

• 研究报告 •

声门上型喉癌组织中的 BRMS1 蛋白表达及甲基化的研究

李晓瑜¹ 吴允刚¹ 孙余才¹ 黄萌萌¹ 马登殿¹ 徐静² 郭星³ 姜学钧³ 关超³ 李福才⁴

[摘要] 目的:探讨声门上型喉鳞状细胞癌组织中乳腺癌转移抑制基因(BRMS1)的蛋白表达以及 BRMS1 基因启动子区域甲基化情况及其临床意义。方法:采用 Western blotting 法检测 70 例声门上型喉癌组织原发灶、60 例癌旁正常喉黏膜组织和 44 例颈部淋巴结转移灶中 BRMS1 蛋白的表达情况;甲基化特异聚合酶链反应(MSP)法检测上述组织中的 BRMS1 基因启动子区域甲基化情况,探讨 BRMS1 基因启动子甲基化与其基因表达的相关性;分析 BRMS1 蛋白表达及 BRMS1 基因启动子甲基化情况与患者的临床分期、病理分级、颈部淋巴结转移等方面的相关分析。结果:Western blotting 检测发现声门上型喉癌原发灶、癌旁正常喉黏膜组织和颈部淋巴结转移灶均有 BRMS1 蛋白表达,在癌组织及转移淋巴结中 BRMS1 蛋白表达下调($P < 0.05$)。MSP 法检测发现 BRMS1 基因启动子区甲基化,在 BRMS1 蛋白低表达患者的原发灶中检测到 34 例 BRMS1 基因启动子区甲基化,44 例 BRMS1 蛋白低表达的颈部淋巴结转移灶中检测到 32 例 BRMS1 基因启动子区甲基化,60 例癌旁正常喉黏膜组织中均未检测到 BRMS1 基因启动子区甲基化,统计学分析结果表明在声门上型喉癌中 BRMS1 基因启动子甲基化与其基因表达下调密切相关($r_s = 0.66, P < 0.05$)。结论:声门上型喉癌组织中 BRMS1 蛋白表达下调。BRMS1 蛋白表达下调与声门上型喉癌的 P-TNM 分期、病理分化程度和颈部淋巴结转移密切相关。BRMS1 基因启动子甲基化与声门上型喉癌组织中 BRMS1 基因表达下调相关,也可能是声门上型喉癌组织中 BRMS1 基因表达下调的原因之一。

[关键词] 乳腺癌转移抑制基因;甲基化;喉肿瘤;淋巴转移

[中图分类号] R739.65 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1781(2012)15-0701-03

The study of expression of BRMS1 gene protein and the expression of BRMS1 gene promotor area methylation in supraglottic laryngeal carcinoma and its clinical significance

LI Xiaoyu¹ WU Yungang¹ SUN Yucai¹ HUANG Mengmeng¹ MA Dengdian¹
XU Jing² GUO Xing³ JIANG Xuejun³ GUAN Chao³ LI Fucui⁴

(¹Department of Otorhinolaryngology, the Affiliated Hospital of Ji'ning Medical College, Ji'ning, 272029, China; ²Department of Scientific Research, the Affiliated Hospital of Ji'ning Medical College; ³Department of Otorhinolaryngology, the First Clinical Hospital, China Medical University; ⁴Department of Medical Genetics, China Medical University)

Corresponding author: XU Jing, E-mail: lixiaoyu_11@yahoo.com.cn

Abstract Objective: To investigate the expression of breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) gene protein and the expression of BRMS1 gene promotor area methylation in supraglottic cancer and to evaluate its clinical significance. **Method:** The expression of BRMS1 protein and BRMS1 gene promotor area methylation were examined by using Western blotting method and methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) method in 70 cases of supraglottic cancer tissues and 60 cases of their surrounding laryngeal normal mucosa tissues (LNT) and 44 cases of cervical lymph node metastasis of supraglottic cancer. **Result:** Western blot results indicate that BRMS1 protein expression is declined expression level in supraglottic cancer tissue than the expression of BRMS1 protein in LNT of supraglottic cancer. Compared with paracarcinoma normal laryngeal mucous tissue, BRMS1 gene protein in supraglottic cancer tissue primary lesion decreased obviously, and it is decreased more obviously in cervical lymph node metastasis lesion, the discrepancy is notable ($P < 0.05$). MSP results indicate BRMS1 gene promotor methylation is coordinated with its down-expression in supraglottic cancer tissue. BRMS1 promotor area methylation analysis reveal that there were 34 patients with methylation in 70 patients' supraglottic cancer tumor primary

* 基金项目:山东省自然科学基金资助项目(No:ZR2010HL045);山东省济宁市科技局[No:济科学(2010)85号]

¹ 济宁医学院附属医院耳鼻咽喉科(山东济宁, 272029)

² 济宁医学院附属医院科研处

³ 中国医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科

⁴ 中国医科大学基础学院遗传学教研室

通信作者:徐静, E-mail: lixiaoyu_11@yahoo.com.cn

lesion, hold 48.6%(34/70); 32 patients have methylation in 44 patients' cervical metastasis lymph node tissue, hold 72.7%(32/44); however, there is no methylation in 60 paracarcinoma tissue($r_s = 0.66, P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of BRMS1 protein in supraglottic cancer is significantly decreased. It had correlation with clinical stage and pathologic differentiation and cervical lymph node metastasis of supraglottic cancer. BRMS1 gene promotor methylation is related with down-expression of BRMS1 gene protein of supraglottic cancer. Maybe BRMS1 gene promotor methylation is one of the reasons of its down-expression.

Key words breast cancer metastasis suppressor 1; DNA methylation; laryngeal neoplasms; lymphatic metastasis

喉癌是常见的头颈部恶性肿瘤,98%以上为喉鳞状细胞癌,其中声门上型喉鳞状细胞癌(supraglottic laryngeal squamous cell carcinoma, SGLSCC)常出现颈部淋巴结转移^[1-2]。颈部淋巴结的转移和局部复发是影响喉癌患者治疗和预后的重要因素^[2]。乳腺癌转移抑制基因 BRMS1(breast cancer metastasis suppressor 1, BRMS1)作为肿瘤转移抑制基因的一员,它的表达下调或缺失可促进多种恶性肿瘤的转移^[3-5]。我们前期通过 RT-PCR 研究发现, BRMS1 基因 mRNA 在 SGLSCC 组织中表达下调,而且 BRMS1 基因 mRNA 表达下调水平与 SGLSCC 颈部淋巴结的转移密切相关^[6]。本研究继续探讨 SGLSCC 组织中 BRMS1 基因启动子 CpG 岛甲基化情况和 BRMS1 蛋白的表达情况,以及 BRMS1 基因启动子甲基化与其蛋白表达的相关性,从而为喉癌的颈部淋巴结转移潜能及预后判定提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

随机选取 2009-07-2010-03 济宁医学院附属医院(10 例)和 2003-09-2007-09 中国医科大学附属一院耳鼻咽喉科(60 例)行手术治疗的原发性 SGLSCC 原发灶患者共 70 例,所有入选患者均已签署知情同意书。取其相邻的癌旁正常喉黏膜组织标本 60 例(为术中所取安全缘,距癌组织边缘 0.5~1.0 cm 以外的癌旁喉黏膜组织,经病理检查证实为正常喉黏膜组织),同时留取术后标本的颈部淋巴结,其中术后病理证实存在转移的颈部淋巴结 44 例。术后病理 P-TNM 分期按 2002 年 UICC 标准: II 期 14 例(T₂N₀M₀ 14 例), III 期 26 例(T₂N₁M₀ 5 例、T₃N₀M₀ 9 例、T₃N₁M₀ 12 例), IV 期 30 例(T₂N_{2a}M₀ 2 例、T₂N_{2b}M₀ 4 例、T₃N_{2a}M₀ 5 例、T₃N_{2b}M₀ 10 例、T₃N_{2c}M₀ 3 例、T₄N₀M₀ 3 例、T₄N₁M₀ 1 例、T₄N_{2b}M₀ 1 例、T₄N_{2c}M₀ 1 例)。其中 G1 高分化鳞状细胞癌 43 例, G2 中分化鳞状细胞癌 18 例, G3 低分化鳞状细胞癌 9 例。男 61 例,女 9 例;年龄 37~84 岁,平均 57.6 岁。所有患者均为初治,术前未做过放疗和化疗,无远处转移,术后病理示其切缘阴性。

1.2 方法

采用 Western Blotting 法检测 BRMS1 蛋白。

采用 MSP 法检测 BRMS1 基因启动子区甲基化。主要试剂:兔抗人 BRMS1 单克隆抗体及鼠抗人 β -actin 单克隆抗体,均购自美国 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. 公司;碱性磷酸酶标记的山羊抗兔、马抗小鼠二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

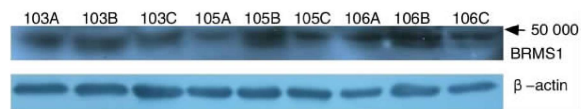
1.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间参数采用单因素方差分析,如有差异,多组间参数的两两比较采用 q 检验;计数资料采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Spearman 秩相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BRMS1 蛋白 Western 印迹结果

在 SGLSCC 原发灶、癌旁正常喉黏膜组织和颈部淋巴结转移灶均有 BRMS1 蛋白表达, BRMS1 蛋白表达值分别为 $72.46 \pm 6.58, 118.83 \pm 25.86$ 和 43.67 ± 4.24 , 3 组间差异具有统计学意义, 3 组间参数的两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与癌旁正常喉黏膜组织比较, BRMS1 基因蛋白在 SGLSCC 组织原发灶中表达明显下调,而且在颈部淋巴结转移灶组织中表达下调更为明显,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),见图 1。



A: SGLSCC 组织原发灶; B: 癌旁正常喉黏膜组织; C: 颈部淋巴结转移灶

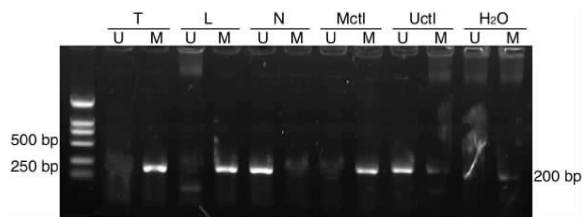
图 1 BRMS1 蛋白 Western 印迹

2.2 SGLSCC 组织中 BRMS1 基因启动子甲基化结果

2.2.1 BRMS1 启动子区甲基化结果 甲基化特异性 PCR 检测发现,在 70 例 SGLSCC 肿瘤原发灶中检测到 34 例(48.6%)BRMS1 基因启动子区甲基化;44 例颈部淋巴结转移灶中检测到 32 例(72.7%)甲基化;而 60 例癌旁正常喉黏膜组织中未发现甲基化,见图 2。

2.2.2 SGLSCC 组织中 BRMS1 启动子区甲基化与 BRMS1 蛋白表达下调的相关性分析 70 例

SGLSCC 原发灶中检测到 34 例 BRMS1 基因启动子区甲基化,34 例均为 BRMS1 蛋白低表达,44 例颈部淋巴结转移灶中检测到 32 例 BRMS1 基因启动子区甲基化,而 44 例颈部淋巴结转移灶均为 BRMS1 蛋白低表达,60 例癌旁正常喉黏膜组织中均未检测到 BRMS1 基因启动子区甲基化,而 60 例癌旁正常喉黏膜组织均为 BRMS1 蛋白高表达。经统计学分析(Spearman 秩相关分析),其差别具有高度显著性($P < 0.05$, $r_s = 0.66$),表明 BRMS1 基因启动子甲基化与 BRMS1 基因表达下调具有关联性, BRMS1 基因启动子甲基化可能是其表达下调的原因之一。



T: 喉鳞状细胞癌组织原发灶; L: 颈部淋巴结转移灶; N: 癌旁正常喉黏膜组织; Mct1: 甲基化阳性对照; Uct1: 去甲基化阳性对照; H₂O: 阴性参照; U: 非甲基化; M: 甲基化

图 2 甲基化特异性 PCR 检测

3 讨论

与肿瘤转移相关的基因分为肿瘤转移基因和肿瘤转移抑制基因。其中, BRMS1 是 Seraj 等^[3]首先在乳腺癌细胞中发现的肿瘤转移抑制基因, 目前已经在人乳腺癌^[3]、黑素瘤^[4]、下咽癌^[5]等多种恶性肿瘤中发现 BRMS1 抑制肿瘤浸润转移, 推测具有高度转移潜能的恶性肿瘤细胞一般表现为 BRMS1 基因表达下调或缺失。

本研究前期工作发现 BRMS1 mRNA 在 SGLSCC 原发灶中表达明显下调, 而在颈部淋巴结转移灶中下调更为明显 ($P < 0.05$)^[6]。BRMS1 mRNA 表达下调或缺失与 SGLSCC 的 P-TNM 分期、病理分级和颈部淋巴结转移密切相关, 研究 BRMS1 基因与 SGLSCC 的关系可能为揭示喉癌发生颈部淋巴结转移的机制提供重要线索。故我们此次采用 Western 印迹方法对 SGLSCC 组织原发灶, 其相邻的癌旁正常喉黏膜组织, 颈部淋巴结转移灶中的 BRMS1 蛋白表达进行了研究。结果表明: BRMS1 蛋白在喉正常黏膜组织中表达, 在 SGLSCC 组织原发灶中表达下调, 在颈部淋巴结转移灶中表达下调更加明显, BRMS1 蛋白表达下调与 SGLSCC 的 P-TNM 分期、病理分级和颈部淋巴结转移密切相关, 而与患者的性别和年龄等无相关性, 这与该基因 mRNA 在 SGLSCC 组织中的表达

一致。故认为 BRMS1 作为肿瘤转移抑制基因可能参与了抑制 SGLSCC 转移的过程, BRMS1 mRNA 和蛋白的表达下调或缺失可能促进了 SGLSCC 细胞脱离原发灶, 从而发生颈部淋巴结的转移。

最近研究发现肿瘤转移抑制基因失活与其启动子区域 CpG 岛甲基化状态直接关联^[7], CpG 岛的甲基化是肿瘤中存在的普遍现象, CpG 岛甲基化在肿瘤发生、发展和转移过程中发挥着关键作用。Meteg 等(2008)研究发现 BRMS1 启动子区甲基化是乳腺癌中 BRMS1 表达下调或缺失的主要原因。本研究结果表明: 在 SGLSCC 组织中 BRMS1 基因启动子甲基化与其蛋白表达下调具有相关性, 提示 BRMS1 基因启动子区甲基化可能是引起 SGLSCC 组织 BRMS1 基因表达下调的主要原因之一。然而, 本研究在 SGLSCC 原发灶和颈部淋巴结转移灶中不仅检测到 BRMS1 启动子区甲基化, 同时还有 BRMS1 启动子非甲基化, 说明 BRMS1 启动子甲基化只是 BRMS1 基因表达下调的主要原因之一, 可能还有基因突变或基因缺失等其他原因造成了 BRMS1 基因表达的下调或缺失, 这还有待进一步进行基因测序等其他方面的研究。

参考文献

- [1] TOMIK J, SKADZIEN J, MODRZEJEWSKI M, et al. Evaluation of cervical lymph node metastasis of 1400 patients with cancer of the larynx[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2001, 28: 233-240.
- [2] 张克, 费声重, 陈哲, 等. 辽宁省工业城市大气污染与喉癌发病率的关系[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1990, 25(4): 240-242.
- [3] SERAJ M J, SAMANT R S, VERDERAME M F, et al. Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13[J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 2764-2769.
- [4] SHEVDE L A, SAMANT R S, GOLDBERG S F, et al. Suppression of human melanoma metastasis by the metastasis suppressor gene, BRMS1[J]. *Exp Cell Res*, 2002, 273: 229-239.
- [5] CROMER A, CARLES A, MILLON R, et al. Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray analysis [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 2484-2498.
- [6] 李晓瑜, 郭星, 李福才, 等. BRMS1 mRNA 在声门上型喉癌中的表达及临床意义[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2008, 22(6): 241-244.
- [7] VOGELAUER M, WU J, SUKA N, et al. Global histone acetylation and deacetylation in yeast[J]. *Nature*, 2000, 408: 495-498.

(收稿日期: 2010-03-24)