

[文章编号] 1007-385X(2003)01- 0039- 03

胃癌 MAGE-1 基因启动子 B’B 区去甲基化状态的研究

许琳¹, 罗兵², 王青¹, 徐翮飞², 黄维青¹, 梁华²(1. 青岛市立医院, 山东 青岛 266011; 2. 青岛大学医学院微生物教研室, 山东 青岛 266011)

[摘 要] 目的: 探讨胃癌组织中 MAGE-1 基因启动子 B’B 区去甲基化状态及其与病理分级及临床分期的关系。方法: 取胃癌组织标本 40 例, 另外取同患者相应的癌旁组织 40 例作为对照。采用分子生物学技术-甲基化敏感性内切酶酶切及 PCR 扩增技术, 研究了胃癌组织中 MAGE-1 启动子 B’B 区的去甲基化状态。结果: 在所检测的胃癌组织标本中 MAGE-1 基因启动子 B’B 区去甲基化的发生率为 25%(10/40)。而在癌旁组织中发生率为 0, 两者发生率的差别具有显著的统计学意义($P < 0.01$)。在低分化腺癌中 MAGE-1 基因的 B’B 区去甲化发生率为 50%(6/12), 中分化腺癌中发生率为 18.7%(3/16), 高分化腺癌中发生率为 8.3(1/11)。其发生率的差异有统计学意义($P < 0.05$)。在早期胃癌组织中 B’B 区的去甲基化的发生率为 16.7%, 在晚期胃癌组织中发生率为 28.6%($P < 0.05$), 差别有统计学意义。结论: 胃癌组织中 MAGE-1 基因启动子的 B’B 区存在去甲基化。该区的去甲基化发生率与胃癌组织的病理分级以及与临床分期有关。

[关键词] 胃癌; MAGE-1 基因启动子; 去甲基化

[中图分类号] R392.1 [文献标识码] A

Methylation State within MAGE-1 B’B Promoter in Gastric Carcinoma

XU Lin, LUO Bing, WANG Qing, XU He-fei, HUANG Wei-qing, LIANG Hua (Qingdao Municipal Hospital, 266011, Qingdao, China)

[Abstract] Objective: To study the methylation state within MAGE-1 B’B promoter in gastric carcinoma and the association between demethylation and pathological differentiation, the association between demethylation and clinical stage. Methods: Using methylation-sensitive restriction analysis followed by polymerase chain reaction (PCR), we studied 80 specimen that were obtained from surgical samples (including 40 gastric carcinoma and 40 matched adjacent normal gastric mucosae). Results: An demethylation state was identified in DNA from gastric carcinoma specimens. The demethylation rate is 25%(10/40). In contrast, no demethylation state was identified in DNA from matched adjacent normal gastric mucosae. The differences were Significant statistically. In our study, the demethylation in poorly, moderately, and well differentiated glandulous-cell carcinoma were detected at frequencies of 50% ,18.7% and 8.3% ,respectively, The differences were significant statistically ($P < 0.05$). The demethylation rate in early, late tumor stage was 16.7% and 28.6%, respectively. The differences were significant statistically($P < 0.05$). Conclusions: The demethylation in MAGE-1 B’B promoter is anomalous in gastric carcinoma, and maybe it is related to the expression of MAGE-1 gene in gastric carcinoma. The demethylation rate is related to the pathological and disease stages differentiation.

[Key words] gastric carcinoma; MAGE-1 gene promoter; demethylation

* 肿瘤的生物疗法已成为继手术、放疗、化疗后的第 4 种疗法, 肿瘤细胞的抗原性和诱导机体产生针对肿瘤抗原特异性免疫应答的能力是肿瘤免疫治疗的基础。编码黑色素瘤相关抗原的黑色素瘤抗原基因-1 (MAGE-1)作为沉默肿瘤相关基因, 在正常细胞不表达, 但具有在肿瘤细胞中转录并翻译出功能性产物而促进肿瘤演进的特点。该肿瘤抗原可被肿瘤患者 T 细

胞识别, 而成为一种十分有效的免疫系统攻击目标, 诱导机体的特异性细胞免疫和体液免疫反应, 阻止肿瘤的生长扩散和复发。胃癌作为最常见的消化道恶性肿瘤, 其治疗是当前肿瘤免疫学治疗研究的热点。本研

[作者简介] 许琳(1968-), 女, 河北省辛集市人, 副主任医师, 硕士研究生, 主要从事胃肠肿瘤研究。

究取胃癌组织标本 40 例及同患者相应的癌旁组织 40 例作为对照,采用甲基化敏感性内切酶酶切及 PCR 技术,探讨胃癌组织中 MAGE-1 基因启动子 B'B 区去甲基化状态及其与病理分级和临床分期的关系。以确定胃癌组织标本中 MAGE-1 基因的去甲基化状态以及对 MAGE-1 基因表达的影响,为进一步开展胃癌的免疫治疗提供实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本收集

40 例胃癌标本,取自青岛市立医院外科住院手术病人。其中高分化腺癌 12 例,中分化腺癌 16 例,低分化腺癌 12 例。病人年龄 35 ~ 73 岁,平均 49.18 ± 11.71 岁,其中男性患者 27 人,女性患者 13 人,同时选取同患者相应的癌旁组织 40 例作为对照,40 例胃癌及相应癌旁组织均经病理证实。

1.2 DNA 提取

用酚-氯仿-异戊醇法常规提取组织 DNA。

1.3 标本 DNA 的甲基化敏感性内切酶酶切反应

反应体系为:10 × buffer 2.0 μl, BSA 0.2 μl, Hpa II 2.0 μl, 标本 DNA 1 μl, 加去离子水至终体积 20 μl; 反应条件为: 37℃ 水浴 10 h。

1.4 酶切后产物 PCR 扩增

1.4.1 引物设计

MAGE-1 基因引物参照文献[1]设计,由上海生物工程技术公司合成,序列如下:CDS20:(有意链引物) 5'GTTCCCGCCAGGAAACAT 3'; CDS22:(有意链引物) 5'AGAAGCGAGGTTTCCATT 3' ; EDP4:(反意链引物) 5'GGGGCTCTCTATTTGTAG 3'

1.4.2 MAGE-1 基因启动子 B'B 区基因序列

Ets Ets ATF

- 67 AAACATCCGGGTGCCCCGATGTGACGCCA - 43

B' - 55 B

1.4.3 PCR 扩增条件

1.4.3.1 PCR 反应体系

反应体积为 30 μl, 其中 10 × PCR buffer 3 μl, Mg²⁺ 终浓度为 1.5 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1 U, dNTP 终浓度为 0.2 μmol/L, 3 条引物的终浓度均为 0.4 μmol/L, 酶切后产物 5 μl, 加入去离子水至终体积为 30 μl。混匀后加无菌石蜡覆盖液面, 瞬时离心后, 放入 PCR 扩增仪。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 然后 94℃ 变性 1 min, 55℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.4.3.2 PCR 产物电泳

取 10 μl 扩增产物于含 EB(0.5 μg/ml) 的 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 80 U, 1 h, 紫外透射仪下观察结果, 根据观察到的扩增条带带型确定 MAGE-1 基因 B'B 区甲基化状态。

2 结 果

2.1 胃癌组织及相应癌旁组织中 MAGE-1 基因启动子 B'B 区甲基化状态电泳结果(见图 1)。

图 1 部分胃癌组织 MAGE-1 基因甲基化检测结果
Fig. 1 Results of methylation analysis within MAGE-1 gene B'B promoter in some gastric carcinoma
Lane 1: DNA marker DL2000; Lane 2 ~ 5: Four PCR products amplified after Hpa II digested of gastric carcinoma DNA; Lane 6 ~ 8: In order of Lane 3 ~ 5, 4 PCR products amplified directly the gastric carcinoma DNA

电泳显示 Lane2 和 Lane4 标本的 B'B 区未被切开, 而 Lane3 和 Lane5 标本的 B'B 区至少一处被切开。在 MAGE-1 基因 B'B 区不存在去甲基化的标本中出现 197 bp, 131 bp 2 条 PCR 扩增条带; 而在 B'B 区存在至少一处的去甲基化现象的标本中, 只出现 131 bp 1 条 PCR 扩增条带(见图 2)。

图 2 部分癌旁组织 MAGE-1 基因甲基化检测结果
Fig. 2 Results of methylation analysis within MAGE-1 gene B'B promoter in some adjacent normal gastric mucosae
Lane 1: DNA marker DL2000l; Lane 2 ~ 5: Four PCR products amplified after Hpa II digested of DNA from adjacent normal gastric mucosae; Lane 6 ~ 8: In order of lane 3 ~ 5, 4 PCR products amplified directly the DNA from adjacent normal gastric mucosae

结果显示均未见有 MAGE-1 基因启动子 B'B 区的去甲基化现象,因此可观察到 197 bp,131 bp 2 条 PCR 扩增条带。

2.2 胃癌组织及相应癌旁组织中

2.2.1 MAGE-1 基因启动子 B'B 区甲基化状态结果分析

在我们研究的 40 例胃癌组织中,有 10 例发现有 MAGE-1 基因启动子 B'B 区的至少一处去甲基化现象。而在 40 例相对应的癌旁组织中未见有 MAGE-1 基因启动子 B'B 区的去甲基化现象,经统计学分析结果显示为 $X^2=9.257, X^2_{0.01(1)}=6.635 (P<0.01)$,差别具有显著的统计学意义。

2.2.2 对 40 例胃癌组织 MAGE-1 基因启动子 B'B 区甲基化状态进行比较分析

发现在 12 例高分化腺癌中有 1 例发生去甲基化现象,发生率为 8.3%;在 16 例中分化腺癌中有 3 例发生去甲基化现象,发生率为 18.7%;在 12 例低分化腺癌中有 6 例发生去甲基化现象,发生率 50%,经 SPSS 9.0 Rsx 列表分析, $X^2=3.974 (P<0.05)$,差别有统计学意义。

2.2.3 分析其发生与临床分期的关系

12 例早期胃癌(Ⅰ+Ⅱ)患者中有 2 例 MAGE-1 基因 B'B 区发生去甲基化,发生率为 16.7%,28 例晚期胃癌(Ⅲ+Ⅳ)患者中有 8 例发生去甲基化,发生率为 28.6%,经 *F* 精确检验显示($P<0.05$),两者差别有统计学意义。

3 讨论

1991 年 van der Bruggen 等^[2]人在黑色素瘤中发现有 MAGE-1 基因的表达,并且其表达产物有较高的特异性,成为当前免疫治疗研究的热点。De Smet 等^[3]人认为在启动子 Ets 结合位点的 CpG 双核苷酸去甲基化状态与 MAGE 基因表达有关。MAGE-1 基因 B'B 区的 DNA 甲基化足以通过阻止转录因子的结合而阻断 MAGE-1 的转录^[4]。Serrano 等^[1]证实了肿瘤组织基因与 2 条有意义引物的结合区域内至少存在一处 Hpa II 切割位点的去甲基化与甲基化两种状态。也证实了那些仅出现一条目的扩增条带的标本其 B'B 区至少存在一处 Hpa II 活性位点的去甲基化状态。Janssen 等^[5]人采用定量 Real-Time PCR 技术检测了 19 个黑色素瘤细胞系和 9 个非黑色素瘤细胞系,实验结果再次证实了 Ets 结合位点去甲基化与 MAGE-1 基因表达的正相关关系。本研究证明,去甲基化药物 DAC 的处理,能造成原本的 MAGE-1 基因非表达细胞株成为表达细胞株。在 40 例胃癌组织中,有 10 例 MAGE-1 基因 B'B

区至少存在一处的去甲基化现象,而 40 例相对应的癌旁组织中无一例存在 B'B 区的去甲基化现象,两者差别具有显著的统计学意义($P<0.01$),提示在胃癌组织中, B'B 区的去甲基化状态存在明显的异常。我们在实验中同时发现, MAGE-1 基因 B'B 区去甲基化的发生率在不同病理分级标本中各不相同,该差别具有统计学意义。提示若采用 MAGE-1 基因表达产物作为抗原进行免疫治疗,那么治疗前患者病变部位的病理分级是应该考虑的。而且高分化腺癌的患者有可能对以 MAGE-1 基因产物纯化物为抗原的免疫治疗反应性较差,而在低分化腺癌中,该治疗可能有较好的效果,因此对高分化腺癌的患者则应慎重考虑该治疗方法。实验结果显示,在胃癌的不同临床分期标本中 MAGE-1 基因启动子 B'B 区的去甲基化发生率是不同的,早期胃癌 MAGE-1 基因 B'B 区去甲基化发生率为 16.7%,晚期胃癌为 28.6%,经 *F* 精确检验显示($P<0.05$)两者差别有统计学意义,提示 MAGE-1 基因的表达为肿瘤发生发展中的晚期事件,这也提示采用 MAGE-1 基因产物纯化物为抗原的免疫治疗有可能对不同临床分期的患者效果不同,故在未来以 MAGE-1 基因产物纯化物为抗原的免疫治疗中应考虑临床分期。

本实验仅对 MAGE-1 基因 B'B 区去甲基化状况进行了研究,更深入的研究如基因缺失、mRNA 的表达、免疫组化检测该基因在细胞中的表达等需进一步探索,以便为将来利用 MAGE-1 基因产物作为抗原进行胃癌的免疫治疗提供实验基础和理论依据。

【参考文献】

- [1] Serrano A, Garcia A, Abriel E, *et al.* Methylated CpG points identified with in MAGE-1 promoter are involved in gene repression[J]. *Int J Cancer*, 1996, 68: 464-470.
- [2] van der Bruggen P, Traver SC, Chomez P, *et al.* A gene encoding and antigen recognized by Cytolytic T lymphocytes on a human melanoma[J]. *Science*, 1991, 254: 1643-1647.
- [3] de Smet C, de Backer O, Faraoni I, *et al.* The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 7149-7153.
- [4] Diala ES, Cheah MS, Rotwich D, *et al.* Extent of DNA methylation in human tumor cells[J]. *Natl Cancer Inst*, 1983, 71: 755-764.
- [5] Janssen BL, van de Locht LT, Fourkour A, *et al.* Transcription of the MAGE-1 gene and the methylation status of its Ets binding promoter elements: A quantitative analysis in melanoma cell lines using a real-time polymerase chain reaction technique[J]. *Melanoma Res*, 1999, 3: 213-222.

【收稿日期】 2002-08-01

【修回日期】 2002-10-30