

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01273

## 肾透明细胞癌中谷胱甘肽 S-转移酶 M3 基因的表达及其启动子区 CpG 岛的甲基化水平

武 旗<sup>1</sup>, 侯建国<sup>1\*</sup>, 杜稳斌<sup>1</sup>, 常文军<sup>2</sup>, 翟羽佳<sup>2</sup>, 林丽萍<sup>2</sup>, 谭晓洁<sup>2</sup>, 曹广文<sup>2\*</sup>

1. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

2. 第二军医大学卫生勤务学系流行病学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的:**检测肾透明细胞癌(ccRCC)中谷胱甘肽 S-转移酶 M3(GSTM3)基因表达水平,观察其启动子区 CpG 岛的甲基化水平,探讨 GSTM3 基因甲基化与 ccRCC 发生和转移的关系。**方法:**半定量 RT-PCR 检测 ccRCC 高转移潜能细胞系(RCC05-TXJ)、低转移潜能细胞系(RCC05-ZYJ)、24 例原位 ccRCC 及其癌旁肾组织和 14 例 ccRCC 转移组织的 GSTM3 基因的表达水平。用去甲基化剂 5-Aza-CdR 干预 RCC05-ZYJ, RT-PCR 检测处理前后 GSTM3 基因的表达变化。用巢式 BSP(nested bisulfite sequencing PCR)检测 10 例原位 ccRCC 及其癌旁肾组织的 GSTM3 基因启动子区 CpG 岛甲基化位点。采用巢式 MSP(nested methylation specific PCR)检测 10 例原位 ccRCC 及其癌旁肾组织、8 例 ccRCC 转移组织甲基化情况。**结果:**RCC05-TXJ 中 GSTM3 基因表达强度低于 RCC05-ZYJ。5-Aza-CdR 处理 RCC05-ZYJ 后, GSTM3 基因表达强度高于处理前。24 例原位 ccRCC 中 17 例 GSTM3 基因的表达强度低于其在癌旁肾组织中的表达强度,其余 7 例原位 ccRCC 中 GSTM3 基因的表达强度不低于其在癌旁肾组织中的表达。10 例原位 ccRCC 及其癌旁和 8 例转移组织中,癌组织 GSTM3 基因启动子甲基化阳性为 4 例,癌旁组织 2 例( $P=0.628$ ),转移组织 1 例( $P=0.314$ ),差异无统计学意义。**结论:**GSTM3 基因表达与 ccRCC 的发生、转移密切相关,其启动子区 CpG 岛甲基化会降低该基因的表达;初步筛选出 ccRCC 中 GSTM3 基因启动子区 CpG 岛甲基化位点,为后续研究奠定了基础。

**[关键词]** 肾脏肿瘤;肿瘤转移;谷胱甘肽转移酶;DNA 甲基化

**[中图分类号]** R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1273-06

### Expression of glutathione S-transferase M3 in clear cell renal cell carcinoma and its promoter CpG methylation

WU Qi<sup>1</sup>, HOU Jian-guo<sup>1\*</sup>, DU Wen-bin<sup>1</sup>, CHANG Wen-jun<sup>2</sup>, ZHAI Yu-jia<sup>2</sup>, LIN Li-ping<sup>2</sup>, TAN Xiao-jie<sup>2</sup>, CAO Guang-wen<sup>2\*</sup>

1. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Epidemiology, Faculty of Health Services, Second Military Medical University, Shanghai 200433

**[ABSTRACT]** **Objective:** To examine the expression and promoter CpG island methylation of glutathione S-transferase M3 (GSTM3) gene in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), and to evaluate the relationship of expression, methylation of GSTM3 gene with the metastasis and oncogenesis of ccRCC. **Methods:** Using semi-quantitative RT-PCR technique, we examined GSTM3 expression in surgical specimens of 24 primary ccRCCs and adjacent non-malignant tissues, 14 metastatic ccRCCs and 2 ccRCC cell lines (RCC05-TXJ, RCC05-ZTJ) with different metastatic potentials. RCC05-TXJ cells were cultured in RPMI 1640 medium and treated with DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR). Semi-quantitative RT-PCR was used to examine the expression of GSTM3 in response to 5-Aza-CdR treatment. Nested bisulfite sequencing PCR and DNA sequencing were used to analyze different methylation locuses in GSTM3 gene promoter in 10 primary ccRCCs and adjacent non-malignant tissues. We also examined the methylation level in 10 primary ccRCCs and the corresponding non-malignant tissues as well as 8 metastatic tissues by nested methylation-specific PCR. **Results:** Expression of GSTM3 gene in metastatic ccRCC cells (RCC05-TXJ) was lower than that in the non-metastatic ccRCC cells (RCC05-ZYJ). Down-regulation of GSTM3 gene expression was found in 17 of the 24 primary ccRCCs as compared with the non-malignant tissue. Expression of GSTM3 in the metastatic ccRCCs was lower than that in primary ccRCCs. 5-Aza-CdR treatment increased GSTM3 expression in RCC05-ZYJ. Methylation in GSTM3 promoter was found in 4 of 10 ccRCC tissues, 2 of 10 adjacent tissues, and 1 of 8 metastatic tissues. No significant

**[收稿日期]** 2008-03-31 **[接受日期]** 2008-06-23

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30873041), Supported by National Natural Science Foundation of China (30873041).

**[作者简介]** 武 旗, 硕士。

\* 通讯作者(Corresponding authors). Tel:021-25070277; Tel:021-25070420, E-mail:gcao@smmu.edu.cn

difference was found between ccRCC and adjacent tissues ( $P=0.628$ ) or ccRCC and metastatic disease ( $P=0.314$ ) due to limit number of cases. **Conclusion:** Our findings support that promoter aberrant methylation is one of the major mechanisms of GSTM3 gene down-regulation in ccRCC. The preliminary identification of GSTM3 promoter methylation sites may provide a basis for further study.

**[KEY WORDS]** kidney neoplasms; neoplasm metastasis; glutathione transferase; DNA methylation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(11):1273-1278]

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是最常见的肾脏肿瘤,约占成人肾肿瘤的85%。近30年RCC的发病率和病死率持续上升<sup>[1]</sup>。肾透明细胞癌(ccRCC)占RCC的60%~85%<sup>[2]</sup>。约30%的RCC患者初诊时即发现转移,其生存期为6~12个月,2年生存率为10%~20%<sup>[3]</sup>,因此早期诊断对于改善RCC预后至关重要。DNA甲基化是肿瘤发生中的早期事件,与肿瘤的发生发展密切相关,对一些肿瘤特异基因甲基化状态进行筛查有望用于肿瘤的早期诊断和转移预测<sup>[4-5]</sup>。

我们的前期研究<sup>[6]</sup>采用cDNA基因表达谱芯片筛选ccRCC相关基因,结果发现谷胱甘肽S-转移酶M3(GSTM3)基因可能与ccRCC的转移相关。GSTM3基因是重要的肿瘤相关基因<sup>[7]</sup>,它可以解除许多致癌剂活性代谢物的毒性<sup>[8]</sup>。为进一步探讨GSTM3基因及其甲基化对ccRCC发生和转移的影响,本研究采用半定量RT-PCR、巢式BSP和MSP检测ccRCC细胞系、原位ccRCC及癌旁正常肾组织和ccRCC转移组织的GSTM3基因的表达水平,观察其启动子区CpG岛的甲基化情况,为后续确定ccRCC易感性遗传标记及寻找ccRCC早期诊断的分子标记物奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料和试剂** RCC细胞系为本实验室前期研究<sup>[13]</sup>建立的能够无限传代的在动物模型中证实具有转移潜能的2株汉族人RCC细胞系(RCC05-TXJ、RCC05-ZYJ)。其中RCC05-TXJ为ccRCC高转移潜能细胞系,来源于ccRCC骨转移组织的原代细胞;RCC05-ZYJ为低转移潜能细胞系,来源于ccRCC原位肿瘤的原代细胞。

RCC转移和原位肿瘤标本来源于2004年1月至2007年9月第二军医大学长海医院及长征医院,其中RCC骨转移标本均来源于长征医院骨科,其他RCC转移和原位肿瘤标本均来源于经病理证实的长海医院泌尿外科肾癌根治手术<sup>[9]</sup>的患者。38例患者中男性25例,女性13例,45~73岁,平均(50.3±13.28)岁,其中ccRCC原位肿瘤24例,ccRCC骨转移7例,ccRCC淋巴结转移5例及ccRCC肝转移2

例。24例癌旁肾组织为距肿瘤边缘3cm远处的肾组织,经术后病理证实为非肿瘤组织。

**1.2 主要试剂及仪器** TRIzol试剂(cat#15596-026)购自Invitrogen公司;RNA逆转录试剂盒(A3500)购自Promega公司;pMD18-T载体(D101A)购自TaKaRa公司;5-aza-2'-deoxycytidine(5-Aza-CdR)、亚硫酸氢钠和氢醌购自Sigma公司;Wizard DNA clean-up system(A7280)购自美国Promega公司;DH5 $\alpha$ 感受态细胞(CB101)、Taq Plus DNA聚合酶购自北京天根生化技术有限公司;PCR仪购自Eppendorf公司;引物由上海生工生物工程公司合成。

**1.3 总RNA及DNA提取** 使用TRIzol试剂分别提取RCC05-TXJ、RCC05-ZYJ、24例原位ccRCC及癌旁肾组织和14例ccRCC转移组织的总RNA。用RNA逆转录酶合成cDNA第一链。反应体系为20  $\mu$ l,包括1~2  $\mu$ g总RNA作为模板、15 U AMV逆转录酶,1  $\mu$ l Oligo(dT)<sub>18</sub>逆转录引物,其他反应参数和条件按说明书进行,所得cDNA -20℃保存。组织DNA的提取采用快速DNA抽提方法,提取后测 $D_{260}$ 值,计算DNA浓度,所得基因组DNA -20℃保存。

**1.4 半定量RT-PCR测定组织和细胞系GSTM3基因表达** 根据GenBank中公布的GSTM3基因的编码区序列,用Primer Premier 5.0及Oligo 6.0软件设计RT-PCR引物,序列见表1。PCR体系为50  $\mu$ l,包括提取的1  $\mu$ l逆转录产物cDNA作为模板、5  $\mu$ l 10 $\times$ PCR Reaction buffer,25 pmol引物、25 nmol dNTP、2.5 U Taq Plus DNA聚合酶。反应程序为95℃预变性1 min,95℃变性45 s,55℃退火45 s,72℃延伸75 s,25~30个循环。最后于72℃延伸10 min。1.5%琼脂糖凝胶120 V电泳30 min。溴化乙锭染色,UV灯观察。

**1.5 5-Aza-CdR处理对GSTM3基因表达的影响** 实验时RCC05-ZYJ细胞处于对数生长期,活细胞数超过95%,在含体积分数为1%胎牛血清的RPMI 1640中饥饿培养24 h后,于培养瓶中加入含浓度为2  $\mu$ mol/L 5-Aza-CdR的培养液,每24 h换液1次,共育5 d后收集细胞,进行实验。以未加5-

Aza-CdR 干预的细胞为对照组。提取处理组和对照组细胞总 RNA, RT-PCR 检测 2 组 GSTM3 基因表

达水平。1.5% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min。溴化乙啶染色, UV 灯观察。

表 1 引物序列和产物长度

Tab 1 Primer sequences and products of PCR

Primer		Sequence(5'→3')	PCR product (bp)
GSTM3-RT	Sense	ATG TCG TGC GAG TCG TCT ATG	562
	Antisense	AAG CCT TCA GGT TTG GGA AC	
$\beta$ -actin	Sense	CTC GCC TTT GCC GAT CC	625
	Antisense	GGA TCT TCA TGA GGT AGT CAG TC	
BSP-outer	Sense	TTT TTA TTG GTA TTA TTA ATG AAT GAA GTT	517
	Antisense	ATC CCA AAA ACT AAA CAA AAA TC	
BSP-inner	Sense	GGG AAG GGA GGA GTT TTA ATT T	304
	Antisense	CCA ATA CCC RAA AAC CAT AAA	
MSP-M	Sense	CGT ACG GTT TTG TGG AGT C	144
	Antisense	TCC GAA CCT TCG AAA ACT AA	
MSP-U	Sense	TTG TGT ATG GTT TTG TGG AGT T	144
	Antisense	CTT CCA AAC CTT CAA AAA CTA AA	

GSTM3-RT: Primers for RT-PCR;  $\beta$ -actin:  $\beta$ -actin was used as an RT-PCR control; BSP-outer: outer pair of primers; BSP-inner: Inner pair of primers; MSP-U: MSP for unmethylated promoter; MSP-M: MSP for methylated promoter; R: G or A

1.6 基因组 DNA 亚硫酸氢盐修饰 本研究对 10 例原位 ccRCC 及其癌旁肾组织和 8 例转移组织所抽取的基因组 DNA, 按 Tollefsbol 等<sup>[10]</sup>的方法进行亚硫酸氢盐修饰, 经修饰的 DNA 以 Wizard DNA clean-up system 纯化, 乙醇沉淀回收, 加 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 溶解, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.7 GSTM3 基因启动子甲基化的巢式 BSP 和 MSP 检测 根据 GenBank 中公布的 GSTM3 基因的全基因序列, 按照 Gardiner-Garden 等<sup>[11]</sup>对启动子区 CpG 岛的定义(长度 > 200 bp, GC 含量 > 50%, Obs CpG 或 Exp CpG > 0.6), 预测并在线分析启动子区 CpG 岛<sup>[12]</sup>, 选取从 -350 到 +442 为研究范围(GC 含量为 66.7%, Obs CpG 或 Exp CpG = 0.85)。应用 Methyl Primer Express<sup>®</sup> Software v1.0 软件及在线软件 MethPrimer<sup>[13]</sup>设计巢式 BSP 内外侧引物, 引物扩增范围分别为: 外侧(-182~+334), 内侧(-137~+166), 内侧引物所扩范围包含 30 个 CpG 位点, 引物序列见表 1。

采用巢式 BSP 检测 10 例原位 ccRCC 及其癌旁肾组织甲基化情况, 第一轮 PCR 反应总体积 40  $\mu$ l, 包括经 NaHSO<sub>3</sub> 修饰的模板 DNA 1  $\mu$ l, 浓度为 5  $\mu$ mol/L 的上下游混合引物 3  $\mu$ l, Taq Plus DNA 聚合酶 2.5 U, 10 $\times$  PCR Reaction buffer 5  $\mu$ l (200 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L KCl, 100 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 29  $\mu$ l。第一轮 PCR 用外侧引物

BSP-outer, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 热启动 4 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 49.8 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环扩增 20 次, 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取 1  $\mu$ l 第一轮 PCR 产物作模板进行第二轮 PCR, 用内侧引物 BSP-inner, 反应退火温度升至 53.4 $^{\circ}$ C, 循环增加到 30 次, 其他条件与第一轮相同。1.5% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min。纯化后的第二轮产物与 pMD18-T 载体连接后转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌, 经  $\alpha$  筛选并培养, 取 500  $\mu$ l 克隆菌液送北京天根生化科技有限公司测序。

根据测序结果所得甲基化位点, 在 BSP 第一轮扩增范围内, 按照 Li 等<sup>[14]</sup>方法设计 MSP 的甲基引物和非甲基化引物。设计软件同 BSP 引物设计, 引物序列见表 1。检测 10 例原位 ccRCC 及其癌旁肾组织、8 例 ccRCC 转移组织甲基化情况, 取 1  $\mu$ l 第一轮 PCR 产物作模板进行 MSP, 反应退火温度为 51.5 $^{\circ}$ C, 循环为 25 次, 其他条件与第一轮 PCR 相同。以 ddH<sub>2</sub>O 作空白对照。1.5% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件, 统计学处理采用  $\chi^2$  检验和 Fisher 确切概率法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 RT-PCR 检测细胞系结果 在高转移潜能细胞系(RCC05-TXJ)中 GSTM3 基因表达条带强度明

显弱于低转移潜能细胞系(RCC05-ZYJ),共 30 个循环(图 1A)。去甲基化剂 5-Aza-CdR 干预 RCC05-ZYJ 后,GSTM3 基因表达条带强度明显增加,共 26 个循环(图 1B)。

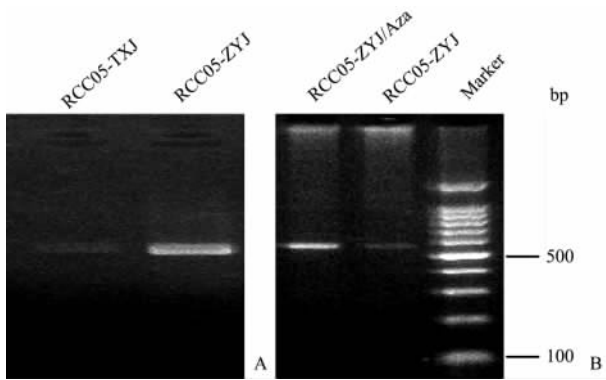


图 1 半定量 RT-PCR 检测细胞系中 GSTM3 基因的表达

Fig 1 Expression of GSTM3 in ccRCC cell lines by semi-quantitative RT-PCR

A; Expression level of GSTM3 as detected by RT-PCR in RCC05-TXJ and RCC05-ZYJ; B; Upregulation of GSTM3 after treatment with 5-Aza-CdR. RCC05-ZYJ/Aza; RCC05-ZYJ treated with 5-Aza-Cd

2.2 RT-PCR 检测组织样本结果 在 24 例原位 ccRCC 及其癌旁肾组织中,17 例原位 ccRCC 中 GSTM3 基因的表达强度低于该基因在其癌旁肾组织中表达强度,其余 7 例原位 ccRCC 中 GSTM3 基因的表达强度不低于其癌旁肾组织(图 2A)。与原位 ccRCC 组织相比较,转移组织中 GSTM3 基因表达水平明显下调(图 2B)。

2.3 巢式 BSP 及 MSP 检测结果 10 例癌组织和癌旁肾组织均见巢式 BSP 条带(图 3A)。克隆后测序发现,4 例癌组织 GSTM3 基因启动子区 CpG 岛存在甲基化,均位于+157 位点;1 例癌旁组织存在甲基化,位于-24 位点(图 4)。两位点癌组织和癌旁肾组织甲基化水平无统计学差异 ( $P_{+157} = 1$ ,  $P_{-24} = 0.087$ )。MSP 发现 10 例 ccRCC 组织标本中,4 例癌组织和 2 例癌旁组织 GSTM3 基因启动子甲基化阳性;8 例转移组织中检测到 1 例呈甲基化阳性。所有检测组织标本中,除 2 例癌组织未见非甲基化条带,其余均可见明亮条带(图 3B)。癌组织 GSTM3 基因启动子甲基化阳性与癌旁组织 ( $P = 0.628$ )、转移组织 ( $P = 0.314$ ),差别无统计学意义。

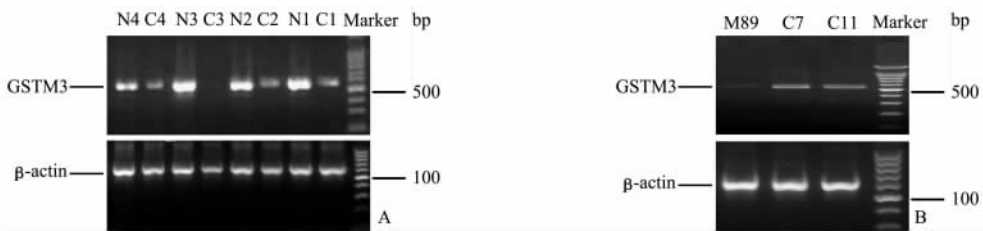


图 2 半定量 RT-PCR 检测组织样本中 GSTM3 的表达

Fig 2 Expression of GSTM3 in tissue specimens by semi-quantitative RT-PCR

A; Expression of GSTM3 in primary ccRCCs and the corresponding non-malignant tissues; B; Expression of GSTM3 in primary ccRCCs and metastatic tissues. C1, C2, C3, C4, C7, C11; ccRCC samples; N1, N2, N3, N4; ccRCC matched normal renal tissues; M89; Metastatic ccRCC; β-actin was used as an RT-PCR control

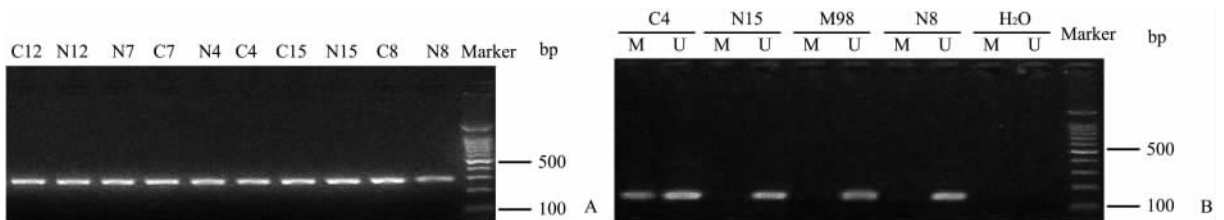


图 3 ccRCC 中 GSTM3 启动子甲基化 BSP 和 MSP 结果分析

Fig 3 Bisulfite-sequencing PCR and methylation-specific PCR of GSTM3 in ccRCC

A; Result of bisulfite-sequencing PCR; B; Result of methylation-specific PCR. Cn; ccRCC samples; Nn; ccRCC matched normal renal tissues; Mn; Metastatic ccRCC; U; Unemthylated; M; Methylated

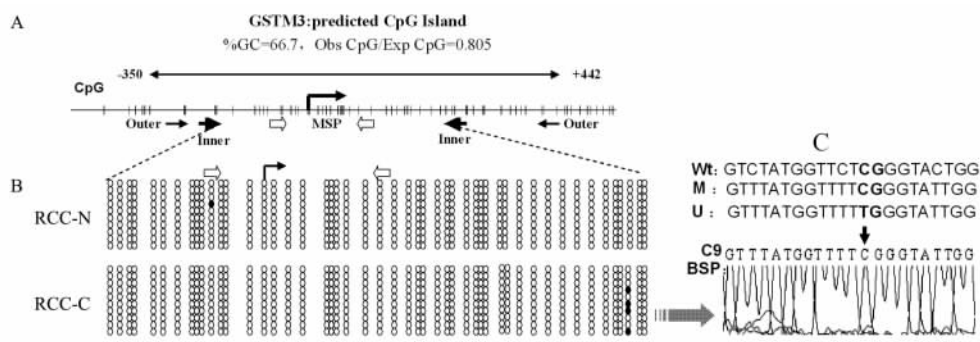


图 4 GSTM3 基因启动子 CpG 岛示意图和 BSP 产物测序结果

Fig 4 Schematic diagram of GSTM3 promoter CpG island (CGI) and sequence of BSP product

A; Schematic diagram of the GSTM3 promoter CpG island (CGI). The core promoter and CpG sites in the CGI (short vertical lines) are shown. The transcription start site (NM\_00849.3) is indicated by a curved arrow. The BSP and MSP regions analyzed are indicated. Bold arrow, outer primer for BSP; thin arrow, inner primer for BSP; empty arrow, primer for MSP. B; High-resolution mapping of the methylation status of every CpG site in the GSTM3 promoter by BSP. Each row of circles (CpG sites) represents an individual allele of the GSTM3 promoter analyzed. The transcription start site is indicated by a curved arrow, MSP primer sites by empty arrows. Black filled circle, methylated; empty circle, unmethylated. RCC-C, primary ccRCCs; RCC-N, corresponding non-malignant tissues. C; The BSP product was directly sequenced and confirmed. Methylated cytosines (C) would not be converted to uracil (T) and remained as C. On the top panel, the wild-type sequence (WT) without bisulfite conversion is shown

### 3 讨论

本研究发现, GSTM3 基因在原位 ccRCC 中表达下调例数多于非表达下调例数, 且转移组织与原位 ccRCC 比较时, 同样出现转移组织中 GSTM3 基因表达水平低于原位 ccRCC 的现象, 进一步证实了前期 cDNA 基因表达谱芯片关于 GSTM3 基因可能与 ccRCC 的发生和转移相关的结果<sup>[6]</sup>。谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferases, GSTs) 是机体在异源物质代谢过程中具有多种生物功能的一类活性蛋白质, 是体内重要的解毒酶系。GSTs 在保护机体免受致癌性化学物质攻击上起了很重要的作用。GSTM3 属于 GSTs 超家族, 可以解除许多致癌剂的活性代谢物毒性<sup>[8]</sup>。很多肿瘤的发生和发展, 包括肝癌、前列腺癌和膀胱癌等, 均与 GSTM3 基因相关<sup>[7, 15]</sup>。

导致基因表达下调的原因包括基因遗传学和基因表观遗传学改变。甲基化是基因表观遗传学作用的主要形式。DNA 启动子区 CpG 岛高度甲基化被认为是除突变和缺失以外的抑癌基因功能失活的关键机制, 是目前相关研究的热点之一<sup>[16]</sup>。GSTs 超家族成员在很多肿瘤组织中均出现异常甲基化, 包括前列腺癌<sup>[17]</sup>、乳腺癌和肾癌, 而在正常组织中却很少发现。通过生物信息学在线工具 String<sup>[18]</sup> 分析发现, GSTM3 和 GSTP1 密切相关, 由此推测 GSTM3 基因在 ccRCC 中的低表达可能与其甲基化相关。

5-Aza-CdR 是胞苷类似物, 作为去甲基化制剂, 它的作用机制是通过与 DNA 甲基化转移酶共价结合, 降低 DNA 甲基化转移酶的生物活性, 从而降低甲基化水平<sup>[19]</sup>。本研究结果发现, ccRCC 细胞系 RCC-ZYJ 在 5-Aza-CdR 干预后 GSTM3 基因表达上调。结果提示 ccRCC 中 GSTM3 基因启动子区存在甲基化, 而且是使其表达下调的原因之一。5-Aza-CdR 不仅可用于间接检测基因甲基化, 而且该药物目前已经用于白血病的临床治疗<sup>[19]</sup>。尽管目前仅在 RCC 细胞系中证实 5-Aza-CdR 可恢复甲基化沉默的肿瘤相关基因表达<sup>[20]</sup>, 抑制肿瘤细胞生长, 尚未得到动物及临床试验方面证实, 但相信随着研究的进一步深入, 有望将其应用于 RCC 的治疗。

MSP 是一种较好的用来分析甲基化位点和程度的方法。该法灵敏度高, 可检出比例为千分之一的甲基化等位片段, 且对 DNA 的质和量要求也低, 能用于微量 DNA, 临床可以用敏感的 MSP 法检测血清、痰等标本, 反映特定基因启动子高甲基化改变<sup>[21]</sup>。然而为保证 MSP 具有良好的特异性, 首先要通过 BSP 明确所研究基因的具体甲基化位点后设计特异性高的引物。本研究不仅测得在 ccRCC 原位肿瘤中 GSTM3 基因甲基化为 40%, 超过了 Zhang 等<sup>[22]</sup> 关于 DLC1 基因在 RCC 肿瘤组织中 35% 的检出率, 而且还通过测序得到 GSTM3 基因甲基化位点初步情况。但由于样本量较少, 所测得 -24 和 +157 两位点的甲基化在癌与癌旁差别无统计学意义, 鉴别 ccRCC 特异性不高, 待扩大样本量

后,进一步明确甲基化位点情况,设计出特异性更好的 MSP 引物。

RCC 中很多基因存在甲基化现象,但甲基化率都很低,包括 VHL、GSTP1、RASSF1A 等<sup>[23]</sup>,仍缺乏 GSTM3 基因的相关报道。本研究结果发现,10 例原位 ccRCC 及其癌旁组织和 8 例转移组织中,癌组织 GSTM3 基因启动子甲基化阳性率为 40%,与癌旁组织 20% ( $P=0.628$ )、转移组织 12.5% ( $P=0.314$ ),差异无统计学意义。此结果可能与样本量较小和样本病理组织成分不均一有关,有待今后扩大样本量及改进样本病理组织成分后,进一步明确 GSTM3 基因甲基化和 ccRCC 发生和转移的关系。

总之,本研究进一步明确 ccRCC 中 GSTM3 基因的甲基化是导致其表达下调一个原因;发现去甲基化剂 5-Aza-CdR 能逆转 GSTM3 基因甲基化状态,增强 GSTM3 基因表达,值得进一步研究以用于 ccRCC 的临床治疗;初步明确了 GSTM3 基因启动子区 CpG 岛的甲基化位点,为进一步建立 ccRCC 中 GSTM3 基因 CpG 岛甲基化图谱奠定了基础,对确定 ccRCC 易感性遗传标记及寻找 ccRCC 早期诊断的分子标记物具有重要意义。

## [参考文献]

- [1] McLaughlin J K, Lipworth L, Tarone R E. Epidemiologic aspects of renal cell carcinoma[J]. *Semin Oncol*, 2006, 33: 527-533.
- [2] Störkel S, Eble J N, Adlakha K, Amin M, Blute M L, Bostwick D G, et al. Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC) [J]. *Cancer*, 1997, 80: 987-989.
- [3] Jungwirth A, Schally A V, Pinski J, Groot K, Armatys P, Halamos G. Growth hormone-releasing hormone antagonist MZ-4-71 inhibits *in vivo* proliferation of Caki-I renal adenocarcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 5810-5813.
- [4] 孙浚雯, 常文军, 翟羽佳, 谭晓洁, 侯建国, 余永伟, 等. 基因组消减杂交技术筛选肾透明细胞癌转移相关甲基化基因[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 485-490.
- [5] 杜稳斌, 侯建国, 武旗, 常文军, 翟羽佳, 林丽萍, 等. 前列腺癌组织中谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因启动子区域甲基化序列分析[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 762-767.
- [6] Tan X, Zhai Y, Chang W, Hou J, He S, Lin L, et al. Global analysis of metastasis-associated gene expression in primary cultures from clinical specimens of clear-cell renal-cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2008, 123: 1080-1088.
- [7] Ladero J M, Martínez C, Fernández J M, Martín F, García-Martín E, Roperio P, et al. Glutathione S-transferases pi 1, alpha 1 and M3 genetic polymorphisms and the risk of hepatocellular carcinoma in humans [J]. *Pharmacogenomics*, 2007, 8: 895-899.
- [8] Sikdar N, Paul R R, Roy B. Glutathione S-transferase M3 (A/A) genotype as a risk factor for oral cancer and leukoplakia among Indian tobacco smokers [J]. *Int J Cancer*, 2004, 109: 95-101.
- [9] 翟羽佳, 谭晓洁, 侯建国, 肖建如, 徐丹枫, 余永伟, 等. 汉族人肾透明细胞癌细胞系的建立 [J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 479-484.
- [10] Tollefsbol T O. Epigenetics protocols [M] // Liu L, Wylie R C, Hansen N J, Andrews L G, Tollefsbol T O. Profiling DNA methylation by bisulfite genomic sequencing: problems and solutions. New York: Humana Press, 2004: 169-179.
- [11] Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes [J]. *J Mol Biol*, 1987, 196: 261-282.
- [12] <http://cpgislands.usc.edu> [2007-09-04]
- [13] <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html> [2007-09-14]
- [14] Li L C, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18: 1427-1431.
- [15] Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Ferreira P, Lobo F, et al. Metabolic susceptibility genes and prostate cancer risk in a southern European population: the role of glutathione S-transferases GSTM1, GSTM3, and GSTT1 genetic polymorphisms [J]. *Prostate*, 2004, 58: 414-420.
- [16] Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer [J]. *Nat Genet*, 2003, 33(Suppl): 238-244.
- [17] Nakayama M, Gonzalgo M L, Yegnasubramanian S, Lin X, De Marzo A M, Nelson W G. GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular biomarker for prostate cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 91: 540-552.
- [18] <http://string.embl.de> [2007-12-25]
- [19] Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, Huang X, O'Brien S, Cortes J, et al. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia [J]. *Blood*, 2007, 109: 52-57.
- [20] To K K, Zhan Z, Bates S E. Aberrant promoter methylation of the ABCG2 gene in renal carcinoma [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 8572-8585.
- [21] Palmisano W A, Divine K K, Saccomanno G, Gilliland F D, Baylin S B, Herman J G, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 5954-5958.
- [22] Zhang Q, Ying J, Zhang K, Li H, Ng K M, Zhao Y, et al. Aberrant methylation of the 8p22 tumor suppressor gene DLC1 in renal cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2007, 249: 220-226.
- [23] Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Uzzo R G, Al-Saleem T, Greenberg R E, Polascik T J, et al. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(12 Pt 1): 3972-3979.

[本文编辑] 贾泽军