

Reprimo 和 hMLH1 基因 甲基化在胃癌早期诊断价值的研究*

李颖^a, 易默^b, 何小勤^b

(陕西省人民医院 a. 腔镜中心; b. 消化内二科, 西安 710068)

摘要:目的 探讨 Reprimo 和 hMLH1 基因启动子区甲基化检测在胃癌早期诊断中的价值。方法 通过陕西省人民医院 2013 年 9 月~2014 年 4 月收治的慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生患者 50 例、异型增生患者 50 例、胃癌患者 50 例, 取内镜下胃活检组织, 并取正常胃黏膜活检组织 30 例作为对照组, 分析 Reprimo 基因和 hMLH1 基因启动子区甲基化表达情况, 比较各组患者间的差异。结果 患者组的胃黏膜组织中 Reprimo 基因和 hMLH1 基因启动子区甲基化阳性率显著高于正常组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Reprimo 基因启动子区甲基化阳性率: 慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生组 28% ($\chi^2 = 10.18, P < 0.05$); 异型增生组 56% ($\chi^2 = 25.84, P < 0.05$); 胃癌组 62% ($\chi^2 = 30.36, P < 0.05$); hMLH1 基因启动子区甲基化阳性率: 慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生组 20% ($\chi^2 = 4.39, P < 0.05$); 异型增生组 44% ($\chi^2 = 15.13, P < 0.05$); 胃癌组 48% ($\chi^2 = 17.41, P < 0.05$), 检测的特异度高。结论 Reprimo 和 hMLH1 基因甲基化检测在胃癌早期诊断中的价值很高, 特异度高, 是一种有效的诊断方式, 在患者的临床诊断方面拥有广阔的治疗前景。

关键词: Reprimo 基因; hMLH1 基因; 胃癌早期诊断

中图分类号: R735.2; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)03-053-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.03.015

Research on Reprimo, hMLH1 Gene Methylation in Early Diagnosis Value of Gastric Cancer

LI Ying^a, YI Mo^b, HE Xiao-qin^b (a. Department of Endoscopy Center;

b. Department of Gastroenterology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: **Objective** To investigate the Reprimo and hMLH1 gene promoter methylation detection value in the diagnosis of early gastric cancer. **Methods** Chose patients in Shaanxi Provincial People's Hospital from September 2013 to April 2014, 50 cases of patients with chronic atrophic gastritis with intestinal metaplasia, 50 cases of patients with gastric mucosal atypical hyperplasia, 50 patients with gastric cancer, endoscopic gastric biopsy samples, and 30 cases of normal gastric mucosa biopsy tissues as control group. Analysis abnormal expression in Reprimo gene and hMLH1 genes promoter methylation, compared the differences between groups of patients. **Results** The patients with gastric mucosal tissues Reprimo and hMLH1 genes promoter methylation positive rate was significantly higher than that of normal group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Reprimo gene promoter methylation were: patients with chronic atrophic gastritis with intestinal metaplasia 28% ($\chi^2 = 10.18, P < 0.05$). Patients with gastric mucosal atypical hyperplasia 56% ($\chi^2 = 25.84, P < 0.05$) and patients with gastric cancer 62% ($\chi^2 = 30.36, P < 0.05$). hMLH1 gene promoter methylation were: patients with chronic atrophic gastritis with intestinal metaplasia 20% ($\chi^2 = 4.39, P < 0.05$), patients with gastric mucosal atypical hyperplasia 44% ($\chi^2 = 15.13, P < 0.05$) and patients with gastric cancer 48% ($\chi^2 = 17.41, P < 0.05$), high specificity of detection. **Conclusion** Reprimo and hMLH1 gene's detect value in the diagnosis of early gastric cancer is very high, high specificity, it is an effective way of diagnosis, treatment in clinical diagnosis of patients with broad prospects.

Keywords: Reprimo gene, hMLH1 gene, early diagnosis of gastric cancer

胃癌是最常见的消化道肿瘤之一, 早期胃癌的 5 年生存率可达 95%, 但是由于早期无特异性症状, 很难被早期发现, “慢性胃炎-胃黏膜萎缩-肠上皮化生-异型增生-胃癌”为胃癌发生发展的一个连续性过程, 动物模型也进一步证实了这种发病过程^[1,2]。研究这一动态过程中基因水平的改变, 有

助于探究癌变机制和寻找胃癌早期诊断的分子标志。DNA 甲基化是肿瘤中最常见的分子改变之一, 主要发生在富含 CpG 岛的启动子区域, 通过该区域的甲基化阻碍转录因子与启动子结合, 从而使基因不能转录或转录水平降低。研究发现, 在人类肿瘤中几乎都存在 CpG 岛过度甲基化的现象^[3],

* 基金项目: 陕西省科技厅社发攻关项目(2013K12-03-18)。

作者简介: 李颖(1971-), 女, 消化内科副主任医师, 长期从事消化内镜的诊治工作, 研究方向: 消化道疾病的内镜诊治, Tel: 18 291937986, E-mail: 879359091@qq.com。

现已确认这种 CpG 岛高甲基化作用在肿瘤的发生发展中起到重要的作用且常发生于肿瘤的早期阶段,尤其表现在肿瘤抑制基因和错配修复基因。本研究检测从胃炎到胃癌发生发展全过程中抑癌基因 Reprimo 和错配基因 hMLH1 甲基化状况及其编码蛋白的异常表达情况,并分析其与临床特征的相关性,以期寻找一种胃癌早期诊断及筛选的方法,提高早期诊断率,为肿瘤患者创造更好的早期治疗机会。

1 材料与方法

1.1 研究对象 病例来源于陕西省人民医院 2013 年 9 月~2014 年 4 月收治的慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生 50 例、异型增生 50 例、胃癌患者 50 例。病例纳入标准:①胃镜病理诊断为慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生、异型增生、胃癌患者;②患者自愿参与研究,并签署知情同意书。病例排除标准:①患者同时患有其他胃肠系统疾病;②患有其他系统肿瘤,转移或不转移至胃部;③已通过手术,放疗化疗等手段进行治疗;④患者并发严重的其他系统疾病,器官衰竭等。另取 30 例正常活检胃黏膜组织作为对照组。经统计学分析,慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生、异型增生、胃癌三组患者与正常对照组年龄、性别等一般资料差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 仪器与试剂 甲基化修饰试剂盒以及 PCR 试剂均购自美国 Zymo Research 公司;引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成;Gel Doc 2000 凝胶成像分析系统为美国 BIO-RAD 公司产品;Gene Amp PCR System 9700PCR 仪为美国 ABI 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与处理:搜集研究对象的胃黏膜组织,在 20 min 内保存于 -76°C 液氮中备用;同时收集同一患者及对照人群血浆样本,采取清晨空腹静脉血 5 ml,EDTA 抗凝,3000 r/min 离心 10 min,取血浆 -76°C 保存。

1.3.2 甲基化检测:组织 DNA 提取按照 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN,德国)操作说明进行。核酸蛋白分析仪 Nanodrop2000 测其 A 值, $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 之间,符合纯度要求,凝胶电泳检测提取 DNA 的质量,剩余 DNA 置于 -20°C 冻存。取组织 DNA 500 ng,采用 EZ DNA Methylation-GOLD Kit(D5005)试剂盒进行 DNA 亚硫酸氢盐修饰与纯化,根据 ZymoTaq PreMix 说明书进行 PCR 反应,反应总体积为 25 μl ,Reprimo 甲基化特异性引物:上游为 5'-AGTTTGTGAGTGAGTGTTCAGTTT-3',下

游为 5'-CACATCCATCTAATTACCTAAAACCA-3'。Reprimo 非甲基化特异性引物:上游为 5'-TGCGAGTGAGCGTTTTCAGTTT-3',下游为 5'-GTCCGTCTAATTACCTAAAACCGA-3'。hMLH1 甲基化特异性引物:上游为 5'-TTGGT-TGGATATTTTGTATTTTTCGA-3',下游为 5'-CTCCCTAAAACAACACTACTACCCACT-3'。hMLH1 非甲基化特异性引物:上游为 5'-ATTG-GTTGGATATTTTCGTATTTTTC-3',下游为 5'-CCTAAAACGACTCTACCCGCT-3'。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 退火,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 42 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。以 Sss. I 甲基转移酶(New England Biolabs,美国)修饰的正常人外周血淋巴细胞 DNA 作为甲基化阳性对照,以未经修饰的正常人外周血淋巴细胞 DNA 作为非甲基化阳性对照,以双蒸水代替模板作为空白对照。取 PCR 产物 10 μl ,行 3 g/dl 琼脂糖凝胶电泳。Gel Doc 2000 凝胶成像分析系统观察并记录图像。MSP 结果判断:MSP 产物电泳时只出现未甲基化条带时,该样本记为未甲基化,而出现甲基化条带时,无论是否出现未甲基化条带,均记为甲基化。使用 BIO-RAD 凝胶成像仪分析成像结果。由成像仪自带的软件对实验结果进行相对定量,计算甲基化程度。所有的甲基化扩增产物经回收纯化后用 ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems,美国)进行测序分析。

1.3.3 研究指标:检测后计算各组的阳性检出率,检测特异度(阳性检出率=阳性患者人数/患者总人数,检测特异度=非患病阴性人数/非患病总人数),并比较各组患者之间的差异。

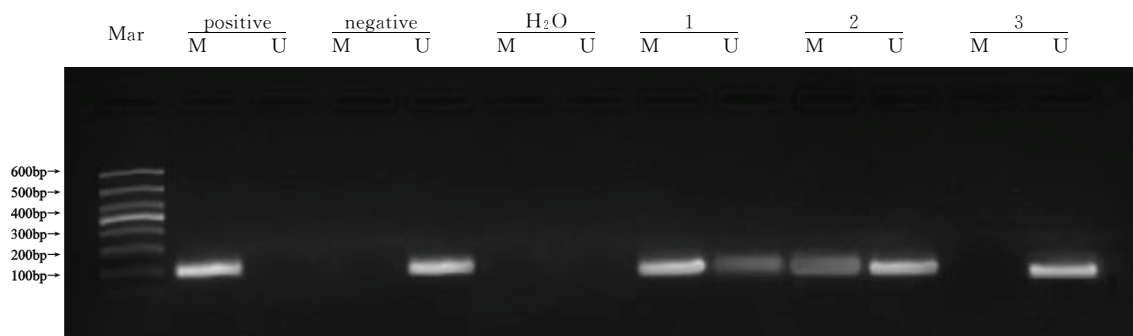
1.4 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计软件对所得数据进行统计分析,检测阳性率和检测特异度采用独立样本 $R \times C$ 列联表资料的 χ^2 检验,按 $\alpha = 0.05$ 的检验水准,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

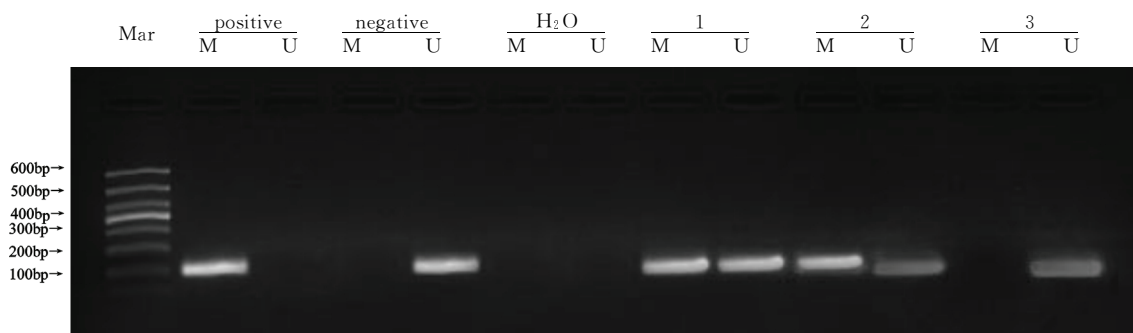
2.1 研究对象胃黏膜组织 Reprimo 基因启动子区甲基化检测结果 正常组胃黏膜样本中未检测出甲基化阳性表达,慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生组 28%(14/50),异型增生组 56%(28/50),胃癌组 62%(31/50),各组与正常对照组比较差异均有统计学意义(χ^2 分别为 10.18,25.84,30.36; P 均 < 0.05),见图 1。

2.2 研究对象胃黏膜组织 hMLH1 基因启动子区甲基化检测结果 正常组胃黏膜样本中仅 1 例检出 hMLH1 基因阳性表达 3.3%(1/30),慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生组 20%(10/50),异型增生组

44%(22/50),胃癌组48%(24/50),各组与正常对照组比较差异均有统计学意义(χ^2 分别为4.39, 15.13, 17.41; P 均 <0.05),见图2。



M. 甲基化;U. 非甲基化;positive. 阳性对照;negative. 阴性对照;H₂O. 蒸馏水对照;1. 胃癌组织;2. 异型增生;3. 肠上皮化生
图1 甲基化特异PCR检测不同组织中Reprimo结果



M. 甲基化;U. 非甲基化;positive. 阳性对照;negative. 阴性对照;H₂O. 蒸馏水对照;1. 胃癌组织;2. 异型增生;3. 肠上皮化生
图2 甲基化特异PCR检测不同组织中hMLH1结果

3 讨论 胃癌发病率在全球常见癌症中居第4位,每年因胃癌死亡者约70万例^[4]。中国每年死于胃癌的约有22.7万人,占所有恶性肿瘤死亡的23%。尽管治疗手段有所改进,但是预后仍主要取决于病灶侵袭的深度。早期胃癌的5年生存率可达95%,而一旦病灶侵袭至肌层或浆膜层,5年生存率在10%~20%左右^[5],如果在早期阶段进行手术治疗,胃癌甚至是可以治愈的。但是由于早期无特异性症状,很难被早期发现,胃癌患者的早期诊断率还不到1/10,大部分患者在就诊时已处于进展期,预后较差,5年生存率较低。众多学者致力于寻找较好的胃癌早期诊断方法。胃癌的早期诊断依赖于对癌前病变的随访追踪,萎缩性胃炎、肠化和上皮内瘤变广义上都被称为胃癌的癌前病变,是胃癌的危险因子,提高对其认识,进行随访监视可以检出早期癌变,提高胃癌的早期诊断率从而有效改善患者预后。

Reprimo 基因是新近发现的潜在抑癌基因,位于人2号染色体上,是调控细胞正常生长的基因之一。其编码的蛋白定位于胞质,是一种高度糖基化的蛋白,是P53介导的细胞周期调控的下游信号,可使异常的细胞停滞在G2期,停滞的细胞,其

Cdc2活性和cyclin B1核迁移被抑制,从而阻止细胞的异常增殖。

hMLH1是DNA错配修复系统的主要成员,在胃癌的发生同样有着重要作用,hMLH1蛋白参与碱基的错配修复过程,其异常表达直接影响细胞错配修复系统的功能,常会导致基因组的不稳定性。微卫星不稳定性(MI)与错配修复基因的异常有关,是大多数胃癌的特点,可以反映出潜在的错配修复缺损。众多研究通过对hMLH1基因在胃癌中的特点进行分析发现:胃癌中hMLH1蛋白表达异常,有MI者由于hMLH1高甲基化而导致其不表达,而没有MI者因为该基因未甲基化而表达,提示hMLH1基因启动子高甲基化可能是MI在胃癌中频繁出现的原因。并且通过对hMLH1启动子甲基化的胃癌患者没有癌变的黏膜进行甲基化分析发现,大部分癌旁组织也出现了甲基化,提示该基因甲基化可能是早期胃癌发展过程中最初的重要特点^[6~9]。本研究结果显示,患者组的胃黏膜组织中Reprimo基因和hMLH1基因表达阳性检出率显著高于正常组,差异有统计学意义($P<0.05$),检测的特异性高。与Bernal等^[10]的研究相一致,证实了Reprimo和hMLH1 (下转59页)

(上接 55 页)基因检测在胃癌的早期诊断中有很高的应用价值,检测患者血浆的方式也为肿瘤的诊断提供了一种方便、快捷和微创或无创的检测方法,检测所需样本量少,相对于组织易于获取,可以作为肿瘤辅助诊断的方法。

综上所述,Reprimo 基因和 hMLH1 基因检测在胃癌的早期诊断拥有较高的应用价值,且检测手段简便易行,不失为一种有效的诊断早期胃癌的方式,在临床诊断中拥有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Dirnu R,Secureanu FA,Neamtu C, et al. Chronic gastritis with intestinal metaplasia: clinico-statistical, histological and immunohistochemical study[J]. Rom J Morphol Embryol, 2012, 53(2): 293-297.
- [2] Tsukamoto T, Mizoshita T, Tatematsu M. Gastric-and-intestinal mixed-type intestinal metaplasia: aberrant expression of transcription factors and stem cell intestinalization[J]. Gastric Cancer, 2006, 9(3): 156-166.
- [3] Yamamoto E, Suzuki H, Takamaru H, et al. Role of DNA methylation in the development of diffuse-type gastric cancer[J]. Digestion, 2011, 83(4): 241-249.
- [4] Fock KM, Talley N, Moayyedi P, et al. 胃癌预防亚太地区共识与指南[J]. 胃肠病学, 2008, 13(4): 231-240.
- [5] Nomura S, Kaminishi M. Surgical treatment of early

gastric cancer[J]. Dig Surg, 2007, 24(2): 96-100.

- [6] Mir MR, Shabir N, Wani KA, et al. Association between p16, hMLH1 and E-cadherin promoter hypermethylation and intake of local hot salted tea and sun-dried foods in Kashmiris with gastric tumors[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(1): 181-186.
- [7] Alves MK, Ferrasi AC, Lima VP, et al. Inactivation of COX-2, HMLH1 and CDKN2A gene by promoter methylation in gastric cancer: relationship with histological subtype, tumor location and *Helicobacter pylori* genotype [J]. Pathobiology, 2011, 78(5): 266-276.
- [8] Xiao XQ, Gong WD, Wang SZ, et al. Polymorphisms of mismatch repair gene hMLH1 and hMSH2 and risk of gastric cancer in a Chinese population[J]. Oncol Lett, 2012, 3(3): 591-598.
- [9] Ling ZQ, Tanaka A, Li P, et al. Microsatellite instability with promoter methylation and silencing of hMLH1 can regionally occur during progression of gastric carcinoma[J]. Cancer Lett, 2010, 297(2): 244-251.
- [10] Bernal C, Aguayo F, Villarroel C, et al. Reprimo as a potential biomarker for early detection in gastric cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(19): 6264-6269.

收稿日期: 2015-03-25

修回日期: 2015-04-25