

鼻咽癌组织中 SYK 基因启动子区的甲基化分析*

李璐¹, 梁辉^{2a}, 陈群蓉^{2b} (1. 北京大学深圳医院检验科, 广东深圳 518035;

2. 深圳市宝安区人民医院 a. 耳鼻咽喉科, b. 输血科, 广东深圳 518101)

摘要:目的 检测鼻咽癌组织中脾酪氨酸激酶(SYK)基因启动子区的甲基化状态,探讨 SYK 基因启动子区的甲基化与鼻咽癌发生的关系。方法 收集 2012 年 2 月~2014 年 8 月间在深圳市宝安区人民医院和北京大学深圳医院就诊的鼻咽癌患者 52 例,慢性鼻咽黏膜炎症患者 26 例,鼻咽癌和慢性鼻咽黏膜炎症患者均经病理学诊断证实。应用甲基化特异性 PCR 技术检测鼻咽癌和慢性鼻咽黏膜炎症组织的 SYK 基因启动子区的甲基化状态,比较鼻咽癌和慢性鼻咽黏膜炎症组织的 SYK 基因启动子区的甲基化率。结果 在 52 例鼻咽癌组织中有 11 例 SYK 基因启动子区存在甲基化,甲基化率为 21.2%,而在 26 例慢性鼻咽黏膜炎症组织中未检测到 SYK 基因启动子区的甲基化。结论 鼻咽癌组织中 SYK 基因启动子区存在较低程度的甲基化,这提示 SYK 基因启动子区出现的甲基化或许与鼻咽癌的发生相关。

关键词:鼻咽癌;SYK 基因;启动子;甲基化

中图分类号:R739.6;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)02-039-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.02.012

Methylation of SYK Gene Promoter Region in Nasopharyngeal Carcinoma

LI Lu¹, LIANG Hui^{2a}, CHEN Qun-rong^{2b}

(1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Hospital of Peking University, Guangdong

Shenzhen 518035, China; 2a. Department of Otorhinolaryngology; 2b. Department of

Blood Transfusion, People's Hospital of Shenzhen Baoan, Guangdong Shenzhen 518101, China)

Abstract: **Objective** To detect methylation of spleen tyrosine kinase (SYK) gene promoter region in nasopharyngeal carcinoma, and to explore relationship between carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma and methylation of SYK gene promoter region. **Methods** A total of 52 patients with nasopharyngeal carcinoma and 26 patients with chronic rhinitis from Baoan People's Hospital of Shenzhen Hospital of Peking University were enrolled in this study between February 2012 and August 2014. All cases were diagnosed by pathological examination. Methylation specific-polymerase chain reaction assay was performed to detect methylation status of SYK gene promoter region, the rate of methylation was compared for patients with nasopharyngeal carcinoma and patients with chronic rhinitis. **Results** The methylation of promoter region of SYK gene was detected for 11 biopsy samples among 52 nasopharyngeal carcinoma patients, the methylation frequency was 21.2% in nasopharyngeal carcinoma biopsy samples, while methylation was not found in 26 chronic rhinitis biopsy samples. **Conclusion** Low methylation of promoter region of SYK gene was found in nasopharyngeal carcinoma. It suggests that methylation of SYK gene promoter region may contribute to carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma.

Keywords: nasopharyngeal carcinoma; SYK gene; promoter; methylation

鼻咽癌是常见的恶性肿瘤之一,好发于中国南方各省及东南亚地区,发病年龄主要分布在 30~59 岁,严重威胁劳动力人口的健康。研究显示鼻咽癌的发生涉及 EB 病毒感染、遗传易感性、癌基因和抑癌基因的相互作用、环境及饮食等因素^[1]。近年来研究表明抑癌基因通过甲基化使自身表达受到抑制,是恶性肿瘤发生的一个重要机制,在鼻咽癌发生过程中就发现一些抑癌基因存在甲基化^[2]。脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, SYK)在造血细胞中广泛表达,其在淋巴细胞发生

及免疫细胞的活化过程中起着重要作用,SYK 表达缺失会导致免疫细胞失活,使机体失去对恶变细胞的监视和杀灭作用,因此 SYK 基因被认为是一个候选的抑癌基因^[3]。一些研究显示在乳腺癌、胃癌、白血病、结肠癌、直肠癌、肝癌、食管癌、宫颈癌及胰腺癌中 SYK 基因启动子区均出现 CpG 岛甲基化。在几株鼻咽癌细胞系中也发现 SYK 基因启动子区存在甲基化^[4]。为了探讨鼻咽癌组织的 SYK 基因启动子区是否也存在甲基化,本研究收集了 52 例鼻咽癌患者的石蜡包埋组织标本,通过

* 基金项目:深圳市宝安区科技计划项目(No. 2014027)。

作者简介:李璐(1975-),男,本科毕业,主管技师,主要从事实验诊断工作,E-mail:31656416@qq.com。

甲基化特异性 PCR 技术探讨鼻咽癌组织中 SYK 基因启动子的甲基化状态。

1 材料与方法

1.1 研究对象及标本 本研究中 52 例鼻咽癌患者(男性 32 例,女性 20 例)组织和 26 例慢性鼻咽黏膜炎症(男性 17 例,女性 9 例)组织均来源于 2012 年 2 月~2014 年 8 月间在深圳市宝安区人民医院和北京大学深圳医院耳鼻咽喉科就诊的患者,所有的鼻咽癌和慢性鼻咽黏膜炎症组织均经病理学诊断证实,其中鼻咽癌患者术前未经放射治疗或化学药物治疗。鼻咽癌患者年龄为 19~76 岁(47.6 ± 13.5 岁),慢性鼻咽黏膜炎症患者年龄为 14~72 岁(45.8 ± 11.8 岁),鼻咽癌和慢性鼻咽黏膜炎症患者的年龄及性别组成经 t 检验比较差异无统计学显著性意义($P > 0.05$)。52 例鼻咽癌患者病理分型为:高分化鳞癌 3 例,低分化鳞癌 46 例,未分化癌 3 例;鼻咽癌 TNM 临床分期(2005 年 WHO 建议)为:Ⅰ期 2 例,Ⅱ期 15 例,Ⅲ期 22 例,Ⅳa 期 11 例,Ⅳb 期 2 例。所有标本均取自深圳市宝安区人民医院和北京大学深圳医院病理科保存的蜡块标本,且本研究标本的使用获得深圳市宝安区人民医院和北京大学深圳医院伦理委员会批准。

1.2 试剂与仪器 Tris-HCl 饱和苯酚、氯仿、蛋白酶 K、无水乙醇、二甲苯、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、氢氧化钠(NaOH)、对苯二酚、亚硫酸氢钠、细胞裂解液及 PCR 反应试剂盒为生工生物工程(上海)股份有限公司产品。Wizard DNA 净化试剂盒为 Promega 公司产品。依据 SYK 基因(GenBank No. Z29630)序列设计的甲基化特异性上游引物序列为 5'-CGATTTTCGCGGGTTTCGTTTC-3',下游引物序列为 5'-AAAACGAACGCAACGCGAAAC-3',扩增的甲基化片段长度为 243 bp;上游引物序列为 5'-ATTTTTGTGGGTTTGTGTTGGTG-3',非甲基化下游引物序列为 5'-ACTTCCTTAACA-CACCCAAAC-3',扩增的非甲基化片段长度为 140 bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。TC9600 扩增仪和 C2500-R 低温离心机(美国 Labnet 公司),电热恒温水箱(上海精宏公司,型号 XMTD-8222),E0303-230V 电源及水平泳槽(美国 Labnet 公司),微量核酸蛋白分析仪(美国 Quawell 公司,型号 Q5000)。

1.3 方法

1.3.1 石蜡组织中基因组 DNA 提取:提取石蜡组织中基因组 DNA 的步骤如下:①将石蜡包埋组织块切成薄片,放于 1.5 ml 灭菌离心管中;②加入

1.0 ml 二甲苯振荡混匀溶解后除去石蜡;③加入 1.0 ml 无水乙醇轻转混匀,离心去除上清液和二甲苯,并使乙醇完全挥发;④加入 200 ml 含 250 mmol/L SDS 的细胞裂解液,同时加入 5 ml 的 200 mg/ml 的蛋白酶 K,60℃水浴 1 h;⑤用苯酚-氯仿法抽提基因组 DNA;⑥测定基因组 DNA 浓度和纯度,分成两份,一份于-30℃冰箱保存备用,另一份进行亚硫酸氢钠处理。

1.3.2 基因组 DNA 亚硫酸氢钠处理:基因组 DNA 的甲基化处理步骤如下:①取 2 g 从石蜡组织中提取的基因组 DNA 稀释于 50 ml 灭菌纯水中,再加入 2 mmol/L 的 NaOH 溶液 5.5 ml,37℃孵育 10 min,使基因组 DNA 解链成单链;②加入新配制的 10 mmol/L 对苯二酚 30 ml 及 3 mol/L 亚硫酸氢钠 520 ml,然后加入液体石蜡覆盖,50℃反应过夜,再除去液体石蜡;③使用 Wizard DNA 净化试剂除去盐离子;④用无水乙醇沉淀基因组 DNA,再溶于 30 ml 灭菌纯水中,测定基因组 DNA 浓度,于-30℃冰箱保存备用。

1.3.3 PCR 反应:PCR 扩增体系为 50 μ l,体系中含 5 μ l 10 × Taq Buffer (含 100 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L KCl, 1.0 mg/ml 明胶), 8 μ l 25 mmol/L MgCl₂, 0.4 μ l 25 mmol/L dNTPs, 2 ml 10 mmol/L 上、下游引物(甲基化特异性引物、非甲基化引物), 0.2 μ l 5 U/L Taq DNA 聚合酶(大连 TaKaRa 公司), 1 μ l 100 ng/L 基因组 DNA(亚硫酸氢钠处理的基因组 DNA、未处理的基因组 DNA),加水 33.4 μ l。PCR 扩增条件为:首先经 95℃变性 5 min;再进行 35 个扩增循环,每一循环包括 95℃变性 1 min, 60℃退火 45 s, 72℃延伸 45 s;循环完成后于 72℃再延伸 5 min。

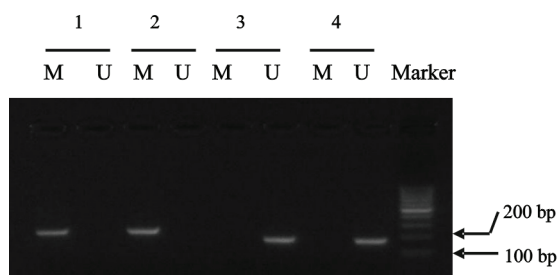
1.4 结果判断 PCR 扩增结束后取 10 μ l 扩增产物外加 2 μ l 上样缓冲液于 1.5 g/dl 琼脂糖凝胶上电泳,甲基化特异性引物扩增出目的条带者为甲基化阳性;非甲基化引物扩增出目的条带,甲基化特异性引物未扩增出目的条带者为甲基化阴性。

2 结果

2.1 鼻咽癌组织中 SYK 基因启动子区的甲基化 本研究的 52 例鼻咽癌组织标本中有 11 例检测到 SYK 基因启动子区的甲基化,甲基化率为 21.2%,而在 26 例慢性鼻咽黏膜炎症组织的对照组中均未检测到 SYK 基因启动子区的甲基化(图 1)。

2.2 鼻咽癌组织中 SYK 基因启动子区甲基化与肿瘤分型及分期 依据病理学分型,46 例低分化鳞癌组织中有 10 例检测到 SYK 基因启动子区的甲基化,3 例未分化癌中有 1 例检测到甲基化,3 例

高分化鳞癌中未检测到甲基化。由于本研究鼻咽癌病例较少,且癌组织中 SYK 基因启动子区的甲基化率较低,本研究未能探讨 SYK 基因启动子区的甲基化与肿瘤的病理分型间的相关性。依据 TNM 临床分期,15 例 II 期患者和 22 例 III 期患者中均检测到 4 例 SYK 基因启动子区的甲基化,11 例 IV a 期患者和 2 例 IV b 期患者中分别检测到 2 例和 1 例甲基化,2 例 I 期患者中未发现 SYK 基因启动子区的甲基化,因此本研究尚难明确 SYK 基因启动子区的甲基化与鼻咽癌 TNM 临床分期的相关性。



M: 甲基化特异性引物扩增条带; U: 非甲基化引物扩增条带; 1~3: 鼻咽癌组织标本; 4: 慢性鼻咽黏膜炎症组织

图1 SYK 基因启动子区的扩增

3 讨论 表观遗传是指 DNA 序列不发生变化但基因的表达却发生了可遗传的改变,如 DNA 甲基化、基因组印迹、组蛋白密码及 RNA 干扰等均属表观遗传学的改变,它是基因表达调控的一种重要机制^[5]。DNA 甲基化是在 DNA 甲基转移酶作用下,以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,将甲基转移到胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸中的胞嘧啶 5 位碳原子上,甲基化是哺乳动物基因组最常见的表观遗传修饰方式。研究已发现 DNA 甲基化与肿瘤的发生和发展相关,肿瘤细胞中基因组整体甲基化水平降低,组织特异性基因启动子区域出现甲基化,遗传不稳定性增加。研究显示癌基因多为低甲基化,低甲基化导致癌基因重新开放或异常表达;抑癌基因多为高甲基化,从而使抑癌基因表达受到抑制,抑癌基因启动子区域 CpG 岛高甲基化是导致恶性肿瘤发生的一个重要机制^[6]。近来研究发现与鼻咽癌发生和发展相关的抑癌基因较多,如 p53, p16, nm23, RASSF1A, CDH1, DLC1, DAPK, TSLC1, WIF1, PCDH10, EDNRB 及 LTF 等,与鼻咽癌发生和发展相关的抑癌候选基因有 NAG7, UBAP1, YH1, NGX6, SYK 等^[7]。

SYK 基因位于染色体 9q22.2 上,表达产物为非受体型蛋白酪氨酸激酶 SYK, SYK 广泛表达于造血细胞,被认为是一种抑癌候选基因^[8]。研究显示在乳腺癌、胃癌、结直肠癌、宫颈癌等恶性肿瘤组

织中 SYK 基因启动子区均出现 CpG 岛甲基化^[9]。国内关于鼻咽癌组织中 SYK 基因启动子区是否存在甲基化未见报道,但研究人员在几株鼻咽癌细胞系中发现 SYK 基因启动子区存在甲基化^[10]。因此本研究探讨鼻咽癌组织中 SYK 基因启动子区的甲基化状态。通过分析,本研究发现在鼻咽癌组织标本中, SYK 基因启动子区的甲基化率为 21.2%,而在慢性鼻咽黏膜炎症组织中均未检测到 SYK 基因启动子区的甲基化。南京医科大学第一附属医院刘月仙等^[11]在 61 例胃癌组织中发现 21 例患者 SYK 基因启动子区出现甲基化,而在癌旁组织中未发现 SYK 基因的甲基化。中山大学第一附属医院杨祖立等^[12]在 120 例结直肠癌肿瘤组织中发现 SYK 基因启动子区的甲基化率为 30.8%,而在癌旁组织中未检测到 SYK 基因启动子区的甲基化。同样在乳腺癌组织中,丁永斌等^[13]在 40 例乳腺癌组织中发现 17 例存在 SYK 基因启动子区的甲基化,而在癌旁组织及乳腺纤维瘤组织中均未发现 SYK 基因启动子区的甲基化。有研究发现肝细胞癌组织 SYK 基因启动子区甲基化的发生率显著高于癌旁肝组织,且甲基化的肝细胞癌患者术后复发转移率也显著高于非甲基化的肝细胞癌患者,这提示 SYK 基因启动子区的甲基化与肝细胞癌的发生及转移均存在相关^[14]。青岛大学医学院附属医院孙桂霞等^[15]对宫颈癌组织中 SYK 基因启动子区的甲基化研究显示 56.7% 宫颈癌组织存在甲基化,而正常宫颈组织的 SYK 基因启动子区未检测到甲基化。这些研究均提示 SYK 基因启动子区甲基化可能参与肿瘤的发生。

国内未见鼻咽癌组织中 SYK 基因启动子区的甲基化报道。本研究发现鼻咽癌组织中 SYK 基因启动子区的甲基化率为 21.2%,低于已报道的胃癌、结直肠癌、乳腺癌、肝细胞癌及宫颈癌等组织的 SYK 基因启动子区的甲基化率。结合上述研究报道,本研究认为 SYK 基因可能是一个抑癌基因,它可能通过高甲基化使自身表达受到抑制。由于在鼻咽癌组织中 SYK 基因启动子区的甲基化率较低,单独检测鼻咽黏膜组织中 SYK 基因启动子区的甲基化状态对鼻咽癌的诊断可能无参考意义。由于鼻咽癌组织中 SYK 基因启动子区的甲基化率较低,且本研究鼻咽癌病例较少,本研究未能探讨 SYK 基因启动子区的甲基化与肿瘤病理分型及 TNM 临床分期的相关性。本研究将继续收集鼻咽癌病例,以探讨 SYK 基因启动子区的甲基化与肿瘤病理分型及 TNM 临床分期的关系。

参考文献:

(下转 45 页)

165.
Zhang Y, Ji JJ, Liu YS, et al. Effect of aspirin combined with prednisone on pregnancy outcome in people with positive anti-phospholipid antibody undergoing IVF-ET[J]. J Int Reprod Health/Fam Plan, 2013, 32(3):162-165.
- [11] Abrahams VM. Mechanisms of antiphospholipid antibody associated pregnancy complications [J]. Thromb Res, 2009, 124(5):521-525.
- [12] 张丽敏, 张正宇. 泼尼松治疗孕前抗磷脂抗体引起复发性流产的临床研究[J]. 右江医学, 2009, 37(3): 294-295.
Zhang LM, Zhang ZY. Clinical studies of prednisone treatment antiphospholipid antibodies caused recurrent miscarriage before pregnancy [J]. Youjiang Medical Journal, 2009, 37(3):294-295.
- 收稿日期:2014-02-13
修回日期:2015-01-04
-
- (上接41页)
- [1] 汪碧琼, 陶华林, 唐明霞. SELDI-TOF-MS 技术筛选鼻咽癌患者血清标志蛋白[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(1):43-45.
Wang BQ, Tao HL, Tang MX. Screening for proteins marker from serum of patients with nasopharyngeal carcinoma by SELDI-TOF-MS technology[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2010, 25(1):43-45.
- [2] Lan J, Tai HC, Lee SW, et al. Deficiency in expression and epigenetic DNA methylation of ASS1 gene in nasopharyngeal carcinoma: negative prognostic impact and therapeutic relevance[J]. Tumour Biol, 2014, 35(1):161-169.
- [3] Kimura Y, Chihara K, Honjoh C, et al. Dectin-1-mediated signaling leads to characteristic gene expressions and cytokine secretion via spleen tyrosine kinase (Syk) in rat mast cells[J]. J Biol Chem, 2014, 289(45):31565-31575.
- [4] Dong SW, Zhang P, Zhong RR, et al. Expression of putative tumor suppressor gene spleen tyrosine kinase in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Lab, 2013, 59(5-6):647-653.
- [5] Dong Y, Wang A. Aberrant DNA methylation in hepatocellular carcinoma tumor suppression(review)[J]. Oncol Lett, 2014, 8(3):963-968.
- [6] Spruijt CG, Vermeulen M. DNA methylation: old dog, new tricks? [J]. Nat Struct Mol Biol, 2014, 21(11):949-954.
- [7] Carr SM, Munro S, Zalmas LP, et al. Lysine methylation-dependent binding of 53BP1 to the pRb tumor suppressor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(31):11341-11346.
- [8] Xia TS, Shi JP, Ding Q, et al. Reactivation of Syk gene by AZA suppresses metastasis but not proliferation of breast cancer cells[J]. Med Oncol, 2012, 29(2):448-453.
- [9] Ma L, Dong SW, Zhang P, et al. The relationship between methylation of the SYK gene in the promoter region and the genesis of lung cancer[J]. Clin Lab, 2010, 56(9/10):407-416.
- [10] Yang Z, Huo L, Chen H, et al. Hypermethylation and prognostic implication of Syk gene in human colorectal cancer[J]. Med Oncol, 2013, 30(2):586.
- [11] 刘月仙, 丁永斌, 杨力, 等. 候选抑癌基因 Syk 启动子甲基化与胃癌转移相关[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2006, 26(3):169-171, 194.
Liu YX, Ding YB, Yang L, et al. Relationship between hypermethylation of Syk gene in promoter and oncogenesis, metastasis of gastric carcinoma [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing(Natural Science), 2006, 26(3):169-171, 194.
- [12] 杨祖立, 汪建平, 元云飞, 等. 结直肠癌侵袭性与脾酪氨酸激酶基因 Syk 启动子甲基化的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(1):68-70.
Yang ZL, Wang JP, Yuan YF, et al. Hypermethylation of SYK gene in promoter region and its association with invasion in colorectal cancer[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2005, 22(1):68-70.
- [13] 丁永斌, 武正炎, 王水, 等. 候选抑癌基因 Syk 启动子甲基化与乳腺癌发生和转移的关系[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(4):290-293.
Ding YB, Wu ZY, Wang S, et al. Hypermethylation of Syk gene in promoter region is associated with oncogenesis, metastasis of breast carcinoma[J]. National Medical Journal of China, 2004, 84(4):290-293.
- [14] 周静, 高曰文, 胡汉卿. Syk 基因甲基化在肝癌中的研究进展及展望[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(2):430-432.
Zhou J, Gao YW, Hu HQ. The research progress and prospect of Syk gene methylation in liver cancer [J]. Journal of Modern Oncology, 2012, 20(2):430-432.
- [15] 孙桂霞, 赵淑萍, 马德花, 等. 宫颈癌组织中抑癌基因 Syk 启动子甲基化的研究[J]. 青岛大学医学院学报, 2009, 45(6):514-516.
Sun GX, Zhao SP, Ma DH, et al. Methylation of Syk gene promoter in Cervical Cancer [J]. Acta Academiae Medical Qingdao Universitatis, 2009, 45(6):514-516.
- 收稿日期:2014-11-24
修回日期:2015-01-20