

DNMT3a 和 HDAC2 在胃癌组织中的表达及临床相关性分析

王正江¹, 杨鸿梅¹, 姚志新², 徐岷^{2*}, 张尤历²

(¹盐城市第一人民医院消化科, 江苏 盐城 224001; ²江苏大学附属医院消化科, 江苏 镇江 212001)

[摘要] **目的:**检测 DNA 甲基转移酶 3a(DNA methyltransferase 3a, DNMT3a)和组蛋白去乙酰化酶 2(histone deacetylase 2, HDAC2)在人胃癌组织中的表达,分析其与临床特征的相关性。**方法:**应用 Western blot 方法检测 30 例配对人胃腺癌和癌旁组织中 DNMT3a 和 HDAC2 表达的差异;免疫组织化学方法检测 90 例胃腺癌患者手术切除癌组织中 DNMT3a 和 HDAC2 的表达水平,并分析其表达与临床病理学指标的关系。**结果:**Western blot 检测结果显示癌组织中 DNMT3a 和 HDAC2 蛋白表达量明显高于癌旁组织($P < 0.01$);90 例胃癌标本中,免疫组化结果显示 DNMT3a 阳性表达率为 79%(71/90),HDAC2 蛋白表达阳性率为 86%(77/90),癌组织中 DNMT3a 表达强度与肿瘤分化程度和淋巴结转移相关 ($P < 0.05$),HDAC2 表达强度与肿瘤浸润深度、病理学大体分型、TNM 分期和淋巴结转移相关($P < 0.05$)。DNMT3a 与 HDAC2 在胃癌组织中的表达呈正相关($P < 0.05$)。**结论:**DNMT3a 与 HDAC2 是胃腺癌发生发展中的危险因素之一,一定程度上能反映胃腺癌的恶性程度,对预后的判断有一定价值,是一项有潜在价值的肿瘤相关标志物。

[关键词] 胃癌; DNA 甲基转移酶; 组蛋白去乙酰化酶; 病理

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)09-1232-05

The correlation between DNMT3a and HDAC2 expression and clinical parameters of gastric cancer

WANG Zheng-jiang¹, YANG Hong-mei¹, YAO Zhi-xin², XU Min^{2*}, ZHANG You-li²

(¹Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Yancheng, Yancheng 224001; ²Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjing 212001, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the correlation between DNA methyltransferase 3a (DNMT3a) and histone deacetylase 2 (HDAC2) expression and clinical parameters of gastric cancer. **Methods:**The expressions of DNMT3a and HDAC2 in 30 gastric adenocarcinoma tissues and paracancerous tissues were detected by Western blot. The expressions of DNMT3a and HDAC2 in 90 gastric adenocarcinoma tissues were detected by immunohistochemistry. The relationship between DNMT3a and HDAC2 expressions and clinicopathological features of gastric adenocarcinoma was analyzed. **Results:**The protein levels of DNMT3a and HDAC2 were significantly higher than those in paracancerous tissues ($P < 0.01$). The immunohistochemistry examination showed that the positive rates of DNMT3a and HDAC2 protein were 79% (71/90) and 86% (77/90) respectively in 90 gastric adenocarcinoma tissues, DNMT3a expression was positively correlated with the differentiation and lymph node metastasis ($P < 0.05$),HDAC2 expression was positively correlated with the pathologic classification, invasion degree, TNM stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). There was positive correlation between DNMT3a and DNMT3b ($P < 0.05$). **Conclusion:**DNMT3a and HDAC2 were risk factors in the development of gastric cancer and might reflect malignant degree and prognosis to a certain degree. For these reasons, they are useful markers of the tumor.

[Key words] gastric cancer; DNA methyltransferase; histone deacetylase; pathology

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(9): 1232-1236]

[基金项目] 盐城市医学科技发展计划项目(YK2009121);
镇江市社会发展科技支撑项目(SH2009012)

*通讯作者, E-mail: peterxu1974@yahoo.com.cn

胃肠道肿瘤的发生发展过程中不但有基因改变,表观遗传改变也参与肿瘤的形成。表观遗传学研究的是基因表型的遗传学变化,而不是 DNA 序列本身的改变^[1]。哺乳动物基因组的表观遗传修饰主要

有两大类:DNA 甲基化和组蛋白修饰^[2]。DNA 和组蛋白修饰水平的改变能够调控细胞生长、分化、转化和凋亡基因的转录。目前 DNA 甲基转移酶 3a (DNA methyltransferase 3a, DNMT3a) 和组蛋白去乙酰化酶 2(histone deacetylase 2, HDAC2)在胃腺癌中的表达及其在胃腺癌发生发展中的作用方面的研究少见报道。本研究采用 Western blot 方法和免疫组织化学方法检测胃癌组织 DNMT3a 和 HDAC2 的表达情况,并分析其与患者临床和病理特性的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2011 年 1 月~2011 年 5 月江苏大学附属医院普通外科接受手术治疗的胃腺癌患者 30 例,每例分别取胃癌和癌旁组织(距肿瘤原发灶 > 2 cm)。30 例中男 24 例,女 6 例,年龄 37~84 岁,平均(59.47 ± 10.41)岁,高分化腺癌 6 例,中分化腺癌 20 例,低分化腺癌 4 例。所有术后标本均放入液氮冷冻后置于-70℃冰箱保存;另收集 2007 年 10 月~2010 年 10 月江苏大学附属医院病理科 HE 染色确诊的高、中、低分化胃腺癌手术切除的癌组织标本各 30 例用于免疫组化实验,并收集相应病例的临床资料,其中男 63 例,女 27 例,年龄 23~84 岁,平均(60.12 ± 10.71)岁。所有病例均未接受放疗及化疗患者。TNM 分期依照 UICC/AJCC 胃癌分期(第七版)。

1.2 方法

1.2.1 Western blot

按照蛋白提取试剂盒说明书操作(BestBio 公司,日本),取上清液作为蛋白样品并定量,进行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜,转移后用 BSA 封闭,与鼠抗人 DNMT3a 单克隆抗体(1:500,Abcam 公司,美国)、兔抗人 HDAC2 多克隆抗体(1:2 000,Abcam 公司,美国)和鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(1:2 000,Santa Cruz 公司,美国)4℃过夜,洗膜,与辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗孵育后 ECL 显影,用 Sage Creation 分析软件成像及分析条带灰度,进行半定量比较分析,以目的基因的条带与内参照 β -actin 的灰度比值表示蛋白的表达水平。

1.2.2 免疫组织化学

组织标本蜡块行 3 μ m 切片,常规二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,对组织抗原进行相应的修复。一抗 DNMT3a(1:500)和 HDAC2(1:250)。根据 UltraSensiti

ve™ S-P 超敏试剂盒(Maixin-bio 公司,福州)说明书操作。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。DAB 显色,苏木精复染。DNMT3a 定位于细胞质,HDAC2 定位于细胞核,阳性染色为棕黄色;根据染色强度和阳性细胞百分比进行判断,强度:0(无染色)、1(弱染色)、2(中度染色)、3(强染色);阳性细胞百分比:0(无)、1(<10%)、2(10%~50%)、3(51%~80%)、4(>80%)。染色指数(染色强度和阳性细胞百分比相乘)范围从 0 到 12(0~6 低表达,8~12 高表达)^[3]。由两位高年资病理科医师进行独立阅片以双盲法确定评分。

1.3 统计学处理

数据应用 SPSS13.0 软件进行处理。计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 *t* 检验或单因素方差分析。计数资料用 χ^2 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中 DNMT3a 和 HDAC2 蛋白表达

Western blot 结果显示 DNMT3a 分子量为 120 000,HDAC2 分子量为 60 000, β -actin 分子量为 43 000;DNMT3a 在癌组织中蛋白的表达量(0.60 ± 0.22)明显高于癌旁组织(0.08 ± 0.04);HDAC2 在癌组织中蛋白的表达量(1.05 ± 0.18)明显高于癌旁组织(0.60 ± 0.24),差异均有统计学意义(*P* < 0.05,图 1)。不同分化的癌组织 DNMT3 和 HDAC2 表达量均高于癌旁组织(*P* < 0.01,图 1)。

2.2 免疫组化检测胃癌组织中 DNMT3a 和 HDAC2 表达率

免疫组化检测结果显示 90 例胃癌组织标本中 DNMT3a 阳性表达率为 79%(71/90),HDAC2 阳性表达率为 86%(77/90),癌旁组织中偶见阳性细胞(图 2)。

2.3 DNMT3a 和 HDAC2 表达与临床病理参数的相关性分析

结果发现胃腺癌组织中 DNMT3a 的表达与肿瘤分化程度和淋巴结转移相关(*P* < 0.05),HDAC2 表达与肿瘤浸润深度、病理学大体分型、TNM 分期和淋巴结转移相关(*P* < 0.05,表 1)。

2.4 胃腺癌组织中 DNMT3a 与 HDAC2 表达的相关性分析

经 Spearman 等级相关分析显示 DNMT3a 与 HDAC2 在胃腺癌组织中的表达呈正相关(*r* = 0.518, *P* < 0.05)。

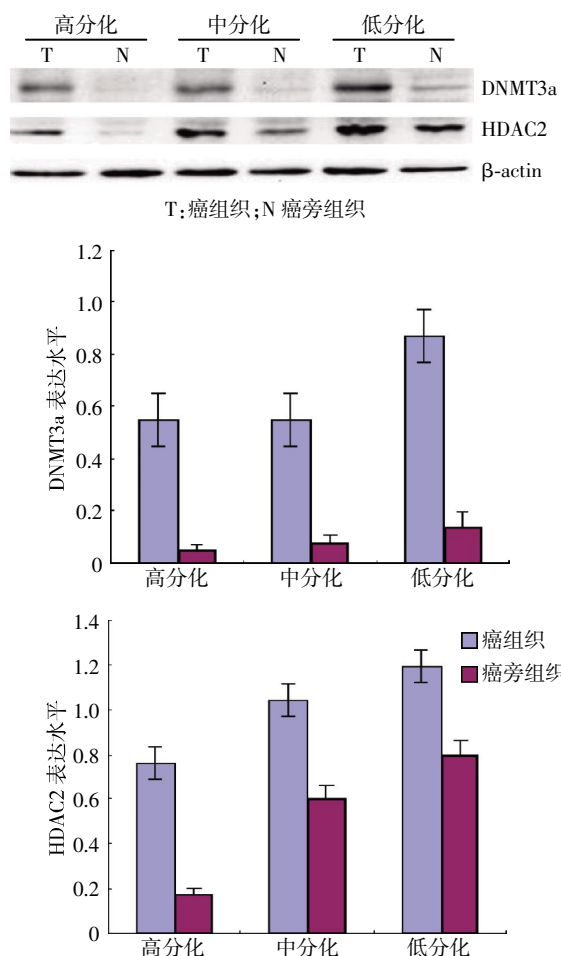


图 1 不同分化的癌和癌旁组织 DNMT3a 和 HDAC2 表达
Figure 1 DNMT3a and HDAC2 expression in differentiated carcinoma and adjacent tissue

3 讨论

DNA 甲基化是主要的基因表观遗传修饰形式和调节基因组功能的重要机制,与人类胚胎的发育分化密切相关。组蛋白修饰相关酶在表观遗传编码机制中具有重要作用。在哺乳动物细胞中,乙酰化和去乙酰化的平衡在基因转录和不同细胞蛋白功能中起到关键的作用。细胞内乙酰化与去乙酰化平衡动态调控靶基因的稳态表达,从而维持细胞的正常生理和生化过程,而在多种肿瘤中均涉及组蛋白去乙酰化酶活性异常,组蛋白过度去乙酰化引起抑癌基因表达抑制或癌基因激活和过度表达,导致肿瘤发生。

目前大量实验表明,在肿瘤发生发展过程中 DNMTs 和 HDACs 起着重要的作用,基因的特异性高甲基化、全 DNA 低甲基化和 DNMTs 过量表达是许多人类恶性肿瘤中的早期事件,肿瘤细胞中 CpG 是异常甲基化的,这些改变与 DNMTs 表达异常有关^[1];HDACs 过度表达在胃肠系统肿瘤中尤为常见,与肿瘤的去分化、提高增殖、侵袭、疾病进展和不良预后有关^[4-5]。DNMT3a 是在细胞内建立新的 DNA 甲基化类型所必须的^[6]。DNMT3a 主要参与从头甲基化,以非甲基化的 DNA 为模板,催化新的甲基化位点形成^[7]。DNMTs 过表达和胃癌的形成有关^[8]。HDAC2 在早期大肠癌的息肉阶段、宫颈不典型增生和浸润癌在异型增生过度区高表达^[9]。HDAC2 的表

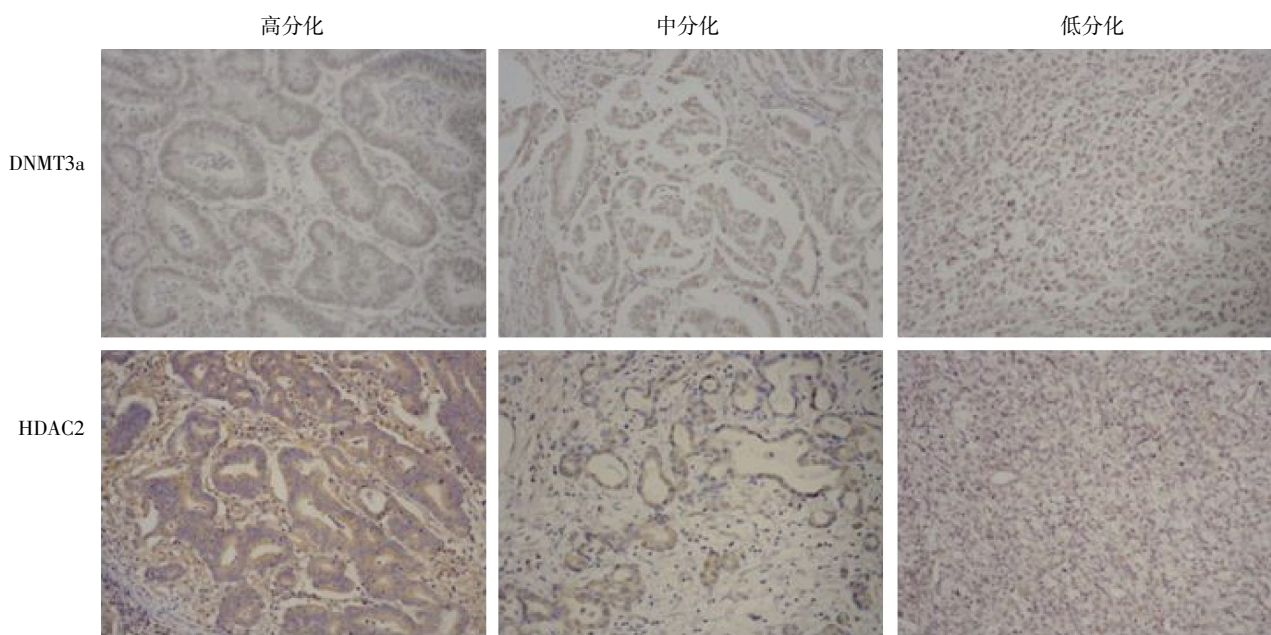


图 2 胃癌组织中 DNMT3a 和 HDAC2 表达(SP 法,×200)
Figure 2 DNMT3a and HDAC2 expression in gastric cancer tissue

表 1 DNMT3a 和 HDAC2 在胃癌中的表达与临床病理参数的关系

Table 1 DNMT3a and HDAC2 expression and the relationship of clinical pathological parameters in gastric cancer (n)

临床参数	n	DNMT3a				HDAC2			
		高表达	低表达	χ^2 值	P 值	高表达	低表达	χ^2 值	P 值
性别				0.029	0.866			1.888	0.169
男	63	50	13			56	7		
女	27	21	6			21	6		
年龄(岁)				0.576	0.750			2.972	0.226
≤49	12	9	3			10	2		
50~59	25	21	4			19	6		
≥60	53	41	12			48	5		
肿瘤位置				0.381	0.826			4.670	0.097
胃底	11	8	3			10	1		
胃体	27	21	6			26	1		
胃窦	52	42	10			41	11		
肿瘤直径				0.045	0.045			0.045	0.832
≤5 cm	61	47	14			51	9		
> 5 cm	29	24	5			26	4		
浸润深度				6.062	0.195			24.629	0.000
T ₁	14	10	4			6	8		
T ₂	18	12	6			17	1		
T ₃	10	9	1			9	1		
T _{4a}	36	28	8			34	2		
T _{4b}	12	12	0			11	1		
病理分型				3.548	0.170			10.787	0.005
结节型	16	10	6			10	6		
溃疡型	51	41	10			44	7		
弥漫型	23	20	3			23	0		
TNM 分期				4.083	0.538			17.856	0.003
I _A	12	8	4			6	6		
I _B	8	5	3			6	2		
II	20	16	4			17	3		
III _A	29	23	6			28	1		
III _B	11	10	1			11	0		
IV	10	9	1			9	1		
分化程度				8.139	0.017			5.574	0.062
高分化	30	19	11			22	8		
中分化	30	24	6			27	3		
低分化	30	28	2			28	2		
淋巴转移				5.969	0.015			13.369	0.000
有	55	48	7			53	2		
无	35	23	12			24	11		

达增加与 p21 表达下降相关, 而将 HDAC2 基因敲除后可增加 p21 基因的表达。在胰腺癌患者的肿瘤组织中 c-Myc 过表达与 HDAC2 上调和细胞周期蛋白 G2(CCNG2)抑制相关^[10], 且 HDAC2 可作为一个独立的肿瘤预后指标^[11], 表明 HDAC2 有可能在维持代谢平衡、调控细胞周期和肿瘤的形成中发挥着一定作用。

本实验结果显示胃腺癌组织 DNMT3a 和 HDAC2 蛋白表达量均显著高于其配对的癌旁组织 ($P < 0.01$), 且分化程度越低相对表达量越高, 表明 DNMT3a 和 HDAC2 蛋白的表达水平可能是反映胃腺癌恶性程度的一个分子生物学指标。免疫组化结果显示 DNMT3a 阳性表达率为 79%, HDAC2 阳性表达率为 86%, 提示 DNMT3a 和 HDAC2 高表达可

能与胃腺癌的发生发展有关;进一步分析 DNMT3a 和 HDAC2 表达与临床病理特征关系,发现 DNMT3a 和 HDAC2 表达均与胃腺癌患者肿瘤分化程度和淋巴结转移相关($P < 0.05$),淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组,且它们在胃腺癌组织中的表达呈正相关,提示 DNMT3a 和 HDAC2 可能加速了胃腺癌的发展进程,是胃腺癌浸润和转移的分子基础,在胃腺癌的侵袭转移过程中可能起着重要协同作用,在一定程度上可以反映肿瘤的恶性程度,可作为判断胃癌发展程度和评价患者预后的指标。

综上所述, DNMT3a 和 HDAC2 是胃腺癌发生发展中的危险因素之一,在胃腺癌的侵袭力及淋巴结转移中起到一定的作用。DNMT3a 和 HDAC2 一定程度上可反映胃腺癌的恶性程度和预后,对评价患者的病情轻重以及预后有一定的意义,是一项有潜在价值的基因治疗靶点及肿瘤相关标志物。

[参考文献]

- [1] Chen C, Yin N, Yin B, et al. DNA methylation in thoracic neoplasms[J]. *Cancer Lett*, 2011, 301(1): 7-16
- [2] Yu N, Wang M. Anticancer drug discovery targeting DNA hypermethylation [J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15(14): 1350-1375
- [3] Mutze K, Langer R, Becker K, et al. Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 expression and chemotherapy in gastric cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(12): 3336-3343
- [4] Weichert W, Röske A, Gekeler V, et al. Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis[J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9(2): 139-148
- [5] Weichert W, Röske A, Gekeler V, et al. Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy [J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(3): 604-610
- [6] Velicescu M, Weisenberger DJ, Gonzales FA, et al. Cell division is required for de novo methylation of CpG islands in bladder cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(8): 2378-2384
- [7] Gray KS, Forrest JC, Speck SH. The de novo methyltransferases DNMT3a and DNMT3b target the murine gamma-herpesvirus immediate-early gene 50 promoter during establishment of latency [J]. *J Virol*, 2010, 84(10): 4946-4959
- [8] Ding WJ, Fang JY, Chen XY, et al. The expression and clinical significance of DNA methyltransferase proteins in human gastric cancer[J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(8): 2083-2089
- [9] Huang BH, Laban M, Leung CH, et al. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1 [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(4): 395-404
- [10] Marshall GM, Gherardi S, Xu N, et al. Transcriptional up-regulation of histone deacetylase 2 promotes Myc-induced oncogenic effects [J]. *Oncogene*, 2010, 29(44): 5957-5968
- [11] Krämer OH. HDAC2: a critical factor in health and disease[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30(12): 647-655

[收稿日期] 2012-04-23