

hMLH1 基因在结直肠癌中的甲基化水平及其预后意义

朱 卉¹,汪 竹¹,袁 昕¹,焦南林²,张有为¹,童建东¹

(¹扬州大学第二临床医学院,扬州市第一人民医院肿瘤科,江苏 扬州 225009;²皖南医学院附属弋矶山医院病理科,安徽 芜湖 241001)

[摘要] 目的:检测错配修复基因 hMLH1 在结直肠癌(colorectal cancer,CRC)中的甲基化水平并分析其预后意义。方法:调取有完整随访资料的 68 例 CRC 患者术后组织蜡块,所有患者均接受 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-Fu)及其衍生物为基础的辅助化疗 4~6 个周期,显微切割结合甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)检测 hMLH1 基因启动子区域甲基化。结果:68 例 CRC 组织中,16 例(23.5%)检出 hMLH1 基因启动子甲基化,显著高于相应正常组织(3/68,4.4%, $P = 0.001$)。尽管 hMLH1 基因异常甲基化与患者临床病理参数无关,生存分析表明 hMLH1 甲基化与无进展生存(progression-free survival,PFS)和总生存(overall survival,OS)获益有关(P 值分别为 0.039、0.045)。结论:hMLH1 基因甲基化可望成为 5-Fu 辅助化疗 CRC 患者预后判断的新型分子标记。

[关键词] 结直肠癌;5-氟尿嘧啶;hMLH1;甲基化;预后

[中图分类号] R735.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)03-391-04

Methylation level of hMLH1 gene in colorectal cancer and its prognostic significance

ZHU Hui¹,WANG Zhu¹,YUAN Xin¹,JIAO Nan-lin²,ZHANG You-wei¹,TONG Jian-dong¹

(¹Department of Oncology,Yangzhou No.1 People's Hospital,the Second Clinical School of Yangzhou University,Yangzhou 225009;²Department of Pathology,Yijishan Hospital,Wannan Medical College,Wuhu 241001,China)

[Abstract] **Objective:** To detect the promoter methylation status of hMLH1 gene in colorectal cancer(CRC) and evaluate its correlation with clinicopathological features and prognosis. **Methods:** The methylation status of hMLH1 gene was determined using manual microdissection followed by methylation-specific PCR (MSP) in 68 paired CRC specimens and adjacent normal tissues,all of the patients received 4~6 cycles of 5-fluorouracil (5-Fu) based adjuvant chemotherapy. **Results:** Methylation frequency of hMLH1 in cancerous tissue was 23.5% (16/68),which was significantly higher than that in the corresponding normal tissue (3/68,4.4%, $P = 0.001$). Although hMLH1 methylation was not associated with patients' clinicopathological features,Kaplan-Meier analysis showed the methylation state of hMLH1 predicted beneficial progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in CRC ($P = 0.039$ and $P = 0.045$,respectively). **Conclusion:** hMLH1 gene methylation maybe a useful biomarker related to favourable prognosis in CRC patients who received 5-Fu based adjuvant chemotherapy.

[Key words] colorectal cancer;5-Fu;hMLH1;methylation;prognosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 391-394]

结直肠癌(colorectal cancer,CRC)是我国常见的恶性肿瘤,即使在早期得到诊断并以手术切除,大多数患者仍不可避免发生肿瘤复发或远处转移^[1]。因此,CRC 预后判断及在此指导下的辅助治疗尤为重要。目前,除传统的临床病理学参数外,新型分子标记物如 K-ras 基因突变、微卫星不稳定(microsatellite instability,MSI)、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)等已显示出越来越重要

的作用^[2]。

DNA 甲基化是导致抑癌基因沉默的一种表观遗传修饰方式,目前已成为肿瘤早期诊断、预后判断及干预治疗的新靶点^[3]。hMLH1(human MutL homolog 1)是人类错配修复基因(mismatch repair gene,MMR)家族中的成员,对保持遗传信息的完整性和稳定性具有重要作用,启动子甲基化导致的 hMLH1 基因沉默已被证实与 CRC 发生发展及 5-氟

尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)的化疗敏感性改变有关^[4]。本研究拟在 68 例接受 5-Fu 及其衍生物为基础的辅助化疗的 CRC 组织中检测 hMLH1 的甲基化状态,并分析其预后意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

68 例原发性 CRC 组织及相应正常组织(距肿瘤边缘 > 5 cm 处)标本来自扬州市第一人民医院和弋矶山医院病理科 2002~2005 年存档蜡块。所有病例病理学诊断明确,术前均未接受放、化疗,术后接受 5-Fu 及其衍生物为基础的辅助化疗 4~6 个周期。其中男 42 例,女 26 例,年龄 45~83 岁,中位年龄 59 岁。肿瘤分期根据国际抗癌联盟(UICC) 2002 标准,其中 II 期 25 例,III 期 42 例,IV 期 1 例。患者详细临床资料见表 1。所有患者均有完整随访资料,中位随访时间 44 个月。本研究经医院伦理委员会批准并取得所有患者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 显微切割及 DNA 提取

显微镜下观察,结合 HE 染色,细针采取石蜡包埋组织中的肿瘤细胞,具体方法参考文献^[5]。DNA 提取依照 QIAmp Mini Kit 试剂盒(德国 Qiagen 公司)说明书进行。

1.2.2 亚硫酸氢盐修饰

采用 EZ DNA Methylation-GOLD Kit 试剂盒(美国 Zymo 公司)对提取的 DNA 进行修饰。经此步后,DNA 序列中未甲基化的胞嘧啶(C)转变为尿嘧啶(U)。

1.2.3 甲基化特异性 PCR(MSP)

hMLH1 基因(GenBank No.AB017806)引物由上海英骏生物技术有限公司合成,具体序列及反应条件参见表 2。PCR 反应体系 25 μ l,其中 10 \times PCR buffer 2.5 μ l(含 Mg²⁺,终浓度 1.5 mmol/L),dNTP mixture 2.5 μ l(终浓度 250 μ mol/L),上下游引物各 2 μ l(20 pmol),修饰后的 DNA 模板 2 μ l,灭菌去离子水 10.85 μ l,Taq 酶 0.15 μ l(日本 TaKaRa 公司)。

表 1 hMLH1 甲基化与结直肠癌临床病理特征的相关性
Table 1 Association between hMLH1 methylation and clinicopathological features of CRC (n)

临床病理特征	n	hMLH1 甲基化状态		P 值
		甲基化	未甲基化	
性别				
男	42	8	34	0.268
女	26	8	18	
年龄(岁)				
< 55	20	3	17	0.359
\geq 55	48	13	35	
肿瘤位置				
近端结肠	18	7	11	0.105
远端结肠	24	5	19	
直肠	26	4	22	
肿瘤大小				
\leq 5 cm	38	7	31	0.264
> 5 cm	30	9	21	
肿瘤分化				
高分化	15	3	12	0.722
中分化	30	7	23	
低分化	23	6	17	
分期				
II	25	6	19	0.496
III/IV	43	10	33	
淋巴结转移				
N ₀	26	6	20	0.945
N ₁ /N ₂	42	10	32	

取扩增产物 5 μ l 行 2%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统拍照。正常人外周血淋巴细胞 DNA 作为非甲基化阳性对照;过量 CpG(S_{ss} I)甲基化酶(美国 NEB 公司)修饰的淋巴细胞 DNA 作为甲基化阳性对照,ddH₂O 代替 DNA 作为阴性对照。部分 MSP 产物进行直接测序验证(上海英骏生物技术有限公司)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,P < 0.05 为差异有统计学意义。率的比较采取 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,生存分析采取 Kaplan-Meier 方法(log-rank 检验)。

表 2 MSP 引物序列

Table 2 List of MSP primers

引物名称	序列(5'→3')	产物	位置	退火温度(循环数)
hMLH1(M)	F: TTAATAGGAAGAGCGGATAGC R: CTATAAATTACTAAATCTCTTCG	106 bp	1 506~1 611	55 $^{\circ}$ C(40)
hMLH1(U)	F: TTAATAGGAAGAGTG GATAGTG R: TCTATAAATTACTAAATCTCTTCA	107 bp	1 506~1 612	55 $^{\circ}$ C(40)

M:甲基化;U:未甲基化;F:上游;R:下游。

2 结果

2.1 CRC 组织及相应正常组织 hMLH1 基因甲基化

68 例 CRC 组织中,16 例 (23.5%) 检出 hMLH1 基因启动子甲基化,显著高于相应正常组织(3/68, 4.4%, $P = 0.001$)。典型 MSP 结果如图 1 所示,并经测序证实。

2.2 hMLH1 甲基化状态与 CRC 临床病理特征的相关性

CRC 组织中 hMLH1 基因异常甲基化与患者年龄、性别、肿瘤位置、大小、分化、分期、淋巴结转移等参数无关。尽管 hMLH1 基因甲基化在近端结肠中显

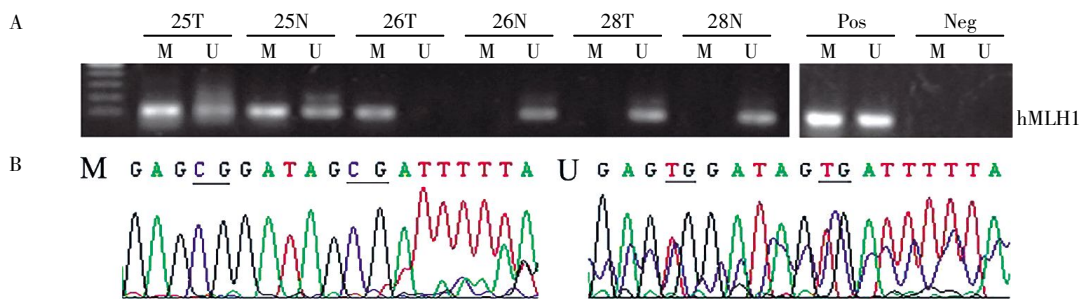
示出一定优势,但无统计学意义($P = 0.105$,表 1)。

2.3 hMLH1 甲基化与 CRC 预后的关系

生存分析结果如图 2 所示,hMLH1 基因高甲基化的患者,无进展生存 (progression-free survival, PFS) 和 5 年总生存 (overall survival, OS) 均优于 hMLH1 基因未甲基化者,中位 PFS 分别为 52 个月与 30 个月($P = 0.039$);中位 OS 分别为 > 60 个月与 36 个月($P = 0.045$)。

3 讨论

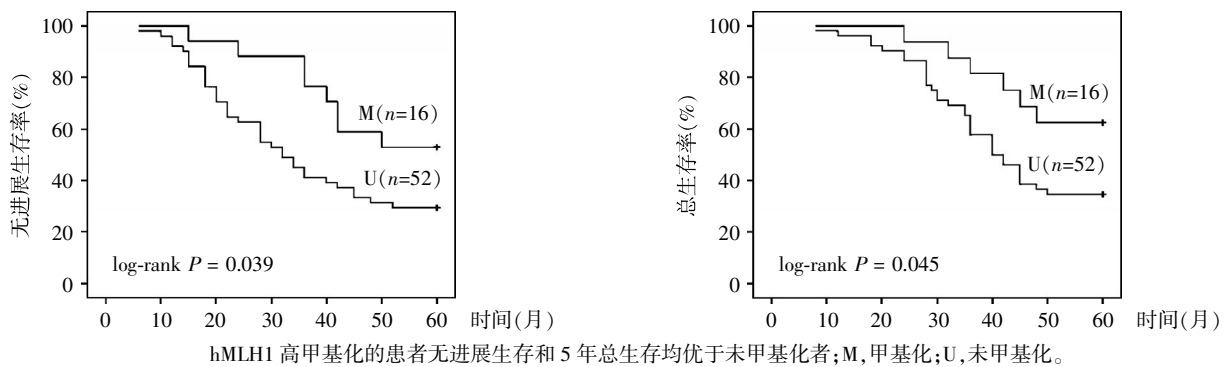
DNA 错配修复(MMR)系统是人体细胞碱基错配的一种修复机制,具有维持 DNA 复制保真度,控



A:典型 MSP 电泳结果;B:MSP 结果测序;M:甲基化;U:未甲基化;T:肿瘤组织;N:正常组织;Pos:阳性对照;Neg:阴性对照。

图 1 CRC 患者 hMLH1 基因甲基化检测

Figure 1 Methylation profiles of hMLH1 in matched CRC and adjacent normal tissues



hMLH1 高甲基化的患者无进展生存和 5 年总生存均优于未甲基化者;M,甲基化;U,未甲基化。

图 2 hMLH1 基因甲基化与 CRC 预后的生存分析

Figure 2 Kaplan-Meier statistical analysis of correlation of hMLH1 methylation with progression-free survival and overall survival among 68 CRC patients

制基因变异的作用。MMR 基因缺陷引起的 MSI 是 CRC 发生的重要机制之一,大部分遗传性非息肉性结直肠癌 (hereditary non-poliposis colorectal cancer, HNPCC) 和 15%~20% 的散发性 CRC 与之有关^[6],而高度 MSI(MSI-H)的 CRC 组织有其独特的生物学行为特征,如发病早,多位于近端结肠,分化差,但较少发生淋巴结转移,预后较好^[7]。

hMLH1 基因位于人类染色体 3p21.3~23,是 MMR 系统的重要成员,启动子甲基化可使 hMLH1

基因沉默,是导致散发性 CRC MMR 缺陷的主要原因^[8]。hMLH1 基因异常甲基化在肺癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胶质瘤等人体其他肿瘤中亦可被检测到,与多种恶性肿瘤发生发展密切相关^[9-10]。本实验采取显微切割结合 MSP 研究 hMLH1 基因甲基化,在显微镜下从组织切片中提取单一类型肿瘤细胞群,大大提高了样本纯度,避免了间质组织 DNA 的干扰,较好地解决了组织异质性的问题。结果发现,23.5%(16/68)的 CRC 组织检出 hMLH1 基因甲

甲基化,显著高于相应正常组织,这个比例在大多数报道的范围之内,但未发现 hMLH1 甲基化与患者临床病理参数的相关性,与 hMLH1 甲基化引起的 MSI 表型并不一致,可能由于样本量较小的缘故。

5-Fu 是 CRC 化疗的一线用药,既往研究表明,hMLH1 的表观遗传学失活与 5-Fu 化疗耐药关系密切。其机制可能为:MMR 缺陷使细胞识别 DNA 损伤的能力减弱,不能产生触发细胞凋亡的信号;MMR 缺陷导致基因组不稳定性增加,产生对药物耐受的突变体^[11]。如 Fujita 等^[12]报道,结肠癌细胞株中 hMLH1 表达下调可抑制 5-Fu 诱导的凋亡;Ricciardiello 等^[13]检测到 hMLH1 甲基化引起的结肠癌 MSI,伴随胸腺嘧啶合成酶(thymidine synthase,TS)高表达,与 5-Fu 耐受有关。这一结论与 hMLH1 甲基化导致的 MSI 型 CRC 本身预后较好存在矛盾之处,临床上关于其给予 5-Fu 化疗是否生存获益也有截然相反的报道,目前仍未明确^[14]。

本研究结果表明,在接受 5-Fu 及其衍生物为基础的辅助化疗的 CRC 组织中,hMLH1 基因高甲基化的患者 PFS 和 5 年 OS 均优于 hMLH1 基因未甲基化者。这与 Ide 等^[15]的研究一致,他们发现,35 例接受 5-Fu 辅助化疗的 CRC 患者中,hMLH1 mRNA 低表达者的 PFS 优于高表达者,多因素分析表明 hMLH1 表达是肿瘤复发的独立预后因子。Jensen 等^[16]也发现,在 340 例接受 5-Fu 术后辅助化疗的 II~IV 期 CRC 中,52 例 MMR 缺陷者的 PFS 和 OS 均有优势。

总之,hMLH1 基因甲基化可望成为 5-Fu 辅助化疗 CRC 患者预后判断较好的新型分子标记,但这个结果与 MSI 型 CRC 本身生物学行为特征有关,还是 5-Fu 化疗敏感性改变所致,尚需进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Tong JD, Jiao NL, Wang YX, et al. Downregulation of fibulin-3 gene by promoter methylation in colorectal cancer predicts adverse prognosis [J]. *Neoplasma*, 2011, 58(5):441-448
- [2] 陈志刚,魏嘉,禹立霞,等. 环氧化酶-2 单核苷酸多态性与结直肠癌生物学行为的相关性研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2009, 29(7):963-966
- [3] Tang D, Wang DR, Li HB. Combination analysis of hypermethylated SFRP1 and SFRP2 gene in fecal as a novel epigenetic biomarker panel for colorectal cancer screening [J]. *JNMU*, 2008, 22(2):96-101
- [4] Iwazumi M, Tseng-Rogenski S, Carethers JM. DNA mismatch repair proficiency executing 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 12(8):756-764

- [5] Sirivatanauksorn Y, Sirivatanauksorn V, Bhattacharya S, et al. Evolution of genetic abnormalities in hepatocellular carcinomas demonstrated by DNA fingerprinting [J]. *J Pathol*, 1999, 189(3):344-350
- [6] Bellizzi AM, Frankel WL. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function; a review [J]. *Adv Anat Pathol*, 2009, 16(6):405-417
- [7] Tejpar S, Saridaki Z, Delorenzi M, et al. Microsatellite instability, prognosis and drug sensitivity of stage II and III colorectal cancer; more complexity to the puzzle [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103(11):841-844
- [8] Brim H, Mokarram P, Naghibalhossaini F, et al. Impact of BRAF, MLH1 on the incidence of microsatellite instability high colorectal cancer in populations based study [J]. *Mol Cancer*, 2008, 7:68
- [9] Ling ZQ, Li P, Ge MH, et al. Aberrant methylation of different DNA repair genes demonstrates distinct prognostic value for esophageal cancer [J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(10):2992-3004
- [10] 宋海珠,易俊,张有为,等. 染色体 3p 区抑癌基因在非小细胞肺癌中的甲基化状况与临床意义 [J]. *中国肺癌杂志*, 2011, 14(3):233-238
- [11] 韩婧,李江. DNA 修复相关基因启动子甲基化和肿瘤化疗耐药的进展 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2011, 31(1):95-98
- [12] Fujita H, Kato J, Horii J, et al. Decreased expression of hMLH1 correlates with reduced 5-fluorouracil-mediated apoptosis in colon cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2007, 18(5):1129-1137
- [13] Ricciardiello L, Ceccarelli C, Angiolini G, et al. High thymidylate synthase expression in colorectal cancer with microsatellite instability: implications for chemotherapeutic strategies [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(11):4234-4240
- [14] Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, et al. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(15):2788-2798
- [15] Ide T, Kitajima Y, Ohtaka K, et al. Expression of the hMLH1 gene is a possible predictor for the clinical response to 5-fluorouracil after a surgical resection in colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(6):1571-1576
- [16] Jensen SA, Vainer B, Kruhoffer M, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer and association with thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9:25

[收稿日期] 2011-08-09