1基因表达的缺失相关,进一步提示了在ESCC组织标本中SHP-1基因存在高甲基化现象。此外,SHP-1的甲基化状态与ESCC患者的TNM分期、病理分化和淋巴结转移相关。结果表明,启动子的异常高甲基化更具肿瘤特异性,并且与SHP-1的表达水平相关。

为进一步深入探究调控机制,本研究根据SHP-1基因CpG岛分布情况,在启动子区CpG岛区域构建重组质粒,进行甲基转移酶处理后,采用双荧光素酶报告基因方法验证SHP-1基因启动子区甲基化状态对于其转录活性的影响,结果显示,甲基转移酶处理组的荧光活性显著低于未处理组,分析可能的原因为:启动子区位于转录起始点附近,与转录因子关系密切,这个区域的CpG位点发生甲基化后可直接或间接阻碍相应转录因

子与近端启动子区的结合,从而影响基因的转录,进一步证实 SHP-1 基因启动子区异常高甲基化修饰是其在 ESCC 中沉默表达的主要机制之一。

生存分析显示, SHP-1 的高甲基化与 ESCC 患者的生存率低有关。有研究^[18]报道, SHP-1 基因启动子区甲基化是发生上皮肿瘤发生淋巴结转移的通用标志物。PRAKASIT 等^[19]发现, 在发生转移的结肠癌患者的淋巴结中 SHP-1 基因启动子区甲基化率显著高于未发生转移及正常对照组。在对非小细胞肺癌的研究^[20]中也发现, SHP-1 基因启动子区高甲基化可能作为疾病预后复发的分子标志物。本研究结果均与以上报道相一致。

综上所述, SHP-1 基因启动子区高甲基化状态可抑制其自身的转录活性, 进而导致该基因表达沉默。此外, SHP-1 的甲基化状态与 ESCC 患者的 TNM 分期, 病理分化, 淋巴结转移相关, 并与患者的生存期相关, 表明 SHP-1 启动子甲基化状态可能有望成为预测 ESCC 患者预后的生物标志物之一。

[参 考 文 献]

- [1] BAXTER E, WINDLOCH K, GANNON F, et al. Epigenetic regulation in cancer progression[J/OL]. *Cell Biosci*, 2014, 4: 45[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4422217/>. DOI:10.1186/2045-3701-4-45.
- [2] HANLY D J, ESTELLER M, BERDASCO M. Interplay between long non-coding RNAs and epigenetic machinery: emerging targets in cancer?[J/OL]. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*, 2018, 373(1748): [2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5915718/>. DOI:10.1098/rstb.2017.0074.
- [3] HAN J J, O'BYRNE M, STENSON M J, et al. Prognostic and therapeutic significance of phosphorylated STAT3 and protein tyrosine phosphatase-6 in peripheral-T cell lymphoma[J/OL]. *Blood Cancer J*, 2018, 8(11): 110[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6232096/>. DOI:10.1038/s41408-018-0138-8.
- [4] YOUSSEF G, GILLET C, AGBAJE O, et al. Phosphorylation of NTRK1 at Y674/Y675 induced by TP53-dependent repression of PTPN6 expression: a potential novel prognostic marker for breast cancer[J]. *Mod Pathol*, 2014, 27(3): 361-374. DOI: 10.1038/modpathol.2013.129.
- [5] WANG S H, YEH S H, SHIAU C W, et al. Sorafenib action in hepatitis B virus X-activated oncogenic androgen pathway in liver through SHP-1[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2015, 107(10): djv190. DOI: 10.1093/jnci/djv190.
- [6] 晏建国, 付海英, 沈建箴, 等. 重亚硫酸氢盐法检测 Wnt 信号通路抑制基因在急性早幼粒细胞白血病细胞中甲基化变化[J]. *中国实验血液学杂志*, 2016, 24(5):1299-1304. DOI:10.7534/j.issn.1009-2137.2016.05.003.
- [7] PARRIS T Z, KOVÁCS A, HAJIZADEH S, et al. Frequent MYC coamplification and DNA hypomethylation of multiple genes on 8q in 8p11-p12-amplified breast carcinomas[J/OL]. *Oncogenesis*, 2014, 3: e95[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4038389/>. DOI:10.1038/oncsis.2014.8.
- [8] AUDIA J E, CAMPBELL R M. Histone modifications and cancer[J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(4): a019521[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4817802/>. DOI:10.1101/cshperspect.a019521.
- [9] TSUI F W, MARTIN A, WANG J, et al. Investigations into the regulation and function of the SH₂ domain-containing protein-tyrosine phosphatase, SHP-1[J]. *Immunol Res*, 2006, 35(1/2): 127-136. DOI: 10.1385/IR:35:1:127.
- [10] AL-EITAN L N, ALGHAMDI M A, TARKHAN A H, et al. Epigenome-wide analysis of common warts reveals aberrant promoter methylation[J/OL]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(2): 191-206[2019-10-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32038103>. DOI: 10.7150/ijms.39261
- [11] SCALA G, FEDERICO A, PALUMBO D, et al. DNA sequence context as a marker of CpG methylation instability in normal and cancer tissues[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 1721. DOI: 10.1038/s41598-020-58331-w.
- [12] ZHANG Y, CHEN F, XIAO X, et al. Chrysin inhibits sphere formation in SMMC-7721 cells via modulation of SHP-1/STAT3 signaling pathway[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 2977-2985. DOI: 10.2147/CMAR.S193647. eCollection 2019.
- [13] KOH J S, JOO M K, PARK J J, et al. Inhibition of STAT3 in gastric cancer: role of pantoprazole as SHP-1 inducer[J]. *Cell Biosci*, 2018, 8: 50. DOI: 10.1186/s13578-018-0248-9. eCollection 2018.
- [14] OKA T, OUCHIDA M, KOYAMA M, et al. Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22): 6390-6394. DOI: unpublished November 2002
- [15] CHIM C S, WONG K Y, LOONG F, et al. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in mantle cell lymphoma and follicular lymphoma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway[J]. *Leukemia*, 2004, 18(2): 356-358. DOI:10.1038/sj.leu.2403216.
- [16] SHENG Y, WANG H T, LIU D C, et al. Methylation of tumor suppressor gene CDH13 and SHP1 promoters and their epigenetic regulation by the UHRF1/PRMT5 complex in endometrial carcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 140(1): 145-151. DOI:10.1016/j.ygyno.2015.11.017.
- [17] 刘磊, 杨柳, 牛云峰, 等. PTPN6 基因对人食管鳞状细胞癌 Eca109 和 Yes-2 细胞恶性生物学行为的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(3): 273-279. DOI: CNKI:SUN:ZLSW.0.2019-03-004.
- [18] RUCHUSATSAWAT K, WONGPIYABOVORN J, SHUANGSHO-TI S, et al. SHP-1 promoter 2 methylation in normal epithelial tissues and demethylation in psoriasis[J]. *J Mol Med*, 2006, 84(2): 175-182. DOI:10.1007/s00109-005-0020-6.
- [19] RATTANATANYONG P, KEELAWAT S, KITKUMTHORN N, et al. Epithelial-specific SHP1-P2 methylation - a novel universal tumor marker for detection of colorectal cancer lymph node metastasis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(8): 4117-4123. PMID: 27644671
- [20] VINAYANUWATTIKUN C, CHANIDA V, CHANTRANUWAT P, et al. The role of SHP-1 promoter 2 hypermethylation detection of lymph node micrometastasis in resectable stage I non-small cell lung cancer as a prognostic marker of disease recurrence[J]. *Int J Clin Oncol*, 2014, 19(4): 586-592. DOI:10.1007/s10147-013-0590-1.

[收稿日期] 2020-02-10

[修回日期] 2020-04-30

[本文编辑] 韩丹