

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00884

PTCH1 基因甲基化在胃癌发病中的作用

左云,高军,李兆申*,宋宇,涂建成,程志健,王浩,丰宇芳,陈亚楠,刘苏霞,龚燕芳
第二军医大学长海医院消化内科,上海 200433

[摘要] **目的:**探讨 PTCH1 基因甲基化在胃癌发生中的作用及去甲基化试剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-dC)对胃癌的治疗作用。**方法:**选取 10 例胃癌组织及其癌旁正常组织和胃癌细胞株 AGS,抽提组织和细胞的总 RNA 和基因组 DNA。实时定量 QRT-PCR 检测 PTCH1 基因的 mRNA 表达,MSP(methylation specific PCR)分析 PTCH1 基因启动子区甲基化变化。用 5-Aza-dC 处理 AGS 细胞株,流式细胞术检测细胞周期和凋亡并观察 PTCH1 基因甲基化水平的改变。**结果:**胃癌组织、癌旁正常组织和胃癌细胞株 AGS 中 PTCH1 基因表达和启动子甲基化水平呈负相关,相关系数为-0.591($P=0.006$);5-Aza-dC 的处理可引起胃癌细胞 AGS 细胞发生凋亡和 G₀/G₁ 期阻滞,PTCH1 基因发生去甲基化变化并表达增加。**结论:**PTCH1 基因启动子区高甲基化是胃癌细胞 PTCH1 低表达主要原因之一,5-Aza-dC 能逆转 PTCH1 基因甲基化状态,调控其表达,对胃癌具有一定的治疗作用。

[关键词] 胃肿瘤;PTCH1 基因;Hedgehog 信号通路;DNA 甲基化;5-氮杂-2'-脱氧胞苷

[中图分类号] R 735.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)08-0884-04

Role of PTCH1 gene hypermethylation in tumorigenesis of gastric cancer

ZUO Yun,GAO Jun,LI Zhao-shen*,SONG Yu,TU Jian-cheng,CHENG Zhi-jian,WANG Hao,FENG Yu-fang,CHEN Yan-nan,LIU Su-xia,GONG Yan-fang

Department of Gastroenterology,Changhai Hospital,Second Military Medical University,Shanghai 200433,China

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effect of PTCH1 methylation on gastric carcinogenesis and the therapeutic effect of methylation inhibitor, 5-aza-2'-deoxyeytidine (5-aza-dC), for treatment of gastric cancer. **Methods:** The total RNAs were extracted from 10 gastric cancer tissues, their corresponding adjacent normal tissues, and gastric cancer cell line AGS. The PTCH1 mRNA expression was detected by Quantitative real-time PCR (QRT-PCR) and the methylation of the promoter was examined by methylation specific PCR (MSP). AGS cells were treated by 5-Aza-dC; the cell cycle and apoptosis were examined by flow cytometry, and the methylation level was also observed. **Results:** PTCH1 expression was negatively correlated with promoter methylation in gastric cancer tissues, their corresponding adjacent normal tissues, and gastric cancer cell line AGS($r=-0.591, P=0.006$). 5-Aza-dC treatment caused apoptosis and G₀/G₁ phase arrest of AGS cells, and also induced demethylation of PTCH1 and increased its expression. **Conclusion:** Hypermethylation of PTCH1 gene promoter region is one of the main causes of low PTCH1 expression in AGS cells. Demethylation agent 5-Aza-dC can reverse this methylation status of PTCH1 and regulate the expression of PTCH1, suggesting a role for it in gastric cancer treatment.

[KEY WORDS] stomach neoplasms; PTCH1 gene; hedgehog signal pathway; methylation; 5-aza-2'-deoxyeytidine

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(8): 884-887]

Hedgehog(HH)信号通路为调控胚胎发育过程的重要分子机制之一,其活化参与多种实体肿瘤的发生^[1-2]。HH 信号通路主要包括 SHH、HHIP、PTCH1、Smo 和 Gli 等成员,其中 PTCH1 基因是 HH 信号通路的负调控因子,抑制 PTCH1 的表达可使 HH 通路活化。既往报道 PTCH1 基因可发生甲基化,可能与某些肿瘤的形成有关^[3],但其甲基化与胃癌的关系尚未见报道。本研究观察了胃癌组织和

细胞株中 PTCH1 基因的甲基化状态与表达,以及去甲基化试剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-dC)对胃癌细胞株 PTCH1 基因甲基化和表达的影响,初步揭示了 PTCH1 高甲基化在胃癌发生的作用。

1 材料和方法

1.1 标本及细胞培养 收集我院进行胃癌根治术的胃癌及癌旁组织各 10 例,每例标本的癌组织和癌

[收稿日期] 2009-01-01 **[接受日期]** 2009-06-30

[作者简介] 左云,博士. E-mail:zuoyun1@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81873241, E-mail:zhshli@81890.net

旁正常组织均常规病理切片证实,并液氮保存。其中男性患者7例,女性患者3例,中位年龄60岁,无其他部位原发肿瘤,手术前未接受任何治疗。人胃癌细胞株 AGS 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞中心,用含10%胎牛血清的 Ham's F12K 培养液 37℃、5%CO₂ 常规培养。

1.2 主要试剂及仪器 5-Aza-dC 购自 Sigma 公司; TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; RNA 反转录试剂盒、PI 试剂和 Annexin V/PI 双染法流式凋亡检测试剂盒均购自上海晶美生物工程有限公司; 甲基化转化试剂盒 EZ DNA Methylation-Gold Kit™ 购自北京天漠科技开发有限公司; ABI7500 型实时定量 PCR 仪由美国应用生物系统公司生产。

1.3 5-Aza-dC 处理 AGS 细胞 AGS 细胞株按每瓶 3×10⁵ 接种于 100 ml 培养瓶中,约 24 h 后细胞进入对数生长期,于培养瓶中加入终浓度为 5×10⁻⁶ mol/L 5-Aza-dC 处理,24 h 换液 1 次,连续处理 3 d,收集细胞。同时设未加 5-Aza-dC 的平行培养的细胞作为对照。培养细胞抽提 RNA 和 DNA 进行实验分析。

1.4 总 RNA 抽提、cDNA 合成及 DNA 抽提 100 mg 组织在液氮中研磨成粉末状,或约 1×10⁶ AGS

细胞株用 PBS 冲洗后离心收集,按常规方法抽提总 RNA(用 50 μl TE 溶解),电泳检测 RNA 浓度及纯度。取 1 μl 总 RNA,加入 1 μl 0.5 μg/μl Oligo-dT18、10 μl DEPC-H₂O,混匀,70℃水浴 5 min 后迅速置冰上冷却,再依次加入以下试剂:4 μl 的 5×反应缓冲液,1 μl 的 20 U/μl RNA 酶抑制剂,2 μl 的 10 mmol/L dNTP,混匀后 37℃水浴 5 min;再加入 1 μl 的 200 U/μl 反转录酶(M-MuLV),42℃水浴 60 min 后,70℃水浴 10 min 终止合成反应,合成的 cDNA 产物-20℃冻存备用。组织和细胞 DNA 按常规的酚/氯仿抽提方法获得,NanoDrop-1000 全波长紫外/可见光扫描分光光度计测定 DNA 质量。

1.5 PTCH1 基因的实时定量 QRT-PCR 检测 取 cDNA 产物 2 μl 为模板,加入 PTCH1 上下游引物(表 1)各 0.5 μl,2×SYBR Green RealTime PCR Master Mix 液 10 μl,无菌水 7 μl,在 ABI7500 型实时定量 PCR 仪上进行 35 个扩增循环检测,条件为 95℃ 5 s、55℃ 5 s、72℃ 30 s。以 β-actin 作为内参。扩增产物行溶解曲线分析,采用 2^{-ΔΔC_t} 进行 PTCH1 基因相对表达量的计算并进行琼脂糖凝胶电泳分析。

表 1 引物序列和扩增产物长度
Tab 1 Primer and length of PCR product

PCR type	Gene	Primer	Product length(bp)
QRT-PCR	PTCH1	5'-TGT GCG CTG TCT TCC TTC TG-3'	119
		5'-ACG GCA CTG AGC TTG ATT C-3'	
	β-actin	5'-GCC ATC CTG CGT CG-3'	260
		5'-TGG GCA CCG GAA CCG CT-3'	
MSP	Methylation	5'-GTT AAT TCG TGA TTT TTC GGA-3'	197
		5'-ATA ACA AAC CTA CGA ACC GC-3'	
	Unmethylation	5'-AAT GTT AAT TTG TGA TTT TTT GGA-3'	197

1.6 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡 收集处理和未处理的 AGS 细胞各约 1×10⁶ 细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液。3 ml 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)洗涤 1 次。离心去 PBS,加入冰预冷的 70%的乙醇 1 ml 4℃固定 24 h 以上。离心弃去固定液,3 ml PBS 重悬 5 min。400 目的筛网过滤 1 次,离心去 PBS。用 1 ml 的 PI 染液(终浓度为 100 μg/ml,0.01 mol/L PBS,pH 7.4)染色,4℃避光 30 min。流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡率。

1.7 重亚硫酸盐转化 DNA 采用 EZ DNA Methylation-Gold Kit™ 甲基化试剂盒,按说明书操作。大体步骤如下:取 20 μl DNA(500 ng)样品,加入 130 μl 配备好的 CT Conversion Reagent,混合后 98℃放置 10 min,64℃放置 2.5 h,4℃保存备用。用

600 μl 的 M-Binding Buffer 加入活化的 Zymo-spin 离心柱中;然后将 4℃保存的转化 DNA 加入 Zymo-spin 离心柱中,颠倒混匀,全速离心 30 s,去除流出液;再加入 100 μl 的 M-Wash Buffer 到柱中,离心 30 s;加入 200 μl 的 M-Desulphonation Buffer 到柱中并且放置 15~20 min,全速离心 30 s;加入 200 μl 的 M-Wash Buffer 到柱中,离心 30 s;加入 30 μl M-Elution Buffer,离心收集转化好的 DNA。转化的 DNA 可-20℃保存 1 周备用。

1.8 MSP(methylation specific PCR)检测 应用 ABI 公司的 Methyl Primer Express v1.0 软件对 PTCH1 mRNA 转录体转录起始位点(计为 0 点)上游-3 950 bp 和下游+2 050 bp 进行 CpG 岛分析和引物设计,MSP 引物见表 1。取重亚硫酸盐处理过

的 DNA 8 μ l,按常规方法配制反应体系,进行降温 PCR 扩增,大体步骤如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,前 10 个循环为降温 PCR(94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,复性温度每个循环降 0.5 $^{\circ}$ C,从 T_m 值+3 $^{\circ}$ C 降到 T_m 值-2 $^{\circ}$ C,时间 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s)。后 40 个循环为普通 PCR (94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,T_m 值-2 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s)。扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。PTCH1 基因 mRNA 相对表达量在胃癌组织和癌旁正常组织之间的差异分析采用非参数 Mann-Whitney U 检验,PTCH1 基因启动子甲基化率在癌组织和癌旁正常组织之间的差异分析采用 Fisher 精确检验,胃癌组织 PTCH1 甲基化率与表达的相关性分析采用 Spearman's 检验。

2 结果

2.1 PTCH1 基因 mRNA 在胃癌细胞 AGS、胃癌组织和癌旁正常组织中的表达 实时定量 QRT-PCR 检测发现,PTCH1 基因在胃癌组织和胃癌细胞 AGS 中存在一定的表达,设定 AGS 为参照样品种,

癌旁正常组织和胃癌组织的 PTCH1 的相对表达量分别为 1.26 \pm 0.89 和 2.74 \pm 1.67,两组之间存在统计学差异($n=10, P=0.023$)。

2.2 MSP 检测 PTCH1 基因启动子区域在胃癌组织和癌旁正常组织中的甲基化变化 为了观察 PTCH1 基因在胃癌组织中甲基化的发生率,我们对 10 例胃癌组织及其癌旁正常组织进行了 MSP 检测,6 例癌组织和 1 例癌旁正常组织存在甲基化扩增带,发生率分别为 60% 和 20% (Fisher 确切概率,双尾检测 $P=0.057$,单尾检测 $P=0.029$)。一定程度表明胃癌组织中 PTCH1 基因存在高甲基化状态。图 1 为部分代表性电泳图。

2.3 胃癌组织中 PTCH1 甲基化率与表达的相关性分析 为了进一步分析 PTCH1 表达与其启动子甲基化之间的关系,我们对 10 例胃癌和癌旁正常组织中 PTCH1 基因的甲基化与相对表达量进行了相关性分析,发生甲基化的组织与未发生甲基化的组织中 PTCH1 的实时定量 QRT-PCR 值分别为 0.93 \pm 0.71 和 2.58 \pm 1.52,与甲基化状态呈负相关,相关系数为 -0.591($P=0.006$)。

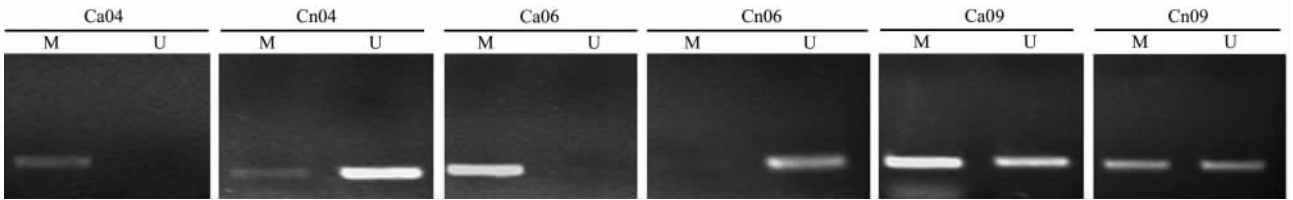


图 1 胃癌和癌旁正常组织中 PTCH1 基因启动子 MSP 产物电泳图

Fig 1 Products of methylation-specific PCR (MSP) of PTCH1 gene promoter in gastric cancer and adjacent normal tissues

Ca; Gastric cancer; Cn; Adjacent normal tissue; M; Methylation PCR production; U; Unmethylation PCR production

2.4 5-Aza-dC 处理对胃癌 AGS 细胞周期和凋亡及 PTCH1 基因甲基化状态的影响 对数生长期的 AGS 细胞经 5 \times 10⁻⁶ mol/L 5-Aza-dC 处理 72 h 后,收集细胞进行 PI 染色的细胞周期检测(图 2),处理后 AGS 细胞出现 G₀/G₁ 期阻滞。同时,收集的细胞进行 Annexin V /PI 双染法检测细胞凋亡,处理后 AGS 细胞出现明显凋亡细胞。3 次独立实验结果表明,处理组与对照组之间存在显著差异($P<0.05$,图 2)。对 5-Aza-dC 处理前后的 AGS 细胞内 PTCH1 基因甲基化和表达分别进行了 MSP 和相对表达量的测定,如图 3 所示,处理前胃癌 AGS 细胞表现为 PTCH1 基因甲基化序列得到扩增而去甲基化序列不能扩增,PTCH1 基因 mRNA 相对表达量较低;处理后胃癌 AGS 细胞表现为 PTCH1 基因去甲基序列得到扩增而甲基化序列不能扩增,PTCH1 基因 mRNA 相对表达量升高。进一步表明 PTCH1

基因高甲基化与其表达呈负相关。

3 讨论

近年来肿瘤表观遗传学研究发现,肿瘤组织细胞的基因组 DNA 存在广泛低甲基化和部分区域 CpG 岛的高甲基化,其中 CpG 岛局部高甲基化可导致部分抑癌基因失活,是引起细胞恶性转化的重要机制^[4]。应用去甲基化制剂 5-Aza-dC 可使这些高甲基化的基因重新获得表达,从而发挥抑癌作用^[5]。

HH 信号通路是一个调控胚胎发育的重要信号转导通路,HH 信号在胚胎形成时期最为活跃,而在正常成熟组织中无表达或仅低表达。然而,在成熟组织和器官的细胞中 HH 信号转导的异常激活可引起各种疾病和肿瘤。既往研究^[6]报道,在小细胞肺癌组织及细胞系中可检测到 SHH 高表达,81% 消化道来源的肿瘤细胞系(包括食管、胃、胆管和

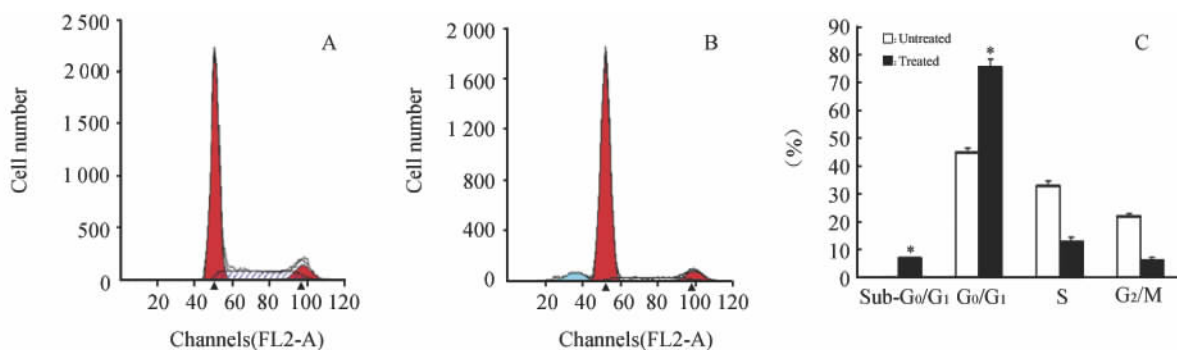


图 2 5-Aza-dC 作用胃癌 AGS 细胞后流式细胞仪检测细胞周期变化

Fig 2 Cell cycle of gastric cancer cell line AGS treated with 5-Aza-dC

A: Untreated cells; B: Treated cells; C: The statistic result of cell cycle (* $P < 0.05$; $n = 3, \bar{x} \pm s$)

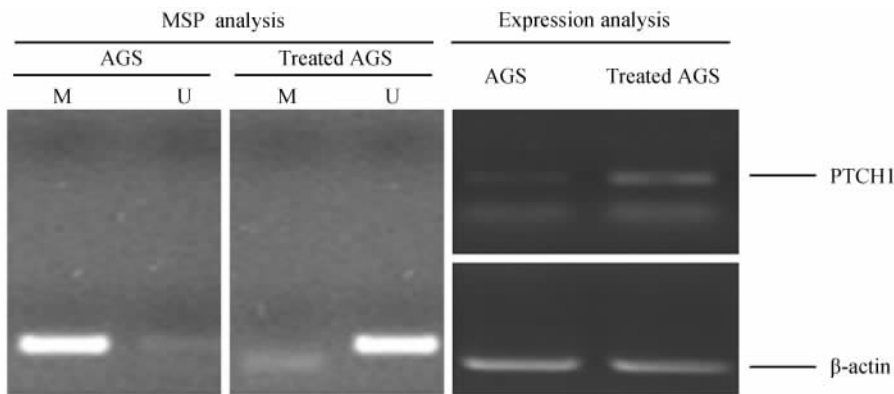


图 3 5-Aza-dC 作用胃癌 AGS 细胞后 PTCH1 基因甲基化及其 mRNA 表达的检测

Fig 3 PTCH1 methylation and PTCH1 mRNA expression of gastric cancer cell AGS treated with 5-Aza-dC

M: Methylation PCR production; U: Unmethylation PCR production

胰腺)表达 SHH 及其受体 PTCH^[7], SHH 抑制因子 HHIP 在胃肠道肿瘤存在高甲基化^[8]。在既往文献报道中,未见 PTCH1 基因在胃癌中的缺失和突变的报道,几乎未见 PTCH1 基因甲基化与胃癌的关系的研究报道,本实验发现在胃癌组织、癌旁正常组织、人胃癌细胞株中均能检测到 PTCH1 mRNA,且癌旁正常组织较癌组织表达较高,在胃癌组织和细胞株中存在高甲基化,表明 PTCH1 基因作为抑癌基因,其高甲基化修饰可能是胃癌发生的机制之一。

本研究初步发现胃癌发生中存在 PTCH1 基因启动子区域高甲基化现象。深入研究参与调控 PTCH1 甲基化变化的分子机制,其高甲基化与胃癌的生物学特征的关系,可为 PTCH1 基因高甲基化作为胃癌标志物,并指导胃癌的治疗及预后,提供更为科学的实验依据。

[参考文献]

[1] Gao J, Li Z, Chen Z, Shao J, Zhang L, Xu G, et al. Antisense Smo under the control of the PTCH1 promoter delivered by an adenoviral vector inhibits the growth of human pancreatic cancer

er[J]. Gene Ther, 2006, 13: 1587-1594.
 [2] Shao J, Zhang L, Gao J, Li Z, Chen Z. Aberrant expression of PTCH (patched gene) and Smo (smoothened gene) in human pancreatic cancerous tissues and its association with hyperglycemia[J]. Pancreas, 2006, 33: 38-44.
 [3] Pritchard J I, Olson J M. Methylation of PTCH1, the Patched-1 gene, in a panel of primary medulloblastomas[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2008, 180: 47-50.
 [4] Fang J Y, Xiao S D. Alteration of DNA methylation in gastrointestinal carcinogenesis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2001, 16: 960-968.
 [5] To K F, Leung W K, Lee T L, Yu J, Tong J H, Chan M W, et al. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in gastric intestinal metaplasia of patients with and without gastric cancer [J]. Int J Cancer, 2002, 102: 623-628.
 [6] Watkins D N, Berman D M, Burkholder S G, Wang B, Beachy P A, Baylin S B. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer[J]. Nature, 2003, 422: 313-317.
 [7] Ma X, Sheng T, Zhang Y, Zhang X, He J, Huang S, et al. Hedgehog signaling is activated in subsets of esophageal cancers[J]. Int J Cancer, 2006, 118: 139-148.
 [8] Taniguchi H, Yamamoto H, Akutsu N, Noshio K, Adachi Y, Imai K, et al. Transcriptional silencing of hedgehog-interacting protein by CpG hypermethylation and chromatin structure in human gastrointestinal cancer[J]. J Pathol, 2007, 213: 131-139.