

肾癌组织中 RASSF1A 和 BLU 基因的异常甲基化

段建敏¹, 李智^{2*}, 赵敏², 张剑英², 彭波¹, 黄建华¹

(1. 同济大学附属第十人民医院泌尿外科, 上海 200072; 2. 第十人民医院检验科)

[摘要] **目的:**观察肾癌组织中 RASSF1A 和 BLU 基因启动子甲基化状态,探讨二者在肾癌发生中的可能作用。**方法:**采用甲基化特异性 PCR(MSP)技术检测 26 例肾癌组织和相应癌旁组织中 RASSF1A 和 BLU 基因启动子甲基化状态,分析二者检测结果。**结果:**肾癌组织中 17 例(65.4%)RASSF1A 基因异常甲基化表达,相应癌旁组织中无 RASSF1A 基因异常甲基化表达;11 例(42.3%)肾癌组织中 BLU 基因高甲基化,相应癌周组织中未发现 BLU 基因高甲基化。**结论:**肾癌组织中 RASSF1A 和 BLU 基因启动子高度甲基化,表明 RASSF1A 和 BLU 基因甲基化可能与肾癌的发生相关。

[关键词] 肾肿瘤;基因,肿瘤抑制;DNA 甲基化;RASSF1A;BLU

[中图分类号] R 737.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)10-1068-04

Abnormal methylation of RASSF1A and BLU genes in renal carcinoma

DUAN Jian-min¹, LI Zhi^{2*}, ZHAO Min², ZHANG Jian-ying², PENG Bo¹, HUANG Jian-hua² (1. Department of Urology, The 10th People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China; 2. Department of Laboratory Medicine, the 10th People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the methylation status of the promoters of RASSF1A and BLU genes in the renal carcinoma tissues and to assess their roles in the tumorigenesis of renal carcinoma. **Methods:** Methylation specific PCR (MSP) method was used to examine the methylation status of the promoters of RASSF1A and BLU genes in the renal carcinoma tissues of 26 patients with renal carcinoma and their corresponding adjacent normal tissues; and the results were analyzed. **Results:** We found that 17 (65.4%) of the renal carcinoma tissues had abnormal methylation of RASSF1A gene, and there was no abnormal methylation of RASSF1A in the adjacent normal tissues. Eleven (42.3%) of 26 renal cancer tissues had hypermethylation of BLU gene, and there was no hypermethylation of BLU gene in the corresponding adjacent tissues. **Conclusion:** Hypermethylation of RASSF1A and BLU genes is present in the renal carcinoma tissues, suggesting the hypermethylation of RASSF1A and BLU might be associated with the tumorigenesis of renal carcinoma.

[KEY WORDS] kidney neoplasms; genes, tumor suppressor; DNA methylation; RASSF1A; BLU

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 27(10):1068-1071]

近年来在肺癌、乳腺癌、肾癌等实体肿瘤中都发现染色体 3p21 等位基因缺失频繁,推测该区域可能存在一个或多个肿瘤抑制基因(tumor suppressor gene, TSG)^[1-3]。2002 年,该染色体区域内至少 10 个候选抑癌基因(RASSF1A、SEMA3B、BLU 等)被先后确定^[4]。越来越多的研究发现肿瘤抑制基因在肿瘤中表现出启动子异常甲基化改变。RASSF1A 基因是新近发现的一种候选肿瘤抑制基因, BLU 位于染色体 3p21.3 上 120 kb 肺癌最小纯合缺失区内,在多种肿瘤组织中启动子高甲基化^[5]。

肾癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,在其发生及进展过程中与多种基因异常表达相关。本研究通过检测肾癌组织 RASSF1A 和 BLU 基因的甲基化状态,探讨二者在肾癌发生和发展中可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 临床资料 取手术切除肾癌组织及癌旁组织标本 26 例,男 19 例,女 7 例,年龄 39~73 岁,平均(55±4)岁。标本来源于同济大学附属第十人民医院和兰州大学第二医院,均经病理确诊。细胞类型 21 例以透明细胞为主,5 例为透明细胞和颗粒细胞混合型癌。Robson 分期为: I 期 13 例, II 期 9 例, III 期 3 例, IV 期 1 例。相应癌旁组织取自距癌组织 2

[基金项目] 国家自然科学基金(30270522);上海市科委基金(054119604)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30270522) and Fund of Science Committee of Health Department of Shanghai Municipal Government(054119604).

[作者简介] 段建敏,硕士,教授、主任医师。

* Corresponding author. E-mail: Gslzjdm@yahoo.com

cm 以上, 病理学检查确定无癌细胞累及。所有标本于术后液氮速冻 -80℃ 保存。

1.2 肾癌组织 RASSF1A 和 BLU 基因甲基化状态的检测

1.2.1 组织 DNA 抽提 采用 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega 公司) 以 Chaotropic-silica 法抽提 DNA, 紫外分光光度仪定量。

1.2.2 甲基化特异性 PCR DNA 亚硫酸氢盐修饰: 采用基因组 DNA 修饰试剂盒 (Serological 公司), 按说明书操作步骤进行。

PCR 扩增: 取 1 μg DNA 按说明书操作步骤进行修饰。以修饰后 DNA 作为模板, 利用甲基化和非甲基化特异性引物进行热启动 PCR 扩增。反应体系 25 μl。RASSF1A 甲基化上游引物: 5'-GGG TTT TGC GAG AGC GCG-3', 下游引物: 5'-GCT AAC AAA CGC GAA CCG-3'; 未甲基化上游引物: 5'-GGT TTT GTG AGA GTG TGT TTA G-3', 下游引物: 5'-GGT TTT GTG AGA GTG TGT TTA G-3'。退火温度分别为 64℃ 和 61℃, 产物长度均为 169 bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成。BLU 甲基化上游引物: 5'-TTC GTG GGT TAT AGT TCG AGA AAG CG-3', 下游引物: 5'- AAC GAA TTA ACC GCG CCT ACG C-3', 未甲基化上游引物: 5'-TTT GTG GGT TAT AGT TTG AGA AAG TG-3', 下游引物: 5'- AAC AAA TTA ACC ACA CCT ACA C-3'。退火温度分别为 72~66℃ 和 66~60℃。产物长度均为 157 bp。所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

取 10 μl MSP 扩增产物进行 2% 的琼脂糖凝胶

电泳, 紫外灯下观察结果, GIS 凝胶图像处理系统分析结果。凝胶电泳结果显示基因异常甲基化的部分 MSP 产物由上海申能博彩生物科技有限公司测序。

1.3 统计学处理 采用 χ^2 检验或四格表精确检验。

2 结果

2.1 肾癌组织中 RASSF1A 基因的甲基化 26 例肾癌组织中, RASSF1A 基因异常甲基化 17 例 (65.4%), 癌旁组织中无异常甲基化改变 (图 1)。测序结果与预期一致 (图 2)。

2.2 肾癌组织中 BLU 的甲基化 26 例肾癌组织中 11 例 (42.3%) BLU 出现基因启动子异常甲基化 (图 3), 相应癌周正常组织中未发现该基因异常甲基化改变。克隆测序结果与预期一致 (图 4)。

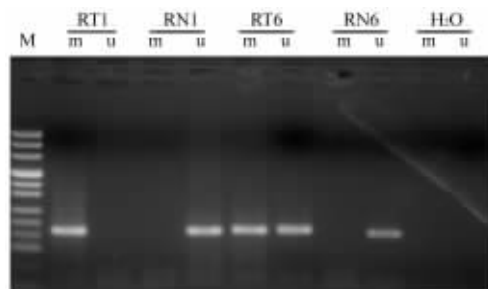


图 1 肾癌组织及癌旁组织中 RASSF1A 基因 MSP 结果

Fig 1 Expression of RASSF1A gene in renal carcinoma tissues and paired adjacent tissues

M: pUC Mix; m: 169 bp production for the methylated RASSF1A gene; u: 169 bp production for the nulli-methylated RASSF1A gene; RT: Renal carcinoma tissue; RN: Paired adjacent tissues; H₂O: Blank control

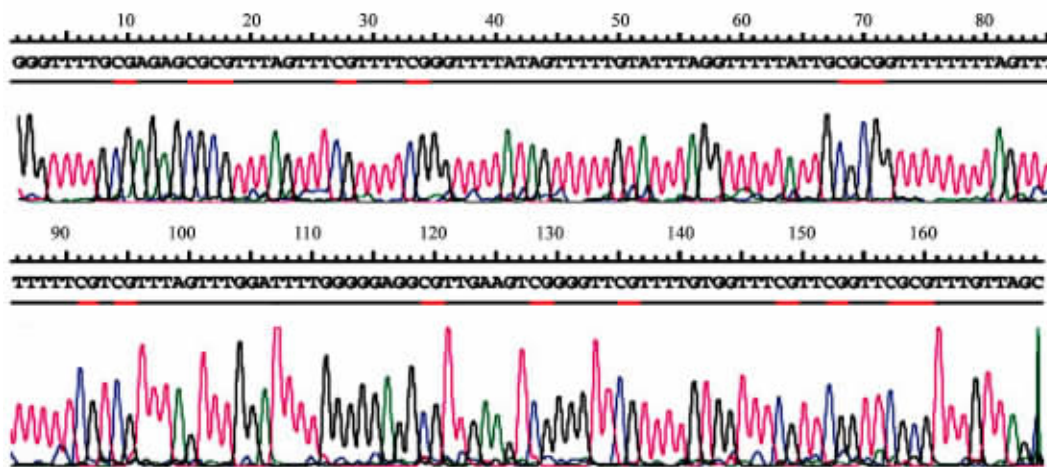


图 2 RASSF1A 基因异常甲基化 MSP 产物的测序结果

Fig 2 Sequencing results of MSP production for modified DNA

The red short lines refer to the methylated islets. 16 CpG islets is in exhaustive methylation

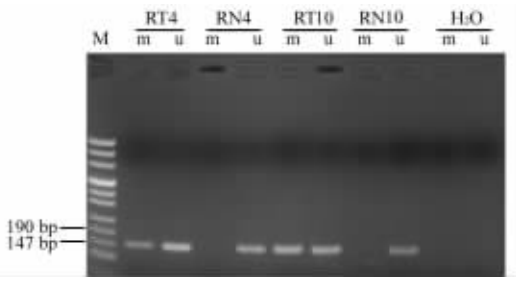


图 3 肾癌组织及癌周正常组织 BLU 基因 MSP 结果

Fig 3 Expression of BLU gene in renal carcinoma tissues and paired adjacent tissues

M: pUC Mix; m: 157 bp production for the methylated BLU gene; u: 157 bp production for the nulli-methylated BLU gene; RT: Renal carcinoma tissue; RN: Paired adjacent tissues; H₂O: Blank control

3 讨论

2000 年 Dammann 等^[6]在染色体 3p21.3 区域首次克隆出 RAS 相关区域家族 1 基因(RASSF1 基因),由于其核苷酸序列的羧基端与小鼠 RAS 效应蛋白 Nore1 高度同源而得名。RASSF1A 为该基因的一种常见转录本,cDNA 全长 1 873 bp,含一个开放阅读框架,编码含 340 个氨基酸的蛋白多肽,相对分子质量为 38 800。分子羧基端含有一个 RAS 相关区域和一个毛细血管扩张性共济失调症突变蛋白(ataxia-telangiectasia-mutated, ATM)磷酸化位点,氨基端含有一个二酰甘油结合区域。已有研究^[6-8]

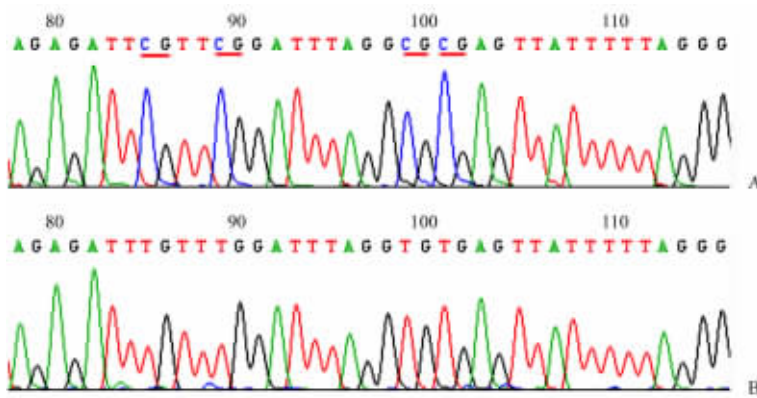


图 4 BLU 基因异常甲基化 MSP 产物的测序结果

Fig 4 Sequencing results of PCR product of abnormal methylation of BLU gene

The red short lines refer to the methylated islets. A: Sequencing graph of PCR production for the methylated BLU gene; B: Sequencing graph of PCR production for the nulli-methylated BLU gene

发现 RASSF1A 分子直接参与细胞周期的调控,体内外抑制细胞生长,并参与诱导细胞凋亡。RASSF1A 基因已被确认为一种候选肿瘤抑制基因,在多种肿瘤组织和癌细胞中均发现 RASSF1A 基因频繁转录失活^[6,9-10],而在正常组织和细胞中均完全表达,其失活机制主要有基因启动子异常甲基化和等位缺失两方面,点突变率极低,且基因甲基化与转录抑制明显相关。

BLU 基因于 2000 年由 Lerman 等^[11]发现,编码含有 440 个氨基酸的蛋白质。BLU 蛋白含有一个 DNA 结合功能域——MYND 功能域,该功能域同样位于 AML/ETO、BS69 等蛋白内,这些蛋白分别在转录抑制、肿瘤细胞生长抑制以及细胞周期调控等方面发挥作用。完整的 MYND 功能域对这些蛋白功能的发挥是必需的,推测 BLU 分子可能具有与其他同源蛋白类似的细胞生长负调控功能,并参与了重要的转录调节途径^[5]。BLU 基因最初被鉴

定为一种候选的肺癌抑制基因,在肺癌细胞系中频繁发生转录下调或缺失^[11]。进一步研究^[5,12]表明,BLU 基因在多种肿瘤中或细胞系中存在启动子区域高度甲基化,转录下调或缺失,推测 BLU 基因可能是多种肿瘤的候选 TSG。

RASSF1A 和 BLU 基因甲基化在肾癌中表达的研究较少,特别是 BLU 基因。Dreijerink 等^[13]对 43 例肾细胞癌中 RASSF1A 基因启动子甲基化的研究中发现其高度甲基化率为 91%,体外研究发现其能抑制非贴壁型细胞生长,认为其可能是肾癌抑制基因。Agathangelou 等^[5]对肾癌细胞系的研究发现 50% (3/6)的细胞系中 BLU 基因高度甲基化,转录表达明显降低或缺失,给予甲基化抑制剂后表达恢复。本研究检测了 26 例肾癌癌组织中 RASSF1A 和 BLU 基因甲基化表达,结果表明,RASSF1A 高甲基化异常表达率为 65.4%,BLU 高甲基化表达率为 42.3%。结果提示在肾癌的发生

过程中,多种基因甲基化异常参与了其病理过程。

在以往对 RASSF1A 和 BLU 基因甲基化在膀胱肿瘤的研究中展示出 RASSF1A 和 BLU 基因在膀胱肿瘤中呈高甲基化改变,提示其与膀胱肿瘤的发生相关,但两者均与膀胱肿瘤临床病理参数无相关性^[14-15]。本研究结果表明,在肾癌的发生过程中,RASSF1A 和 BLU 基因的高甲基化参与其中,癌组织中两者高甲基化,而在其相应癌周组织中,均无甲基化的异常表达,但由于本研究样本数量相对较少,难以评估 RASSF1A 和 BLU 基因高甲基化与肾癌临床病理参数的相关性。结合二者在膀胱肿瘤中的变化,推测两者可能是肾癌发生过程中的早期事件,对于其是否参与了肾癌发生的早期细胞转变的某一过程仍须进一步研究。

RASSF1A 和 BLU 基因对机体影响的具体机制目前仍不清楚。RASSF1A 分子与 RAS 效应蛋白 Norel 具高度同源性,二者形成一种异型二聚体,推测 RASSF1A 分子可能是一种新的 RAS 效应分子,参与 RAS 介导的信号转导途径。而对 BLU 基因甲基化具体机制的相关研究相对较少。Hesson 等^[16]发现位于染色体 3p21.3 区域的 RASSF1A 基因和 BLU 基因在黑素瘤细胞系和癌组织中均表现出启动子高度甲基化和基因转录失活,但是两基因甲基化间并无明显相关性,由此推测 BLU 基因异常甲基化是一独立事件,并非染色体 3p21.3 区域甲基化的结果。

总之,RASSF1A 和 BLU 基因启动子异常甲基化可能与肾癌的发生相关,具体的作用机制仍需进一步的研究探讨。

[参考文献]

[1] Wistuba I I, Behrens C, Virmani A K, et al. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints[J]. *Cancer Res*,2000,60: 1949-1960.

[2] Martinez A, Fullwood P, Kondo K, et al. Role of chromosome 3p12-p21 tumour suppressor genes in clear cell renal cell carcinoma; analysis of VHL dependent and VHL independent pathways of tumorigenesis[J]. *Mol Pathol*,2000,53: 137-144.

[3] Martinez A, Walker R A, Shaw J A, et al. Chromosome 3p allele loss in early invasive breast cancer: detailed mapping and association with clinicopathological features[J]. *Mol Pathol*, 2001,54: 300-306.

[4] Braga E A, Kashuba V I, Maliukova A V, et al. Novye geny-supressory opukholevogo rosta v goriachikh tochkakh khromosomy 3 cheloveka: novye metody identifikatsii. [New tumor suppressor genes in hot spots of human chromosome 3: new methods of identification][J]. *Mol Biol (Mosk)*,2003,37: 194-211.

[5] Agathangelou A, Dallol A, Zochbauer-Muller S, et al. Epigenetic inactivation of the candidate 3p21.3 suppressor gene BLU in human cancers[J]. *Oncogene*,2003,22: 1580-1588.

[6] Dammann R, Li C, Yoon J H, et al. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3[J]. *Nat Genet*,2000,25: 315-319.

[7] Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, et al. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation[J]. *Mol Cell Biol*,2002,22: 4309-4318.

[8] Ortiz-Vega S, Khokhlatchev A, Nedwied M, et al. The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Norel[J]. *Oncogene*,2002,21: 1381-1390.

[9] Yan P S, Shi H, Rahmatpanah F, et al. Differential distribution of DNA methylation within the RASSF1A CpG island in breast cancer[J]. *Cancer Res*,2003,63: 6178-6186.

[10] Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, et al. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma[J]. *Oncogene*,2003,22: 3806-3812.

[11] Lerman M I, Minna J D. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium[J]. *Cancer Res*,2000,60: 6116-6133.

[12] Balch C, Yan P, Craft T, et al. Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer[J]. *Mol Cancer Ther*,2005,4: 1505-1514.

[13] Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, et al. The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001,98: 7504-7509.

[14] 王楠楠,李智,于永春,等.膀胱肿瘤 RASSF2A 及 NORE1A 启动子甲基化状况研究[J]. *同济大学学报·医学版*,2006,27:34-36.

[15] 张剑英,李智,于永春,等.膀胱癌和肾癌组织中 RASSF1A 基因的甲基化改变[J]. *中华泌尿外科杂志*,2006,27(增刊):9-11.

[16] Hesson L, Bieche I, Krex D, et al. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas[J]. *Oncogene*,2004,23: 2408-2419.

[收稿日期] 2007-06-12

[修回日期] 2007-09-30

[本文编辑] 贾泽军