非小细胞肺癌 RASSF1A 基因甲基化及下游基因表达*

于正洪 陈龙邦 王玉才 刘 畅 苏全胜

（南京军区南京总医院肿瘤内科 江苏 南京 210002）

摘要 目的：研究非小细胞肺癌 RASSF1A 基因启动子甲基化及下游基因表达情况。**方法**：留取 58 例非小细胞肺癌患者手术标本及正常肺组织，甲基化特异性 PCR 分析 RASSF1A 基因启动子甲基化情况，同时 Northern blot 分析 SM22、SPARC、SDHB 和 CCND3 等 4 种 RASSF1A 下游基因的表达情况。**结果**：58 例非小细胞肺癌中 RASSF1A 基因启动子甲基化阳性率为 34.5%，甲基化与各临床参数之间无显著相关性，SM22 和 SPARC 在 RASSF1A 甲基化组表达明显下调。**结论**：原发性非小细胞肺癌中存在着较高比例的 RASSF1A 启动子过度甲基化，并与下游基因 SM22 和 SPARC 的表达下调密切相关，提示 RASSF1A 在非小细胞肺癌的发生中起着多种作用。

关键词：肺癌；RASSF1A；甲基化

中图分类号：R655.3 **文献标识码**：A

Analysis of Methylation Status of RASSF1A promoter Region and Transcription Level of Downstream Genes in Non-Small Cell Lung Cancer*

YU Zheng-hong, CHEN Long-bang, WANG Yu-cai, LIN Chang, SU Quan-sheng

(Department of Oncology, Jinling Hospital, Nanjing 210002, Jiansu, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the methylation status of RASSF1A promoter region and transcription level of downstream genes in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods:** 58 resected non-small cell lung cancer and corresponding normal lung tissue sample were collected. Methylation specific PCR was conducted to determine the methylation status of RASSF1A promoter, and Northern blot analysis was conducted to detect the transcription levels of SM22, SPARC, SDHB and CCND. **Results:** Among 58 NSCLC samples,the positive rate of methylation of RASSF1A promoter was 34.5% (n=20); there was no significant correlation between the methylation status and clinical parameters. Transcription levels of SM22 and SPARC were significantly down-regulated in RASSF1A methylated cases. **Conclusion:** Frequent hypermethylation of RASSF1A promoter exists in primary non-small cell lung cancer, which is associated with the down-regulation of downstream gene SM22 and SPARC, so it is suggested that RASSF1A plays a multifunctional role in the genesis of non-small cell lung cancer.

Key words: Lung cancer;RASSF1A; Methylation

前言

肺癌现已是主要的致残和致死的原因，过去对肺癌的研究主要局限于分析基因点突变、小片段缺失、插入等方式造成的原癌基因的激活和抑癌基因的功能丧失。近期研究表明，甲基化状态的改变与肿瘤发生的关系极大，是造成基因功能改变的又一重要机制。基因的异常甲基化还可通过 5-AZA-CdR 等药物将其逆转。因此更深入地研究基因甲基化可能为肺癌的防治提供一条新的思路。Ras 相关区域家族 1A(RASSF1A)基因是 2000 年从 3 号染色体短臂克隆出来的新型候选基因。科学家们很早发现肺癌患者 3 号染色体短臂上存在多个位点的杂质性丢失(Loss of heterozgosity, LOH)[1,2]。除肺癌外，在其它多种肿瘤中也存在 RAFFS1A 的过度甲基化，包括脑肿瘤、卵巢癌、乳腺癌、食管癌、膀胱癌、前列腺癌、鼻烟癌、肾癌等[3,6,7]。RASSF1A 可以通过抑制 cyclin D1 的聚积而诱导细胞周期中断[8]、也可以通过抑制 APC-Cdc20 调控 cyclin 的稳定性和有丝分裂的进程[18]，因此在肿瘤细胞周期调控中起着重要作用。RAFFS1A 还可以调控包括 SM22、SPARC、SDHB 和 CCND3 在内的 66 种基因，提示它是一种多功能的基因[9]。

本研究主要检测 58 例非小细胞肺癌中的 RASSF1A 甲基化情况，并进一步分析 RASSF1A 下游基因的表达情况。

1 材料和方法

1.1 组织

58 例原发性非小细胞肺癌患者均于我院心胸外科接受手术治疗，留取癌组织和相应正常肺组织标本。58 例患者中有 42 例腺癌，14 例鳞癌，以及 2 例腺鳞癌。参照文献[14]提取 DNA 和 RNA。

1.2 甲基化分析

用 CpGenome DNA Modification Kit (Intergen, Purchase, NY) 修饰已提取的 DNA，分别用甲基化特异性引物和甲基化非特异性引物进行 PCR 扩增，扩增产物行 3%琼脂糖电泳。引物设计参照文献[3]。

1.3 Northern blot 分析

* 南京军区南京总医院科研基金资助项目(资助号：2005018)

作者简介：于正洪(1968-)，女，江苏盐城人，医学硕士，副主任医师，从事肿瘤学专业。

通讯作者：于正洪，E-mail：fish@e165.com

(收稿日期：2006-09-15 接受日期：2006-10-11)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参照文献[12]进行 Northern blot 分析。取 10μg RNA 行甲醛-10.%琼脂糖电泳，电泳结果转印至 Hybond-N+尼龙膜(Amarsham Pharmacia Biotech, Buckingham, UK)。探针由逆转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)获得，序列(Sense /Anti-sense)为：

SM22: 5′-TCCAGGAGAACTTCCAAGGA-3′ / 5′-TCTCTGTGAATTCCCTCTTA-3′

SPARC: 5′-ACTTCTTTGCCACAAAGTGC-3′ / 5′-GTACTTGTCATTGTCCAGGT-3′

SDHB: 5′-ACAGCTCCCCGTATCAAGAA-3′ / 5′-GAGTCAATCATCCAGCGATA

CCND3: 5′-ATCAAGCCGCACATGCGGAAG-3′ / 5′-GCAAAGGTATAATCTGTAGC-3′

SM22, SPARC, SDHB, CCND3 和 β-actin 的转录水平采用 Imaging analyzer (BAStation, FUJIFILM, Tokyo, Japan)分析，其中 β-actin 作为对照。

1.4 统计分析

统计方法包括 Fisher's exact test、Student's t test 和 x^2-test，P<0.05 时有统计学意义。

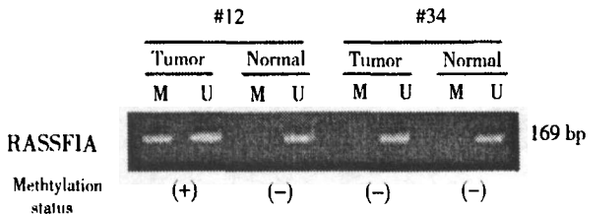

图 1 RASSF1A 甲基化分析

Fig.1 Methylation analysis of RASSF1A

M-Methylated, U-Unmethylated

表 1 RASSF1A 甲基化与临床参数之间的相关性分析

Table 1 Correlation analysis between RASSF1A methylation status and clinical factors

		甲基化情况		
		(+)	(-)	P
合计		20	38	
年龄(平均,岁)		63.8	64.4	0.72a
性别	男	13	22	0.78b
	女	7	16	
吸烟史(年包)	<20	8	19	0.58b
	20	12	19	
病理分型	腺癌	16	27	0.53c
	鳞癌	4	9	
	腺鳞癌	0	2	
分化程度	高分化	3	12	0.39c
	中分化	13	20	
	低分化	4	6	
临床分期	Ⅰ/Ⅱ期	16	26	0.54b
	ⅢⅣ	4	12	

[a] Student's t test.

[b] Fisher's exact test.

[c] x^2-test.

2 结果

2.1 甲基化及其与临床病理的关系

20 例(34.5%)癌组织中发生了 RASSF1A 启动子区域的甲基化。非甲基化条带在所有标本中均有显示，而甲基化条带在正常标本中均无显示。(图 1)甲基化情况与对应临床参数之间的关系如表 1 所示，各参数不同组之间无统计学差异。

2.2 RASSF1A 下游基因表达水平

随机选取了 8 例甲基化和 8 例非甲基化的病例，分析 RASSF1A 下游基因的表达情况。SM22 和 SPARC 在甲基化组的表达较非甲基化组分别降低 60%和 50%，差异显著。SDHB 和 CCND3 的表达情况也显示出了类似趋势，但尚无统计学差异。

3 讨论

本研究检测了 58 例非小细胞肺癌患者肿瘤组织中 RASSF1A 基因启动子过度甲基化情况，结果表明甲基化阳性率为 34.5%(20/58)，与文献报道的 30-40%[3-5,13]一致。

许多研究提示 RASSF1A 基因多种肿瘤的发生、发展中起重要作用，但是其具体作用还未完全明确。有人发现 RAFFS1A 可以调控包括 SM22、SPARC、SDHB 和 CCND3 在内的 66 种基因，本研究中分析了 8 例甲基化和 8 例非甲基化的病例中 RASSF1A 下游这 4 个基因的表达情况。SM22 和 SPARC 在甲基化组的表达较非甲基化组显著降低，提示这它们可能是 RASSF1A 的靶基因。SPARC 在包括肺癌、乳腺癌、结肠癌、食管癌、神经母细胞瘤多种实体瘤的发生中起着重要作用[14-17]。有研究表明，在胰腺癌中 SPARC 的表达缺失与 CpG 岛过度甲基化有关[13]。还有研究提示 SPARC 编码的蛋白具有多种功能，可以调节细胞黏附和细胞生长[17,19]。而我们的研究表提示，SPARC 在非小细胞肺癌的产生种起着抑制作用，但这仍需要进一步研究证实。

总之，非小细胞肺癌中存在着较高比例的 RASSF1A 启动子过度甲基化，并与下游基因 SM22 和 SPARC 的表达下调密切相关，提示 RASSF1A 在非小细胞肺癌的发生中起着多种作用。尽管 RASSF1A 等抑癌基因的失活是肺癌发生、发展中的重要事件，但是其具体机制尚有待进一步研究证实。

参考文献

[1] Virmani AK, Fong KM, Kodagoda D, et al. Allelotyping demonstrates common and distinct patterns of chromosomal loss in human lung cancer types[J]. Genes Chromosomes Cancer, 1998,21(4):308-319

[2] Hung J Kishimoto Y, Sugio K, et al. llete-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma[J]. JAMA, 1995,273(7):558-563

[3] D.G. Burbee, E. Forgacs, S. Zu chbauer-Mu ller, L. Shivakumar, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression, J[J]. Natl Cancer Inst, 2001,93(11): 691-699

[4] Dammann, C. Li, J.H. Yoon, P.L.. Pfeifer, et al.,Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus Nat[J]. Genet, 2000,25(7):15-319

[5] T.Kuroki, F. Trapasso, S. Yendamuri, et al. Allelic loss on

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of semaphorin 3B in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 2003,63 (12): 3352-3355

[6] A. Agathanggelou, S. Honorio, D.P. Macartney, A. et al. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region in lung, breast and ovarian tumors[J]. Oncogene, 2001,20(8):1509-1518

[7] J.H. Yoon, R. Dammann and G.P. Pfeifer, Hypermethylation of the CpG island of the RASSF1A gene in ovarian and renal cell carcinomas, Int. J[J]. Cancer, 2001,94(3):212-217

[8] M.S. Song, S.J. Song, N.G. Ayad, et al. The tumor suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex, Nat[J]. Cell Biol, 2004,6(2):129-137

[9] A.Agathanggelou, I. Biè che, J. Ahmed-Choudhury, B. et al. Identification of novel gene expression targets for the Ras association domain family 1 (RASSF1A) tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer and neuroblastoma [J]. Cancer Res, 2003,63 (21): 5344-5351

[10] W.D. Travis, T.V. Colby, B. Corrin, et al.Histological typing of lung and pleural tumors[J]. Spriner, Berin, 1999,13(7):432-437

[11] Y.Sekido, M. Sato, N. Usami, et al. Establishment of a large cell lung cancer cell line (Y-ML-1B) producing granulocyte colony-stimulating factor, Cancer Genet[J]. Cytogenet, 2002,137(1):33-42

[12] K.Shigemitsu, Y. Sekido, N. Usami, et al.Genetic alteration of the β-catenin gene (CTNNB1) in human lung cancer and malignant mesothelioma and identification of a new homozygous deletion. Oncogene, 2001,21(12):4249-4257

[13] H. Endoh, Y. Yatabe, S. Shimizu, et al. F1A gene inactivation in non-small cell lung cancer and its clinical implication [J]. Int. J. Cancer, 2003,16(1):45-51

[14] C.Gilles, J.A. Bassuk, H. Pulyaeva, et al. Thompson, SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines[J]. Cancer Res.,1998,58(11):5529-5536

[15] H.Porte, E. Chastre, S. Prevot, et al., Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes [J]. Int. J. Cancer, 1995,64 (1): 70-75

[16] J. Brabender, R.V. Lord, R. Metzger, J. Park, D. Salonga and K.D. Danenberg et al. Differential SPARC mRNA expression in Barrett's oesophagus[J]. Br. J. Cancer, 2003, 89(10):1508-1512

[17] A. Chlenski, S. Liu, S.E. Crawford, et al. PARC is a key Schwannian-derived inhibitor controlling neuroblastoma tumor angiogenesis[J]. Cancer Res, 2002,64(11):7357-7363

[18] N. Dhanesuan, J.A. Sharp, T. Blick, et al. Thompson, Doxycycline-inducible expression of SPARC/Osteonectin/BM40 in MDA-MB-231 human breast cancer cells results in growth inhibition, Breast Cancer Res[J]. Treat, 2002,25(1):73-85

[19] N. Sato, N. Fukushima, N. Maehara, et al, SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions [J]. Oncogene, 2003,19 (13):5021-5030

刘红艳(上接第16页)

置同时引入氢键受体基团有利于增加化合物的活性,表1中的1~13号化合物在3'和4'位置都同时接有"-OH"基团,它们的活性均高于其它化合物。

4 结论

采用CoMFA和CoMSIA方法建立的3D-QSAR模型不仅具有良好估计能力而且对外部样本具有良好的预测能力。CoMFA和CoMSIA模型的三维等值线图直观地解释了化合物的构效关系,对于黄酮类醛糖还原酶抑制剂来说,在化合物的3号位适合引入电负性强的基团、氢键给体基团和疏水性强的基团,在3'和4'位置适合引入氢键受体基团和电负性强的基团,这些结论为进一步结构优化提供了重要依据。

参考文献

[1] Cameron NE, Cotter MA, Basso M, et al. Comparison of the effects of inhibitors of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase on neurovascular function, nerve conduction and tissue polyol pathway metabolites in streptozotocin-diabetic rats[J]. Diabetologia, 1997,40: 271-281

[2] Petrash JM. All in the family: aldose reductase and closely related aldoketo reductases[J]. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 2004,61:739-749

[3] 赵晶,戴德哉.糖尿病并发症的药物治疗[J].药学进展,2003,27(2): 88-91

[4] 闫泉香.黄酮类醛糖还原酶抑制剂的活性研究[J].中药药理与临床,2004,20(2): 9-11

[5] Rastelli G, Costantino L. Moleccular dynamics simulations of the structure of aldose reductase complexed with the inhibitor tolrestat[J]. bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 1998, 8: 641-646

[6] Klebe G, Abraham U, Mietzner T. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity [J]. J. Med. Chem. 1994, 37 (24): 4130-4146

[7] Fernó ndez M, Caballero J, Helguera AM, et al. Quantitative structure-activity relationship to predict differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2005, 13: 3269-3277

[8] 聂晶,董喜成,潘家裕.几种改进的CoMFA方法比较研究血小板活化因子拮抗剂[J].化学学报,2003,61(7): 1129-1135

[9] 朱杰,盛春泉,张万年.比较分子力场分析法(CoMFA)的研究新进展[J].化学进展,2000,12(2): 203-207

[10] 盛春泉,张万年,张珉,等.新型三唑类抗真菌化合物的三维定量构效关系研究[J].化学学报,2005,63(7): 617-624

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net