

## IGFBP3 基因在食管鳞状细胞癌中的表达及甲基化状态

孙萍萍<sup>1</sup>, 沈素朋<sup>2</sup>, 王晶田<sup>2</sup>, 郭炜<sup>2</sup>, 董稚明<sup>2</sup>, 郭艳丽<sup>2</sup>, 邝钢<sup>2</sup>(1. 北京怀柔医院 病理科, 北京 101400; 2. 河北医科大学第四医院 河北省肿瘤研究所病理研究室, 河北 石家庄 050011)

**[摘要]** **目的:** 检测食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)中胰岛素样生长因子结合蛋白3(insulin-like growth factor binding protein 3, *IGFBP3*)基因的表达情况及甲基化状态,探讨其与ESCC发生发展的关系。**方法:** 收集河北医科大学第四医院2008至2011年间的82例ESCC手术患者的ESCC原发灶组织及癌旁正常黏膜组织。RT-PCR及甲基化特异性-PCR(methylation specific-PCR, MSP)的方法分别检测DNA甲基转移酶抑制剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dC)处理前后的ESCC细胞系(TE1、TE13、YES-2、T. TN、Eca109)及82例ESCC及相应癌旁组织中*IGFBP3*基因mRNA表达水平及甲基化状态,应用免疫组织化学方法检测IGFBP3在ESCC组织中的蛋白表达情况,并分析*IGFBP3*基因甲基化状态与其表达水平之间的关系。**结果:** 在ESCC细胞株TE1、TE13、YES-2、T. TN、Eca109中,*IGFBP3*基因mRNA均呈阴性或弱阳性表达,用5-Aza-dC培养处理后,其mRNA表达水平均呈现不同程度的增高( $P < 0.05$ );MSP检测结果显示,在ESCC细胞株TE1、TE13、T. Tn、Yes-2中*IGFBP3*基因均呈高甲基化状态。在ESCC组织中*IGFBP3* mRNA表达显著低于癌旁组织[( $0.15 \pm 0.07$ ) vs ( $0.88 \pm 0.32$ )],  $P < 0.01$ ],且IGFBP3蛋白在癌组织中的表达阳性率显著低于癌旁组织[29.3% (24/82) vs 84.1% (69/82)],  $P < 0.01$ ],并与TNM分期密切相关( $P < 0.05$ );*IGFBP3*基因在ESCC组织中的甲基率为68.3% (56/82),明显高于癌旁组织的15.9% (13/82) ( $P < 0.01$ );*IGFBP3*基因在Ⅲ和Ⅳ期肿瘤组织中的甲基化率明显高于Ⅰ和Ⅱ期肿瘤组织( $P < 0.05$ ),而该基因的甲基化率与肿瘤患者的组织学分级无相关性( $P > 0.05$ )。*IGFBP3*基因甲基化状态与其表达之间有明显的相关性( $P < 0.05$ )。**结论:** ESCC组织及细胞株中*IGFBP3*基因呈高甲基化状态,该基因的甲基化可能导致其表达下调,并有可能是ESCC的发生机制之一。

**[关键词]** 食管鳞状细胞癌;表达;DNA甲基化;胰岛素样生长因子结合蛋白3

**[中图分类号]** R735.1; Q753 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2015)04-0472-07

## Expression and methylation of *IGFBP3* gene in esophageal squamous cell cancer

Sun Pingping<sup>1</sup>, Shen Supeng<sup>2</sup>, Wang Jingtian<sup>2</sup>, Guo Wei<sup>2</sup>, Dong Zhiming<sup>2</sup>, Guo Yanli<sup>2</sup>, Kuang Gang<sup>2</sup>(1. Pathology Department, Beijing Huairou Hospital, Beijing 101400, China; 2. Pathology Research Room, Tumor Research Institute of Hebei Province, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression and methylation of *IGFBP3* gene in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell lines and primary tumor tissues, and to explore the relationship between *IGFBP3* expression and the clinical pathological features of ESCC. **Methods:** The mRNA and methylation status of *IGFBP3* gene were detected by reverse transcription-PCR (RT-PCR) and methylation specific-PCR (MSP) using RNA and DNA from ESCC cell lines (TE1, TE13, YES-2, T. TN, Eca109) as well as primary tumor tissues and paired normal tissues from 82 ESCC patients. Immunohistochemistry was used to detect the expression of *IGFBP3* in ESCC tissues. The relationship among aberrant methylation, expression of *IGFBP3* gene, and clinical pathological features were analyzed with the SPSS 13.0 software. **Results:** *IGFBP3* mRNA was undetectable or at very low level in ESCC cell lines examined (TE1, TE13, YES-2, T. TN,

**[基金项目]** 河北省科技计划资助项目(No. 122777117);河北自然科学基金资助项目(No. H2013206315);河北省医学科学研究重点课题计划资助项目(No. 20130543)。Project supported by the Science and Technology Plan Projects of Hebei Province(No. 122777117), the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2013206315), and the Focal Point Project of Medical Research of Hebei Province(No. 20130543)

**[作者简介]** 孙萍萍(1979-),女,北京市怀柔区人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤病因学方面的研究,E-mail:pingspingrainbow@163.com

**[通信作者]** 邝钢(Kuang Gang, corresponding author),E-mail:kuanggang1960@163.com

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20150728.1413.016.html>

Eca109)。However, its level increased significantly after the cells were treated with DNA methyltransferase inhibitor, 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC), indicating that *IGFBP3* gene existed is hypermethylated in these cells ( $P < 0.05$ )。In primary tumor tissues from ESCC patients, *IGFBP3* mRNA level ( $0.15 \pm 0.07$ ) was significantly lower than that in corresponding normal tissues ( $0.88 \pm 0.32$ ) ( $P < 0.01$ )。Similarly, the positive rate of *IGFBP3* (29.3%, 24/82) in ESCC tissues was significantly lower than that in corresponding normal tissues (84.1%, 69/82) ( $P < 0.01$ )。Thus, The methylation status of *IGFBP3* gene associates with its mRNA and protein expression ( $P < 0.05$ )。Moreover, the methylation frequency of *IGFBP3* gene in ESCC tissues (68.3%, 56/82) was increased significantly compared to that in corresponding normal tissues (15.9%, 13/82) ( $P < 0.01$ ) and associated with TNM stage of the tumors ( $P < 0.05$ )。The methylation frequency of *IGFBP3* gene in stage III-IV tumor tissues was significantly higher than that in stage I-II tumor tissues ( $P < 0.05$ )。However, the methylation status of *IGFBP3* in ESCC tissues was not associated with its pathological grade ( $P > 0.05$ )。 **Conclusion:** The hypermethylation of *IGFBP3* gene is a frequent event in ESCC cell lines and primary tumor tissues. The reduced expression of *IGFBP3* caused by promoter hypermethylation of the gene may play an important role in the development of ESCC.

[ **Key words** ] esophageal squamous cell carcinoma( ESCC ); expression; DNA methylation; insulin-like growth factor binding protein 3 ( *IGFBP3* )

[ Chin J Cancer Biother, 2015, 22(4): 472-478 ]

胰岛素样生长因子( insulin growth factor, IGF )参与对细胞增殖及凋亡过程的调节, IGF 信号转导与多种恶性肿瘤的细胞转化和凋亡密切相关, 其在肿瘤发生发展中的作用受到越来越多的关注<sup>[1-2]</sup>。胰岛素样生长因子结合蛋白 3( insulin-like growth factor binding protein 3, *IGFBP3* )基因是 IGF 信号通路的重要调节因子。*IGFBP3* 在肝癌<sup>[3]</sup>、肺癌<sup>[4]</sup>、结肠癌<sup>[5]</sup>、卵巢癌<sup>[6]</sup>、乳腺癌<sup>[7]</sup>、前列腺癌<sup>[8]</sup>中均有异常表达, 且可能与其异常甲基化有关<sup>[4,5]</sup>。但 *IGFBP3* 在食管鳞状细胞癌( esophageal squamous cell cancer, ESCC )中的表达及甲基化状态尚未见报道。本研究通过检测 ESCC 细胞株及 82 例 ESCC 组织中 *IGFBP3* 的表达及其甲基化状态, 了解 ESCC 中 *IGFBP3* 的表达情况及导致其表达降低的可能机制, 并结合临床资料探讨该基因异常甲基化的表达情况与 ESCC 恶性表型的相关性, 为确定 *IGFBP3* 基因在 ESCC 发生发展中的作用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自 Sigma 公司, 5-氮杂-2'-脱氧胞苷( 5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dC ) 购自 Sigma 公司, 蛋白酶 K 购自 Merck 公司, 亚硫酸氢钠和氢醌购自 Sigma 公司, Wizard DNA 纯化试剂盒购自 Promega 公司, 甲基化酶购自 NEB 公司, TRIzol 和逆转录试剂盒均购自 Invitrogen 公司, 一抗为兔抗人 *IGFBP3* 多克隆抗体( 1:200 ) 购自 Abcam 公司, SP 试剂盒及 DAB 显

色液购自北京中杉金桥公司。所有引物均由上海生物工程合成。

### 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 2008 至 2011 年间的 ESCC 手术患者, 共 82 例, 其中男性 59 例、女性 23 例, 年龄 41 ~ 74 岁, 中位年龄 61 岁。全部患者术前均未经化疗和放疗, 该研究中所有研究对象均签署知情同意书, 并经医院伦理委员会批准同意。每例患者均取 ESCC 原发灶组织及癌旁正常黏膜组织, 每例采集的标本一部分于液氮保存用于 DNA 和 RNA 的提取, 一部分以 10% 中性甲醛溶液固定, 用于制作蜡块保存, 以进行免疫组织化学染色。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( Union for International Cancer Control, UICC )标准进行 TNM 分期, 其中 I 期 12 例( 14.6% )、II 期 30 例( 36.6% )、III 期 30 例( 36.6% )、IV 期 10 例( 12.2% )。按照 WHO 肿瘤病理学分级标准, 其中 28 例高分化( 34.1% )、37 例中等分化( 45.1% )、17 例低分化( 20.7% )。

### 1.3 ESCC 细胞系的培养与 5-Aza-dC 处理

ESCC 细胞系 TE1、TE13、T. TN、Yes-2、Eca109 由本院生物标本库保留并传代, 用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100  $\mu\text{g/ml}$  链霉素的 RPMI 1640 培养液于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度和 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中传代培养。取对数生长期细胞, 用 5-Aza-dC( 终浓度 5  $\mu\text{mol/L}$  ) 处理细胞株作为实验组, 每 24 h 更换液体, 培养 2 d, 第 3 天换全血清培养基, 培养 24 h 后收集细胞并提取 DNA 及 RNA。以未经 5-Aza-dC

处理的细胞作为对照组。

1.4 RT-PCR 检测 ESCC 细胞及肿瘤组织 *IGFBP3* mRNA 的表达

按 TRIzol 试剂使用说明书提取 5-Aza-dC 处理前后的细胞系及组织中的总 RNA, 并参照逆转录试剂盒说明书操作, 将 RNA 逆转录成 cDNA, 以

GAPDH 为内参照, 引物序列及退火温度见表 1。所有 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。并应用凝胶成像分析软件 Gel Pro Analyzer 3.1 测定条带灰度值, 以目的基因的灰度值/内参的灰度值计算得到相对含量。

表 1 RT-PCR 及 MSP 引物序列及反应条件  
Tab. 1 Primer sequences and reaction conditions of RT-PCR and MSP

Gene	Primer sequence	Annealing temperature (t/°C)	Product size (bp)
RT-PCR			
<i>IGFBP3</i>	F: 5'- GCTGTGTTGCCTATGTAGA-3'	60	452
	R: 5'- TTGTGATGCCTCTGAATGT-3'		
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'	59	97
	R: 5'-AGGGGTCATTGATGGCAACA-3'		
MSP			
Methylation	F: 5' - TGATTCGGGTTTTTCGGGCGTGC-3'	60	209
	R: 5' - GCCGACCGCTATATAAAAAACCG-3'		
Unmethylation	F: 5'-TGATTTGGGTTTTGGGTGTGT-3'	60	209
	R: 5'- ACCAACCCTATATAAAAAACCA -3'		

F: Forward primer; R: Reverse primer

1.5 甲基化特异性 PCR( methylation specific polymerase chain reaction, MSP)检测 ESCC 细胞系和组织中 *IGFBP3* 基因的甲基化状态

采用常规酚/氯仿抽提法, 提取组织和细胞中的 DNA, 进行定量后, 取适量 DNA 标本按文献[9]的方法进行亚硫酸氢盐处理。经亚硫酸氢盐处理后, DNA 中的 C 转变为 U, 而基因的 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。运用在线软件 MethPrimer 预测 *IGFBP3* 基因 5'端 CpG 岛分布情况(图 1), 并结合 Alibaba2.1 分析软件, 选择与重要转录因子结合的区域且富含 CpG 岛的部位设计该基因的甲基化引物和非甲基化引物, 扩增片段为启动子区的 -226 bp ~ -17 bp, 引物序列及退火温度见表 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 阳性对照采用正常人血有核细胞基因组 DNA 经甲基化酶 Sss I 处理以后进行 PCR 扩增, 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% 的标本进行重复实验。

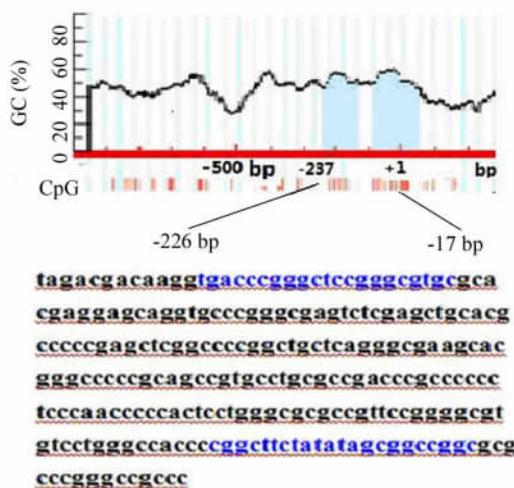


图 1 *IGFBP3* 基因启动子区 CpG 岛分布情况  
Fig.1 CpG island of *IGFBP3* gene promoter

MSP primers are highlighted in blue, and the sequence of CpG island is from -226 to -17 bp (“+1” is the initiation point of transcription)

### 1.6 免疫组织化学方法检测 ESCC 组织中 *IGFBP3* 蛋白的表达

石蜡标本常规制备 4 μm 连续切片,平铺于经 APES(aminopropyltriethoxy silane)处理的载玻片上,62 ℃ 烤箱烘烤 2 h。二甲苯脱蜡、梯度酒精水化,3% 甲醇过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,高压热修复 5 min。免疫组化 S-P 法按试剂盒操作说明进行,山羊血清封闭,所用一抗 *IGFBP3*(兔抗人多克隆抗体)的稀释浓度为 1:200,DAB 显色,自来水冲洗,复染、脱水、透明、中性树胶封片。PBS 取代一抗作为空白对照。

### 1.7 免疫组织化学结果判定标准

*IGFBP3* 蛋白为细胞质着色,随机选取 5 个高倍视野(×400)计数肿瘤细胞总数和阳性细胞数,得出阳性细胞百分率;阳性细胞率 ≤ 25% 记为 0 分,26% ~ 50% 为 1 分,51% ~ 75% 为 2 分, > 75% 为 3 分。再按多数阳性细胞呈现的染色强度予以记分,无显色为 0 分,浅棕黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。将上述 2 项得分相加,0 分判为“-”,1 ~ 2 分判为“+”,3 ~ 4 分判为“++”,5 ~ 6 分判为“+++”<sup>[10]</sup>。由 3 名有经验的临床病理医师阅片,采用双盲评估的方法,根据其评分的平均值判定结果。本研究进行结果分析时,以“++”和“+++”定义该蛋白为阳性表达,“-”和“+”定义为阴性表达。

### 1.8 统计学处理

采用 SPSS 13.0 版软件进行数据统计分析,计数资料采用  $\chi^2$  检验;计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验;相关性分析采用 Spearman 等级相关分析,采用双侧检验。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ESCC 细胞系中 *IGFBP3* mRNA 表达及甲基化状态

RT-PCR 检测结果(图 2A)显示,在未经任何处理的 ESCC 细胞系 TE1、TE13、T. Tn、Yes-2、Eca109 中,*IGFBP3* mRNA 均呈阴性或弱阳性表达,但用甲基转移酶抑制剂 5-Aza-dC 处理培养后,其 mRNA 表达均呈现不同程度的增高。MSP 检测结果(图 2B)显示,在用 5-Aza-dC 处理前,ESCC 细胞系 TE1、TE13、T. Tn、Yes-2 细胞中均扩增出了甲基化条带,而在用 5-Aza-dC 处理后,甲基化条带减弱或消失,非甲基化条带出现。

### 2.2 ESCC 组织中 *IGFBP3* mRNA 及蛋白表达情况

RT-PCR 检测结果(图 3A)显示,ESCC 中

*IGFBP3* mRNA 表达量显著低于癌旁组织[(0.15 ± 0.07) vs (0.88 ± 0.12),  $P < 0.01$ ]。Ⅲ期和Ⅳ期 ESCC 患者癌组织中 *IGFBP3* mRNA 表达水平显著低于Ⅰ期和Ⅱ期患者[(0.12 ± 0.09) vs (0.31 ± 0.21),  $P < 0.01$ ],低分化组 ESCC 患者癌组织中 *IGFBP3* mRNA 表达水平显著低于中高分化组[(0.14 ± 0.04) vs (0.28 ± 0.18),  $P < 0.01$ ]。按照年龄、性别分组进行统计分析,各组 ESCC 中 *IGFBP3* mRNA 表达差异均不具有统计学意义( $P > 0.05$ )。

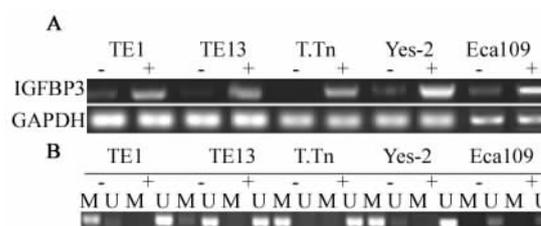


图 2 ESCC 细胞株中 *IGFBP3* mRNA 表达(A)及其甲基化状态(B)

Fig. 2 mRNA expression (A) and methylation (B) of *IGFBP3* gene in ESCC cell lines

- : Indicates before treatment with 5-Aza-dC;  
+ : Indicates after treatment with 5-Aza-dC;  
M: Methylated gene; U: Unmethylated gene

*IGFBP3* 的免疫组织化学染色主要为细胞质着色(图 4),经统计分析,ESCC 组织中 *IGFBP3* 蛋白阳性表达率(29.3%, 24/82)显著低于癌旁正常组织(84.1%, 69/82)( $\chi^2 = 50.295$ ,  $P < 0.01$ )。*IGFBP3* 基因在Ⅲ期和Ⅳ期 ESCC 患者中的表达水平显著低于Ⅰ期和Ⅱ期患者( $P < 0.05$ );但其蛋白表达与患者的年龄、性别及肿瘤组织学分级无关( $P > 0.05$ ,表 2)。

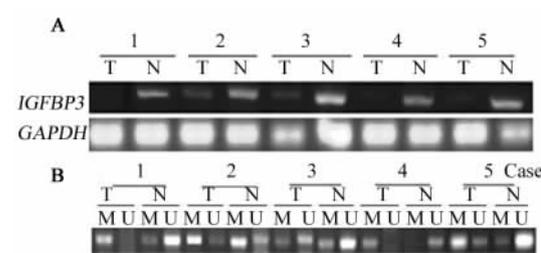


图 3 ESCC 组织中 *IGFBP3* 基因 mRNA 表达(A)及其甲基化状态(B)

Fig. 3 mRNA expression (A) and methylation (B) of *IGFBP3* gene in ESCC tissues

M: Methylated gene; U: Unmethylated gene;  
T: ESCC tissues; N: Normal tissues

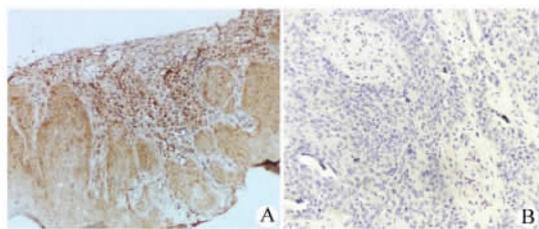


图 4 ESCC 组织中 IGFBP3 蛋白的表达 (×200)

Fig. 4 Protein expression of IGFBP3 in ESCC tissues (×200)

A: The positive expression of IGFBP3 protein in ESCC tissues;  
B: The negative expression of IGFBP3 protein in ESCC tissues

### 2.3 ESCC 组织中 IGFBP3 基因的甲基

化状态

对 82 例 ESCC 组织及相应癌旁组织进行了 MSP 分析, 结果(图 3)显示, *IGFBP3* 基因在 ESCC 组织中的甲基化率(68.3%, 56/82)显著高于癌旁正常组织(15.9%, 13/82) ( $\chi^2 = 51.004, P < 0.01$ )。按 TNM 分期进行统计学分析, III 期和 IV 期 ESCC 组织中 *IGFBP3* 基因发生甲基化的比率显著高于 I 期和 II 期肿瘤组织 ( $\chi^2 = 10.067, P = 0.002$ )。按照肿瘤组织学分级进行统计学分析, 其甲基化率与肿瘤的组织学分级无关 ( $\chi^2 = 5.523, P = 0.063$ ); 且 *IGFBP3* 基因甲基化率与患者的年龄及性别均无关 ( $P > 0.05$ , 表 2)。

表 2 ESCC 组织中 *IGFBP3* 基因表达及其甲基化状态与患者临床病理特征的关系 (N=82)

Tab. 2 Correlation of methylation status and expression of IGFBP3 with the clinicopathological characteristics of the patients with ESCC (N=82)

Group	N	<i>IGFBP3</i> mRNA		IGFBP3 protein		Promoter methylation	
		$\bar{x} \pm s$	P	n(%)	P	n(%)	P
Age			0.689		0.560		0.723
<50	14	0.12 ± 0.05		5(20.8)		9(16.1)	
≥50	68	0.11 ± 0.02		19(79.2)		47(83.9)	
Gender			0.361		0.156		0.226
Male	59	0.10 ± 0.03		18(75)		38(67.9)	
Female	23	0.12 ± 0.02		6(25)		18(32.1)	
Differentiation			<0.001a		0.198		0.063
Well	28	0.28 ± 0.18		9(32.1)		20(35.7)	
Moderate	37			13(35.1)		21(37.5)	
Poor	17	0.14 ± 0.04		2(11.8)		15(26.8)	
TNM stage			0.001b		0.006b		0.002b
I	12	0.31 ± 0.21		8(33.3)		3(5.4)	
II	30			10(41.7)		19(33.9)	
III	30	0.12 ± 0.09		6(25.0)		25(44.6)	
IV	10			0		9(16.1)	

a: Well-moderate vs Poor; b: Stage III-IV vs Stage I-II

### 2.4 ESCC 组织中 *IGFBP3* 基因的甲基化状态与表达之间的相关性

在 *IGFBP3* 发生甲基化的 ESCC 组织中, *IGFBP3* mRNA [(0.27 ± 0.16) vs (0.14 ± 0.05)],  $P <$

0.05]和蛋白[3.6%(2/56) vs 84.6%(22/26)],  $\chi^2 = 56.335, P = 0.000$ ]表达量均明显低于未发生甲基化的癌组织, *IGFBP3* 甲基化与其蛋白表达缺失间呈明显负相关 ( $r = -0.829, P < 0.001$ ; 图 5)。

### 3 讨论

*IGFBP3* 基因位于人染色体 7p12-14, 在肿瘤细胞的增殖和凋亡中有重要作用。研究<sup>[11-14]</sup>表明, *IGFBP3* 启动子甲基化和基因沉默与包括结直肠癌在内的人类多种肿瘤发生有关, 还与肺癌和卵巢癌临床疗效不佳有关。Zeng 等<sup>[7]</sup>研究发现, 经 DNA 甲基化抑制剂 5-Aza-dC 处理的乳腺癌细胞中 *IGFBP3* 基因恢复表达, 进一步证实该基因甲基化可能是乳腺癌发生的重要机制之一。Takako 等<sup>[5]</sup>在对结肠癌的研究中发现, *IGFBP3* 基因表达沉默可能与其启动子区异常高甲基化有关。

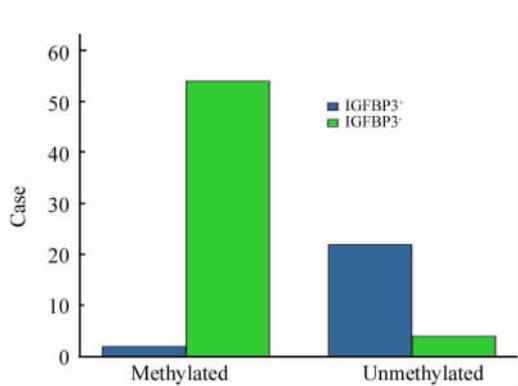


图5 *IGFBP3* 甲基化及未甲基化 ESCC 组织中 *IGFBP3* 蛋白的表达

Fig. 5 Expression of *IGFBP3* protein in the ESCC tissues with or without a methylation on the *IGFBP3* gene

本研究通过对 ESCC 细胞株 (TE1、TE13、YES-2、T. TN、Eca109) 中 *IGFBP3* mRNA 表达的检测发现, *IGFBP3* 基因在上述细胞株中表达减弱或缺失, 用去甲基化药物 5-Aza-dC 处理培养后, 其 mRNA 表达呈阳性, 提示 5-Aza-dC 逆转 ESCC 细胞中 *IGFBP3* 基因甲基化状态, 可提高其表达水平, 即基因 DNA 甲基化可能是该基因表达下调的重要机制之一。经 Methprimer 在线软件预测 *IGFBP3* 基因 CpG 岛, 并结合 Alibaba2.1 分析软件, 选择与重要转录因子结合的区域, 设计甲基化与非甲基化上下游引物进行 MSP 检测, 这些区域发生甲基化时可能抑制其与转录因子结合从而降低其转录水平。结果发现, TE1、TE13、T. Tn、Yes-2 细胞中均扩增出了甲基化条带, 而在用 5-Aza-dC 处理后, 甲基化条带减弱或消失, 非甲基化条带出现, 证明上述细胞株中均发生了 *IGFBP3* 基因甲基化, 可能在其转录抑制中起重要作用。进一步选取 ESCC 组织进行实验验证, 结果显

示在癌组织中 *IGFBP3* mRNA 及蛋白表达明显低于癌旁组织, 并利用选取的 CpG 位点在组织中进行 MSP 分析, 发现癌组织中 *IGFBP3* 基因呈高甲基化状态, 并与其 mRNA 及蛋白表达密切相关, 进一步提示 *IGFBP3* 基因甲基化引起的基因表达下调可能是 ESCC 发生的重要机制之一。Zeng 等<sup>[7]</sup>和 Perry 等<sup>[8]</sup>对乳腺癌及前列腺癌的研究中与本研究结果相一致。此外, 本实验中也发现在部分组织中蛋白表达呈阳性同时又发生甲基化, 其甲基化表现为不完全甲基化。除此之外, 有研究<sup>[15]</sup>认为, 甲基化抑制基因的表达主要表现在转录水平, 其对转录的抑制程度与基因岛甲基化的密度有关。Chen 等<sup>[16]</sup>研究也发现, *IGFBP3* 基因在 III、IV 期胃癌患者中的甲基化明显高于 I、II 期。Landt 等<sup>[17]</sup>认为, *IGFBP3* 与肿瘤的侵袭和分化有关, 可作为宫颈癌预后预测的指标。本研究中发现 *IGFBP3* 基因甲基化状态及表达与 TNM 分期有关。

基因 DNA 启动子区甲基化可以直接或间接阻碍转录因子与其启动子结合从而降低其转录水平。抑癌基因启动子区高甲基化后降低其转录水平, 进而可能导致该基因表达沉默, 可能导致肿瘤的发生。但是基因甲基化状态又具有可逆性, 当抑癌基因重新被激活恢复其表达时又可发挥其抑癌作用, 这就为肿瘤分子治疗提供了靶点。总之, 本研究结果提示, *IGFBP3* 启动子区甲基化可能导致了其低表达, 在 ESCC 的发生、发展中具有重要作用, 实验结果为从分子水平揭示 ESCC 的病因提供实验依据。

### [参考文献]

- [1] Grimberg A, Cohen P. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis [J]. *J Cell Physiol*, 2000, 183(1): 1-9.
- [2] Baserga R. Customizing the targeting of IGF-1 receptor [J]. *Future Oncol*, 2009, 5(1): 43-50.
- [3] Regel I, Eichenmüller M, Joppien S, et al. *IGFBP3* impedes aggressive growth of pediatric liver cancer and is epigenetically silenced in vascular invasive and metastatic tumors [J]. *Mol Cancer*, 2012, 11: 9.
- [4] Kim YH, Sumiyoshi S, Hashimoto S, et al. Expressions of insulin-like growth factor receptor-1 and insulin-like growth factor binding protein 3 in advanced non-small-cell lung cancer [J]. *Clin Lung Cancer*, 2012, 13(5): 385-390.
- [5] Kawasaki T, Noshio K, Ohnishi M, et al. *IGFBP3* promoter methylation in colorectal cancer: Relationship with microsatellite instability, CpG island methylator phenotype, and p53 [J]. *Neoplasia*, 2007, 9(12): 1091-1098.
- [6] Peeters PH, Lukanova A, Allen N, et al. Serum IGF-I, its major binding protein (*IGFBP-3*) and epithelial ovarian cancer risk:

- The european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) [ J ]. *Endocr Relat Cancer*, 2007, 14( 1 ): 81- 90.
- [ 7 ] Zeng L, Jarrett C, Brown K, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 ( IGFBP-3 ) plays a role in the anti-tumorigenic effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine ( AZA ) in breast cancer cells [ J ]. *Exp Cell Res*, 2013, 319( 14 ): 2282- 2295.
- [ 8 ] Perry AS, Loffus B, Morooso R, et al. In silico mining identifies IGFBP3 as a novel target of methylation in prostate cancer [ J ]. *Br J Cancer*, 2007, 96( 10 ): 1587- 1594.
- [ 9 ] Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, et al. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93( 18 ): 9821- 9826.
- [ 10 ] Bittner M, Meltzer P, Chen Y, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling [ J ]. *Nature*, 2000, 406( 6795 ): 536- 540.
- [ 11 ] Hanafusa T, Yumoto Y, Nouse K, et al. Reduced expression of insulin-like growth factor binding protein-3 and its promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma [ J ]. *Cancer Lett*, 2002, 176( 2 ): 149- 158.
- [ 12 ] Tomii K, Tsukuda K, Toyooka S, et al. Aberrant promoter methylation of insulin-like growth factor binding protein-3 gene in human cancers [ J ]. *Int J Cancer*, 2007, 120( 3 ): 566- 573.
- [ 13 ] Chang YS, Wang L, Liu D, et al. Correlation between insulin-like growth factor-binding protein-3 promoter methylation and prognosis of patients with stage I non-small cell lung cancer [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8( 12 ): 3669- 3675.
- [ 14 ] Wiley A, Katsaros D, Fracchioli S, et al. Methylation of the insulin-like growth factor binding protein-3 gene and prognosis of epithelial ovarian cancer [ J ]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16( 1 ): 210- 218.
- [ 15 ] Selvi BR, Mohankrishna DV, Ostwal YB, et al. Small molecule modulators of histone acetylation and methylation: A disease perspective [ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799( 10/11/12 ): 818-828.
- [ 16 ] Chen HY, Zhu BH, Zhang CH, et al. High CpG island methylator phenotype is associated with lymph node metastasis and prognosis in gastric cancer [ J ]. *Cancer Sci*, 2012, 103( 1 ): 73- 79.
- [ 17 ] Landt S, Wehling M, Heidecke H, et al. Prognostic significance of angiogenic factors in uterine cervical cancer [ J ]. *Anticancer Res*, 2011, 31( 8 ): 2589-2595.
- [ 收稿日期 ] 2015 -03 -13 [ 修回日期 ] 2015 -07 -07  
[ 本文编辑 ] 黄静怡

· 科技动态 ·

## 内脏脂肪组织中的 NK 细胞促进炎症和胰岛素抵抗

巨噬细胞是一种位于组织内的白细胞,作为重要的固有免疫细胞,其功能是吞噬死亡的细胞残片和病原体,通过膜上或胞内的模式识别受体( pattern recognition receptors, PRRs )识别病原相关分子模式( pathogen-associated molecular patterns, PAMPs ),诱导信号通路的级联放大,从而分泌炎症因子和趋化因子等来抗击病原体,而且还可以激活、辅助 T 细胞活化。当巨噬细胞的死亡受到抑制作用,人体就会产生异常的免疫反应,对自身细胞进行破坏性攻击。自然杀伤( natural killer, NK )细胞是机体重要的免疫细胞,不仅与抗肿瘤、抗病毒感染和免疫调节有关,而且在某些情况下参与超敏反应和自身免疫性疾病的发生。

2 型糖尿病( type 2 diabetes, T2D )已逐渐成为全球最受关注的一类慢性疾病和研究热点,约 80% 的糖尿病与有肥胖有关。营养过剩或肥胖能够激活多条代谢信号通路,来源于内脏脂肪的慢性全身性炎症是造成肥胖诱导的胰岛素抵抗的一个重要因素。而内脏脂肪炎症与脂肪组织内促炎性巨噬细胞的积累有关,但引起巨噬细胞积累的免疫信号仍不清楚。

2015 年 3 月, *Nat Immunol* 在线发表了克罗地亚科学家的一项最新研究进展,研究者发现,驻留在脂肪组织内的 NK 细胞通过分泌 IFN- $\gamma$ , 促进脂肪组织促炎性巨噬细胞的形成和积累,并会促进肥胖诱导的胰岛素抵抗。

研究人员发现了一群驻留在内脏脂肪组织中的具有特殊表型的 NK 细胞亚群,这群 NK 细胞在肥胖诱导的脂肪应激和内脏脂肪炎症反应之间起到了重要的纽带作用。肥胖的发生能够驱动脂肪细胞中 NK 细胞激活型受体 NCR1 的配体表达上调,并进一步刺激 NK 细胞发生增殖,合成 IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  会进而诱导促炎性巨噬细胞分化,并促进胰岛素抵抗的发生。NK 细胞、NCR1 或 IFN- $\gamma$  缺失会抑制内脏脂肪组织内促炎性巨噬细胞的积累,并大大增加胰岛素敏感性。

该研究报告首次证明了 NK 细胞在内脏脂肪组织的新作用机制,通过分泌 IFN- $\gamma$  促进炎症巨噬细胞的形成和积累,从而加强了慢性炎症微环境,并促进胰岛素抵抗的发生。该研究为肥胖导致的 2 型糖尿病的发病机制提出了新的研究视角,并为免疫治疗 2 型糖尿病提供了新思路。

[ 赵德志 摘译,王春梅 审阅. Wensveen FM, Jelenčić V, Valentić S, et al. *Nat Immunol*, 2015, 16( 4 ): 376-385. ]