

肝内胆管癌中上皮-钙黏附素基因 CDH1 的甲基化研究

翟博, 鄢和新, 刘淑琴, 陈磊, 吴孟超, 王红阳*

(第二军医大学东方肝胆外科医院国际合作信号转导研究室, 上海 200438)

[摘要] **目的:**探讨肝内胆管癌组织中上皮-钙黏附素(epithelial-cadherin, E-cadherin)基因 CDH1 的甲基化状况。**方法:**42 例肝内胆管癌标本系东方肝胆外科医院术后肿瘤组织和癌旁组织的石蜡包埋及新鲜冰冻标本。男性 32 例, 女性 10 例。分别采用 MSP、RT-PCR 以及 EnVision 方法检测 42 例肝内胆管癌患者术后标本中 CDH1 基因甲基化以及 E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达变化。**结果:**肝内胆管癌中 CDH1 甲基化发生率为 28.6%。E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达减低率分别为 64.3% 和 69.1%。CDH1 基因甲基化与 E-cadherin 蛋白表达、mRNA 表达以及胆管癌肝内转移之间存在显著相关(分别 $P=0.008$, $P=0.031$ 和 $P=0.020$)。CDH1 甲基化与生存预后之间无相关性, E-cadherin 表达异常与患者不良生存则显著相关($P=0.002$)。**结论:**肝内胆管癌中常发生 CDH1 高甲基化及 E-cadherin 表达异常, 表明 CDH1 甲基化及 E-cadherin 的表达异常与肝内胆管癌的发生发展密切相关。

[关键词] 胆管, 肝内; 胆管肿瘤; 上皮-钙黏附素; CDH1; 甲基化; 预后

[中图分类号] R 735.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0053-05

CDH1 methylation of E-cadherin gene in human intrahepatic cholangiocarcinomas: correlation between clinicopathologic parameters and patients' survival

ZHAI Bo, YAN He-xin, LIU Shu-qin, CHEN Lei, WU Meng-chao, WANG Hong-yang* (International Cooperation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate CDH1 methylation of epithelial-cadherin(E-cadherin) gene in intrahepatic cholangiocarcinomas (ICCs). **Methods:** Forty-two liver samples were obtained from ICC patients (32 males and 10 females) during surgical resection in Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital. The ICC tissue samples and the adjacent tissue samples were paraffin-embedded and fresh ice-frozen. A methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was used for analyzing the methylation of CDH1 gene; E-cadherin protein and mRNA expression was detected by immunohistochemical method and RT-PCR analysis, respectively. **Results:** The methylation rate of CDH1 was 28.6% in ICC patients. The expression of E-cadherin mRNA and protein was decreased in 64.3% and 69.1% of the samples, respectively. The methylation of CDH1 gene was correlated with the expression of E-cadherin protein and mRNA and metastasis of ICCs ($P=0.008$, $P=0.031$, and $P=0.020$, respectively), but not with the prognosis of ICC. The abnormal expression of E-cadherin was significantly correlated with the survival of patients ($P=0.002$). **Conclusion:** The methylation of CDH1 gene and down-regulation of E-cadherin are frequently seen in ICC patients, indicating that they may be closely related to the development and progression of ICCs.

[KEY WORDS] bile ducts, intrahepatic; bile duct neoplasms; epithelial-cadherin; CDH1; methylation; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(01): 53-57]

上皮-钙黏附素(epithelial-cadherin, E-cadherin)在钙离子的辅助下介导上皮细胞间的黏附,其表达受到 CDH1 基因的调控。在多种人体肿瘤中存在 CDH1 基因 CpG 小岛异常甲基化,造成基因静默、转录停止,并且与肿瘤的组织学特征等临床病理指标存在不同程度的相关性。近年来在肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)中也发现某些肿瘤抑制基因发生不同程度的 CpG 小岛甲基化。本研究采用激光捕获微切系统(LCM)在 42 例肝内胆管癌术后标本上分离切割纯净的胆管上皮细胞和肿瘤细胞,应用甲基化特异 PCR(MSP)方法检

测正常胆管上皮细胞和肝内胆管癌中 CDH1 基因 CpG 小岛的甲基化状况,并探讨甲基化与患者临床病理学特征、侵袭转移以及生存预后间的关系,为建立判断 ICC 进展和结局的新的生物学指标提供理论上的支持。

[基金项目] 青岛市自然科学基金(032jz12)。Supported by Natural Science Foundation of Qingdao(032jz12)。

[作者简介] 翟博,博士,主治医师。

* Corresponding author. E-mail:hywangk@online.sh.cn

1 材料和方法

1.1 标本及一般临床资料 42例肝内胆管癌标本取自第二军医大学东方肝胆外科医院1997年10月到2004年3月间的术后患者。其中男性32例,女性10例。年龄27~73岁,中位年龄51岁。术后标本均包括肿瘤组织和癌旁组织的石蜡包埋和新鲜冰冻标本。另取10例肝内胆管结石患者的术后标本。42例患者中伴发肝硬化者13例(30.9%),伴发慢性肝炎者15例(35.7%)。

临床病理指标包括性别、年龄、组织学分级、pTNM分期、肿瘤大小、包膜和血管侵袭与否、有无卫星结节、肝内转移、周围淋巴结浸润以及患者的复发生存状况。根据日本肝癌协会^[1]标准,ICC的组织学分级包括高、中、低3种程度。根据国际抗癌联盟UICC进行pTNM分期^[2]。

1.2 试剂和材料 试剂盒 Wizard DNA Clean-up System 和 Puregene DNA Purification System 均为 Promega 公司产品, First-Strand cDNA Synthesis Using SuperScript II RT 和 TRIzol Reagent 均为 Invitrogen 公司产品, EnVision™ Kit 为 DAKO 公司产品。兔抗人 E-cadherin IgG 多抗和羊抗兔生物素化二抗均为 Santa Cruz 公司产品。

CDH1 基因甲基化序列正义链: TTA GGT TAG AGG GTT ATC GCGT; 反义链: TAA CTA AAA ATT CAC CTA CCG AC。CDH1 基因非甲基化序列正义链: TAA TTT TAG GRR AGA GGG TTA TTGT; 反义链: CAC AAC CAA TCA ACA ACA CA。用于 RT-PCR 的 E-cadherin 基因上游引物: GGT TAT TCC TCC CAT CAG CT; 下游引物: CAG TGT CCG GAT TAA TCT CC。

1.3 肝内胆管癌组织和正常胆管上皮组织的分离切割 按照 LCM 步骤对肝内胆管癌及正常胆管上皮组织的新鲜冰冻标本切片进行切割。

1.4 DNA 的抽提与纯化、MSP 检测 CDH1 基因甲基化 应用 DNA purification System 纯化、抽提 DNA; DNA Clean-up System 进行 DNA 亚硫酸氢盐修饰。PCR 产物扩增设置: 95℃ 5 min 变性。95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 45 s, 共 33 个循环。72℃ 4 min 终止反应。2% 琼脂糖凝胶电泳 2 h。溴化乙锭染色, UV 灯观察。

1.5 TRIzol 法提取总 RNA 及 RT-PCR 测定 每

份标本中加入 TRIzol 100 μl, 按说明书进行总 RNA 抽提。建立反应体系进行 RNA 逆转录, 按照下列反应设置: 起始温度 95℃ 5 min。94℃ 30 s, 54℃ 60 s, 72℃ 30 s, 共 32 个循环。终止温度 72℃ 7 min。PCR 产物进行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳。溴乙锭染色, UV 灯观察。

1.6 免疫组织化学染色 采用 EnVision 方法。简单步骤为: 切片脱蜡, 30% H₂O₂ 中室温孵育 20 min, 洗涤后在 0.01 mol/L 柠檬酸中 100℃ 微波炉加热 20 min, 1% BSA 封闭 30 min。加入抗兔 E-cadherin 抗体(稀释度为 1:200) 4℃ 过夜。羊抗兔二抗 37℃ 30 min, PBS 漂洗后 DAB 显色 5 min, 苏木精衬染, 脱水, 封片。取 10 例正常肝组织做抗体阳性对照, PBS 做阴性对照。参照 Gamallo 等^[3]免疫组化评分方法进行染色结果评估, 评分标准包括染色强度和染色范围两方面。染色强度分为 0 到 3 级(0: 与非实质细胞的染色背景相同; 1: 淡黄色; 2: 黄褐色; 3: 红褐色, 强度与正常肝内胆管上皮细胞的染色一致)。染色范围指阳性染色细胞占总细胞的百分比, 同样分成 0~4 级(0: 阳性染色细胞小于 5%; 1: 5%~25%; 2: 26%~50%; 3: 51%~75%; 4: 76%~100%)。染色强度积分与染色范围积分之和 ≥ 6 即定义为表达阳性(+), < 6 者定义为表达阴性(-)。

1.7 统计学处理 应用 χ^2 和 Fisher 精确检验进行统计学分析。采用 Kaplan-Meier 方法评估生存曲线, Log-rank 检验进行评估。采用 Cox 回归模型进行多因素分析, 评估甲基化的预后价值(与肿瘤大小、分化程度、分期、淋巴结侵袭、血管侵袭、肝内转移、卫星结节等临床病理指标一起评估)。所有相关系数都采用双边检验值, $P < 0.05$ 为有统计学意义。所有统计学处理均采用 SPSS 软件系统(SPSS for Windows, Inc., Chicago, IL)。

2 结果

2.1 MSP 的检测结果 在 42 例 ICC 标本中, 12 例(28.6%) 在 115 bp 处出现条带, 显示发生 CDH1 小岛甲基化。正常胆管上皮组织标本在 115 bp 处未出现条带(图 1)。

2.2 基因甲基化与 ICC 组织学指标间的关系 表 1 显示, 在 ICC 发生早期和分化好的 ICC 中均发生 CDH1 甲基化改变, 但是 CDH1 基因甲基化状态与患者的组织学分化以及 pTNM 分期之间未发现明显差异(分别 $P = 0.768$ 和 $P = 0.392$)。

2.3 CDH1 基因甲基化结果与 E-cadherin mRNA 表达间的关系 图 2 显示了 E-cadherin mRNA 表达的 RT-PCR 特征。10 例正常胆管上皮细胞组织中均正常表达 E-cadherin mRNA。42 例 ICC 标本

中 E-cadherin mRNA 表达下调 27 例(64.3%),其中 11 例发生 CDH1 甲基化;E-cadherin mRNA 表达正常的 15 例标本中有 1 例发生了 CDH1 甲基化,两者之间存在显著相关性($P=0.031$)。

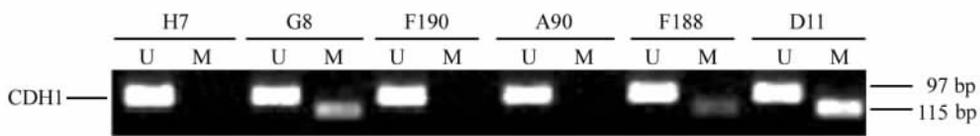


图 1 ICC 中 CDH1 基因启动子甲基化 MSP 结果分析

Fig 1 Methylation-specific PCR of CDH1 in ICCs

Code names of samples were indicated on top. The product of CDH1 methylation was 115 bp and that of the CDH1 unmethylation was 97 bp.

U; Unmethylated; M;Methylated

表 1 CDH1 甲基化与组织学特征间的关系

Tab 1 Relationship between methylation of CDH1 and histological features of ICC tissues

Index	N	CDH1		P value
		U	M	
[n(%)]				
Differentiation grade				
Well	3	2(66.6)	1(33.4)	0.768
Mediate	14	11(78.6)	3(21.4)	
Poor	25	17(68.0)	8(32.0)	
pTNM stage				
I	2	2(100)	0(0)	0.392
II	9	6(66.7)	3(33.3)	
III	25	19(76)	6(24)	
IV	6	3(50)	3(50)	

U; Unmethylation; M;Methylation

2.4 CDH1 基因甲基化结果与 E-cadherin 蛋白表达间的关系 42 例标本中 E-cadherin 蛋白表达减弱或缺失 29 例(69.1%)。其中 12 例显示 CDH1 基因 CpG 高甲基化,而在 13 例 E-cadherin 蛋白表达正常者中未发生甲基化改变。甲基化状态与 E-cadherin 的蛋白水平显著相关($P=0.008$)。

2.5 CDH1 基因甲基化与 ICC 临床病理指标间的关系 表 2 显示,CDH1 基因甲基化的发生与肿瘤大小、包膜侵袭、卫星结节、血管侵袭以及淋巴结浸润等临床病理指标间无显著统计学意义,然而与 ICC 的肝内转移之间关系显著($P=0.020$),发生甲基化的 ICC 患者较未发生甲基化者更容易发生肝内转移。

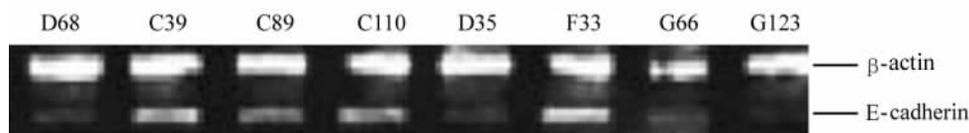


图 2 ICC 中 E-cadherin mRNA 表达的 RT-PCR

Fig 2 RT-PCR analysis of E-cadherin mRNA in ICCs

Code names of samples were indicated on top. The PCR product of β -actin gene was used as control

2.6 MSP 结果与患者生存间的关系 42 例 ICC 患者中有 37 例得到了有效随访。随访时间 4~72 个月。26 例患者在随访期间肿瘤复发,其中 17 例(45.9%)死于 ICC 复发,3 例死于其他疾病,17 例在 72 个月后仍然存活。

12 例 CDH1 发生甲基化者和 31 例未发生甲基化者的平均生存期分别为 35.6 个月和 47.4 个月;中位生存时间分别为 31.0 个月和 47.0 个月。3 年生存率分别为 28.4% 和 70.8%,5 年生存率为

9.6% 和 20.1%。

单变量分析显示,只有 E-cadherin 蛋白表达异常和包膜侵袭是 ICC 患者生存预后的预测因素(分别为 $P=0.002$ 和 $P=0.014$)。Cox 回归模型多变量分析证实只有肿瘤大小和包膜侵袭是生存期独立的预测因子(分别 $P=0.048$ 和 $P=0.039$)。单变量和多变量分析均未证实 CDH1 甲基化与患者的生存预后相关(分别 $P=0.087$ 和 $P=0.517$)。

表 2 CDH1 甲基化与临床病理指标间的关系
Tab 2 Relationship between methylation of CDH1 and clinicopathologic parameters of ICC patients

Index	N	CDH1		P value
		U	M	
[n(%)]				
Size				
<5 cm	17	13(76.5)	4(23.5)	0.832
5-10 cm	16	11(68.8)	5(31.2)	
>10 cm	9	6(66.7)	3(33.3)	
Capsular invasion				
Present	6	5(83.3)	1(16.7)	0.655
Absent	36	25(69.4)	11(30.6)	
Satellite nodules				
Present	11	8(72.7)	3(27.3)	1.000
Absent	31	22(35.5)	9(64.5)	
Vascular invasion				
Present	13	9(69.2)	4(30.8)	1.000
Absent	29	21(72.4)	8(27.6)	
Lymph node permission				
Present	7	3(42.9)	4(57.1)	0.088
Absent	35	27(77.1)	8(22.9)	
Intrahepatic metastasis				
Present	10	4(40)	6(60)	0.020
Absent	32	26(81.3)	6(18.7)	

U: Unmethylation; M: Methylation

3 讨论

本研究中,E-cadherin 基因 CDH1 在正常胆管上皮组织中未发生甲基化,而 ICC 中则增高至 28.9%,该结果低于 Lee 等^[4]报道的 ICC 中 34%的 CDH1 甲基化发生率。我们的结果显示 CDH1 甲基化与 ICC 的分化程度及分期无明显相关,但甲基化在 ICC 的早期以及分化较好的 ICC 中便已发生,表明 CDH1 甲基化参与了 ICC 的形成及发展的全过程。CDH1 甲基化连同 E-cadherin 的表达异常可能会共同减弱细胞间的黏附力,导致侵袭的启动和正常组织形态的破坏。

为了比较 CDH1 基因甲基化在 HCC 和 ICC 中发生的频率和特征, Lee 等^[4-5]分别在 40 例 HCC 和 79 例 ICC 中探讨了包括 CDH1 基因在内的 8 种基因的甲基化状况。发现 HCC 比 ICC 更多发生 CDH1 基因的甲基化,发生率之比为 54% : 33%,表明在相同的器官中肿瘤类型不同基因发生甲基化的频率也存在不同的趋势。首先这可能与细胞的不同来源有关,其次可能与不同的致病因素有关;85%的 HCC 患者呈 B、C 型肝炎病毒阳性,而 ICC 中只有

15%,因此病毒感染可能也是甲基化状况不同的可能机制之一。

在本研究中,正常胆管上皮细胞中未发 E-cadherin mRNA 和蛋白表达的改变,而在 ICC 中无论 E-cadherin mRNA 还是蛋白均出现明显的表达减弱或缺失,而且 CDH1 基因甲基化与 E-cadherin 基因产物及蛋白的表达异常均密切相关,存在良好一致性。

另外本研究发现,1 例 CDH1 基因甲基化的肿瘤患者仍然保持 E-cadherin mRNA 表达阳性,E-cadherin 蛋白表达则依然阴性;而 16 例和 17 例 CDH1 非甲基化患者分别显示 E-cadherin mRNA 和蛋白表达减弱或缺失。对于这种基因甲基化与蛋白或(和)mRNA 表达不一致的现象, Li 等^[6]认为 CDH1 基因启动子的高甲基化可能是 E-cadherin 表达下降的最主要原因。也可能与下列机制有关^[7-8]: (1)CDH1 启动子甲基化不完全或者在某一单个等位基因上重新发生了甲基化;(2)肿瘤细胞克隆的甲基化状态存在异质性;(3)甲基化并未发生在导致基因发生静默的重要部位。

我们对 CDH1 基因甲基化与 ICC 侵袭转移等临床病理指标进行了探讨,发现与 Lee 等^[4]的结果不同,CDH1 基因甲基化发生率与 ICC 淋巴结转移、血管和胆管侵袭、包膜侵犯无关,但与肝内转移明显相关,表明 CDH1 基因甲基化可能与 ICC 的发生和进展有关。

本研究中单变量分析发现 CDH1 基因的高甲基化与肝内胆管癌的不良预后无关,E-cadherin 蛋白异常表达对 ICC 患者的临床结局有着显著的预测价值,这种差异的根本机制尚不清楚,标本量过少可能是原因之一。这与其他肿瘤中的回顾性免疫组化资料是一致的,不少资料^[9-14]证实,发生 E-cadherin 表达下调的患者有着不良的预后结局。

很多学者认为,CDH1 甲基化是协作影响肿瘤行为的多种肿瘤抑制基因甲基化中有代表性的指标。不管与 CDH1 一起发生甲基化的基因数目有多少,一致性有多大,可以肯定的一点是:单纯的 CDH1 基因甲基化可能某种程度上影响着患者的生存预后,E-cadherin 蛋白的下调表达可能有助于肿瘤的形成^[15]。

总之,我们通过 MSP 方法研究了 ICC 中 CDH1 基因 CpG 小岛的甲基化状况,发现 CDH1 基因甲基化是 ICC 一种常见的肿瘤特异性改变,是造成肿瘤抑制基因静默、促进 ICC 发生发展的一种重要机制。通过去甲基化活性药物可能会使这种后生性改变发

生潜在的可逆性的转变,并有可能成为新的抗肿瘤化合物的重要作用靶点。

[参考文献]

- [1] Liver Cancer Study Group of Japan. The general rules for the clinical and pathological study of primary liver cancer[J]. *Jpn J Surg*, 1989, 19: 98-129.
- [2] Hermanek P, Hutter R V P, Sobin L H, et al. TNM Atlas, UICC[M]. 4th ed. Berlin: Springer Press, 1997: 115-123.
- [3] Gamallo C, Palacios J, Suarez A, et al. Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 1993, 142: 987-997.
- [4] Lee S, Kim W H, Jung H Y, et al. Aberrant CpG island methylation of multiple genes in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2002, 161: 1015-1022.
- [5] Lee S, Lee H J, Kim J H, et al. Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2003, 163: 1371-1378.
- [6] Li Z, Ren Y, Lin S X, et al. Association of E-cadherin and beta-catenin with metastasis in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2004, 117: 1232-1239.
- [7] Yang B, Guo M, Herman J G, et al. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2003, 163: 1101-1107.
- [8] Brock M V, Gou M, Akiyama Y, et al. Prognostic importance of promoter hypermethylation of multiple genes in esophageal adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 2912-2919.
- [9] Oyama T, Hanagiri T, Morita M, et al. The methylation status and protein expression of CDH1, p16(INK4A), and fragile histidine triad in nonsmall cell lung carcinoma: epigenetic silencing, clinical features, and prognostic significance[J]. *Cancer*, 2006, 106: 2190-2199.
- [10] Joo Y E, Park C S, Kim H S. Prognostic significance of E-cadherin/Catenin complex expression in gastric cancer[J]. *J Korean Med Sci*, 2000, 15: 655-666.
- [11] Shimamoto T, Ohyashiki J H, Hirano T, et al. Hypermethylation of E-cadherin gene is frequent and independent of p16INK4A methylation in non-small cell lung cancer: potential prognostic implication[J]. *Oncol Rep*, 2004, 12: 389-395.
- [12] Guilford P. E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire[J]? *Mol Med Today*, 1999, 5: 172-177.
- [13] Tamura G, Yin J, Wang S, et al. Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92: 569-573.
- [14] Caldeira J R, Prando E C, Quevedo F C, et al. CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2006, 6: 48.
- [15] Machado J C, Oliveira C, Carvalho R. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 1525-1528.
- [收稿日期] 2006-07-21 [修回日期] 2006-11-23
- [本文编辑] 尹茶

抗病毒免疫反应调节机制有新发现

一种抗病毒免疫反应调节新机制,由第二军医大学免疫学研究所、医学免疫学国家重点实验室曹雪涛院士和安华章副教授等组成的课题组所揭示。这一新的科学发现,为人类有效调控抗病毒免疫反应增添了新思路,同时有可能提出抗病毒免疫治疗的新靶点。2006年12月7日,国际免疫学领域权威学术期刊《免疫》(*Immunity*)刊登了该研究论文。[An H, Zhao W, Hou J, et al. SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production. *Immunity*, 2006, 25(6): 919-928.]

在国家自然科学基金重大项目和国家“973”免疫学项目支持下,该课题组人员瞄准 Toll 样受体与机体免疫调控这一免疫学国际前沿热点,首次发现了一种称为“蛋白磷酸酶 2”的信号转导分子,通过结合“蛋白激酶分子 1”的激酶活性结构域并抑制其激酶活性,从而能够特异性地显著抑制 Toll 样受体活化的巨噬细胞产生炎症性细胞因子和 I 型干扰素,进而负向调控机体抗病毒免疫反应,为抗病毒免疫反应的调节机制增添了新的认识,同时提示“蛋白磷酸酶 2”有可能成为抗病毒免疫治疗的新靶点。

“蛋白磷酸酶 2”是由国际著名华裔分子生物学家冯根生教授于 1993 年发现的,冯根生教授对该项研究工作给予了大力支持。利用该分子作为靶点可以调节 I 型干扰素的产生,为有效治疗病毒性肝炎、红斑狼疮等免疫相关性疾病开辟新的途径。