

文章编号:1005-6947(2008)01-0029-05

· 肝肿瘤专题研究 ·

肝细胞癌中 SFRP1 和 APC 基因启动子甲基化与其 mRNA 的表达

吴龙, 钱叶本, 朱立新, 耿小平, 熊奇如

(安徽医科大学第一附属医院 肝胆外科, 安徽 合肥 230022)

摘要:目的 探讨肝细胞癌(HCC)中 SFRP1 和 APC 基因启动子甲基化状态及其 mRNA 表达的关系。方法 应用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术,检测30例肝细胞癌(HCC组)及相应的癌旁组织(癌旁组)和10例正常肝组织(正常对照组)中 SFRP1 及 APC 基因启动子甲基化状态和 mRNA 的表达水平,分析甲基化与某些临床参数与 mRNA 表达的关系。结果 HCC组、癌旁组及正常对照组中的 SFRP1 和 APC 基因启动子甲基化率分别是 11/30, 4/30, 0/10 和 14/30, 5/30, 0/10; HCC组明显高于其余两组($P < 0.05$)。SFRP1 基因启动子甲基化与临床资料无关($P > 0.05$); APC 基因启动子甲基化与年龄(< 60)岁和癌肿无假包膜有关($P < 0.05$)。HCC组 SFRP1 基因 mRNA 表达明显低于其余两组($P < 0.05$),各组 APC 基因 mRNA 表达差异无显著性。两基因甲基化之间无相关性。结论 SFRP1 和 APC 基因启动子甲基化与 HCC 的形成和进展有关,但 HCC 组织中基因甲基化与 mRNA 表达的关系尚不明确。 [中国普通外科杂志, 2008, 17(1): 29-33]

关键词: 癌, 肝细胞/病理学; APC; SFRP1; 启动子甲基化; mRNA

中图分类号: R 735.7

文献标识码: A

Promoter methylation and mRNA expression of SFRP1 and APC gene in hepatocellular carcinoma

WU Long, QIAN Yeben, ZHU Lixin, GENG Xiaoping, XIONG Qiru

(Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

Abstract: Objective To investigate the promoter methylation status and mRNA expression of SFRP1 and APC gene in hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** Methylation specific PCR was employed to detect the methylation status of APC and SFRP1 gene promoter in 30 HCC and their adjacent non-cancerous tissues, 10 normal hepatic tissues. Expression of SFRP1 and APC mRNA was also determined by reverse transcriptase PCR in the aforesaid tissues. The correlation between methylation and mRNA expression of the two genes and clinical data in patients with HCC was analyzed. **Results** SFRP1 promoter methylation was observed in 11/30, 4/30, 0/10 and APC promoter methylation was observed in 14/30, 5/30, 0/10 in HCC, adjacent non-cancerous tissues and normal hepatic tissues, respectively. Methylation of SFRP1 and APC genes in HCC increased significantly compared with the other two groups($P < 0.05$). No correlation was found between methylation status of SFRP1 gene and clinical data($P > 0.05$). Significant correlation between methylation of APC gene with age younger than 60 years-old and in carcinomas without pseudo-capsule were observed. Expression level of SFRP1 gene mRNA in HCC was significantly lower

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金资助项目(2006KJ094A)。

收稿日期:2007-09-10; **修订日期:**2007-12-20。

作者简介:吴龙,男,安徽医科大学第一附属医院主治医师,主要从事肝胆外科基础与临床方面的研究。

通讯作者:钱叶本 E-mail:qianyeben@hotmail.com

compared with the other two groups. Statistically significant differences of APC mRNA expression was not found among the three groups. No correlation between methylation of SFRP1 and APC genes was observed.

Conclusions The aberrant promoter methylation of APC and SFRP1 genes are both related to hepatocarcinogenesis and HCC progress, but the relationships between methylation and mRNA expression of the genes in HCC remain unclear.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(1): 29 - 33]

Key words: Carcinoma, Hepatocellular/pathol; APC; SFRP1; Promoter Methylation; mRNA

CLC number: R 735.7

Document code: A

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的发生涉及到多基因的改变,但其确切的分子机制仍不明了。近来发现 Wnt 信号异常激活与 HCC 发病有关^[1]。分泌型 Frz 受体相关蛋白 (secreted Frizzled-related protein 1, SFRP1) 和多发性腺瘤样息肉病蛋白 (adenomatous polyposis coli, APC) 均为 Wnt 信号的重要抑制因子,在多种人类肿瘤中已检测到它们的缺失、突变或甲基化失活。DNA 甲基化可改变基因启动子区 Cp 岛的甲基化状态而影响基因转录,被认为是沉默抑癌基因的表遗传学机制。本研究采用甲基化特异性聚合酶链反应 (MSP) 和逆转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术,检测 30 例 HCC 癌及癌旁组织中 SFRP1 和 APC 基因启动子甲基化状态及 mRNA 表达水平,并分析其与临床资料的关系,以期揭示 HCC 发病的某些机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 标本一般资料 30 例肝细胞癌 (HCC 组) 及癌旁组织 (癌旁组) 标本均取自本院肝胆外科 2006 年 6 月 ~ 2007 年 3 月行手术治疗的 HCC 患者,病例均经病理证实。其中男 24 例,女 6 例;平均年龄 50 岁, < 60 岁 20 例, ≥ 60 岁 10 例。肝功能 Child 分级: A 级 26 例, B 级 4 例。HBsAg 阳性 25 例,肝硬化 24 例。甲胎蛋白 (AFP) 平均 520.6 μg/L, < 20 μg/L 者 13 例, ≥ 20 μg/L 者 17 例。肿瘤直径平均 7 cm, < 3 cm 者 4 例, ≥ 3 cm 者 26 例。单发 21 例,多发 9 例。病理分级: I ~ II 级 25 例, III 级 5 例。TNM 分期采用 UICC 标准: I ~ II 期 18 例, III 期以上 12 例。标本切除离体后,立即保存于液氮中,于次日存放于 -80℃ 冰箱内。采样时选取无组织坏死或出血的部位。癌旁组织距癌肿边缘 2 cm 以上,肉眼无肿瘤组

织。正常对照组中 8 例来源于同期肝血管瘤旁组织, 2 例为胆囊切除术中活检的肝组织; 10 例均无乙肝病毒感染史及肝硬化。

1.1.2 试剂及仪器 QIAamp DNA 提取试剂盒 (Qiagen 公司), CpGenome DNA 修饰试剂盒 (Chemicon 公司), AmpliTaq Gold 酶及 10 × PCR buffer II, 25 mmol/L MgCl₂, 2.5 mmol/L dNTPs (Roche 公司), trizol 试剂 (Invitrogen 公司), RT-PCR 试剂盒 (Fermentas 公司), Biometra PCR 扩增仪 (Biomedizinische Analytic GmbH, Germany), Tanon GIS 凝胶图像处理系统 (上海天能科技有限公司) 等。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 和 RNA 提取 用 QIAamp DNA 提取试剂盒提取组织总 DNA, 用 trizol 试剂提取组织总 RNA (具体方法均按说明书进行); 提取的 DNA 和 RNA 经紫外分光光度计测定其浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性; 符合要求的 DNA 和 RNA 置于 -80℃ 保存备用。

1.2.2 MSP 取 DNA 提取液 8 μL (约含 DNA 0.5 μg), 用 CpGenome DNA 修饰试剂盒, 按说明书修饰基因组 DNA, 然后用甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物进行 PCR 扩增, 引物序列、退火温度、产物大小及参考文献见表 1。反应体系 (总体积 10 μL), MilliQ H₂O 5.33 μL, 10 × PCR 缓冲液 II 1 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 0.8 μL, TagGold 0.07 μL, U 或 M-引物 F 0.4 μL, U 或 M-引物 R 0.4 μL 及修饰后的 DNA 1.0 μL。反应条件: 95℃ 预变性 12 min 后, 95℃ 30 s, 退火温度 30 s, 72℃ 30 s, 共 45 次循环, 最后 72℃ 延伸 7 min 使反应完全。以去离子 H₂O 为每次反应的阴性对照。反应产物以 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 恒压 80 V, 30 min, Tanon GIS 凝胶图像处理系统观察结果并拍照。

表1 甲基化特异性 PCR 和 RT-PCR 分析所用引物

基因名称	引物用途	引物序列(5'-3')	退火温度(°C)	产物长度(bp)	参考文献
APC	MSP-M ¹⁾	(F ³⁾)-TATTGCGGAGTGCGGGTC (R ⁴⁾)-TCGACGAACCTCCCACGA	56	98	[2]
	MSP-U ²⁾	(F)-GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGTT (R)-CCAATCAACAACTCCAACAA	58	108	[2]
	RT-PCR	(F)-GAAACCAACTTCACCACTAA (R)-AATAGCGGTGTAATGATGAG	55	238	[3]
SFRP1	MSP-M	(F)-GTGTCGCGGTTCTGCTTTCCGC (R)-AACGTTACCCGACTCCCAGACC	66	173	[4]
	MSP-U	(F)-GAGTTAGTGTGTGTTTGTGTTTGT (R)-CCCAACATTACCCAACCTCCACAACCA	62	182	[4]
	RT-PCR	(F)-CGAGTTTGCAGTGAAGATGA (R)-CAGCACAAGCTTCTTCAGGTC	55	130	[5]
GAPDH	RT-PCR	(F)-AGCTGAAGCTCGGAGTCAACG (R)-AGGGGTCATTGATGGCAACA	62	102	[6]

注:1)M-甲基化;2)U-非甲基化;3)F-正义链;4)R-反义链

1.2.3 RT-PCR 取 4 μ L (约 1 μ g) 提取的总 RNA,按 RT 试剂盒反应步骤,加入各试剂至总反应体系 20 μ L。RT 反应条件:70 $^{\circ}$ C 5min, 37 $^{\circ}$ C 5min, 40 $^{\circ}$ C 60min, 最后 70 $^{\circ}$ C 10min。PCR 反应:取 1 μ L cDNA 按 PCR 试剂盒说明书进行扩增,水为阴性对照,同时以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因作为内参基因。总反应体系 25 μ L,无酶的 DEPC 处理水 11.3 μ L,2 \times PCR Master Mix 液 12.5 μ L,100 mmol/L 引物 F 0.1 μ L,引物 R 0.1 μ L,修饰后的 DNA 1.0 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,93 $^{\circ}$ C 30s,退火温度 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,32 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。反应产物以 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳,恒压 80V,30 min, Tanon GIS 凝胶图像处理系统观察、拍照并分析条带的积分光密度(OD)。目的基因 mRNA 表达水平,以样品电泳条带扫描值/GAPDH 条带扫描值表示相对表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 对数据进行统计分析,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 *t* 或秩和检验。HCC 癌组织基因甲基化与临床资料的关系采用四格表确切概率法;两种属性的关联程度采用相关分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 MSP 检测结果

30 例 HCC 组及癌旁组检测到 SFRP1 基因甲基化分别为 11 例和 4 例 ($\chi^2 = 4.356, P = 0.037$), APC 基因甲基化分别是 14 例和 5 例 ($\chi^2 = 6.239, P = 0.012$) (图 1)。HCC 组中两种基因甲基化率

均明显高于癌旁组 ($P < 0.05$)。10 例对照组均未发现 SFRP1 和 APC 基因甲基化现象 (图 2)。正常对照组两种基因甲基化率均明显低于 HCC 组及癌旁组 ($P < 0.05$)。采用列联系数分析 HCC 组两种基因甲基化之间的关联程度,未发现两者有线性相关 ($r = 0.018, P = 0.923$)

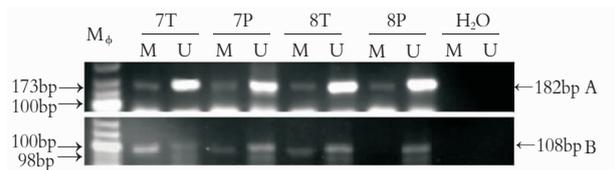


图1 部分肝细胞癌及相应癌旁组织 MSP 产物
A: SFRP1-MSP 产物; B: APC-MSP 产物; M ϕ : DNA Maker; T: HCC 组; P: 癌旁组; H₂O: 阴性对照; M: 甲基化产物条带; U: 非甲基化产物条带

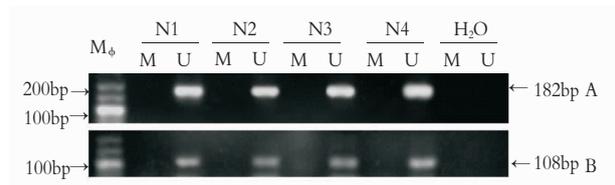


图2 部分正常对照肝组织 MSP 产物
A: SFRP1-MSP 产物; B: APC-MSP 产物; M ϕ : DNA Maker; N: 正常对照组; H₂O: 阴性对照; M: 甲基化产物条带; U: 非甲基化产物条带

2.2 甲基化与临床资料的关系

HCC 组 APC 基因甲基化与性别、Child 分级、AFP、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阳性、肝硬化、TNM 分期等因素无关 ($P > 0.05$),但与年龄

<60 岁,肿瘤无假包膜相关(均 $P < 0.05$)。SFRP1 基因甲基化与临床资料无关,上述各因素在 HCC 和癌旁组间差异无显著性(均 $P > 0.05$)(表 2)。

表 2 HCC 癌组织 SFRP1 和 APC 基因甲基化与临床资料的关系

临床资料	APC 基因甲基化		P 值	SFRP1 基因甲基化		P 值
	阴性	阳性		阴性	阳性	
性别						
男	12	12	0.395	16	8	0.38
女	4	2		3	3	
年龄(岁)						
<60	8	12	0.045	13	7	0.548
≥60	8	2		6	4	
Child 分级						
A	14	12	0.648	17	9	0.47
B	2	2		2	2	
AFP(ng/mL)						
<20	7	6	0.626	10	3	0.167
≥20	9	8		9	8	
肿瘤个数						
单发	13	8	0.15	13	8	0.571
多发	3	6		6	3	
肿瘤大小(cm)						
<3	2	2	0.648	3	1	0.53
≥3	14	12		16	10	
HBsAg						
阳性	13	12	0.567	14	11	0.082
阴性	3	2		5	0	
肝硬化						
阳性	12	12	0.395	15	9	0.62
阴性	4	2		4	2	
假包膜						
有	15	8	0.025	15	8	0.515
无	1	6		4	3	
癌栓						
有	1	2	0.448	1	2	0.298
无	15	12		18	9	
TNM 分期						
I/II	12	6	0.078	11	7	0.534
III	4	8		8	4	
病理分级						
I/II	14	11	0.433	16	9	0.619
III	2	3		3	2	

2.3 RT-PCR 检测结果

SFRP1 基因 mRNA 在 3 种组织中的平均相对表达量分别为 0.23, 0.30, 0.32, HCC 组表达量明显低于癌旁组及正常对照组($P < 0.05$), 后两组相比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。APC mRNA 在 3 种组织中平均相对表达量分别为 0.76, 0.86, 0.84, 3 种组织中 APC mRNA 相对表达量之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。HCC 组中两种基因 mRNA 表达之间无线性相关($r = 0.284, P = 0.128$)。

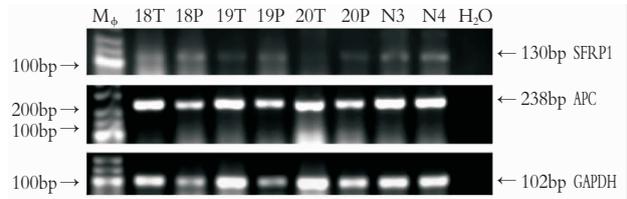


图 3 3 组肝组织中 APC 和 GAPDH RT-PCR 产物电泳结果 M ϕ : DNA Marker; T: HCC 组; P: 癌旁组; N: 正常对照组; H₂O: 阴性对照

2.4 甲基化与 mRNA 表达之间的关系

在 SFRP1 基因甲基化阳性的 HCC 组织中, 其 mRNA 相对表达量平均为 0.18, 甲基化阴性的癌组织 mRNA 相对表达量平均为 0.25, 两者差异无统计学意义($P = 0.077$)。在 APC 基因甲基化阳性的 HCC 组织中, 其 mRNA 相对表达量平均为 0.70, 甲基化阴性癌组织 mRNA 相对表达量平均为 0.81, 两者差异无统计学意义($P = 0.134$)。

3 讨论

SFRP1 和 APC 是 Wnt 信号通路中两种重要的抑制因子, 已有报道在 HCC 中发现有 SFRP1 或 APC 基因的频繁甲基化^[2,7-8], 而 HCC 组织中这两种基因甲基化状态与 mRNA 表达水平的检测鲜有报道。

SFRP1 是 Wnt 信号上游抑制因子, 已在多种人类恶性肿瘤中检测到 SFRP1 基因甲基化。Shih 等^[7]报道 HCC 组织中 SFRP1 基因甲基化率为 48.2%, 而正常肝组织中无甲基化现象, 并且在甲基化的癌组织中 SFRP1 mRNA 表达下降的例数明显多于非甲基化者, 因此认为 SFRP1 基因甲基化是 HCC 中的共同事件, 它介导的 SFRP1 基因沉默, 在 HCC 发病中起重要作用, 但甲基化与临床资料无相关性。Shih 还发现, 非甲基化癌组织样本亦有 66.7% 出现 SFRP1 mRNA 表达下调, 说明除甲基化外, 还有其他遗传学的改变, 如突变、杂合性缺失等也可介导该基因 mRNA 表达下调。本研究发现 HCC 组织中 SFRP1 基因甲基化率是 36.6% (11/30), 比 Shih 的报道略低, 可能是实验标本来源和样本量不同的缘故。HCC 组甲基化率明显高于癌旁和正常对照组, 且癌、癌旁及对照组的甲基化率逐渐降低, 表明 SFRP1 基因甲基化是 HCC 形成的早期事件, 并且在 HCC 中频繁发生。本实验结果亦显示, 癌组织的 SFRP1 mRNA 相对表达量明显低于癌旁和对照组, 但甲

甲基化与非甲基化癌组织比较,其表达虽然降低,却无统计学差异。究其原因可能是:(1)部分甲基化对该基因表达下调无统计学差异;(2)在 HCC 中除甲基化外,估计还有其他介导 SFRP1 基因表达下调的遗传学改变。另外,本研究亦未发现甲基化与临床资料具有相关性。关于甲基化对 SFRP1 mRNA 表达的影响,尚需大样本的进一步研究。

APC 是 Wnt 信号的下游抑制因子。研究发现,在结直肠癌、膀胱癌、乳腺癌、肺癌、子宫颈癌、食管癌等组织中有 APC 基因的高甲基化。HCC 中 APC 基因甲基化发生率一般为 53.0% ~ 81.7%,显著高于邻近的癌旁组织及正常肝组织,是肝癌形成的早期且频发事件^[2,8]。本研究发现 HCC 组 APC 基因甲基化率是 46.6% (14/30),显著高于癌旁及正常对照组,而且三者甲基化率依次降低。说明 APC 基因甲基化是 HCC 形成的早期事件,并且在肝细胞的恶性转化过程中逐步积累。本研究还发现,APC 基因甲基化与年龄及肿瘤有无假包膜有关,年龄小于 60 岁者甲基化率明显高于 60 岁以上者 ($P = 0.045$)。正常情况下甲基化与衰老有关,年长者甲基化率高^[9]。这种低龄伴高甲基化可能是 HCC 的一种特性。肿瘤无假包膜者甲基化率明显高于有假包膜者 ($P = 0.025$)。假包膜与肿瘤的转移和侵袭有关,基因甲基化干扰了 APC 的表达或功能,导致 β -catenin 在细胞内聚集,而该分子在介导上皮细胞黏附中发挥重要作用,这种作用便于 HCC 的肝内转移^[10]。说明 APC 基因高甲基化还与 HCC 侵袭性有关。Deng 等^[11]发现,基因启动子甲基化抑制了 APC 表达,因为启动子甲基化后改变了染色体构象,干扰转录因子结合 CCAAT-盒而抑制转录。本实验显示,虽然 HCC 组 APC mRNA 相对表达量较癌旁组和对照组降低,但无统计学差异;APC 基因甲基化似未影响其 mRNA 表达。Chen 等^[12]也发现,高甲基化不影响结肠癌肝转移组织的 APC 表达,据此推测:(1)等位基因中可能只有一条链发生了甲基化,另一条链未发生甲基化,因而 APC 表达未降低;(2)在被检测的癌组织内除了甲基化的癌细胞外,还有未发生甲基化的癌细胞和大量间质细胞;这些细胞中,APC 基因的正常表达掩盖了甲基化对表达的影响。表明甲基化的程度较低,对 mRNA 表达的影响未见有统计学差异。

SFRP1 和 APC 虽然是 Wnt 信号的抑制因子,但作用的部位和方式不同,SFRP1 位于细胞外而

APC 位于细胞内。目前尚无证据显示这两种基因之间存在相互抑制或相互促进;本实验也未发现两种基因甲基化之间及其 mRNA 表达之间有相关性。因此,笔者认为 SFRP1 和 APC 基因启动子甲基化均参与 HCC 的形成,并且是 HCC 的早期和频发事件;APC 基因启动子甲基化还可能与 HCC 的侵袭性有关。但甲基化与两种基因 mRNA 表达的关系还不明确,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Lee HC, Kim M, Wands JR. Wnt/ Frizzled signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Biosci*, 2006, 11: 1901 - 1915.
- [2] Lee S, Lee HJ, Kim JH, *et al.* Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(4): 1371 - 1378.
- [3] 王夫景, 杨茂鹏, 于洪亮, 等. 抑癌基因 KLF-6 和 APC 在结直肠癌组织中的表达及临床意义 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2006, 9(5): 429 - 432
- [4] Chang Q, Pang JC, Li KK, *et al.* Promoter hypermethylation profile of RASSF1A, FHIT, and sFRP1 in intracranial primitive neuroectodermal tumors [J]. *Hum Pathol*, 2005, 36(12): 1265 - 1272.
- [5] Urakami S, Shiina H, Enokida H, *et al.* Combination analysis of hypermethylated Wnt-antagonist family genes as a novel epigenetic biomarker panel for bladder cancer detection [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(7): 2109 - 2116.
- [6] Takada T, Yagi Y, Maekita T, *et al.* Methylation-associated silencing of the Wnt antagonist SFRP1 gene in human ovarian cancers [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(9): 741 - 744.
- [7] Shih YL, Shyu RY, Hsieh CB, *et al.* Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*, 2006, 107(3): 579 - 590.
- [8] Yang B, Guo M, Herman JG, *et al.* Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(3): 1101 - 1107.
- [9] Lehmann U, Berg-Ribbe I, Wingen LU, *et al.* Distinct methylation patterns of benign and malignant liver tumors revealed by quantitative methylation profiling [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10): 3654 - 3660.
- [10] Suzuki T, Yano H, Nakashima Y, *et al.* Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: a possible participation of beta-catenin in the dedifferentiation process [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17(9): 994 - 1000.
- [11] Deng G, Song GA, Pong E, *et al.* Promoter methylation inhibits APC gene expression by causing changes in chromatin conformation and interfering with the binding of transcription factor CCAAT-binding factor [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(8): 2692 - 2698.
- [12] Chen J, Rocken C, Lofton-Day C, *et al.* Molecular analysis of APC promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(1): 37 - 43.