肝癌组织 hSulf－1 基因表达与其甲基化状态的关系

沈伟敏　刘　凌　陆　贝

摘　要　目的　研究肝细胞肝癌组织中人硫酸酯酶－1(hSulf－1)基因甲基化的状态,其 mRNA 以及蛋白表达情况及与甲基化状态的相关性,探讨 hSulf－1 基因甲基化在肝癌发生发展中的作用。**方法**　应用 RT－PCR、甲基化特异性 PCR 及免疫印迹法,测定 42 例肝癌组织及其癌旁正常组织 hSulf－1 的 mRNA、甲基化及蛋白表达水平,并分析 hsulf－1 基因表达水平及甲基化与肝癌临床特征的关系。**结果**　在肝癌组织中,hSulf－1 mRNA 和蛋白表达水平明显低于癌旁正常组织,而正常肝组织几乎检测不到。肝癌组织 hSulf－1 甲基化率为 66.7%(28/42),而在癌旁正常组织中 hSulf－1 甲基化率为 7.1%(3/42),二者之间差异有统计学意义($P<0.05$),在 hSulf－1 mRNA 表达缺失或下调的 31 例肝癌组织中,其中有 25 例发生甲基化($\chi^2=8.45$, $P<0.05$)。在肝癌组织中,甲基化组 hSulf－1 mRNA 及蛋白表达明显低于非甲基化组(分别为 0.687±0.092 vs 2.324±0.123,$P<0.01$;0.825±0.119 vs 2.212±0.178, $P<0.01$)。hSulf－1 基因甲基化与患者肝硬化密切相关。**结论**　肝细胞肝癌 hSulf－1 基因 mRNA 及蛋白表达明显下降、其甲基化程度明显增高,且 hSulf－1 基因的甲基化状态与 mRNA 及蛋白的表达情况具有某种联系,提示 hSulf－1 基因的甲基化状态可能与肝癌的发生、发展有关。

关键词　甲基化　肝细胞肝癌　hSulf－1　基因抑制

中图分类号　R735　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2015.12.032

Influence of Methylation of hSulf－1 Gene on hSulf－1 mRNA and Protein Expression in Hepatocellular Cancer Tissues. *Shen Weimin, Liu Ling, Lu Bei. Department of General Surgery, Hangzhou First People Hospital, Nanjing Medical University, Zhejiang 310006, China*

Abstract　Objective　To study the effect of hSulf－1 gene metheylation on mRNA and protein expression in colorectal cancer, and the role of hSulf－1 gene metheylation in pathogenesis of hepatocellular cancer. **Methods**　mRNA, methylation and protein expression of hsulf－1 gene were detected by RT－PCR, methylation specific PCR and Western blott in 40 tumor and normal tissues of hepatocellular cancer. **Results**　hSulf－1 mRNA and protein expression in tumor tissues were lower significantly than those in corresponding normal tissues of hepatocellular cancer. Methylation of hSulf－1 gene in the tumor tissues was detected at 66.7%, while the normal tissues had lower frequencies (7.1%). hSulf－1 mRNA and protein expression in methylation group of HCC tissues were lower than that in unmethylation group (0.687±0.092 vs 2.324±0.123, $P<0.01$; 0.825±0.119 vs 2.212±0.178, $P<0.01$ respectively). (4) Methylation of hSulf－1 gene in the tumor tissues was closely related to liver cirrhosis. **Conclusion**　mRNA and protein expression levels of hSulf－1 is lower in the HCC tissue and low expression of hSulf－1 is associated with hypermethylation of hSulf－1 gene, which suggestes that hSulf－1 gene methylation plays a role in HCC carcinogenesis.

Key words　Methylation; Hepatocellular cancer; hSulf－1; Gene suppressor

肝细胞肝癌(hepatocellular cancer, HCC)是一类恶性程度极高的肿瘤,在我国其发生率位居第 2 位。多种研究表明,肝癌的发生、发展可能包括某些基因突变,原癌基因的激活及抑癌基因的失活。而在肝癌的早期阶段,表观遗传机制导致的基因失活起着尤为重要的作用[1]。表观遗传学与遗传学机制不同,指基于非基因序列本身的改变而引起基因表达的变化,其中 DNA 甲基化是表观遗传学机制最常见的形式[2]。hSulf－1 基因是 Dhoot 等[3]在 2001 年发现并命名的,其定位于 8 号染色体长臂 8q13.3 上。有研究发现,在胃癌和乳腺癌等多种肿瘤发生、发展过程中,hSulf－1 基因表达明显下调,且证实 hSulf－1 基因表达下调与其启动子甲基化有关[4]。但是目前尚未见报道肝癌中 hSulf－1 基因表达水平情况以及甲基化水平的相关性研究。因此本实验研究 hSulf－1 基因在肝癌中甲基化的状态水平,其 mRNA 及相关蛋白水平的表达及相关性,进一步探讨研究 hSulf－1 基因甲基化在肝癌发生、发展中的作用。

材料与方法

1. 材料:组织标本取自 2012 年 9 月～2014 年 1 月,在南京医科大学附属杭州医院行外科手术治疗的肝癌患者 42 例,

作者单位:310006　南京医科大学附属杭州第一人民医院普外科
通讯作者:刘凌,电子信箱:liugift123@163.com

患者年龄 46～78(57.6±13.7)岁。所有患者经过病理诊断确诊(TNM 分期标准),而且术前也未用任何放、化疗,病理类型均为肝细胞癌。

2. 主要试剂:Trizol 试剂购于贝特试剂公司,TaKaRa RNA PCR KIT(AMV)Ver.3.0 试剂盒购于大连宝生物公司,Methylation-Direct™ Kit 试剂盒购于 Toyobo 公司,BCA 试剂盒购于百泰克公司,ECL 试剂盒购于碧云天公司,一抗购于 Santa Cruz 公司,HSulf-1 基因的引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成,甲基化引物和非甲基化引物均由上海生工生物技术服务有限公司合成。

3. 方法:(1)本实验研究标本为肝癌组织以及癌旁正常组织(距肝癌癌缘 2cm),手术操作切除组织标本后立即放入液氮罐,并保存于 -80℃ 冰箱。且肝癌标本经两名病理学家确定病理类型及分期(TNM 分期标准)。(2)按照 Trizol 试剂说明书要求提取 100mg 组织中的 DNA、总 RNA 及蛋白质,分别加入 8mmol/L NaOH 溶解 DNA,适量 TE 溶液溶解 RNA 及用 1% SDS 溶解蛋白质,紫外分光光度计测定 DNA 及 RNA 浓度和纯度,按照 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质含量。(3)RT-PCR 检测 hSulf-1 mRNA 的表达:应用 TaKaRa RNA PCR KIT(AMV)Ver.3.0 试剂盒将 mRNA 反转录成 cDNA。本研究中 hSulf-1 和 GAPDH 的引物参照相关文献设计,并以后者作为本研究的内参照[5,6]。hSulf-1 的引物为:forward 5′-CTCACAGTCCGGCAGAGCACGCGGAAC-3′; reverse 5′-CACGGCGTTGCTGCTATCTGCCA GCATCC-3′。GAPDH 的引物为 forward 5′-A GTCAACGGATTTGGTCGT-3′;reverse 5′-TTGATTTTGGAGG GATCTG-3′。将提取后的 RNA 立即进行反转录反应,按以下条件依次操作:30℃ 10min,42℃ 30min,99℃ 5min,5℃ 5min。反转录成 cDNA 后进行 PCR 反应:94℃ 2min,接着 94℃ 30s,53℃ 45s,72℃ 60s,共需 35 个循环,最后在 72℃ 下反应 2 min。本研究 hSulf-1 的产物条带大小为 371bp,而 GAPDH 的产物条带大小为 238bp。最后产物均用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳下电泳分离,接着以 EB 染色后 Alpha Imager 紫外凝胶成像分析系统照相并进行定量分析。(4)按 Methylation-Direct™ Kit 试剂盒中操作说明进行标本硫化后进行 PCR 扩增:hSulf-1 甲基化引物与非甲基化引物均参照文献[6],MSP 引物序列为:hSulf-1 甲基化引物 forward 5′-TGTTCGTCGTCG TTTAAGTC-3′,reverse 5′-CGTAAA CGAC GCCGACCCCACTA-3′;目的片段长度为 265bp;hSulf-1 非甲基化引物 forward 5′-GAC GAT CTA CGA AAT ACT CG-3′, reverse 5′-CAT AAA CAA CAC CAA CCC CAC TA-3′,目的片段长度为 270 bp。实验扩增条件为 95℃,并设定 5 min 为 1 个循环;95℃ 30s、56℃ 45s、72℃ 1min,共需 35 个循环;最后在 72℃ 下反应 10 min。实验采用等量灭菌的双蒸水来代替模板 DNA 作为实验阴性对照。而试剂盒中 P16 为实验阳性对照。在琼脂糖凝胶电泳后,于 Alpha Imager 紫外凝胶成像分析系统下照相并分析。(5)取实验蛋白总量 50μg,然后加入 2×SDS loading buffer,加热变性后开始上样(标本及 marker),于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,电泳结束后立即行半干式转膜,将 PVDF 膜移至平皿中,封闭后加入一抗及二抗,控制时间,将 ECL 发光试剂盒中 A 及 B 两种试剂混合并反应显影、X 线片压片后取出 X 线片,并迅速显影以及定影,自然水冲净定影液并晾干,并用 Alpha Imager 紫外凝胶成像分析系统扫描并定量分析(实验值以 A 值表示),本实验采用 β-actin 为内参照。

4. 统计学方法:本研究用 SPSS 19.0 进行相关统计学的分析。其中 hSulf-1 的甲基化的表达结果,mRNA 及蛋白表达的差异采用 t 检验,而甲基化率分析及其与临床病理特征的关系采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. RT-PCR 检测 hSulf-1 基因 mRNA 的表达结果:在 42 例肝癌患者中,hSulf-1 基因 mRNA 在癌旁正常组织中的全部表达,hSulf-1mRNA 的表达量用组织中 mRNA 的 A 值与内参照 GAPDH 的 A 值做比值表示,其中有 31 例肝癌组织的表达量低于其对应的正常组织(73.8%)。而且肝癌旁正常组织中 hSulf-1mRNA 的表达量(2.218±0.113)则要明显高于癌组织 hSulf-1mRNA 的表达量(1.072±0.132),两者差异有统计学意义($P<0.01$,图 1)。

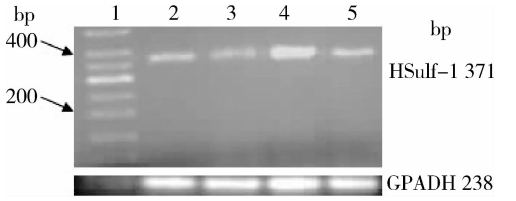

图 1　肝癌组织和癌旁正常组织 hSulf-1 mRNA 表达情况

1. 标志物;2、4. 正常组织;3、5. 对应癌组织

2. Western blot 法检测 hSulf-1 蛋白表达的结果:在 42 例肝癌患者中,其中有 27 例肝癌组织的 hSulf-1 蛋白的表达量低于其对应的正常癌组织(64.3%)。hSulf-1 蛋白的表达量与内参照 β-actin 的进行比值表示,实验结果显示肝癌旁正常组织中 hSulf-1 蛋白的表达量(1.809±0.145)同样明显高于癌组织的 hSulf-1 蛋白的表达量(1.088±0.128),差异有统计学意义($P<0.01$,图 2)。直线相关分析显示,肝癌组织中 hSulf-1 蛋白表达与 mRNA 表达具有明显相关性($r=0.352$,$P<0.01$,图 3)。

3. MSP 检测 hSulf-1 甲基化表达的结果:用 MSP 法对 hSulf-1 基因启动子区甲基化进行检测,结果显示肝癌组织及癌旁正常组织中 hSulf-1 基因启动子甲基化的频率分别为 66.7%(28/42)和 7.1%

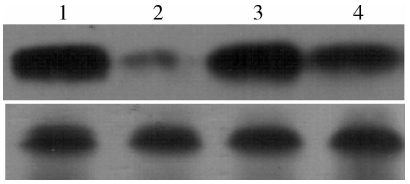

图 2　肝癌组织和癌旁正常组织 hSulf－1 蛋白表达情况

1、3. 癌旁正常组织；2、4. 其相对应的癌组织

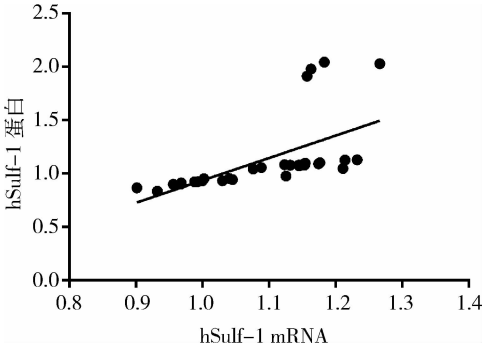

图 3　hSulf－1 mRNA 表达与蛋白表达的相关性

(3/42)。肝癌组织中 hSulf－1 基因启动子区甲基化率较癌旁正常组织的 hSulf－1 基因启动子区甲基化明显升高，两者存在统计学差异($P<0.05$)，启动子发生高度甲基化，在 hSulf－1 mRNA 表达缺失或下调的 31 例肝癌组织中，其中有 25 例发生甲基化($\chi^2=8.45$，$P<0.05$)。肝癌组织甲基化组 hSulf－1 mRNA 的表达明显低于非甲基化组(A 比值分别为 0.687±0.092 vs 2.324±0.123，$P<0.01$)，肝癌组织甲基化组 hSulf－1 蛋白的表达明显低于非甲基化组(灰度值比值分别为 0.825±0.119 vs 2.212±0.178，$P<0.01$)，这说明 hSulf－1 mRNA 表达下调与其甲基化关系密切(图 4，表 1)。

4. hSulf－1 启动子甲基化与临床病例特征的分析：42 例肝癌组织根据临床病理特征分类，发现 hSulf－1 启动子甲基化与性别、年龄、血清 HBsAg、临床分期及门静脉癌栓均未发现有相关性($P>0.05$)，与肝硬化程度具有相关性($P<0.05$，表 2)。

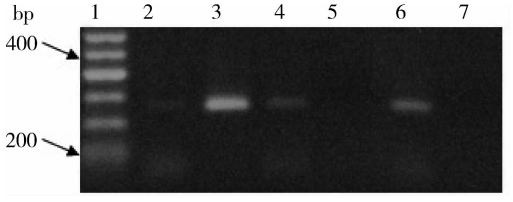

图 4　肝癌组织和癌旁正常组织 hSulf－1 甲基化情况

1. 标志物；2. 癌组织非甲基化条带；3. 癌组织甲基化条带；4. 癌旁正常组织非甲基化条带；5. 癌旁正常组织甲基化条带；6. 阳性产物；7. 阴性产物

表 1　hSulf－1 基因甲基化状态与 hSulf－1 mRNA 表达的关系

甲基化状态	hSulf－1 mRNA 表达		合计
	下调	未下调	
甲基化	25	3	28
未甲基化	5	8	17
合计	31	11	42

表 2　hSulf－1 基因甲基化状态与肝癌临床病理特征之间的关系

临床特征	n	hsulf－1 甲基化		χ^2	P
		甲基化	非甲基化		
性别					
男性	24	15	9	0.008	>.005
女性	18	13	5		
年龄(岁)					
≤50	17	11	6	0.156	>0.05
>50	25	17	8		
血清 HBsAg(＋)	29	18	11	0.045	>0.05
血清 HBsAg(－)	13	10	3		
临床分期					
Ⅰ～Ⅱ	28	16	12	2.298	>0.05
Ⅲ～Ⅳ	14	12	2		
肝硬化					
有	29	21	8	5.361	<0.05
无	13	7	6		
门静脉癌栓					
有	16	10	6	0.321	>0.05
无	26	18	8		

讨　　论

目前多种研究已经证实，肿瘤的发生、发展是遗传学和表观遗传学机制二者相互共同作用的结果。而表观遗传学与遗传学机制不同，它的研究不涉及 DNA 序列变化及可遗传的基因表达变化，具体包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰以及 RNA 干涉等，虽然不涉及 DNA 序列改变，但是其在基因转录调控的过程中起着非常重要的作用，是当前研究的热点[7]。其中，表观遗传学机制最为常见的是 DNA 甲基化，通过某些基因启动子区域内的异常甲基化，可直接抑制其表达，而由此导致肿瘤的发生、发展[8]。有研究表明，硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPGs)通过稳定、保护、运输配体及促进配体－受体间相互作用调控多种信号通路，调控细胞与微环境组成成分之间的作用，由此一系列生物作用，而 hSulf－1 基因作为 HSPGs 活性的调控因子，其表达通过减少 HSPGs 硫化作用，抑制与其相关的信号通路，抑制癌细胞增殖并促进癌细胞凋亡，提高癌细胞对凋亡诱导因子的敏感度[9]。

因此可以认为 hSulf－1 基因是一种抑癌基因。研究表明，hSulf－1 基因在人体内几乎所有正常组织均有表达，而在一些常见肿瘤中表达减少或缺失，如卵巢癌、胃癌、乳腺癌等，提示表观遗传修饰可能在 hSulf－1 基因作用中发挥着重要作用[6,10～12]。

本研究结果发现，肝癌组织中 hSulf－1 基因 mRNA 和蛋白表达的水平较癌旁正常组织中表达水平均明显降低，提示 hSulf－1 基因在肝癌组织中同样也是一种抑癌基因，但是到底 hSulf－1 基因下调的机制是什么？据前人在研究 hSulf－1 基因与其他肿瘤的关系时，发现 hSulf－1 基因存在甲基化，而这种甲基化机制导致 hSulf－1 基因在肿瘤中表达下调，在此基础上，笔者进一步对肝癌组织及癌旁正常组织进行甲基化分析。笔者采用 MSP 方法检测了 hSulf－1 基因启动子区域甲基化状态，结果显示，hSulf－1 基因启动子区域甲基化率占 66.7%（28/42），而在相对应的癌旁正常组织中，只有 3 例出现 hSulf－1 基因启动子区域异常甲基化现象，甲基化率占 7.1%（3/42）（$P<0.05$），其启动子甲基化频率明显高于癌旁正常组织。

由此可见，在肝癌组织中，hSulf－1 基因同样也出现甲基化，由于 DNA 甲基化改变常发生于遗传学改变之前，因此早期检测到 hSulf－1 基因甲基化有助于肝癌的早期诊断，但是笔者发现 hSulf－1 启动子甲基化与性别、年龄、血清 HbsAg、临床分期及门静脉癌栓均未发现有相关性（$P>0.05$），与肝硬化程度具有相关性（$P<0.05$）。为了进一步证实 hSulf－1 基因在肝癌组织中 mRNA 与蛋白表达下降是否与启动子甲基化状态有关，笔者将 hSulf－1 基因甲基化组与非甲基化组的 hSulf－1 基因的 mRNA 与蛋白表达进行比较，结果显示甲基化组 hSulf－1 基因 mRNA 与蛋白表达水平显著低于非甲基化组，而在 hSulf－1 mRNA 表达缺失或下调的 31 例肝癌组织中，其中有 25 例发生甲基化（$\chi^2=8.45$，$P<0.05$）提示 hSulf－1 基因在肝癌组织中的高度甲基化可能与 hSulf－1 基因的转录与蛋白表达异常有关。

综上所述，本研究证实了 hSulf－1 基因 mRNA 表达以及其蛋白表达在肝癌组织中较癌旁组织减少或缺失，并进一步明确与其表达水平与启动子甲基化具有显著的相关性，提示 hsulf－1 基因甲基化是肝癌发生的重要分子机制，hSulf－1 基因甲基化检测可能成为肝癌早期诊断以及预后评估的一种潜在标志物，而且这也为将来应用去甲基化药物，使得因甲基化的失活而产生的抑癌基因重新表达，并为其早期治疗肝癌提供了一定的实验依据。

参考文献

1 Anwar SL, Lehmann U. DNA methylation, microRNAs, and their crosstalk as potential biomarkers in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(24):7894－7913

2 Hung SY, Lin HH, Yeh KT, et al. Histone－modifying genes as biomarkers in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(5):2496－2507

3 Dhoot GK, Gustafsson MK, Ai X, *et al*. Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase[J]. Science, 2001, 293:1663－1666

4 Liu H, Fu X, Ji W, *et al*. Human sulfatase－1 inhibits the migration and proliferation of SMMC－7721 hepatocellular carcinoma cells by downregulating the growth factor signaling[J]. Hepatol Res, 2013, 43(5):516－525

5 Megumi M, Kenji U, Zena W, *et al*. Cloning and characterization of two extracellular heparin－degrading endosulfatases in mice and humans[J]. J Biol Chem, 2002, 277(51): 49175－49185

6 Chen Z, Fan JQ, Li J, *et al*. Promoter hypermethylation correlates with the HSulf－1 silencing in human breast and gastric cancer[J]. Int J Cancer, 2009, 124(3):739－744

7 Nazarian R, Jazirehi AR. Epigenomics and targeted therapy in cancer[J]. Epigenomics, 2014, 6(6):571－575

8 Ehrlich M, Ehrlich KC. DNA cytosine methylation and hydroxymethylation at the borders[J]. Epigenomics, 2014,6(6):563－566

9 Khurana A, Beleford D, He X, *et al*. Role of heparan sulfatases in ovarian and breast cancer[J]. Am J Cancer Res, 2013, 3(1):34－45

10 He X, Khurana A, Roy D, *et al*. Loss of HSulf－1 expression enhances tumorigenicity by inhibiting Bim expression in ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2014,15,135(8):1783－1789

11 Roy D, Mondal S, Wang C, *et al*. Loss of HSulf－1 promotes altered lipid metabolism in ovarian cancer[J]. Cancer Metab, 2014, 2(13):1186－2049

12 Ji W, Yang J, Wang D, *et al*. hSulf－1 gene exhibits anticancer efficacy through negatively regulating VEGFR－2 signaling in human cancers[J]. PLoS One, 2011, 6(8):e23274

（收稿日期：2015－05－05）
（修回日期：2015－05－28）