

结直肠癌 HOXA11 基因启动子甲基化状态的研究

潘烽平 陈一鹏 李彦 张明明

【摘要】 目的 探讨结直肠癌 HOXA11 基因启动子异常甲基化及其与临床病理特征之间的关系。方法 从 89 对结直肠癌组织和配对的正常肠黏膜组织中分别提取基因组 DNA, 采用甲基化特异 PCR(MSP)检测 HOXA11 基因启动子区甲基化状态, 比较结直肠癌及正常肠黏膜组织中 HOXA11 甲基化的发生率, 并统计分析结直肠癌组织中甲基化水平与患者临床病理特征的关系。在体外实验中, 采用甲基化转移酶抑制剂 5-Aza-dC 处理细胞, 实时荧光定量 PCR 检测 HOXA11 mRNA 表达水平的变化。结果 结直肠癌组织中 HOXA11 基因启动子甲基化阳性率显著高于配对的正常肠黏膜组织($P<0.01$)。HOXA11 基因启动子异常甲基化与直肠癌淋巴结转移($P<0.01$)及 TNM 分期($P<0.01$)密切相关。结直肠癌细胞经 5-Aza-dC 处理后 HOXA11 mRNA 表达水平显著增高($P<0.05$)。结论 在结直肠癌组织中, HOXA11 基因启动子区异常甲基化抑制 HOXA11 基因的转录表达。HOXA11 启动子区异常甲基化与结直肠癌患者的淋巴结转移及 TNM 分期密切相关。

【关键词】 结直肠癌 HOXA11 甲基化 基因表达 淋巴结转移 TNM 分期

Association of methylation status of HOXA11 gene promoter with clinicopathological features in colorectal cancer PAN Fengping, CHEN Yipeng, LI Yan, et al. Department of Anorectal Surgery, the First Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314001, China

【Abstract】 Objective To investigate the methylation status of HOXA11 gene promoter in colorectal cancer (CRC) and its relationship with clinicopathological features. Methods Genomic DNA was extracted from 89 pairs of CRC tissues and corresponding normal tissues. Methylation-specific PCR(MSP) was performed to examine the methylation status of HOXA11 gene promoter. The relationship between HOXA11 methylation level and clinicopathological features was analyzed. In vitro experiments, CRC cell lines were treated with methyltransferase inhibitor 5-Aza-dC, and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of HOXA11 mRNA. Results The methylation-positive rate was significantly higher in CRC tissues than that in corresponding intestinal mucosa ($P<0.01$). The hypermethylation of HOXA11 gene promoter was significantly associated with lymph node metastasis ($P<0.01$) and TNM stage ($P<0.01$) in CRC patients. In vitro, 5-Aza-dC treatment significantly increased the expression of HOXA11 mRNA ($P<0.05$). Conclusion In CRC tissues, aberrant methylation of the HOXA11 gene promoter regulates HOXA11 gene expression, and its hypermethylation is significantly associated with lymph node metastasis and TNM stage in CRC patients.

【Key words】 Colorectal cancer HOXA11 Methylation Gene expression Lymph node metastasis TNM stage

结直肠癌是全球范围内高发病率和死亡率的恶性肿瘤之一^[1-2]。研究发现, DNA 甲基化在结直肠癌发病机制中具有十分重要的作用, 其中抑癌基因甲基化是近年来肿瘤表观遗传研究的热点^[3]。HOXA11 是一个受表

观遗传调控而表达丢失的基因, 异常甲基化导致 HOXA11 基因表达下调, 影响肿瘤的发生、发展及预后。研究证实, 在卵巢癌中 HOXA11 基因启动子 CpG 岛异常甲基化是其不良预后的一个独立危险因素^[4]。在恶性胶质瘤中, HOXA11 的异常低表达与放疗抵抗密切相关并且影响患者的生存预后^[5]。然而, HOXA11 在结直肠癌中是否存在异常甲基化, HOXA11 的异常甲基化是否参与调控肿瘤细胞的生物学行为目前尚未见于研究报道。本研究以结直肠癌为研究对象, 探讨 HOXA11 在结直肠癌中的表达水平以及甲基化程度, 以及 HOXA11 启动子区异常甲基化与患者临床病理特征间的相关性。

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.12.2019-66

基金项目: 浙江省医药卫生科技项目(2018KY797); 嘉兴市科技计划项目(2017AY33005); 嘉兴市医学重点学科普通外科学(04-F-15)

作者单位: 314001 嘉兴市第一医院肛肠外科(潘烽平、李彦、张明明), 消化内科(陈一鹏)

通信作者: 潘烽平, E-mail: panhnjx@163.com

1 材料和方法

1.1 组织标本 89 对结直肠癌组织及配对的正常肠黏膜组织标本取自于 2016 年 8 月至 2018 年 10 月在嘉兴市第一医院(55 例)和浙江大学医学院附属第一医院普外科(34 例)接受结直肠癌根治术的患者。所有患者术前均未接受放化疗,结直肠癌组织及配对的正常肠黏膜组织均经过病理学检查证实。此外,组织标本的使用均获得患者本人或其家属的同意,并签署书面同意书。

1.2 细胞培养 本研究选用的 6 种结直肠癌细胞系(HT29、SW480、HCT116、SW620、LoVo 和 SW1116)均购于上海科学院细胞库。细胞采用含有 10%FBS 的 RPMI1640 培养液,置于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱内培养。

1.3 主要试剂和仪器 CpGenome Universal DNA Modification kit、5-Aza-dC 均购于美国 Sigma-aldrich 公司(批号:S7822、A3656);Trizol 试剂购于美国 Invitrogen 公司(批号:15596018);反转录试剂盒为日本 TaKaRa 公司产品(批号:RR047A);SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒购于日本 Toyobo 公司(批号:QPK-201)。ABI 7900 测序仪购于美国 ABI 公司。

1.4 甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific PCR, MSP)检测 HOXA11 甲基化状态采用酚-氯仿法抽提 100mg 结直肠癌和配对正常肠黏膜组织标本中的 DNA,并以 CpGenome Universal DNA Modification kit 试剂盒修饰 DNA。甲基化引物(HOXA11-M)和非甲基化引物(HOXA11-U)分别用于扩增 HOXA11 基因 5'CpG 岛甲基化和非甲基化的等位基因,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。HOXA11-U 引物序列为:5'-TGTGTGTGAAGTGATTTTTAGAGAGTAT-3'(正义链),5'-AACAACTCTCTATACACAAACTCCTCCA-3'(反义链);HOXA11-M 引物序列为:5'-TGCGCGAAGT-GATTTTTAGAGAGTAC-3'(正义链),5'-CAATCTC-TATACACGAACTCCTCCG-3'(反义链)。MSP 反应条件如下:95℃预变性 5min,95℃变性 30s,63℃退火 30s,72℃延伸 45s,共 35 个循环,最后 72℃延伸 5min,4℃终止反应。最后将反应产物行 2%琼脂糖凝胶电泳,电泳凝胶呈像系统照相并分析结果。

1.5 实时荧光定量 PCR (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 HOXA11 mRNA 表达水平将 6 种结直肠癌细胞系细胞置于 5-Aza-dC 终浓度为 20μmol/L 的培养液中培养 96h,行去甲基化处理。处理前后分别收集细胞,采用 Trizol 试

剂抽提各组细胞和正常肠黏膜组织中的总 RNA,按照反转录试剂盒说明书操作流程反转录合成 cDNA。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,HOXA11 上游引物:5'-GCAGCAGAGGAGAAAGAGGG-3',下游引物:5'-GTGGATTTGCTGAGTAGTACTG;GAPDH 上游引物:5'-CCCATCACCATCTTCCAGGAG-3',下游引物:5'-CTTCTCCATGGTGGTGAAGACG-3'。采用 ABI 7900 测序仪进行 qRT-PCR,反应条件如下:95℃预变性 1min,95℃反应 10s,59℃反应 30s,共 50 个循环。每组设置 3 个复孔,独立重复 3 次,获得 CT 值。 Δ CT 为同一标本目的基因(HOXA11)与内参基因(GAPDH)CT 值之差,即 Δ CT=CT(HOXA11)-CT(GAPDH), $\Delta\Delta$ CT= Δ CT(各组结直肠癌细胞)- Δ CT(正常肠黏膜组织)的差值,HOXA11 的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta$ CT} 表示。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 25.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;组间频数比较采用 χ^2 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HOXA11 在结直肠癌中呈异常甲基化状态 采用 MSP 技术检测结直肠癌和配对正常肠黏膜组织中 HOXA11 基因启动子 CpG 岛的甲基化情况,扩增结果见图 1。89 例结直肠癌患者中共 67 例癌组织标本存在甲基化(75.3%),而正常肠黏膜组织中仅 14 例存在甲基化(15.7%)。上述实验结果表明,结直肠癌组织中 HOXA11 基因甲基化率显著高于正常肠黏膜组织(*P*<0.01)。

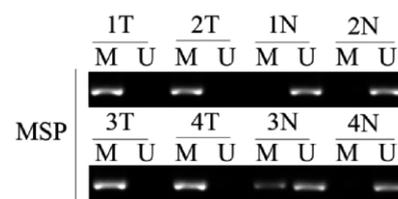


图 1 MSP 检测结直肠癌组织及配对正常肠黏膜组织中 HOXA11 启动子甲基化状态(T:结直肠癌组织;N:正常肠黏膜组织;M:甲基化;U:非甲基化)

2.2 HOXA11 基因启动子甲基化状态与其 mRNA 表达量的关系 发生甲基化的结直肠癌组织中 HOXA11 mRNA 的相对表达量明显低于较未发生甲基化的结直肠癌组织(*P*<0.01),见图 2。

2.3 HOXA11 基因启动子甲基化与结直肠癌患者临床病理特征的关系 结直肠癌组织中 HOXA11 基因启动子的甲基化状态与淋巴结转移(*P*<0.01)及 TMN 分期

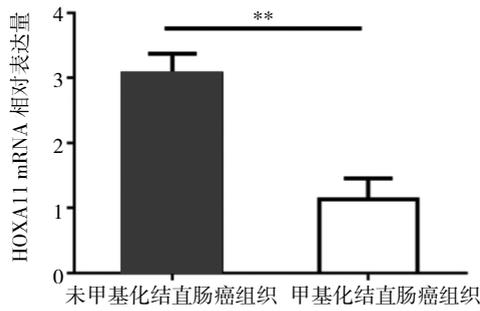


图 2 结直肠癌组织中 HOXA11 甲基化状态与其 mRNA 表达水平的关系 (** $P < 0.01$)

($P < 0.01$)密切相关,而与患者的年龄、性别、组织分化、浸润深度无关(均 $P > 0.05$),见表 1。

表 1 HOXA11 基因启动子甲基化与结直肠癌患者临床病理特征的关系

组别	n	甲基化例数	甲基化比例(%)	P 值
性别				
男	53	39	73.58	0.653
女	36	28	77.78	
年龄				
<60 岁	29	20	68.97	0.337
≥60 岁	60	47	78.33	
组织分化				
高、中分化	49	36	73.47	0.661
低、未分化	40	31	77.50	
浸润深度				
T ₁ +T ₂	36	24	66.67	0.121
T ₃ +T ₄	53	43	81.13	
淋巴结转移				
无	36	21	58.33	0.002
有	53	46	86.79	
TNM 分期				
I ~ II 期	41	25	60.97	0.004
III ~ IV 期	48	42	87.50	

2.4 结直肠癌细胞系 HOXA11 基因启动子甲基化情况 MSP 结果显示,所有结直肠癌细胞系中 HOXA11 启动子均呈高甲基化状态。使用 20 μ mol/L 甲基化转移酶抑制剂 5-Aza-dC 处理细胞 96h 后,HOXA11 mRNA 相对表达量均较无 5-Aza-dC 处理组显著升高($P < 0.05$),见图 3。

3 讨论

肿瘤的发生和发展是在多种致癌因素作用下,多基因参与、多步骤发生的过程,主要涉及癌基因的激活和抑癌基因的失活。DNA 甲基化异常,特别是癌基因的低甲基化和抑癌基因的高甲基化,是肿瘤发生的重要机制

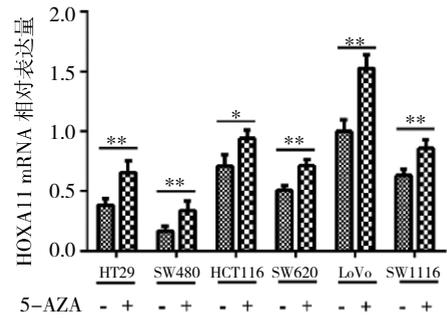


图 3 5-Aza-dC 处理结直肠癌细胞系后 HOXA11 mRNA 表达水平 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

之一^[6],其中抑癌基因通常由于过度甲基化,导致表观遗传学改变,从而抑制基因的转录和蛋白表达,参与恶性肿瘤的进展^[7]。结直肠癌中广泛存在抑癌基因异常甲基化,目前研究认为,部分肿瘤相关基因甲基化是结直肠癌早期诊断及靶向治疗的生物标志^[8]。因此,深入研究结直肠癌中的 DNA 甲基化对于肿瘤诊断和治疗具有至关重要的意义。

同源框基因(homeobox genes, HOX)主要包括 A、B、C、D 四个基因簇,是一类在进化上高度保守的基因,主要参与调控胚胎发育和细胞分化。近期研究表明,HOX 基因表达异常与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关^[9-10]。HOXA11 是 HOX 基因家族中的一员,位于染色体 7p。最新研究表明,卵巢癌^[4]、胶质瘤^[11]、乳腺癌^[12]、肾癌^[13]、肺癌^[14-15]和胃癌^[16-17]普遍存在 HOXA11 异常甲基化,抑制 HOXA11 基因的表达,促进肿瘤的发展。

为阐明 HOXA11 在结直肠癌组织中的甲基化水平及其与患者临床病理特征间的关系,本研究采用 MSP 法对结直肠癌组织及配对正常肠黏膜组织中 HOXA11 基因甲基化状态进行检测。结果表明,与正常肠黏膜比较,HOXA11 基因在结直肠癌组织中普遍存在异常甲基化。除此之外,结直肠癌组织中异常甲基化与淋巴结转移及 TNM 分期密切相关。进一步研究发现,发生甲基化的结直肠癌组织中 HOXA11 mRNA 表达水平显著低于未甲基化的结直肠癌组织。基因的异常甲基化会导致基因的表达沉默,笔者推测,HOXA11 基因异常甲基化可能是导致 HOXA11 基因低表达的重要原因之一。为进一步验证推测,体外实验中使用了甲基化转移酶抑制剂 5-Aza-dC,降低细胞的甲基化水平,结果提示 5-Aza-dC 作用后,6 种 HOXA11 异常甲基化的结直肠癌细胞系中 HOXA11 mRNA 的表达水平显著增高,与推测一致。由此可以得出,结直肠癌组织中 HOXA11 基因异常甲基化抑制了 HOXA11 基因的转录和表达,促进肿瘤的发展。

综上所述, 本研究发现结直肠癌组织中 HOXA11 基因普遍存在异常甲基化, 抑制其转录表达。结直肠癌中 HOXA11 基因启动子区异常甲基化是淋巴结转移及 TNM 分期的危险性因素。通过本研究, 笔者预测 HOXA11 基因甲基化检测可能是结直肠癌早期筛查及精准治疗的潜在生物标志物。

4 参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115–132. DOI:10.3322/caac.21338.
- [2] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9–29. DOI:10.3322/caac.21208.
- [3] Bai X, Zhu Y, Pu W, et al. Circulating DNA and its methylation level in inflammatory bowel disease and related colon cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(10): 13764–13769. DOI:10.1581/ijcep.24597.
- [4] Fiegl H, Windbichler G, Mueller-Holzner E, et al. HOXA11 DNA methylation—a novel prognostic biomarker in ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2008, 123(3): 725–729. DOI:10.1002/ijc.23563.
- [5] Se YB, Kim SH, Kim JY, et al. Underexpression of HOXA11 is associated with treatment resistance and poor prognosis in glioblastoma[J]. Cancer Res Treat, 2017, 49(2): 387–398. DOI: 10.4143/crt.2016.106.
- [6] Pfeifer GP. Defining driver DNA methylation changes in human cancer[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 1166. DOI: 10.3390/ijms19041166.
- [7] Pan Y, Liu G, Zhou F, et al. DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics[J]. Clinical and Experimental Medicine, 2018, 18(1): 1–14. DOI:10.1007/s10238-017-0467-0.
- [8] Weisenberger DJ, Liang G, Lenz HJ. DNA methylation aberrancies delineate clinically distinct subsets of colorectal cancer and provide novel targets for epigenetic therapies[J]. Oncogene, 2018, 37(5):566–577. DOI:10.1038/onc.2017.374.
- [9] Labade AS, Karmodiya K, Sengupta K. HOXA repression is mediated by nucleoporin Nup93 assisted by its interactors Nup188 and Nup205[J]. Epigenetics Chromatin, 2016, 9:54. DOI:10.1186/s13072-016-0106-0.
- [10] Lebert-Ghali CE, Fournier M, Kettyle L, et al. Hoxa cluster genes determine the proliferative activity of adult mouse hematopoietic stem and progenitor cells[J]. Blood, 2016, 127(1): 87–90. DOI: 10.1182/blood-2015-02-626390.
- [11] Skiriute D, Vaitkiene P, Asmoniene V, et al. Promoter methylation of AREG, HOXA11, hMLH1, NDRG2, NPTX2 and Tes genes in glioblastoma[J]. J Neuro Oncol, 2013, 113(3):441–449. DOI:10.1007/s11060-013-1133-3.
- [12] Xia B, Shan M, Wang J, et al. Homeobox A11 hypermethylation indicates unfavorable prognosis in breast cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(6): 9794–9805. DOI:10.18632/oncotarget.14216.
- [13] Wang L, Cui Y, Sheng J, et al. Epigenetic inactivation of HOXA11, a novel functional tumor suppressor for renal cell carcinoma, is associated with RCC TNM classification[J]. Oncotarget, 2017, 8(13): 21861–21870. DOI:10.18632/oncotarget.15668.
- [14] Li Q, Chen C, Ren X, et al. DNA methylation profiling identifies the HOXA11 gene as an early diagnostic and prognostic molecular marker in human lung adenocarcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(20): 33100–33109. DOI:10.18632/oncotarget.16528.
- [15] Hwang JA, Lee BB, Kim Y, et al. HOXA11 hypermethylation is associated with progression of non-small cell lung cancer [J]. Oncotarget, 2013, 4(12): 2317–2325. DOI:10.18632/oncotarget.1464.
- [16] Cui Y, Gao D, Linghu E, et al. Epigenetic changes and functional study of HOXA11 in human gastric cancer[J]. Epigenomics, 2015, 7(2): 201–213. DOI:10.2217/epi.14.92.
- [17] Bai Y, Fang N, Gu T, et al. HOXA11 gene is hypermethylation and aberrant expression in gastric cancer[J]. Cancer Cell Int, 2014, 14(7):19–21. DOI:10.1186/s12935-014-0079-7.

(收稿日期:2019-01-05)

(本文编辑:沈昱平)

读者·作者·编者

《浙江医学》对作者署名的一般要求

同时具备以下 3 项条件者方可署名为作者:(1)参与选题和设计或资料的分析与解释者;(2)起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容者;(3)能对编辑部的修改意见进行核修,在学术界进行答辩,并最终同意该文发表者;(4)除了负责本人的研究贡献外,同意对研究工作各方面的诚信问题负责。仅参与研究项目资金的获得或收集资料者不能列为作者,仅对科研小组进行一般管理者也不宜列为作者。对文章中的各主要结论,均必须至少有 1 位作者负责。作者中如有外籍作者,应征得同意,并在投稿时向编辑部提供相应证明材料。集体署名的文稿,在题名下列出署名单位,于文末列出整理者姓名,并须明确该文的主要负责人,在论文首页脚注通信作者姓名、单位、邮政编码及 Email 地址。通信作者一般只列 1 位,由投稿者确定。如需注明协作组成员,则于文末参考文献前列出协作组成员的单位及姓名。作者的具体排序应在投稿前即确定,在编排过程中不应再改动,确需改动时必须出示单位证明。

对给予实质性帮助但不符合作者条件的单位或个人可在文后给予志谢,不宜将志谢人放在作者的位置上,以免混淆作者和被志谢者的权利和义务。

本刊编辑部