

Research of PCDH10 DNA Methylation in Gastric Cancer

Yafei Ju¹, Xiangjun Jiang^{2*}

¹Spleen-Stomach Disease Department, Yanzhou Traditional Medicine Hospital, Jining Shandong

²Gastroenterology Department, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao Shandong

Email: juyafeiamy@163.com, drjxj@163.com

Received: Feb. 25th, 2016; accepted: Mar. 13th, 2016; published: Mar. 17th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To analyze and compare methylation status of PCDH10 gene in gastric cancer and normal tissues. **Methods:** Methylation-Specific PCR (MSP) and RT-PCR (real-time RT-PCR) were applied to detect DNA methylation features of the PCDH10 gene in 100 samples. **Results:** The PCDH10 gene methylation in the gastric cancer tissues was significantly higher than that in normal tissues. **Conclusion:** PCDH10 DNA methylation is correlated with gastric cancer.

Keywords

PCDH10, MSP, RT-PCR, Gastric Cancer

PCDH10基因DNA甲基化在胃癌中的研究

鞠亚菲¹, 姜相君^{2*}

¹山东省济宁市兖州区中医医院脾胃病科, 山东 济宁

²青岛市市立医院消化内科, 山东 青岛

Email: juyafeiamy@163.com, drjxj@163.com

收稿日期: 2016年2月25日; 录用日期: 2016年3月13日; 发布日期: 2016年3月17日

*通讯作者。

摘要

目的: 探讨PCDH10(原钙粘蛋白10)基因DNA发生甲基化后, 其表达与胃癌发生的关系。**方法:** 采用甲基化特异性PCR (methy-lation specific PCR)法和实时荧光定量逆转录-多聚合酶链反应(real-time RT-PCR)方法检测100例胃癌组织及正常组织中PCDH10基因启动子区的甲基化情况。**结果:** 胃癌组织中PCDH10基因的甲基化阳性率较正常组织明显升高, 差异具有统计学意义。**结论:** PCDH10的基因DNA甲基化可能与胃癌发生有关。

关键词

原钙粘蛋白10, 甲基化特异性聚合酶链反应, 实时荧光定量逆转录-多聚合酶链反应, 胃癌

1. 引言

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤, 发病机制复杂, 其发生发展与特定基因 DNA 甲基化状态改变密切相关。DNA 甲基化是化是目前表观遗传学中的研究热点, 特定基因 DNA 的甲基化与胃癌的发生发展, 诊断治疗及预后密切相关。近年来, 越来越多的研究结果显示原钙粘蛋白 10 (PCDH10)的表达缺失与胃癌, 结直肠癌及肝癌密切相关。本文拟通过对比胃癌组织与正常组织中 PCDH10 启动子区的甲基化情况, 初步探讨 PCDH10 的表达缺失与胃癌的发病关系。

2. 资料与方法

2.1. 对象及分组

收集青岛大学医学院附属青岛市市立医院普外科 2014 年 1 月~2015 年 1 月手术切除的胃癌肿瘤标本 100 例, 标本均经病理科复核并确诊为原发性胃癌, 其中男 50 例, 女 50 例, 平均年龄 53.76 ± 11.89 岁。

2.2. 标本搜集及储存

胃癌组织取自癌灶中央非坏死区域, 正常组织取自与之配对的距癌组织 5 cm 以上区域, 取后立即置于 RNA 保存液中, -80°C 冰箱保存, 用于提取 DNA 和 RNA, 入选患者术中均行淋巴结清扫, 术前未行放化疗, 拥有完整的临床资料。

2.3. 检测指标及方法

组织 DNA 提取严格按照离心柱试剂盒(北京天根)操作说明书进行, 保证提取的 DNA 无蛋白质及 RNA 污染。对 DNA 修饰后进行甲基化特异性 PCR (methy-lation specific PCR), 提取 RNA 采用日本 TakaRa 公司的 RNA 提取试剂盒, 提取后的 RNA 逆转录为 cDNA 保存于 -20°C 冰箱中, 以进行 RT-PCR 反应。反应引物为 PCDH10-F (bp120-GGCAAGTAACGGTGGAGATG.PCDH10-R(bp228C)-TCTCCGGATGGA TGTTCTTC (Invitrogen 英潍捷基上海贸易有限公司)。

2.4. 统计学处理

应用 SPSS17.0 软件包进行统计学处理, 计数资料比较采用 χ^2 检验, P 为双侧性检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3. 结果

胃癌组织与正常组织中 PCDH10 启动子区的甲基化情况: 胃癌组织中启动子区甲基化率为 46.00% (46/100), 明显高于正常组织 12% (12/100), 差异有统计学意义($\chi^2 = 21.04, P < 0.05$)。PCDH10 扩增曲线熔解曲线见图 1, 熔解曲线见图 2。在胃癌组织中, PCDH10 基因启动子区域的 DNA 甲基化导致了其基因表达缺失, PCDH10 基因的甲基化状态与胃癌的发生有密切关系。

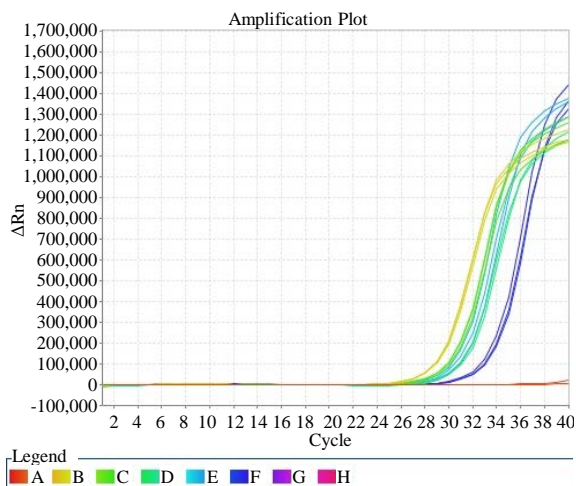


Figure 1. PCDH10 amplification curve

图 1. PCDH10 扩增曲线

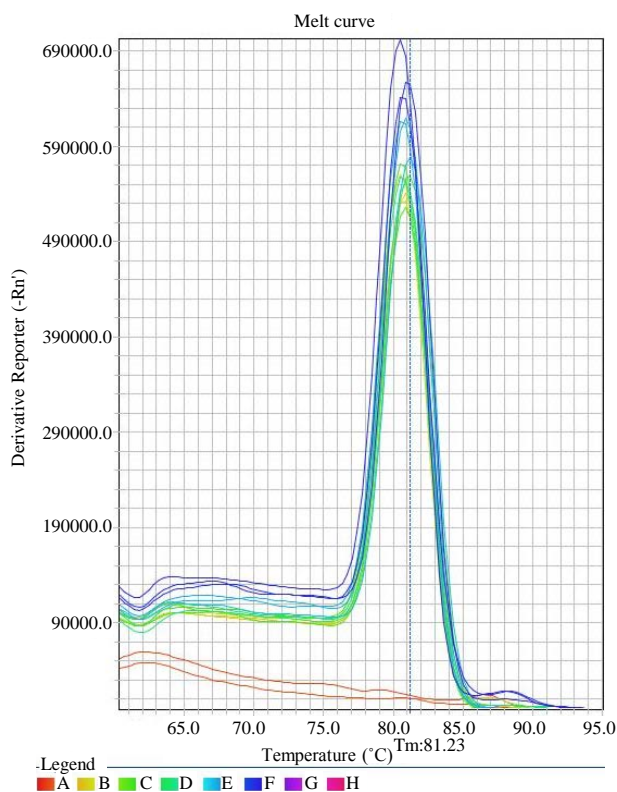


Figure 2. PCDH10 dissociation curve

图 2. PCDH10 熔解曲线

4. 讨论

DNA 甲基化是对 DNA 的一种化学修饰, 主要发生于胞嘧啶[1] [2], 通过甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)来实现[3] [4]。首先, DNMT 与 DNA 结合, 将目标核苷酸反转暴露于 DNA 双螺旋外, 之后半胱氨酸的亲基团与胞嘧啶第六位碳 C6 共价结合, 从 S-腺苷甲硫氨酸 SAM 处转甲基至胞嘧啶 C5 [5]上, 从而形成甲基化状态。目前已有许多研究报道这两种之间的关系。Lou J [6]和 Fang JY [7]等发现在胃癌组织中 c-myc 和 c-Ha-ras 基因甲基化水平降低, c-Ha-ras 基因低甲基化是胃腺细胞早期癌变的一个重要遗传学事件。以往研究也证实了参与调节细胞周期的 p14, p15, p16, CHF, RIZ1 基因, 介导细胞信号转导的 APC, PTEN, RASSF1, RUNX3, PDK1 基因; 参与 DNA 修复的 hMLH1, MGMT, pS2 基因及抑制肿瘤扩散生长和转移的 E-cadherin, TIMP-3 基因存在高甲基化。

PCDH10 (原钙粘蛋白 10)是钙粘蛋白超家族成员, 其 4q28.3 染色体区域在肝癌, 结直肠癌, 前列腺癌, 胰腺癌和乳腺癌中存在缺失。目前研究的热点集中于中枢神经系统方面, 在消化道肿瘤方面的研究较少。Zhong X 等[8]研究发现在 8 个结直肠癌细胞系中 PCDH10 基因启动子区 DNA 均表达沉默。Fang S 等[9]研究了 PCDH10 基因 DNA 发生甲基化后, 在肝癌中的表达下降, 并发现该基因可作为肝癌的筛查基因之一。Li Z 等[10]发现在人胃癌组织中, PCDH10 表达量明显下降, 且灵敏度较高, 可作为筛查早期胃癌的靶点之一。Yu B 等人[11]运用高分辨率熔解曲线技术对 100 例胃癌, 100 例结直肠癌及 70 例胰腺癌组织中的 PCDH10 基因 DNA 甲基化水平进行检测, 发现其甲基化水平与肿瘤的发生密切相关。Yu J 等人[12]研究发现 PCDH10 作为一个肿瘤抑制基因, 与胃癌的不良预后有着极为密切的关系。

本实验表明, 在胃癌组织中, PCDH10 基因启动子区域的 DNA 甲基化导致了其基因表达缺失, PCDH10 基因的甲基化状态与胃癌的发生有密切关系, 更深层次的研究需在大样本的条件下进一步深入。

基金项目

青岛市科技局基金资助项目, No. 2012-1-3-1-(10)。

参考文献 (References)

- [1] Klose, R.J. and Bird, A.P. (2006) Genomic DNA Methylation: The Mark and Its Mediators. *Trends in Biochemical Sciences*, **31**, 89-97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2005.12.008>
- [2] Gupta, R., Nagarajan, A. and Wajapeyee, N. (2010) Advances in Genome-Wide DNA Methylation Analysis. *BioTechniques*, **49**, iii-xi. <http://dx.doi.org/10.2144/000113493>
- [3] Goll, M.G. and Bestor, T.H. (2005) Eukaryotic Cytosine Methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, **74**, 481-514. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721>
- [4] Lee, T.F., Zhai, J. and Meyers, B.C. (2010) Conservation and Divergence in Eukaryotic DNA Methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **107**, 9027-9028. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1005440107>
- [5] Cheng, X. and Blumenthal, R.M. (2008) Mammalian DNA Methyltransferases: A Structural Perspective. *Structure*, **16**, 341-350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2008.01.004>
- [6] Luo, J., Li, Y.N., Wang, F., et al. (2010) S-Adenosylmethionine Inhibits the Growth of Cancer Cells by Reversing the Hypomethylation Status of c-myc and H-ras in Human Gastric Cancer and Colon Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, **6**, 784-795. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.6.784>
- [7] Fang, J.Y., Cheng, Z.H., Chen, Y.X., et al. (2001) Expression of Dnmt1, Demethylase, MeCP2 and Methylation of Tumor-Related Genes in Human Gastric Cancer. *World Journal of Gastroenterology*, **10**, 3394-3398. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v10.i23.3394>
- [8] Zhong, X., Zhu, Y., Mao, J., et al. (2013) Frequent Epigenetic Silencing of PCDH10 by Methylation in Human Colorectal Cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **139**, 485-90. <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-012-1353-5>
- [9] Fang, S., Huang, S.F., Cao, J., et al. (2013) Silencing of PCDH10 in Hepatocellular Carcinoma via de Novo DNA Methylation Independent of HBV Infection or HBX Expression. *Clinical and Experimental Medicine*, **13**, 127-134. <http://dx.doi.org/10.1007/s10238-012-0182-9>

-
- [10] Li, Z., Chim, J.C., Yang, M., *et al.* (2012) Role of PCDH10 and Its Hypermethylation in Human Gastric Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1823**, 298-305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.11.011>
- [11] Yu, B., Yang, H. and Zhang, C. (2010) High-Resolution Melting Analysis of PCDH10 Methylation Levels in Gastric, Colorectal and Pancreatic Cancers. *Neoplasma*, **57**, 247-252. http://dx.doi.org/10.4149/neo_2010_03_247
- [12] Yu, J., Cheng, Y.Y. and Tao, Q. (2009) Methylation of Protocadherin 10, a Novel Tumor Suppressor, Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer. *Gastroenterology*, **136**, 640-651.e1. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.050>