

# DNA 甲基转移酶与甲基化 CpG 结合结构蛋白 2 在胃肠道间质瘤的表达

何 苗<sup>1</sup>, 范 晶<sup>2</sup>, 林 劼<sup>3</sup>, 王子卫<sup>4</sup>, 赵和照<sup>1△</sup> (1. 重庆市肿瘤研究所胃肠外科, 重庆 400030; 2. 重庆医科大学附属第一医院急诊科, 重庆 400016; 3. 重庆医药(集团)股份有限公司 400011; 4. 重庆医科大学附属第一医院普通外科, 重庆 400016)

**【摘要】 目的** 研究 DNA 甲基转移酶(DNMT)和甲基化 CpG 结合结构蛋白 2(MBD2)在胃肠道间质瘤(GIST)的蛋白表达。**方法** 采用免疫组织化学法与免疫印迹法对 28 例成人 GIST 标本及配对对照标本进行 DNMTs 与 MBD2 的蛋白表达研究。**结果** DNMT1、DNMT2、DNMT3a、DNMT3L、MBD2 蛋白在 GIST 中表达显著高于配对对照组织, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 但 DNMT3a 在 GIST 的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** GIST 表达 DNMTs(除外 DNMT3a)和 MBD2 更显著。

**【关键词】** DNA 甲基转移酶; 甲基化 CpG 结合结构蛋白 2; 胃肠道间质瘤

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.04.013 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)04-0469-03

**Expression of DNA methyltransferase and methyl-CpG-binding domain protein 2 in gastrointestinal stromal tumor** HE Miao<sup>1</sup>, FAN Jing<sup>2</sup>, WANG Zi-wei<sup>3</sup>, ZHAO He-zhao<sup>1△</sup> (1. Department of Gastrointestinal Surgery, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China; 2. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the protein expressions of DNA methyltransferase (DNMT, including DNMT1, DNMT2, DNMT3aa, DNMT3b and DNMT3L) and methyl-CpG-binding domain protein 2 (MBD2) in gastrointestinal stromal tumor(GIST). **Methods** Immunohistochemistry and Western blotting were used to detect DNMT and MBD2 expressions in 28 pairs of adult GIST and matched non-tumor tissue. **Results** The protein expressions of DNMT1, DNMT2, DNMT3b, DNMT3L and MBD2 were significantly stronger in adult GISTs than in matched non-tumor tissues( $P < 0.05$ ); the protein expression of DNMT3a, however, did not differ significantly between tumors and non-tumor tissues( $P > 0.05$ ). **Conclusion** GISTs show protein expressions of DNMT(except DNMT3a) and MBD2 strongly.

**【Key words】** DNMT; MBD2; GIST

表观遗传学研究无基因序列变化的可遗传的基因修饰作用, 主要包括 DNA 甲基化、非编码 RNA、组蛋白修饰、染色质重塑等。其中 DNA 甲基化是人类肿瘤表观遗传研究的重点。肿瘤细胞基因组呈现异常 DNA 甲基化状态, 表现为抑癌基因启动子 CpG 岛高甲基化和全基因组序列的广泛低甲基化<sup>[1]</sup>。这些异常变化可能是抑癌基因失活和癌基因激活的重要原因, 并导致肿瘤发生、发展<sup>[2]</sup>。目前认为, DNA 甲基转移酶(DNMTs)和甲基化 CpG 结合结构蛋白 2 (MBD2)的异常表达可能是肿瘤基因组甲基化异常的原因之一<sup>[3]</sup>。DNMTs 与 MBD2 的异常高表达可通过促进抑癌基因启动子高甲基化并失活, 进而促进肿瘤发展<sup>[4]</sup>。现分析胃肠道间质瘤(GIST)中 DNMT(包括 DNMT1、DNMT2、DNMT3a、DNMT3b、DNMT3L)与 MBD2 的表达。报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 28 对成人 GIST 及配对对照组织(距间质瘤边缘大于 2 cm)来自重庆市肿瘤研究所组织标本库(均源于手术切除标本)。病理学诊断 GIST 明确(包括 KIT: +, CD34: +, DOG-1: +, SMA: +, S-100: -)。组织标本用于免疫组织化学法及免疫印迹实验。

**1.2 仪器与试剂** 所有第 1 抗体(包括 DNMTs 及 MBD2)购

自 Santa Cruz; 免疫组织化学相关试剂购自中杉金桥公司。免疫印迹实验材料购于碧云天公司。电泳仪、转印槽、成像系统等免疫印迹仪器购自 Bio-Rad。

## 1.3 方法

**1.3.1 免疫组织化学法** 采用中杉金桥公司提供的试剂盒说明书进行免疫组织化学操作。1 抗稀释比为 1:50, 1 抗孵育采用 4℃ 过夜, 显色时间 5 min。

**1.3.2 免疫组织化学法结果判断** 细胞染色程度 a: 0(无染色), 1(浅黄色), 2(黄褐色), 3(褐红色)。细胞染色比例 b: 1( $b < 25\%$ ), 2( $25\% \leq b < 50\%$ ), 3( $50\% \leq b < 75\%$ ), 4( $b \geq 75\%$ )。根据  $a \times b$  值判断结果 c,  $c = 0, 1, 2$  为阴性表达,  $c = 3, 4, 6, 8, 9, 12$  为阳性表达。此外, 若 c 值在肿瘤组织大于配对对照组织, 则标记这对组织为“+”; 反之为“-”; 若 c 值相等, 则记为“0”。

**1.3.3 免疫印迹实验** 免疫印迹实验步骤参照文献[5]描述进行, 实验重复 3 次, 利用 Quantity One 分析结果。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计数资料使用  $\chi^2$  检验、Fisher 精确检验、Wilcoxon 符号秩检验分析, 计量资料应用  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计意义。

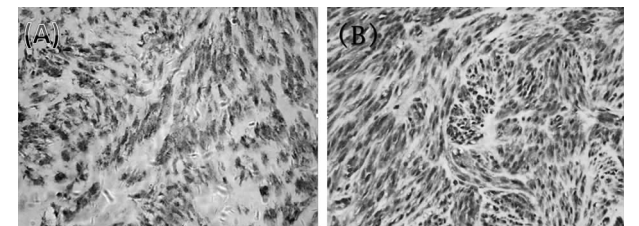
## 2 结 果

**2.1 DNMT 与 MBD2 蛋白在 GIST 组织的表达** GIST 组织表达各种 DNMT 蛋白及 MBD2 蛋白。除 DNMT3a 外,其余 DNMT 蛋白及 MBD2 蛋白在 GIST)组织的表达强于配对对照组织,DNMT1、DNMT2、DNMT3b、DNMT3L、MBD2 在 GIST 的蛋白表达显著高于配对对照组织,差异有统计学意义 ( $P<$

0.05);但 DNMT3a 在 GIST 的表达与配对对照组织比较,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。免疫印迹除 DNMT3a 外,其他 DNMTs 及 MBD2 在 GIST 组织中表达显著增强,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见图 1~3。

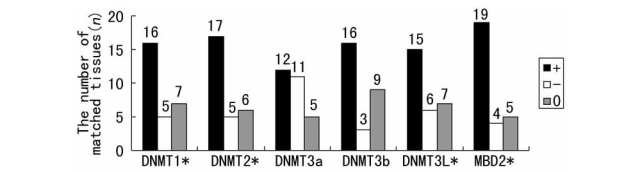
表 1 不同临床特征 GIST 的 DNMT 阳性表达[n(%)]

| 项目       | 类别        | n  | DNMT1    | DNMT2    | DNMT3a  | DNMT3b   | DNMT3L   | MBD2     |
|----------|-----------|----|----------|----------|---------|----------|----------|----------|
| 性别       | 男性        | 16 | 9(56.3)  | 15(93.8) | 8(50.0) | 12(75.0) | 10(62.5) | 13(81.3) |
|          | 女性        | 12 | 6(50.0)  | 10(83.3) | 5(41.7) | 9(75.0)  | 6(50.0)  | 10(83.3) |
| P        |           |    | 1.00     | 0.56     | 0.72    | 1.00     | 0.70     | 1.00     |
| 年龄(岁)    | > 50      | 17 | 10(58.8) | 14(82.4) | 6(35.3) | 13(76.5) | 9(52.9)  | 16(94.1) |
|          | ≤ 50      | 11 | 5(45.5)  | 11(100)  | 7(63.6) | 8(72.7)  | 7(63.6)  | 7(63.6)  |
| P        |           |    | 0.70     | 0.26     | 0.25    | 1.00     | 0.71     | 0.06     |
| 肿瘤大小(cm) | > 5       | 15 | 10(66.7) | 13(86.7) | 7(46.7) | 14(93.3) | 10(66.7) | 14(93.3) |
|          | ≤ 5       | 13 | 5(38.5)  | 12(92.3) | 6(46.2) | 7(53.8)  | 6(46.2)  | 9(69.2)  |
| P        |           |    | 0.26     | 1.00     | 1.00    | 0.03     | 0.45     | 0.15     |
| 分裂指数     | ≤5/50 HPF | 14 | 4(28.6)  | 11(78.6) | 5(35.7) | 7(50.0)  | 6(42.9)  | 10(71.4) |
|          | >5/50 HPF | 14 | 11(28.6) | 14(100)  | 8(57.1) | 14(100)  | 10(71.4) | 13(92.9) |
| P        |           |    | 0.02     | 0.22     | 0.45    | 0.01     | 0.25     | 0.33     |
| 幽门螺杆菌感染  | 阳性        | 16 | 10(62.5) | 14(87.5) | 7(43.8) | 11(68.8) | 13(81.3) | 13(81.3) |
|          | 阴性        | 12 | 5(41.7)  | 11(91.7) | 6(50.0) | 10(83.3) | 3(25.0)  | 10(83.3) |
| P        |           |    | 0.45     | 1.00     | 1.00    | 0.66     | 0.01     | 1.00     |



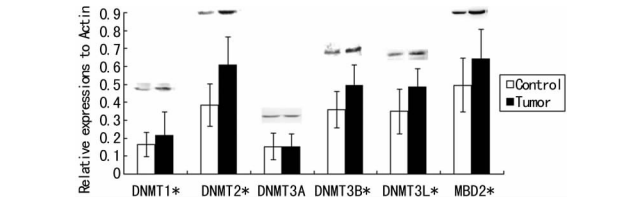
注:A 表示 DNMT1 在 GIST 的表达;B 表示 MBD2 在 GIST 表达。

图 1 胃肠间质瘤 DNMTs 与 MBD2 的表达



注:免疫组织化学“+”表示蛋白在肿瘤表达高于配对对照组织;“-”表示蛋白在肿瘤表达弱于配对对照组织;“0”表示蛋白在肿瘤表达与配对对照组织相似。

图 2 DNMTs 与 MBD2 在 GIST 及配对对照组织的表达



注:Actin 表示内参。

图 3 DNMTs 与 MBD2 在 GIST 及配对对照组织的差异表达

**2.2 DNMT 和 MBD2 表达与 GIST 临床病理特征的关系**

DNMT 和 MBD2 表达与 GIST 患者的性别、年龄差异无统计学意义 ( $P>0.05$ );但 DNMT1 表达与间质瘤分裂指数相关,DNMT3b 表达与间质瘤大小及分裂指数相关,而 DNMT3L 表达可能与幽门螺杆菌感染相关 ( $P<0.05$ )。见表 1。

**3 讨论**

GIST 是胃肠道最常见的间叶细胞来源肿瘤,其中大约 60% 发生在胃壁。GIST 的风险评估由解剖位置、肿瘤大小、瘤细胞核分裂能力决定<sup>[6]</sup>。通常认为 GIST 的发病是由于 KIT 基因或 PDGFRA 基因激活突变引起。在绝大多数 GIST 标本中均可发现 KIT 基因或 PDGFRA 基因变异,其变异可编码突变的酪氨酸激酶受体(tyrosine receptor kinases),导致非调控性激酶活性,最终导致细胞周期及凋亡的异常改变<sup>[7]</sup>。CD34、DOG1、KIT (CD117) 的表达检测是目前鉴别 GIST 与其他肿瘤的准确方法<sup>[8]</sup>。而酪氨酸激酶抑制剂(TKI)甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate)和外科手术切除是当前治疗 GIST 的经典方法。但是部分 GIST (成人大约 10%~15%,儿童约 85%~90%)并无 KIT 与 PDGFRA 基因突变,提示 GIST 发病机制存在复杂性<sup>[9]</sup>。

DNMTs 和 MBD2 是表观遗传学中重要的功能蛋白。DNMT1 是维持 DNA 甲基化谱的甲基转移酶,其使新合成的 DNA 链具有同母链一致的 DNA 甲基化信息。DNMT1 失活可导致 DNA 链低甲基化,染色体不稳定,还可激活转座元件,影响基因转录。DNMT2 为 tRNA 甲基转移酶,也有部分 DNA 甲基转移酶活性<sup>[10]</sup>。DNMT3a、DNMT3b 是胚胎发育初期建立起 DNA 甲基化谱的重新甲基转移酶,通常在胚胎及肿瘤细胞中高表达,而在成人机体细胞中表达微弱。DNMT3L 在基因组印记中发挥作用,也通过 DNMT3a 与 DNMT3b 激活重新甲基化过程<sup>[11]</sup>。有研究报道 DNMT3L 在肿瘤中可单独调节 15 种基因甲基化状态<sup>[12]</sup>。MBD2 蛋白在 DNA 甲基化调控基因转录过程中发挥重要作用。一般认为,甲基化的 DNA

与 MBD2 蛋白结合后通过招募组蛋白去乙酰化酶而形成转录抑制复合物,使染色体形态结构改变,不利 DNA 解旋和解链,进而抑制基因转录<sup>[13]</sup>。也有观点认为 MBD2 具有去甲基化酶功能<sup>[14]</sup>。

表观遗传修饰改变,如启动子高甲基化引起肿瘤相关基因转录活性改变在肿瘤发生、发展机制中发挥重要作用。通常假设是 DNMT 与 MBD2 的异常表达通过促进抑癌基因高甲基化并失活,进而促进肿瘤发展。目前有部分研究证实肿瘤组织高表达 DNMT 与 MBD2 蛋白<sup>[15]</sup>。

本研究结果表明,几乎所有 DNMT(除外 DNMT3a)及 MBD2 蛋白均在 GIST 中表达增强(相较配对对照组织)。本组结果与其他一些关于 DNMTs 在肿瘤中的研究发现类似,提示除 KIT 与 PDGFRA 基因突变外,表观遗传改变可能也在 GIST 发展分子机制中发挥潜在作用。另一方面,部分 DNMT 表达与 GIST 临床病理特征的关系提示 DNMT 表达检测在 GIST 诊断中可能具有潜在价值。当然,本研究结论需要更大标本资料的研究去证实。而且 GIST 基因组中肿瘤相关基因的 DNA 甲基化状态是否异常, DNMT 抑制剂,如 5-aza-2-deoxycytidine 是否可以抑制 GIST 细胞增殖,这些疑问均需进一步研究去解答。

综上所述,GIST 可高表达 DNMT 与 MBD2 蛋白,且 DNMT 表达可能与 GIST 的部分临床病例特征存在关联。

# 参考文献

- [1] Lin Q, Wagner W. Epigenetic aging signatures are coherently modified in cancer [J]. PLoS Genet, 2015, 11(6): e1005334.
- [2] Shen J, Le Fave C, Sirosh I, et al. Integrative epigenomic and genomic filtering for methylation markers in hepatocellular carcinomas [J]. BMC Med Genomics, 2015, 8(1): 28-30.
- [3] Hervouet E, Vallette FM, Cartron PF. Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation[J]. Epigenetics, 2009, 4(7): 487-499.
- [4] Wang X, Zhang L, Ding N, et al. Identification and characterization of DNA zymes targeting DNA methyltransferase I for suppressing bladder cancer proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 461(2): 329-333.
- [5] He M, Fan J, Jiang R, et al. MBD2 may be an underlying target of gastric cancer treatment[J]. Science Asia, 2013, 39(5): 486-491.
- [6] Gheorghe M, Predescu D, Iosif C, et al. Clinical and therapeutic considerations of GIST[J]. J Med Life, 2014, 7(2): 139-149.
- [7] Abdel-Rahman O, Fouad M. Systemic therapy options for advanced gastrointestinal stromal tumors beyond first-line imatinib; a systematic review[J]. Future Oncol, 2015, 11(12): 1829-1843.
- [8] Joensuu H, Rutkowski P, Nishida T, et al. KIT and PDGFRA mutations and the risk of GI stromal tumor recurrence[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(6): 634-642.
- [9] Rossi S, Gasparotto D, Miceli R, et al. KIT, PDGFRA, and BRAF mutational spectrum impacts on the natural history of imatinib-naïve localized GIST; a population-based study [J]. Am J Surg Pathol, 2015, 39(7): 922-930.
- [10] Elhardt W, Shanmugam R, Jurkowski TP, et al. Somatic cancer mutations in the DNMT2 tRNA methyltransferase alter its catalytic properties[J]. Biochimie, 2015, 112(3): 66-72.
- [11] Pacaud R, Sery Q, Oliver L, et al. DNMT3L interacts with transcription factors to target DNMT3L/DNMT3B to specific DNA sequences; role of the DNMT3L/DNMT3B/p65-NFκB complex in the (de-) methylation of TRAF1[J]. Biochimie, 2014, 104(8): 36-49.
- [12] Kim H, Park J, Jung Y, et al. DNA methyltransferase 3-like affects promoter methylation of thymine DNA glycosylase independently of DNMT1 and DNMT3B in cancer cells[J]. Int J Oncol, 2010, 36(6): 1563-1572.
- [13] Desai MA, Webb HD, Sinanan LM, et al. An intrinsically disordered region of methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2) recruits the histone deacetylase core of the NuRD complex[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(6): 3100-3113.
- [14] Du Q, Luu PL, Stirzaker C, et al. Methyl-CpG-binding domain proteins; readers of the epigenome[J]. Epigenomics, 2015, 30(2): 1-23.
- [15] Zhu D, Hunter SB, Vertino PM, et al. Overexpression of MBD2 in glioblastoma maintains epigenetic silencing and inhibits the antiangiogenic function of the tumor suppressor gene BAI1[J]. Cancer Res, 2011, 71(20): 5859-5870.

(收稿日期: 2015-06-25 修回日期: 2015-09-25)

(上接第 468 页)

- iron-deficient states[J]. Clin Lab Haematol, 2006, 28(6): 303-308.
- [13] Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Erythrocyte and reticulocyte indices in the assessment of erythropoiesis activity and iron availability[J]. Int J Lab Hematol, 2013, 35(2): 144-149.
- [14] Peerschke EI, Pessin MS, Maslak P. Using the hemoglobin content of reticulocytes (RET-He) to evaluate anemia

in patients with cancer[J]. Am J Clin Pathol, 2014, 142(4): 506-512.

- [15] Piva E, Brugnara C, Chiangetti L, et al. Automated reticulocyte counting; state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(10): 1369-1380.

(收稿日期: 2015-06-25 修回日期: 2015-09-25)