

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.06.002

· 研究快报 ·

## 食管鳞状细胞癌中 *Smad4* 基因 CpG 岛甲基化状态分析

董稚明, 郭 炜, 郭艳丽, 杨植彬, 邝 钢(河北医科大学第四医院肿瘤研究所, 河北石家庄 050011)

[摘要] 目的:探讨食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中 *Smad4*(mothers against decapentaplegic homolog 4)基因启动子区及第一外显子区的 CpG 岛甲基化状态及其与 *Smad4* 蛋白、TGF- $\beta$ 1 蛋白表达之间的相关性。方法:128 例 ESCC 组织标本采集自河北医科大学第四医院 2004-2008 年的手术病例,每例患者均取癌旁正常黏膜组织作对照。分别应用甲基化特异性 PCR(methylmion specific PCR, MSP)、RT-PCR 和免疫组织化学法检测 ESCC 组织及相应癌旁组织中 *Smad4* 基因 CpG 岛的甲基化情况、*Smad4* mRNA 和 *Smad4* 蛋白表达情况,应用免疫组织化学法检测 TGF- $\beta$ 1 的蛋白表达情况。结果:ESCC 组织中 *Smad4* 基因启动子区 CpG 岛甲基化率为 5.5% (7/128),第一外显子 5'非翻译区 CpG 岛甲基化率为 30.5% (39/128);相应癌旁正常黏膜组织均未检测到这两个位点的甲基化( $P < 0.05$ );ESCC 组织中 *Smad4* 甲基化率显著高于癌旁正常组织( $P < 0.05$ )。ESCC 组织中 *Smad4* mRNA 及蛋白表达显著低于癌旁正常组织( $P < 0.05$ ),且与 *Smad4* 甲基化相关。TGF- $\beta$ 1 蛋白在 ESCC 组织中的表达率(66.4%)显著高于相应癌旁正常组织(21.9%,  $P < 0.01$ ),且随 ESCC 分期的增高和分化程度的降低而升高( $P < 0.05$ )。*Smad4* 和 TGF- $\beta$ 1 蛋白在 ESCC 中的表达呈明显的负相关( $P < 0.01$ )。结论:*Smad4* 基因 CpG 岛甲基化及 TGF- $\beta$ 1 的过表达可能是 ESCC 发生机制之一,其中 *Smad4* 基因第一外显子 5'非翻译区 CpG 岛比启动子区 CpG 岛更易发生甲基化,从而导致 *Smad4* 基因沉默。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; *Smad4*; DNA 甲基化; TGF- $\beta$ 1; CpG 岛

[中图分类号] R735.1; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)06-0597-07

## Methylation status of CpG island of *Smad4* gene in esophageal squamous cell carcinoma

DONG Zhi-ming, GUO Wei, GUO Yan-li, YANG Zhi-bin, KUANG Gang (Cancer Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the methylation status in promoter and exon1 CpG island of *Smad4* (mothers against decapentaplegic homolog 4) gene and its correlation with protein expressions of *Smad4* and TGF- $\beta$ 1 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods:** Totally 128 ESCC samples and the corresponding adjacent normal tissues were obtained from Fourth Hospital of Hebei Medical University (2004-2008) in the present study. Methylation specific PCR (MSP), RT-PCR and immunohistochemistry assays were used to examine the methylation status of 5' CpG island, mRNA and protein expression of *Smad4* in ESCC and the corresponding adjacent normal tissues. Immunohistochemistry method was used to detect the protein expression of TGF- $\beta$ 1 in ESCC and the corresponding adjacent normal tissues. **Results:** For the CpG island of promoter site, *Smad4* was methylated in 7/128 (5.5%) ESCC tissues; for the CpG island of 5' UTR of exon1, *Smad4* was methylated in 39/128 (30.5%) ESCC tissues; the numbers were all significantly higher than those in the corresponding adjacent normal tissues ( $P < 0.05$ ). *Smad4* mRNA and protein expressions in ESCC tissues were significantly lower than those in the corresponding adjacent normal tissues ( $P < 0.05$ ) and were correlated with *Smad4* methylation status. TGF- $\beta$ 1 expression rate was 66.4% in ESCC tissues, which was significantly higher than that in the corresponding adjacent normal tissues ( $P < 0.01$ ), and TGF- $\beta$ 1 expression rate was increased with the increase of MNT stage and the decrease of differentiation stage of ESCC ( $P < 0.05$ ). The protein expression of *Smad4* was inversely

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题计划(No. 20090465)。Project supported by the Key Medical Science Research Foundation of Hebei Province (No. 20090465)

[作者简介] 董稚明(1963-),男,河北省泊头市人,主任医师,主要从事肿瘤分子病理学研究

[通信作者] 董稚明(DONG Zhi-ming, corresponding author), E-mail: dddzzmm@ yahoo.com.cn

[网络出版] 2010-12-01; <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20101201.1552.005.html>

correlated with TGF-β1 expression in ESCC. **Conclusion:** Methylation of CpG island in *Smad4* gene and TGF-β1 overexpression might play important roles in the development of ESCC, and CpG island in 5' UTR of exon1 in *Smad4* gene is more likely to be hypermethylated than the promoter region and results in *Smad4* gene silence.

[ **Key words** ] esophageal squamous cell carcinoma; DNA methylation; *Smad4* gene; TGF-β1; CpG island

[ Chin J Cancer Biother, 2010, 17(6): 597-603 ]

转化生长因子-β( transforming growth factor-β, TGF-β )信号通路具有广泛的生物学作用,通过调节基因在细胞核的转录参与细胞的凋亡、分化和细胞周期的调控,其信号转导主要是激活 Smad 蛋白通路<sup>[1]</sup>。*Smad4*( mothers against decapentaplegic homolog 4 )最初在胰腺癌的研究中被确定为候选抑癌基因,定位于 18q21.1,主要参与 TGF-β 超家族的信号转导,是 TGF-β 信号转导通路所必须的下游信号分子。*Smad4* 表达缺失在人类肿瘤中较为多见,在胰腺癌和结直肠癌中 *Smad4* 基因的突变导致其表达降低并与肿瘤的恶性进展相关<sup>[2-3]</sup>。在食管腺癌、结肠癌和胃癌中还可发生 *Smad4* 基因启动子区高甲基化而导致 *Smad4* 基因失活<sup>[4-6]</sup>,但 *Smad4* 在食管鳞癌( esophageal squamous cell carcinoma, ESCC )中的甲基化状态国内外尚未见报道。本研究拟检测 ESCC 中 *Smad4* 基因 CpG 岛的甲基化状态及其与 TGF-β1 表达的相关性,为确定 *Smad4* 基因 CpG 岛甲基化在 ESCC 中的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

蛋白酶 K 购于 Merck 公司,氢醌、亚硫酸氢钠购于 Sigma 公司, TRIzol 购于 Invitrogen 公司,鼠抗人 *Smad4* 单克隆抗体( sc-7966 )和兔抗人 TGF-β1 多克隆抗体( sc-146 )购于 Santa Cruz 公司。Wizard DNA 纯化试剂盒、逆转录试剂盒( reverse transcription system A3500 )购于 Promega 公司,即用型免疫组织化学 S-P 法试剂盒购于北京中杉金桥生物技术公司。所有引物均在北京赛百胜公司合成。

1.2 研究对象和标本来源

研究对象均来自河北医科大学第四医院2004 - 2008 年间的食管癌手术患者,共 128 例,其中男性 92 例,女性 36 例,年龄范围 38 ~ 77 岁,中位年龄 59.8 岁。每例患者均取癌旁正常黏膜组织及食管癌原发灶组织,全部患者术前均未经化疗和放疗。手术切除标本一部分于 - 80 °C 冻存用于 RNA 的提取,一部分以 10% 中性甲醛溶液固定,常规制作蜡块保存,用于 DNA 的提取和免疫组织化学染色。肿瘤组织及癌旁组织均经常规病理诊断证实。按照国

际抗癌联盟( UICC )标准进行 TNM 分期,128 例 ESCC 患者中 I 期有 6 例( 4.7% )、II 期有 63 例( 49.2% )、III 期有 55 例( 43.0% )、IV 期有 4 例( 3.1% )。按照 ESCC 的病理学分级,31 例为高分化( 24.2% ),50 例为中等分化( 39.1% ),47 例为低分化( 36.7% )。

1.3 甲基化特异性 PCR( methylmion specific PCR, MSP )检测 *Smad4* 基因 CpG 岛的甲基化状态

每个标本均取 10 μm 石蜡切片 10 ~ 20 片,按常规蛋白酶 K 消化,酚/氯仿抽提法提取癌组织和癌旁组织基因组 DNA。每个样本取 5 μg DNA,用 2 mol/L NaOH 变性处理,于 10 mmol/L 氢醌和 3 mol/L 亚硫酸氢钠中 50 °C 反应 16 h,然后用 Wizard DNA 纯化试剂盒纯化。经亚硫酸氢盐处理后, DNA 中的 C 转变为 U;如基因的 CpG 岛发生甲基化后,则不能发生这种改变。根据此原理设计相应的引物,检测该基因是否发生甲基化。由于基因甲基化多发生在启动子区及第一外显子区富含 CpG 岛的部位,在检索文献及比对最新 Genbank 数据库的基础上,本研究最终确定了 *Smad4* 基因的两个富含 CpG 岛的部位( 图 1 )进行分析,其中一个部位位于启动子区<sup>[10]</sup>,另一个部位位于第一外显子的 5'非翻译区<sup>[8]</sup>,具体的引物及反应条件见表 1。MSP 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,用 UV 凝胶电泳成像及图像分析系统进行图像分析。MSP 阳性对照采用基因组 DNA 经甲基化酶 Sss I ( New England BioLabs, Inc. , Beverly, MA )处理以后进行 PCR,阴性对照用灭菌双蒸水取代 DNA 模板进行 PCR。为进行 MSP 检测的质量控制,随机选取 10% 标本进行重复实验。

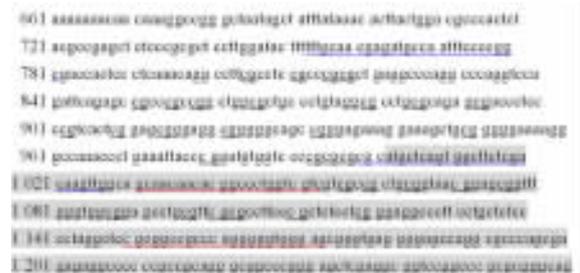


图 1 用于甲基化研究的 *Smad4* 基因序列  
Fig.1 *Smad4* gene sequence in the present methylation reseach

表1 *Smad4* 基因 MSP 及 RT-PCR 引物序列及反应条件Tab.1 Primer sequence and reaction condition in MSP and RT-PCR assays detecting *Smad4* gene

Assay	Primer sequence	Annealing temp. ( t/°C )	Product size( bp )
MSP	Smad4 methylation( promoter )	F:5'-GTAACGAGATGTTAATTTTTTCGGC-3'	
		R:5'-ACTTATCGAAAAACCACTAAACATACG -3'	49
	Unmethylation( promoter )	F:5'-TTTGTAATGAGATGTTAATTTTTTTGGT-3'	
		R:5'-CAACTTATCAAAAAACCACTAAACATACA-3'	56
	Methylation( exon1 )	F:5'-GTA ATA ATA CGG TTT TGG TCG TC-3'	
		R: 5'-CTC CCA CCC CCT AAA CGA CCG CG-3'	64
Unmethylation( exon1 )	F: 5'-GTA ATA ATA TGG TTT TGG TTG TT-3'		
	R: 5'-CTC CCA CCC CCT AAA CAA CCA CA-3'	59	
RT-PCR	Smad4	F: 5'- ATCTGAGTCTAATGCTACC-3'	
		R: 5'- CGTATCCATCAACAGTAAC-3'	58
	GAPDH	F: 5'- GGGAAACTGTGGCGTGAT -3'	
		R: 5'- GTGGTCGTTGAGGGCAAT-3'	58

#### 1.4 RT-PCR 检测 *Smad4* mRNA 的表达

按 TRIzol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA,并参照逆转录试剂盒说明书的比例加样,将 RNA 逆转录成 cDNA。RT-PCR 的引物及内参照 GAPDH 的引物及反应条件见表 1。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,采用 Gel Work-2ID 软件,对电泳图像中 *Smad4* mRNA 的表达进行半定量分析。以 *Smad4* 条带光密度值与 *GAPDH* 条带光密度值的比值表示 *Smad4* 基因的相对表达强度,并取重复 3 次实验的平均值。

#### 1.5 免疫组织化学方法检测组织中 *Smad4* 和 TGF- $\beta$ 1 蛋白的表达

石蜡切片常规脱蜡至水,3% 甲醇  $H_2O_2$  封闭内源性过氧化物酶,微波修复 15 min。依次加入一抗 (*Smad4* 或 TGF- $\beta$ ) 及相应生物素化二抗和辣根过氧化物酶标记的三抗,DAB 显色,苏木精复染细胞核,常规脱水,透明,中性树脂封片。PBS 取代一抗作为空白对照,其余步骤同上。正常食管黏膜组织作为 *Smad4* 表达的阳性对照,乳腺癌组织作为 TGF- $\beta$ 1 表达的阳性对照。

#### 1.6 统计学分析

采用 SPSS 软件( 11.5 版 )进行统计分析。计数资料采用  $\chi^2$  和校正  $\chi^2$  检验,计量资料采用 *t* 检验,相关性分析采用 Spearman 分析( 双侧检验 ), $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ESCC 组织中 *Smad4* 基因 CpG 岛甲基化状态

对于启动子区 CpG 岛位点,128 例 ESCC 组织 *Smad4* 的甲基化率为 5.5% ( 7/128, 图 2A ),而相应癌旁正常黏膜无甲基化,癌组织 *Smad4* 基因甲基化率显著高于癌旁正常组织 ( $\chi^2 = 5.29, P = 0.02$ )。按照 TNM 分期及病理分级进行统计分析,*Smad4* 基因甲基化率没有明显差异 ( $P > 0.05$ )。对于第一外显子的 5' 非翻译区 CpG 岛位点,ESCC 组织中 *Smad4* 的甲基化率为 30.5% ( 39/128, 图 2B ),相应癌旁正常组织均未检测到甲基化,癌组织 *Smad4* 基因 CpG 岛甲基化率显著高于癌旁正常组织 ( $\chi^2 = 46.01, P = 0.00$ )。启动子区发生甲基化的 7 例 ESCC 组织,其第一外显子也均呈现为甲基化状态。

按照 TNM 分期进行统计分析,Ⅲ期和Ⅳ期 ESCC 患者中 *Smad4* 基因发生甲基化率显著高于Ⅰ期和Ⅱ期患者 ( $\chi^2 = 5.39, P = 0.02$ )。按照 ESCC 的病理分级进行统计分析,高、中、低分化 ESCC 发生甲基化的比例亦有明显差异 ( $\chi^2 = 7.28, P = 0.03$ ) ( 表 2 )。

### 2.2 ESCC 组织中 *Smad4* mRNA 表达情况及其与 *Smad4* 甲基化的关系

在 98 例 ESCC 组织及相应的癌旁组织中,以 RT-PCR 检测了 *Smad4* mRNA 的表达情况( 图 3 )。ESCC 组织中 *Smad4* mRNA 的表达显著低于相应的

癌旁组织(  $0.493 \pm 0.180$  vs  $0.872 \pm 0.292$ ,  $P < 0.01$  )。对于启动子区,甲基化阳性的ESCC组织 *Smad4* mRNA 的表达低于未发生甲基化的ESCC组织,但不具有统计学意义(  $0.478 \pm 0.164$  vs  $0.516 \pm 0.201$ ,  $P > 0.05$  );对于第一外显子的5'非翻译区位点,甲基化阳性的ESCC组织 *Smad4* mRNA 表达显著低于未发生甲基化的ESCC组织(  $0.285 \pm 0.082$  vs  $0.606 \pm 0.261$ ,  $P < 0.01$  )。

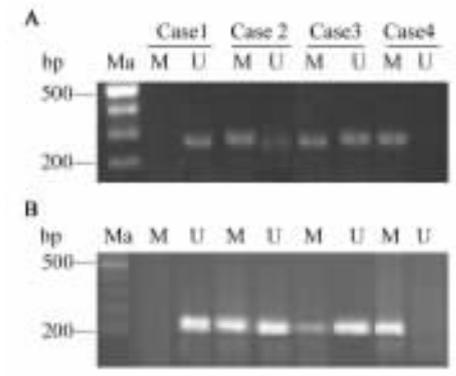


图2 ESCC组织中 *Smad4* 基因甲基化分析

Fig. 2 Methylation analysis of *Smad4* gene in ESCC tissues

A: Methylation status of promoter in *Smad4* gene;

B: Methylation status of exon1 in *Smad4* gene

U: Unmethylated *Smad4* gene; M: Methylated *Smad4* gene;

Ma: Marker; Cases 1: Unmethylation tissue; Case 2, 3: Partly methylated tissue; Case 4: Fully methylated tissues

表2 *Smad4* 基因甲基化与

ESCC患者临床病理特征的关系(  $n$  )

Tab. 2 Relationship of methylation status of *Smad4* gene with clinical pathological characteristics of ESCC patients(  $n$  )

Group	N	Promoter			Exon 1		
		M	U	P	M	U	P
TNM stage							
I	6	0	6		0	6	
II	63	3	60		15	48	
III	55	3	52		22	33	
IV	4	1	3	0.703 <sup>a</sup>	2	2	0.020 <sup>a</sup>
Differentiation							
Well	31	1	30		6	25	
Moderate	50	3	47		12	38	
Poor	47	3	44	0.817 <sup>b</sup>	21	26	0.026 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>  $P$  value of stage III and IV groups vs stage I and II;

<sup>b</sup>  $P$  value among three differentiation groups; M: Methylation; N: Unmethylation

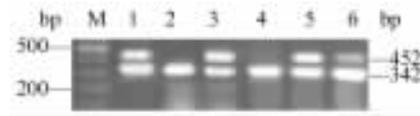


图3 RT-PCR分析ESCC组织中 *Smad4* mRNA 的表达情况

Fig. 3 RT-PCR analysis of *Smad4* mRNA expression in ESCC tissues

M: 100 bp DNA marker; 1,3,5,6: Positive *Smad4* mRNA expression; 2,4: Negative *Smad4* mRNA expression

### 2.3 ESCC组织中 *Smad4* 蛋白表达情况及其与 *Smad4* 甲基化的关系

*Smad4* 蛋白免疫组化染色为胞质和胞核着棕色(图4),ESCC组织中 *Smad4* 蛋白表达阳性率为48.4%(62/128),显著低于相应的癌旁正常组织(96.9%,124/128)( $P < 0.01$ )。III期和IV期ESCC组织 *Smad4* 蛋白表达显著低于I期和II期(表2,  $\chi^2 = 5.45$ ,  $P = 0.02$ );随着肿瘤组织分化程度的降低,*Smad4* 蛋白阳性表达率逐渐降低( $\chi^2 = 8.33$ ,  $P = 0.02$ )(表3)。发生 *Smad4* 启动子区高甲基化的7例ESCC肿瘤组织中,*Smad4* 蛋白表达均为阴性;发生第一外显子5'非翻译区高甲基化的39例ESCC组织中,35例 *Smad4* 蛋白表达为阴性。结果显示, *Smad4* 基因的甲基化与其蛋白表达缺失有明显的相关性( $P < 0.01$ ,表4)。

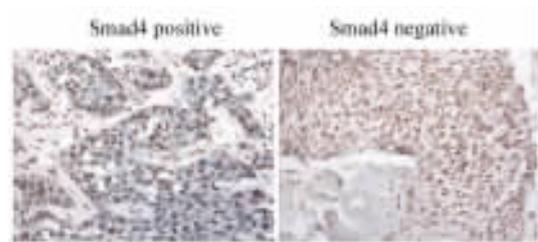


图4 ESCC组织中 *Smad4* 蛋白的表达(S-P染色,  $\times 200$ )

Fig. 4 *Smad4* protein expression in ESCC tissues(S-P,  $\times 200$ )

### 2.4 ESCC组织中 TGF- $\beta$ 1 蛋白的表达及其与 *Smad4* 蛋白表达、*Smad4* 基因甲基化的关系

TGF- $\beta$ 1 蛋白免疫组化染色为胞质着棕色(图5),在ESCC组织的表达阳性率为66.4%(85/128),而相应的癌旁正常组织中表达阳性率为21.9%(28/128),两者相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。III期和IV期ESCC组织TGF- $\beta$ 1的蛋白表达阳性率显著高于I期和II期组织( $\chi^2 = 4.78$ ,  $P =$

0.03);且随肿瘤分化程度的降低,其阳性率明显升高( $\chi^2 = 6.76, P = 0.03$ )(表5)。ESCC 组织中 *Smad4* 蛋白表达与 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达之间呈明显的负相关( $r = -0.76, P < 0.05$ )。39 例发生 *Smad4* 基因甲基化的 ESCC 组织有 30 例 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达阳性,两者呈明显的正相关(表6)。

表3 *Smad4* 蛋白表达与 ESCC 患者病理特征的关系( $n$ )Tab. 3 Relationship of *Smad4* protein expression with clinical pathological characteristics of ESCC patients( $n$ )

Group	N	<i>Smad4</i> expression		P
		-	+	
TNM stage				
I	6	1	5	
II	63	28	35	
III	55	34	21	
IV	4	3	1	0.020 <sup>a</sup>
Differentiation				
Well	31	12	19	
Moderate	50	22	28	
Poor	47	32	15	0.016 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> P value of stage III and IV patients vs stage I and II patients; <sup>b</sup> P value among three different groups

表4 ESCC 组织中 *Smad4* 第一外显子 CpG 岛甲基化与 *Smad4* 蛋白表达间的相关性Tab. 4 Correlation of methylation in exon 1 CpG island of *Smad4* gene with *Smad4* protein expression in ESCC tissues

<i>Smad4</i> protein expression	<i>Smad4</i> methylation	<i>Smad4</i> unmethylation
+	4	58
-	35	31

$\chi^2 = 32.739, P = 0.000$

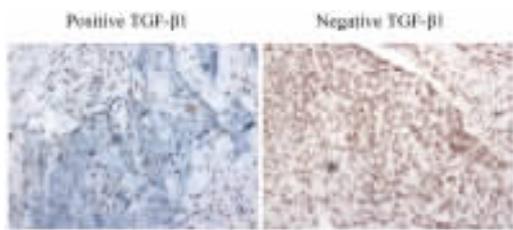


图5 ESCC 组织中 TGF- $\beta$ 1 蛋白的表达(S-P 染色,  $\times 200$ )  
Fig. 5 TGF- $\beta$ 1 protein expression in ESCC tissues(S-P,  $\times 200$ )

表5 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达与 ESCC 患者病理特征的关系( $n$ )Tab. 5 Relationship of TGF- $\beta$ 1 protein expression with clinical pathological characteristics of ESCC patients( $n$ )

Group	N	TGF- $\beta$ 1 expression		P
		-	+	
TNM stage				
I	6	4	2	
II	63	25	38	
III	55	13	42	
IV	4	1	3	0.029 <sup>a</sup>
Differentiation of tumor				
Well	31	16	15	
Moderate	50	16	34	
Poor	47	11	36	0.034 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> P value of stage III and IV patients vs stage I and II patients; <sup>b</sup> P value among three different groups

表6 ESCC 组织 *Smad4* 与 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达的相关性Tab. 6 Correlation of *Smad4* protein expression with TGF- $\beta$ 1 protein expression in ESCC tissues

TGF- $\beta$ 1 protein expression	<i>Smad4</i> protein expression	
	+	-
+	33	52
-	29	14

$\chi^2 = 9.364, P = 0.002$

### 3 讨论

TGF- $\beta$ /Smad 信号转导通路具有重要的生物学作用,它调节细胞的增殖、分化、凋亡、迁移、黏附以及胞外基质的产生,并且在胚胎发育以及组织修复和免疫调节中也发挥重要作用。在信号转导过程中,TGF- $\beta$  首先与 II 型 TGF- $\beta$  受体结合成二元复合物, I 型受体识别此复合物并与之结合形成三元复合物。II 型 TGF- $\beta$  受体的丝/苏氨酸蛋白激酶结构域使 I 型 TGF- $\beta$  受体的 GS 结构域中的丝/苏氨酸磷酸化, I 型 TGF- $\beta$  受体被激活后进一步磷酸化下游的 Smad2 和 Smad3 蛋白。磷酸化后的 Smad2 和 Smad3 可与 Smad4 形成异源复合物,由胞质移位至胞核,调节靶基因的转录。Smad4 的缺失、突变是恶性肿瘤细胞逃避 TGF- $\beta$  生长抑制效应而引发肿瘤

的机制之一<sup>[1]</sup>。在胰腺癌和结直肠癌中可发生 *Smad4* 基因的突变, 从而导致其表达降低<sup>[2-3]</sup>。有研究<sup>[7-10]</sup>表明, 在乳腺癌、头颈部癌、前列腺癌、食管癌和胃癌中 *Smad4* 突变的发生率较低, 因此推测 *Smad4* 基因突变并不是此基因在肿瘤中失活的唯一机制, 而另有其他机制导致此基因在肿瘤中的失活, 表观遗传学的改变如基因 5' 端 CpG 岛甲基化也可能是一个非常重要的机制。近年来研究<sup>[4-6]</sup>证实, 在食管腺癌、结肠癌和胃癌中可发生 *Smad4* 基因高甲基化从而导致其失去活性, 但 *Smad4* 基因在 ESCC 中的甲基化状态迄今未见报道。本研究发现, *Smad4* 基因在 ESCC 组织中可发生高甲基化, 并有相应的 Smad4 蛋白表达缺失, 提示由于 *Smad4* 基因发生甲基化导致的 *Smad4* 基因沉默可能是 ESCC 中 *Smad4* 基因失活的重要原因之一。

由于基因的甲基化多发生在启动子区和第一外显子区, 对于某种肿瘤, 位于不同区域的 CpG 位点发生甲基化的频率可能不完全相同, 本研究在检索最新 Gene bank 数据库的基础上, 选取了启动子区和第一外显子 5' 非翻译区富含 CpG 岛的两个区域进行了分析。结果发现, 这两个区域的 *Smad4* 基因 CpG 岛甲基化率有很大差别, ESCC 中 *Smad4* 基因第一外显子 5' 非翻译区的 CpG 岛甲基化率高达 30.5%, 而启动子区的 CpG 岛甲基化率仅为 5.5%, 因此在基因的甲基化研究中应充分考虑不同区域 CpG 位点的影响。

*Smad4* 基因在不同肿瘤中的甲基化率有很大差别, Onwuegbusi 等<sup>[4]</sup>发现, 原发性食管腺癌中 *Smad4* 基因的甲基化率高达 70%, Wang 等<sup>[6]</sup>仅在 5% 的胃癌组织中检测到了 *Smad4* 基因的高甲基化, Roth 等<sup>[11]</sup>在结直肠癌中未发现 *Smad4* 基因的甲基化。究其原因, 首先, 肿瘤类型不同可能是原因之一, 不同类型的肿瘤可能有其特定的甲基化谱。其次, 甲基化检测方法的不同可能导致实验结果的差异。Roth 等<sup>[11]</sup>在检测结直肠癌中 *Smad4* 基因甲基化时, 应用的是酶切法, 而其他研究(包括本研究)应用的是 MSP 法。MSP 法敏感度较高, 发生甲基化的等位基因低于总 DNA 的 5% 即可被检测出来, 并且针对石蜡包埋组织标本也有较好的效果, 特异度和可重复性都优于酶切法。第三, 甲基化位点的选择不同也可能是一个重要的影响因素。本研究中两个位点的 *Smad4* 基因甲基化率就有明显差异。Wang 等<sup>[6]</sup>在胃癌的研究中选取的是启动子区, 而 Onwuegbusi 等选取的是第一外显子 5' 非翻译区, 这两项研究得出的结果有很大差异, 提示在肿瘤发生过程中,

*Smad4* 基因的第一外显子 5' 非翻译区比启动子区可能更易发生甲基化而导致 *Smad4* 基因失活。

本研究发现, ESCC 组织中 Smad4 蛋白表达显著低于癌旁正常组织, 并与 *Smad4* 基因甲基化状态呈明显的负相关。但是, *Smad4* 基因甲基化的 ESCC 组织仍可见 Smad4 蛋白的表达, 肿瘤组织中混杂有正常组织是其原因之一, 但基因异质性甲基化或一个等位基因发生甲基化也是一个重要的原因, 而且本研究也发现, Smad4 蛋白表达呈阳性而同时发生 *Smad4* 甲基化的 ESCC 组织, 其甲基化均表现为不完全甲基化的状态。目前认为 DNA 甲基化主要在转录水平抑制基因的表达。有研究<sup>[12]</sup>认为, CpG 岛甲基化的密度与转录的抑制程度有关, 弱的启动子能被密度较低的甲基化完全抑制; 而当启动子由增强子增强时, 即可恢复基因的转录功能。部分肿瘤组织中, 可能 *Smad4* 基因启动子甲基化程度不足以抑制转录, 而导致 *Smad4* 甲基化的 ESCC 组织仍可表达 Smad4 蛋白。

在正常情况下, TGF- $\beta$  作用于多种上皮细胞、肿瘤细胞的 G<sub>1</sub> 期, 使细胞停滞于 G<sub>1</sub> 期, 从而抑制细胞增殖, 诱导其分化或凋亡。但在肿瘤发生、发展中 TGF- $\beta$  的作用却具有双重性, 即在肿瘤发生早期, 细胞对 TGF- $\beta$  的抗增殖效应有反应, TGF- $\beta$  起着抑制肿瘤的作用; 随着肿瘤的进展, TGF- $\beta$  表达及激活发生变化, TGF- $\beta$  受体或受体后水平 Smad 信号缺陷或下游底物血管内皮生长因子表达改变等异常情况的出现, 均可使肿瘤细胞失去对 TGF- $\beta$  的敏感性, 而发生不受控的异常增殖, 肿瘤细胞亦增加了 TGF- $\beta$  的分泌, 使其迁移并侵袭正常组织<sup>[1]</sup>。本研究发现, ESCC 组织中 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达水平明显升高, 并且随着肿瘤分期的增高和分化程度的降低, 其表达水平也明显升高, 提示 TGF- $\beta$ 1 与 ESCC 的发生、发展、浸润和转移密切相关。另外, ESCC 组织中 Smad4 蛋白与 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达呈负相关, 且发生 *Smad4* 基因甲基化的 ESCC 组织多数表现为 TGF- $\beta$ 1 蛋白的阳性表达, 提示由于 *Smad4* 基因的高甲基化导致 Smad4 蛋白表达降低, 从而阻滞了 TGF- $\beta$ /Smad 信号转导通路, 使得肿瘤细胞逃脱 TGF- $\beta$  的抑制作用, 有利于肿瘤的发生、发展, 同时肿瘤细胞在肿瘤的发展过程中增加了 TGF- $\beta$  的分泌, 促使肿瘤迁移。

总之, 本研究结果发现, 在 ESCC 组织中 *Smad4* 基因第一外显子的 5' 非翻译区比启动子区更易发生高甲基化而导致 *Smad4* 基因沉默, 是 CpG 岛中的关键性 CpG 位点。 *Smad4* 基因的甲基化及 TGF- $\beta$ 1

蛋白的高表达在 ESCC 的发生、发展中具有重要作用,此研究将有助于从分子水平揭示 ESCC 的病因,对 ESCC 的预防、早期诊断具有重要意义。

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF- $\beta$  superfamily [ J ]. *Science*, 2002, 296 ( 5573 ): 1646-1647.
- [ 2 ] Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 ( DPC4 ) inactivation in human cancer [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306 ( 4 ): 799-804.
- [ 3 ] Iacobuzio-Donahue CA, Song J, Parmigiani G, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Missense mutation of MADH4: Characterization of the mutational hot spot and functional consequences in human tumors [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10( 5 ): 1597-1604.
- [ 4 ] Onwuegbusi BA, Aitchison A, Chin SF, Kranjac T, Mills I, Huang Y, et al. Impaired transforming growth factor beta signaling in Barrett's carcinogenesis due to frequent SMAD4 inactivation [ J ]. *Gut*, 2006, 55( 6 ): 764-774.
- [ 5 ] Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer [ J ]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2002, 3: 101-128.
- [ 6 ] Wang LH, Kim SH, Lee JH, Choi YL, Kim YC, Park TS, et al. Inactivation of SMAD4 tumor suppressor gene during gastric carcinoma progression [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13( 1 ): 102-110.
- [ 7 ] Schutte M, Hruban RH, Hedrick L, Cho KR, Nadasdy GM, Weinstein CL, et al. DPC4 gene in various tumor types [ J ]. *Cancer Res*, 1996, 56( 11 ): 2527-2530.
- [ 8 ] Kim SK, Fan Y, Papadimitrakopoulou V, Clayman G, Hittelman WN, Hong WK, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene, is altered infrequently in head and neck squamous cell carcinoma [ J ]. *Cancer Res*, 1996, 56( 11 ): 2519-2521.
- [ 9 ] MacGrogan D, Pegram M, Slamon D, Bookstein R. Comparative mutational analysis of DPC4 ( Smad4 ) in prostatic and colorectal carcinomas [ J ]. *Oncogene*, 1997, 15( 9 ): 1111-1114.
- [ 10 ] Lei J, Zou TT, Shi YQ, Zhou X, Smolinski KN, Yin J, et al. Infrequent DPC4 gene mutation in esophageal cancer, gastric cancer and ulcerative colitis-associated neoplasms [ J ]. *Oncogene*, 1996, 13 ( 11 ): 2459-2462.
- [ 11 ] Roth S, Laiho P, Salovaara R, Launonen V, Aaltonen LA. No SMAD4 hypermethylation in colorectal cancer [ J ]. *Br J Cancer*, 2000, 83( 8 ): 1015-1019.
- [ 12 ] Bird A. Molecular biology. Methylation talk between histones and DNA [ J ]. *Science*, 2001, 294( 5549 ): 2113-2115.
- [ 收稿日期 ] 2010 - 09 - 12 [ 修回日期 ] 2010 - 11 - 05  
[ 本文编辑 ] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 《中国肿瘤生物治疗杂志》征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》是由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的国家级医学学术期刊(刊号为 ISSN 1007-385X; CN31-1725/R),双月刊,国内外公开发刊。本刊为中国惟一的肿瘤生物治疗专业高级学术刊物,重点报道我国肿瘤生物治疗领域基础理论与临床应用的最新研究成果、新理论、新技术及新经验,宣传我国肿瘤生物治疗的政策和发展策略。主要栏目有述评、院士论坛、专家论坛、论著(基础研究,临床研究)、研究快报、技术方法、文献综述、学术争鸣、专题讲座、科技动态等。本刊以肿瘤防治专业的中高级临床和科研工作者、医药院校师生及其他相关学科的科技人员为读者对象。

本刊为中国中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),已被美国《化学文摘》(CA)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、美国《乌利希国际期刊指南》(Ulrich IPD)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、荷兰《医学文摘》(EMbase)、英国《国际农业和生物科学研究文摘》(CABI)、英国《公共健康研究数据库》(GH)、波兰《哥白尼索引》(IC)等多个国际著名检索系统收录;已被中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)、中国科学引文数据库(CSCD)、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)等国内所有知名检索系统和专业相关权威文摘期刊收录。本刊在肿瘤学领域的学术地位和影响力名列前茅,在国际学术界的显示度日益广泛和增强。

《中国肿瘤生物治疗杂志》每期定价 12.00 元,全年定价 72.00 元。邮发代号: 4-576,请通过邮局订阅。若错过,可从本刊编辑部补订,请将 72.00 元(优惠免邮资)寄编辑部,并注明详细通讯地址及邮政编码,编辑部负责将每期杂志准时寄给您。

**联系地址:**上海市翔殷路 800 号第二军医大学免疫楼《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部(邮编 200433)

**联系人:**王莹,韩丹;**联系电话:**021-55620605×22,021-81871002×22;**传真:**021-81871007

**网址:**www.biother.org;**电子邮箱:**cjcb@biother.org