

子宫内膜癌中 SFRP1 基因启动子甲基化及其 mRNA 表达

Methylation of SFRP1 gene promoter and its mRNA expression in endometrial carcinoma

黄启成^{1*}, 陆锦标², 汤春晖¹

1. 南通大学附属医院妇产科, 南通 226001

2. 南通大学医学院病理解剖学教研室, 南通 226001

[摘要] **目的** 研究子宫内膜癌中 SFRP1 基因启动子甲基化及其对 SFRP1 mRNA 表达的影响。**方法** 应用甲基化特异性 PCR 技术检测 36 例子宫内膜癌组织和对应癌旁组织中 SFRP1 基因启动子甲基化状态, RT-PCR 方法检测上述样本的 mRNA 表达水平, 并对结果进行统计学分析。**结果** 子宫内膜癌组织中 SFRP1 基因启动子甲基化的阳性率为 47.2%, 癌旁组织中为 11.1%, 两者比较差异有统计学意义 ($P=0.001$)。14 例存在启动子甲基化和 5 例无启动子甲基化的子宫内膜癌组织中缺乏 SFRP1 mRNA 表达或表达较癌旁组织明显下降。**结论** SFRP1 基因启动子甲基化在子宫内膜癌中常见, 部分成为其表达下降的原因。

[关键词] 子宫内膜肿瘤; SFRP1 基因; DNA 甲基化

[中图分类号] R 737.33 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)04-0450-03

子宫内膜癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一。大多数与雌激素过度刺激有关, 但其确切的发病机制尚未明了。已有的研究表明, 微卫星不稳定、PTEN、K-Ras 和 β -catenin 等基因异常可能参与其中^[1]。Wnt 信号通路在细胞的增生、运动和分化中发挥着重要作用, 其异常激活参与了多种肿瘤的发生。细胞外配体 Wnt 蛋白与跨膜受体 Frizzled 结合后, 能抑制 GSK3 β 对该信号通路关键分子 β -catenin 的磷酸化作用, 避免后者被泛素化蛋白酶体识别和降解。由此, β -catenin 在细胞质内积聚并转位进入核内, 与转录因子结合后激活基因表达^[2]。

Secreted frizzled-related proteins-1(SFRP1)是近年来受到关注的一种分泌型糖蛋白, 其在细胞外竞争性结合 Frizzled 受体而发挥拮抗 Wnt 信号通路的作用^[2]。在结肠癌、乳腺癌和肝癌等多种恶性肿瘤中的研究发现, SFRP1 基因因启动子甲基化而失活^[3-6], 由此出现的表达下降可能导致拮抗作用降低而使 Wnt 信号通路处于异常激活状态。本研究通过比较子宫内膜癌和癌旁组织中 SFRP1 基因启动子甲基化和表达水平, 探讨 SFRP1 在子宫内膜癌发生进展中的作用。

1 材料和方法

1.1 病例和组织 36 例子宫内膜癌及其癌旁子宫内膜组织取自南通大学附属医院妇产科手术标本。组织经液氮速冻后-70℃保存备用。患者年龄 45~66 岁, 中位年龄 60 岁。病理诊断均为子宫内膜样腺癌, 按 FIGO 标准进行病理组织学分级和手术病理分期, 其中 G1 级 12 例, G2 级 16 例, G3 级 8 例; I 期 21 例, II 期 11 例, III 期 4 例。

1.2 甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP) 经典苯酚-氯仿法抽提基因组 DNA。采用 EZ DNA 甲基化试剂盒(Zymo Research 公司)对 1 μ g DNA 进行亚硫酸盐修饰, 然后用甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物(表 1)进行 PCR 扩增, 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳后观察结果。MSP 反应体系: 总体积 25 μ l, 含 1 \times 缓冲液, 0.5 μ mol/L 上游引物, 0.5 μ mol/L 下游引物, 50100 ng 修饰后 DNA 模板, 1 U Hotstar Taq DNA 多聚酶(Qiagen 公司)。PCR 反应在热循环仪中进行, 95℃热启动 10 min, 运行 35 个循环(95℃变性 30 s, 61℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s), 最后 72℃延伸 10 min。

表 1 PCR 引物

PCR	基因	引物序列(5'-3')	退火温度 θ /℃	产物长度(bp)
MSP	甲基化 SFRP1	上游 GTG TCG CGC GTT CGT CGT TTC GT 下游 AAC GTT ACC CGA CTC CGC GAC CG	61	173
	非甲基化 SFRP1	上游 GAG TTA GTG TTG TGT GTT TGT TGT TTT GT 下游 CCC AAC ATT ACC CAA CTC CAC AAC CA	61	180
RT-PCR	SFRP1 mRNA	上游 CGG CAG AGT CCT TAG TGG AG 下游 CAC ATC CAA ATG CAA ACT GG	58	687
	GAPDH mRNA	上游 GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT 下游 TGT GGT CAT GAG TCC TTC CA	55	512

[收稿日期] 2009-12-21 [接受日期] 2010-03-12

[作者简介] 黄启成, 主治医师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0513-85850510, E-mail: Campolord@yahoo.com.cn

1.3 RT-PCR TRIzol 试剂提取总 RNA。1 μ g RNA 用 Superscript II 逆转录酶 (Invitrogen 公司) 逆转录成 cDNA, 使用设计的引物 (表 1) 进行 PCR 扩增。以 GAPDH 作为内参照。PCR 反应体系为 25 μ l, 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 运行 30 个循环 (95 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s), 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后分析。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子宫内 膜癌中 SFRP1 基因启动子甲基化 17 例 (47.2%) 子宫内 膜癌组织和 4 例 (11.1%) 癌旁组织中存在 SFRP1 基因启动子甲基化 (图 1), 采用 χ^2 检验对 2 种组织 SFRP1 基因启动子甲基化发生率进行比较, 结果显示组间差异具有统计学意义 ($P=0.001$)。

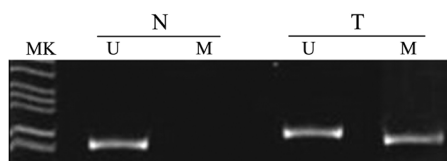


图 1 子宫内 膜癌 SFRP1 基因启动子甲基化情况

MK: Marker; N: 癌旁组织; T: 子宫内 膜癌组织; U: 非甲基化基因; M: 甲基化基因

2.2 子宫内 膜癌中 SFRP1 基因 mRNA 表达和基因启动子甲基化的关系 36 例子宫内 膜癌组织中 8 例无 SFRP1 mRNA 表达, 其对应癌旁组织均存在 SFRP1 mRNA 表达 (图 2), 13 例子宫内 膜癌组织中 SFRP1 mRNA 表达较对应癌旁组织明显下降。17 例存在 SFRP1 基因启动子甲基化中 6 例无 SFRP1 mRNA 表达, 8 例可观察到 SFRP1 mRNA 表达下降。

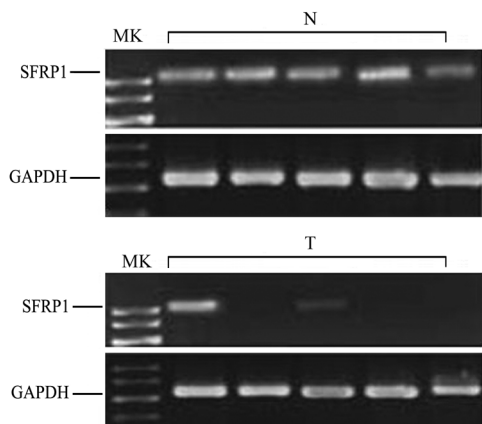


图 2 子宫内 膜癌 SFRP1 mRNA 表达情况

MK: Marker; N: 癌旁组织; T: 子宫内 膜癌组织

2.3 子宫内 膜癌 SFRP1 基因甲基化与临床病理参数间的关系 SFRP1 基因启动子甲基化存在与否与患者年龄、病理组织学分级、有无肌层浸润及手术病理分期无关 (表 2)。

表 2 子宫内 膜癌 SFRP1 基因启动子甲基化与临床病理参数的关系

参数	例数	SFRP1 甲基化[n(%)]	P 值
年龄 (岁)			
<50	7	4(57.1)	0.684
≥ 50	29	13(44.8)	
病理分级			
G1	12	5(41.7)	0.422
G2	16	7(43.8)	
G3	8	5(62.5)	
肌层浸润			0.732
无	12	5(41.7)	
有	24	12(50)	
病理分期			0.815
I	21	9(42.9)	
II	11	6(54.5)	
III	4	2(50)	

3 讨论

细胞外配体 Wnt 蛋白与其跨膜受体 Frizzled 结合后能抑制胞质内 β -catenin 的降解, 后者转位入核内而启动转录过程。多种肿瘤中存在 β -catenin 基因突变, 转录翻译的蛋白质难以降解而导致细胞内 Wnt 信号通路的结构性激活。在子宫内 膜癌中, 约 20% 的病例存在 β 连环蛋白基因突变^[1], 且与其他子宫内 膜癌中常见的遗传学异常如 MSI、K-ras 和 PTEN 异常并无关联^[7], 提示 Wnt 信号通路异常可能相对独立地在子宫内 膜癌的发生发展中发挥作用。

近年来的研究表明, 除 β -catenin 基因突变外, 涉及信号通路中的抑制基因异常同样可能导致 Wnt 信号通路的激活。SFRP1 通过与 Wnt 蛋白竞争性结合 Frizzled 而发挥抑制信号通路的作用。Suzuki 等^[3-4] 首先在结肠癌中发现存在 SFRP1 基因启动子甲基化, 其后又证实表观修饰所导致的表达下降与结肠癌进展有关。随后的研究在多种肿瘤中均有类似发现^[5-6]。在本研究中, 36 例子宫内 膜癌中 17 例存在 SFRP1 基因启动子甲基化, 其中 14 例伴随表达下降甚至缺失, 提示 SFRP1 基因启动子甲基化在子宫内 膜癌发生和进展中同样发挥着重要的作用。其中 7 例子宫内 膜癌中虽无 SFRP1 基因启动子区甲基化, 但其表达却明显下降, 一方面提示 SFRP1 表达下降在子宫内 膜癌中是常见事件, 并可能是最终导致 Wnt 信号通路异常激活的原因之一, 另一方面也预示着还有其他机制导致 SFRP1 表达下降。除启动子区甲基化外, 基因突变或杂合性缺失等都可能是导致抑癌基因失活表达下降的原因, 但累及 SFRP1 基因的这些方面的异常目前尚无报道。

最近的一些研究进一步显示了 SFRP1 在调控 Wnt 信号通路参与肿瘤发生进展中的重要作用。Shih 等^[8] 发现, 体外肝癌细胞系在外源性表达 SFRP1 后核内 β -catenin 的积聚减少, 提示其对经典的 Wnt/ β -catenin 通路具有直接调控作用。Yang 等^[9] 证实在乳腺癌细胞中, SFRP1 除了能抑制经典的 Wnt/ β -catenin 通路外, 还能抑制非经典的 Wnt/钙离子通路,

并最终降低细胞的生长活性。Chung 等^[10]还发现 SFRP1 能降低宫颈癌细胞的侵袭能力。SFRP1 基因对 Wnt 信号通路重要的调控作用,有望使其成为候选的治疗靶点。

[参考文献]

- [1] Tavassoli F A, Devilee P. World Health Organization Classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs[M]. Lyon: IARC Press, 2003.
- [2] Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 13): 2627-2634.
- [3] Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijnenberg M P, et al. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer[J]. Nat Genet, 2002, 31: 141-149.
- [4] Suzuki H, Watkins D N, Jair K W, Schuebel K E, Markowitz S D, Chen W D, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer[J]. Nat Genet, 2004, 36: 417-422.
- [5] Veeck J, Niederacher D, An H, Klopocki E, Wiesmann F, Betz B, et al. Aberrant methylation of the WNT antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis[J]. Oncogene, 2006, 25: 3479-3488.
- [6] Shih Y L, Shyu R Y, Hsieh C B, Lai H C, Liu K Y, Chu T Y, et al. Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 2006, 107: 579-590.
- [7] Palacios J, Catasús L, Moreno-Bueno G, Matias-Guiu X, Prat J, Galmallo C. Beta- and gamma-catenin expression in endometrial carcinoma. Relationship with clinicopathological features and microsatellite instability[J]. Virchows Arch, 2001, 438: 464-469.
- [8] Shih Y L, Hsieh C B, Lai H C, Yan M D, Hsieh T Y, Chao Y C, et al. SFRP1 suppressed hepatoma cells growth through Wnt canonical signaling pathway[J]. Int J Cancer, 2007, 121: 1028-1035.
- [9] Yang Z Q, Liu G, Bollig-Fischer A, Haddad R, Tarca A L, Ethier S P. Methylation-associated silencing of SFRP1 with an 8p11-12 amplification inhibits canonical and non-canonical WNT pathways in breast cancers[J]. In J Cancer, 2009, 125: 1613-1621.
- [10] Chung M T, Lai H C, Sytwu H K, Yan M D, Shih Y L, Chang C C, et al. SFRP1 and SFRP2 suppress the transformation and invasion abilities of cervical cancer cells through Wnt signal pathway[J]. Gynecol Oncol, 2009, 112: 646-653.

[本文编辑] 孙岩