

RASSF10基因在贲门腺癌组织中的 甲基化状态及表达

崔建利 郭炜 郭艳丽 沈素朋 董稚明

河北医科大学第四医院河北省肿瘤研究所病理研究室, 河北 石家庄 050011

[摘要] **背景与目的:** *Ras*相关域家族10基因(*Ras*-association domain family 10, *RASSF10*)在多种肿瘤组织中具有肿瘤抑制功能,然而在贲门腺癌组织中的研究尚未见报道。检测贲门腺癌(gastric cardia adenocarcinoma, GCA)组织中*RASSF10*基因的甲基化状态及表达情况,进一步探讨*RASSF10*基因在GCA发生、发展中的作用。**方法:**分别应用甲基化特异性聚合酶链式反应(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)、逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)及免疫组织化学方法检测81例GCA患者癌组织及癌旁正常组织中*RASSF10*基因的甲基化状态及mRNA和蛋白表达情况。**结果:***RASSF10*基因在GCA组织中的启动子区甲基化率(64.2%, 52/81)显著高于癌旁正常组织(21.0%, 17/81, $P<0.05$),并与肿瘤组织的TNM分期、分化程度及淋巴结转移相关(P 均 <0.05)。*RASSF10*基因在GCA组织中的mRNA表达量(0.57 ± 0.05)显著低于癌旁正常组织(0.78 ± 0.02 , $P<0.05$),并与肿瘤组织的TNM分期及淋巴结转移相关(P 均 <0.05)。*RASSF10*蛋白在GCA组织中的阳性表达率(31.1%, 26/81)明显低于癌旁正常组织(71.6%, 58/81, $P<0.05$),并与肿瘤组织的TNM分期、分化程度及淋巴结转移相关(P 均 <0.05)。*RASSF10*基因在GCA组织中的甲基化率与其蛋白表达呈明显的负相关。**结论:***RASSF10*基因启动子区的异常高甲基化导致的基因沉默可能是GCA发生的机制之一。

[关键词] 贲门腺癌; 甲基化; *RASSF10*基因

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.08.002

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)08-0568-07

Methylation status and expression of *RASSF10* gene in gastric cardia adenocarcinoma CUI Jian-li, GUO Wei, GUO Yan-li, SHEN Su-peng, DONG Zhi-ming (Cancer Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang Hebei 050011, China)

Correspondence to: DONG Zhi-ming E-mail: dongzhiming2000@aliyun.com

[Abstract] **Background and purpose:** *RASSF10* acts as a kind of tumor suppressor in various tumor tissues, but researches in cardiac adenocarcinoma has not been reported. This study aimed to detect the methylation status and expression of *Ras*-association domain family 10 (*RASSF10*) in gastric cardia adenocarcinoma (GCA), and explore its role in occurrence and development of GCA. **Methods:** Methylation specific polymerase chain reaction (MSP), reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry method were respectively used to detect methylation status, mRNA expression and protein expression of *RASSF10* in 81 GCA tissues and corresponding normal tissues. **Results:** The promoter methylation frequency of *RASSF10* in GCA tissues (64.20%, 52/81) was significantly higher than that in corresponding normal tissues (20.99%, 17/81, $P<0.05$), and was closely correlated with TNM stages, differential degree and lymph node metastasis ($P<0.05$). *RASSF10* mRNA expression in GCA tissues (0.57 ± 0.05) was significantly lower than that in corresponding normal tissues (0.78 ± 0.02 , $P<0.05$), and was closely correlated with TNM stages and lymph node metastasis ($P<0.05$). Protein expression of *RASSF10* in GCA tissues (31.10%, 26/81) was significantly lower than that in corresponding normal tissues (71.60%, 58/81, $P<0.05$), and was closely correlated with TNM stages, differential degree and lymph node metastasis ($P<0.05$). The promoter methylation frequency of *RASSF10* in GCA tissues was inversely related to its protein expression. **Conclusion:** Inactivation of *RASSF10* caused by aberrant

methylation in the promoter region may be closely correlated with the GCA tumorigenesis.

[Key words] Gastric cardia adenocarcinoma; Methylation; *RASSF10* gene

贲门癌是发生于贲门黏膜上皮及腺体的癌, 主要指原发于或占据于胃食管交接处以下2 cm内的肿瘤, 主要组织学类型是腺癌^[1]。以往贲门癌常被列入食管癌或胃癌, 近年随着病理诊断技术及内镜筛查方法的不断改进而将其独立出来, 其发病部位与Barrett食管接近, 其形态学、病因、治疗和预防均不同于胃远端腺癌, 临床症状隐匿, 绝大多数患者确诊时已属中晚期, 其发病率呈逐年上升趋势。由于其部位的特殊性, 及表型、生长方式、组织学、细胞分化等方面具有多样性的特征, 近年来受到越来越多研究者的关注^[2]。然而其发病机制尚未完全明确, 因此, 明确其发生、发展的分子机制对于早期检测及治疗显得尤为重要。*Ras*相关域家族(*Ras*-association domain family, *RASSFs*)共包含10个成员, *RASSF1-RASSF10*、*RASSF1-6*为经典家族成员, *RASSF7-10*为N-端家族成员^[3]。*RASSF10*基因属于N-端家族成员之一, 编码N-端RA相关域, 缺乏经典家族成员特有的Sav-Ras-Hippo(SARAH)作用域。该基因为单一外显子基因, 编码507个氨基酸, 定位于染色体11p15.2, 位置上靠近*RRAS2*基因^[4]。研究表明*RASSFs*成员在多种实体肿瘤组织中发生表观遗传失活。目前, 有关*RASSF10*基因在(gastric cardia adenocarcinoma, GCA)组织中的研究还尚未报道。本研究检测了组织中*RASSF10*基因的甲基化状态及表达情况, 旨在探讨其在GCA发生、发展中的作用, 以便探究GCA发生的表观遗传学机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

蛋白酶K、甲基化酶Sss I购自Merck公司, DNA纯化试剂盒、蓝色体系、购自Promega公司。TRIzol购自Invitrogen公司, 逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain

reaction, RT-PCR)试剂盒购自Fomentas公司, 绿色体系购自Promega公司。所有引物均由北京赛百盛基因技术有限公司合成。*RASSF10*兔抗人多克隆抗体、免疫组织化学SP试剂盒、DAB显色剂购自河北博海生物工程开发有限公司。

1.1.2 标本

收集河北医科大学第四医院2011年9月—2012年9月间的GCA手术患者, 共81例, 其中男性50例, 女性31例, 年龄37~75岁, 中位年龄58岁, 所有患者术前均未给予任何放疗与化疗, 标本及其资料的收集均经患者本人签署知情同意书, 且该研究经当地伦理委员会批准。标本取自贲门腺癌原发灶及相应癌旁正常组织(距离原发灶边缘2 cm以上)。手术切除所采集的标本, 一部分用4%中性甲醛溶液固定, 用于常规石蜡包埋, 行免疫组织化学染色。另一部分用液氮保存, 用于DNA和RNA提取, 行甲基化特异性聚合酶链式反应(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)和RT-PCR检测。所有标本均经3位资深病理医师通过HE染色确诊。按肿瘤病理学分级, 高分化25例(30.9%), 中分化10例(12.3%), 低分化46例(56.8%)。按国际抗癌联盟(UICC)标准进行TNM分期: I期10例(12.4%), II期56例(69.0%), III期10例(12.4%), IV期5例(6.2%)。有淋巴结转移者38例, 无淋巴结转移者43例。

1.2 方法

1.2.1 MSP方法检测*RASSF10*基因CpG岛的甲基化状态

每个标本均取10 μm石蜡切片约15片, 经蛋白酶K消化后, 运用酚/氯仿抽提法提取GCA组织及相应癌旁正常组织中的DNA, 取2 μg DNA标本进行亚硫酸氢盐转换, 依照DNA纯化试剂盒步骤进行纯化。通过亚硫酸氢盐处理后, 单链DNA中未甲基化的胞嘧啶(C)可脱去氨基转为尿嘧啶(U), 而甲基化的胞嘧啶在甲基的保护作用下不能转为尿嘧啶。运用MethPrimer对*RASSF10*基因CpG岛的分布情况进行在线预测

并结合亚硫酸氢盐转换的原理分别设计相应引物(图1), 以检测*RASSF10*基因的甲基化状态, 引物、退火温度见表1。反应条件为: 95 °C预变性10 min; 95 °C变性45 s, 退火45 s, 72 °C延伸50 s, 35个循环后, 72 °C终延伸7 min。将扩增产物用2%琼脂糖凝胶进行电泳, 用UV凝胶电泳成像仪进行图像分析。阳性对照为甲基化酶Sss I 处理基因组DNA进行PCR, 阴性对照为灭菌双蒸水替代DNA模板进行PCR。随机选择10%标本进行重复以保证MSP的可靠性。

1.2.2 RT-PCR的方法检测*RASSF10* mRNA的表达

取冻存组织每例大约100 mg剪碎研磨,

按TRIzol试剂说明提取RNA, 并测定浓度及纯度。严格按照逆转录试剂盒步骤将RNA反转录为cDNA。以GAPDH作为内参照, 引物、退火温度见表1。反应条件为: 95 °C预变性10 min; 95 °C变性45 s, 退火45 s, 72 °C延伸50 s, 35个循环后, 72 °C终延伸7 min。将扩增产物用2%琼脂糖凝胶进行电泳。利用Gel work-2ID软件, 对电泳图像中*RASSF10*基因mRNA表达水平进行半定量研究。以*RASSF10*基因条带的吸光度值和GAPDH条带的吸光度值的比值表示*RASSF10*基因mRNA的相对表达水平。实验重复3次, 取平均值。

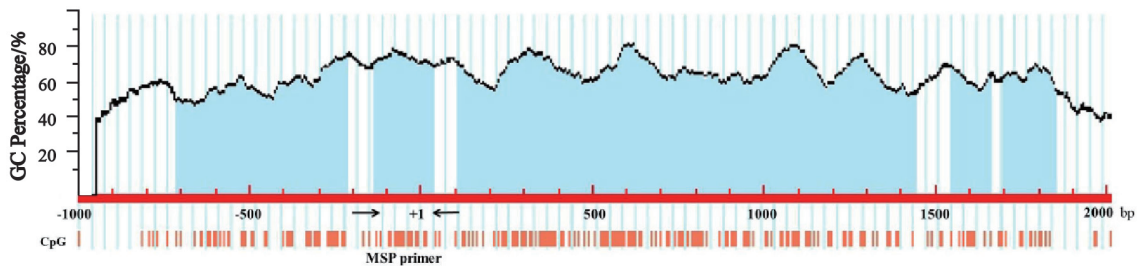


图1 *RASSF10*基因CpG岛分布及MSP引物位置

Fig. 1 CpG islands of *RASSF10* gene and the location of primer for MSP

Blue region: Position of CpG island; → ←: The location of primer for MSP; +1: Transcription initiation site.

表1 *RASSF10*基因RT-PCR、MSP引物及反应条件

Tab. 1 Primer sequences and reaction conditions of RT-PCR and MSP for *RASSF10* gene

Types	Primer sequence	Annealing temperature/°C	Product size/bp
RT-PCR			
RASSF10	F: 5'-GCGCCATGGATCCTTCGAAAA-3'	56	244
	R: 5'-GGCAGCGCCTCGTCGTCGCTCT-3'		
GAPDH	F: 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'	57	104
	R: 5'-AGGGGTCATTGATGGCAACA-3'		
MSP			
Methylation	F: 5'-GGGTATTTGGGTAGAGTTAGAGC-3'	58	126
	R: 5'-AAACAACTAAAAACGACTACGAC-3'		
Unmethylation	F: 5'-GGGTATTTGGGTAGAGTTAGAGTG-3'	56	127
	R: 5'-AAAACAACTAAAAACAACACTACAAC-3'		

F: Forward primer; R: Reverse primer.

1.2.3 免疫组织化学方法检测*RASSF10*蛋白表达

组织经脱水、包埋后每例常规3 μm连续切片, 平贴于防脱载玻片上, 置60 °C烤箱中2 h备用。采用SP法, 切片常规脱蜡, 过氧化氢/甲醇溶液滴加于组织, 室温避光修复20 min以封闭内源性过氧化物酶, EDTA缓冲液高压锅抗原热修复4 min。滴加一抗(稀释比例为1:100),

在4 °C冰箱中过夜。次日依次滴加二抗和三抗试剂, 显微镜下DAB显色, 蒸馏水终止显色。苏木素细胞核复染, 逐级脱水, 透明, 中性树脂封片。PBS代替一抗作为空白对照, 余步骤同上。正常胃黏膜组织为阳性对照。*RASSF10*蛋白以细胞核中出现棕褐/棕黄色颗粒为阳性表达, 判定标准^[5]: 按照多数阳性细胞的染色强度列为4个等级: 无显色0分; 淡黄色1分; 棕

黄色2分；棕褐色3分。镜下阳性细胞数所占比例≤25%为0分；26%~50%为1分；51%~75%为2分；>75%为3分。将以上两项得分相加：0分记为“-”，1~2分记为“+”，3~4分记为“++”，5~6分记为“+++”。其中“++”、“+++”为阳性表达，“-”、“+”为阴性表达。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析。MSP及免疫组化实验结果与临床病理资料间的关系采用 χ^2 和校正 χ^2 检验的统计方法，RT-PCR与临床病理资料及MSP间的关系采用t检验和近似t检验，MSP与免疫组化间的关系采用 χ^2 检验及Spearman相关性分析的统计方法。以上均为双侧检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RASSF10基因在GCA中的甲基化状态

全部81例GCA组织及癌旁正常组织均成功进行了MSP检测(图2)。结果显示，RASSF10基因启动子区在GCA组织和癌旁正常组织中的甲基化率分别为64.2%(52/81)和21.0%(17/81)，GCA组织中RASSF10基因启动子区甲基化率显

著高于癌旁正常组织($P=0.010$)。分组分析发现，有淋巴结转移组的甲基化发生率(76.3%，29/38)显著高于无淋巴结转移组(53.5%，23/43， $\chi^2=4.574$ ， $P=0.032$)；III、IV期组甲基化发生率(86.7%，13/15)明显高于I、II期组(59.1%，39/66， $\chi^2=4.044$ ， $P=0.044$)；低分化组甲基化发生率(87.0%，40/46)明显高于高、中分化组(34.3%，12/35， $\chi^2=23.991$ ， $P=0.000$)；年龄<60岁组的甲基化发生率为65.3%(32/49)，≥60岁组的甲基化发生率为62.5%(20/32)，两者差异无统计学意义($\chi^2=0.066$ ， $P=0.797$)；男性组的甲基化发生率为64.0%(32/50)，女性组的甲基化发生率为64.5%(20/31)，两者差异无统计学意义($\chi^2=0.002$ ， $P=0.962$ ，表2)。

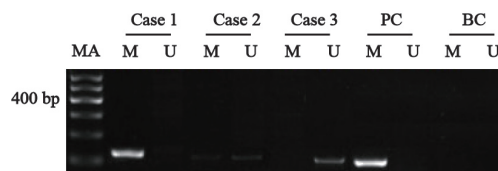


图2 GCA中RASSF10基因的甲基化状态

Fig. 2 Methylation analysis of RASSF10 gene in GCA tissues

Case 1: Methylated; Case 2: Hemi-Methylated; Case 3: Unmethylated; PC: Positive control; BC: Blank control; M: Methylated; U: Unmethylated; MA: 100 bp DNA marker.

表2 GCA组织中RASSF10基因的mRNA和蛋白表达、甲基化状态及其与临床病理资料之间的关系

Tab. 2 The relationship between mRNA, protein expression, methylation status of RASSF10 gene and GCA clinical pathological data

Group	Case	mRNA Expression		Protein expression		Methylation frequency	
		$\bar{x} \pm s$	P value	n(%)	P value	n(%)	P value
Age/year							
<60	49	0.56±0.05	0.759	15(30.6)	0.732	32(65.3)	0.797
≥60	32	0.57±0.04		11(34.4)		20(62.5)	
Gender							
Male	50	0.56±0.04	0.280	14(28.0)	0.316	32(64.0)	0.962
Female	31	0.57±0.05		12(38.7)		20(64.5)	
Lymph node status							
Positive	38	0.55±0.04	0.014	7(18.4)	0.013	29(76.3)	0.032
Negative	43	0.58±0.05		19(44.2)		23(53.5)	
Pathological differentiation							
Well/moderate	35	0.58±0.06	0.092	25(71.4)	0.000	12(34.3)	0.000
Poor	46	0.56±0.04		1(2.2)		40(87.0)	
TNM stage							
I+II	66	0.57±0.04	0.000	25(37.9)	0.019	39(59.1)	0.044
III+IV	15	0.53±0.05		1(6.7)		13(86.7)	

2.2 RASSF10基因mRNA在GCA组织中的表达

在81例GCA组织及相应癌旁正常组织中检测了RASSF10基因mRNA的表达(图3)。GCA组织中RASSF10基因mRNA的相对表达量

(0.57±0.05)显著低于癌旁正常组织(0.78±0.02)，差异有统计学意义($t=-36.940$ ， $P=0.000$)。分组分析发现，有淋巴结转移组的RASSF10基因mRNA相对表达量(0.55±0.04)显著低于无淋巴

结转移组(0.58 ± 0.05 , $t = -2.512$, $P = 0.014$); I、II期*RASSF10* mRNA相对表达量(0.57 ± 0.04)显著高于III、IV期*RASSF10* mRNA相对表达量(0.53 ± 0.05 , $t = 4.086$, $P = 0.000$);高、中分化组*RASSF10* mRNA的相对表达量为 0.58 ± 0.06 ,低分化组*RASSF10* mRNA相对表达量为 0.56 ± 0.04 ,差异无统计学意义($t = 1.711$, $P = 0.092$);年龄 < 60 岁组的相对表达量为 0.56 ± 0.05 ,年龄 ≥ 60 岁组的相对表达量为 0.57 ± 0.04 ,差异无统计学意义($t = -0.308$, $P = 0.759$);男性组的相对表达量为 0.56 ± 0.04 ,女性组的相对表达量为 0.57 ± 0.05 ,差异无统计学意义($t = -1.087$, $P = 0.280$,表2)。

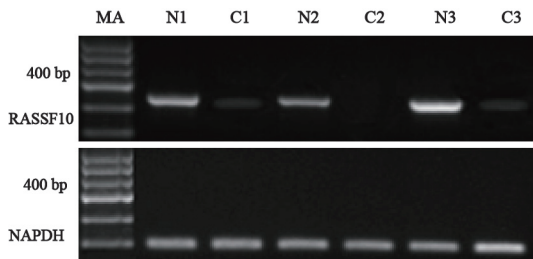


图3 GCA及癌旁正常组织中*RASSF10*基因的mRNA表达

Fig. 3 mRNA expression of *RASSF10* gene in GCA and corresponding normal tissues

C(1-3): GCA tissues; N(1-3): Corresponding normal tissues; MA: 100 bp DNA Marker.

2.3 *RASSF10*在GCA组织中的蛋白表达

81例GCA组织中有26例*RASSF10*蛋白表达呈阳性,其阳性率为32.1%;相应癌旁正常贲门组织中58例*RASSF10*蛋白表达呈阳性,阳性率为71.6%,GCA组织*RASSF10*蛋白阳性率显著低于癌旁正常组织($\chi^2 = 0.167$, $P = 0.048$,

图4)。*RASSF10*蛋白在无淋巴结转移组的阳性率(44.2%, 19/43)显著高于有淋巴结转移组的阳性率(18.4%, 7/38, $\chi^2 = 6.144$, $P = 0.013$); I、II期*RASSF10*蛋白阳性率为37.9%(25/66),显著高于III、IV期的6.7%(1/15, $\chi^2 = 5.463$, $P = 0.019$);高、中分化组*RASSF10*蛋白阳性率(71.4%, 25/35)显著高于低分化组(2.2%, 1/46, $\chi^2 = 43.739$, $P = 0.000$);年龄 < 60 岁组的*RASSF10*的蛋白阳性率为30.6%(15/49), ≥ 60 岁组的蛋白阳性率为34.4%(11/32),差异无统计学意义($\chi^2 = 0.126$, $P = 0.723$);男性组的*RASSF10*蛋白阳性率为28.0%(14/50),女性组蛋白阳性率为38.7%(12/31),差异无统计学意义($\chi^2 = 1.007$, $P = 0.316$,表2)。

2.4 *RASSF10*基因甲基化与表达之间的相关性

在*RASSF10*蛋白表达阳性的GCA组织中,其mRNA相对表达量为 0.59 ± 0.04 ,而在*RASSF10*蛋白表达阴性的GCA组织中,其mRNA相对表达量为 0.55 ± 0.04 ,差异有统计学意义($t = 4.266$, $P = 0.000$)。在*RASSF10*基因启动子区甲基化阳性的GCA组织中,其mRNA相对表达量为 0.56 ± 0.04 ,甲基化阴性的GCA组织中mRNA相对表达量为 0.58 ± 0.05 ,差异有统计学意义($t = -2.507$, $P = 0.014$)。发生*RASSF10*基因启动子区高甲基化的GCA组织中*RASSF10*蛋白阳性表达率为9.6%(5/52),*RASSF10*基因启动子区甲基化阴性组的*RASSF10*蛋白表达阳性率为72.4%(21/29),差异有统计学意义($\chi^2 = 33.686$, $P = 0.000$,表3)。*RASSF10*基因启动子区甲基化与其蛋白表达之间呈负相关($P = 0.000$)。

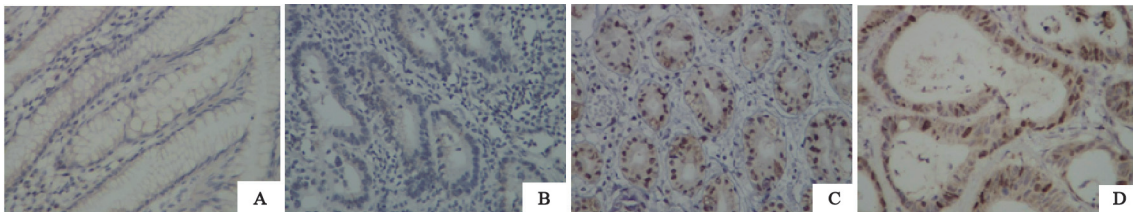


图4 贲门组织中*RASSF10*蛋白的表达

Fig. 4 Protein expression of *RASSF10* in gastric cardia tissue

(SP, $\times 400$)
A: Negative expression of *RASSF10* in normal tissue; B: Negative expression of *RASSF10* in tumor tissue; C: Positive expression of *RASSF10* in normal tissue; D: Positive expression of *RASSF10* in tumor tissue.

表3 GCA组织中*RASSF10*基因甲基化与mRNA和蛋白表达之间的关系

Methylation	Case	mRNA expression		Protein expression	
		$\bar{x} \pm s$	<i>P</i> value	<i>n</i> (%)	<i>P</i> value
Methylated	52	0.56±0.04	0.014	5(9.6)	0.000
Unmethylated	29	0.58±0.05		21(72.4)	

3 讨 论

除多基因改变以外, 表观遗传机制, 尤其是DNA甲基化, 与肿瘤的发生、发展密切相关, 启动子区CpG岛的甲基化可改变癌症相关基因的表达水平, 从而调节参与癌细胞增殖、凋亡和转移的信号通路^[6]。近年来研究发现Ras蛋白可以通过与*RASSF*家族效应因子相互作用来调节多条信号通路影响细胞活动。据报道某些*RASSFs*成员(*RASSF1A*、*RASSF2*、*RASSF4*和*RASSF5A*)在多种类型的实体肿瘤中由于其启动子区CpG岛甲基化而发生表观遗传学失活^[3,7]。

作为表观遗传学重要作用机制的DNA甲基化是恶性肿瘤发病的基本事件之一。肿瘤抑癌基因启动子区高甲基化引起的表达缺失, 可导致其失去对肿瘤细胞生长的负性调控作用^[8]。有研究报道*RASSF10*基因在白血病^[9]、甲状腺癌^[10]、胶质母细胞瘤^[11]、皮肤黑色素瘤^[12]、前列腺癌^[13]、胃癌^[14]和食管鳞癌^[15]中发生高度甲基化。然而, *RASSF10*基因在GCA中的甲基化状态及表达尚未见报道。目前检测DNA甲基化常见的方法主要有酶切法、直接测序法、MSP等, MSP与其他方法相比避免了使用限制性内切酶, 敏感性高, 简便易行, 适用于大样本检测, 但存在一定假阳性结果, 适当提高退火温度可降低假阳性率, 从而提高其特异度, 为检测DNA甲基化较为可信的方法。本研究通过MSP的方法发现*RASSF10*在贲门腺癌组织中的启动子区甲基化率显著高于癌旁正常组织, 且淋巴结转移组高于无淋巴结转移组, 这与文献报道的*RASSF10*基因甲基化程度与转移相关^[10,12,15]这一结论相一致。本研究结果还显示低分化组*RASSF10*基

因甲基化率高于高、中分化组, III、IV期高于I、II期, 这提示GCA的分化程度及分期可能同样与*RASSF10*基因的甲基化相关。研究随后分别应用RT-PCR及免疫组化的方法对*RASSF10*基因的mRNA及蛋白水平进行检测, 结果显示GCA组织中该基因的转录及翻译水平均显著低于相应癌旁正常组织, 这与Schagdarsurengin等^[10]报道*RASSF10*基因在乳腺组织以外的几乎所有正常组织中高表达相一致。且经统计分析发现, *RASSF10*基因启动子区发生高甲基化的GCA组织其mRNA及蛋白表达水平显著低于未发生甲基化组, 提示*RASSF10*基因启动子区的甲基化可能是导致该基因在GCA中失活的机制之一。此外Schagdarsurengin等^[10]用去甲基化药物5-aza-dC处理*RASSF10*基因表达缺失或降低的甲状腺癌细胞系后, 该基因的表达得以恢复或提高。Lu等^[15]在多株食管癌细胞系中检测到*RASSF10*基因mRNA表达水平的缺失或降低, 并伴随启动子甲基化的发生, 用去甲基化药物5-aza-dC处理后, 其表达得以恢复或提高。进一步证明了*RASSF10*基因CpG岛的甲基化可导致该基因在肿瘤中的沉默。Wei等^[16]也通过去甲基化药物5-aza-dC处理*RASSF10*基因mRNA的表达缺失的胃癌细胞系使得该基因的表达得以恢复。同样提示启动子甲基化可能是导致*RASSF10*失活的主要机制。此外Wei等^[16]还证明*RASSF10*过表达可显著抑制胃癌细胞的生长和集落形成, 并在裸鼠体内抑制肿瘤的形成, siRNA介导的*RASSF10*缺失可显著促进正常胃上皮细胞的生长, 表明*RASSF10*具有肿瘤抑制功能。Hill等^[11]在细胞培养实验中发现过表达的*RASSF10*可导致神经胶质瘤细胞系克隆形成力下降, 同样表明*RASSF10*具有肿瘤抑制功能。

Knudson的二次打击学说指出表观遗传沉默和杂合性缺失是导致*RASSF10*双等位基因失活

的两个相关机制^[17]。有研究报道, *RASSF10* 过表达可降低 β -连环蛋白的核积累, 增加TCF/LEF转录活性^[16]。并通过检测 β -连环蛋白下游基因(*c-Myc*、*cyclinD1*、*cyclinE1*)和过氧化物酶体增殖物激活受体(CF-1、TCF-4、CD44)的表达水平以探究*RASSF10*诱导生长抑制的分子机制, 发现这些分子的蛋白水平均显著降低^[18-21]。因此除DNA甲基化外, Wnt/ β -连环蛋白信号传导途径的抑制可能也是*RASSF10*诱导细胞生长抑制、促进凋亡、降低细胞增殖的机制之一。

本研究证实GCA组织中*RASSF10*基因的甲基化率显著高于癌旁正常组织, 并伴随转录及翻译水平的降低, 且与肿瘤组织的分期、分化程度及淋巴结转移密切相关。因此*RASSF10*有可能作为检测GCA发生、发展及恶性程度的一个新的分子靶标, 以期其在临床治疗过程中发挥一定指导作用, 然而其具体分子生物学机制有待深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] 董稚明, 郭炜, 何明, 等. 贲门腺癌中*RASSF1A*基因的甲基化状态及表达 [J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36 (7): 566-570.
- [2] HUANG Q, ZHANG L H. The histopathologic spectrum of carcinomas involving the gastroesophageal junction in the Chinese [J]. Int J Surg Pathol, 2007, 15(1): 38-52.
- [3] VAN DER WEYDEN L, ADAMS D J. The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis [J]. Biochem Biophys Acta, 2007, 1776(1): 58-85.
- [4] SHERWOOD V, MANBODH R, SHEPPARD C, et al. *RASSF7* is a member of a new family of RAS association domain-containing proteins and is required for completing mitosis [J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(4): 1772-1782.
- [5] YOKOYAMA Y, SAKAMOTO T, SATO S, et al. Evaluation of cytoreductive surgery with pelvic and paraaortic lymphadenectomy and intermittent cisplatin-based combination chemotherapy for improvement of long-term survival in ovarian cancer [J]. Eur J Gynaecol Oncol, 1999, 20(5-6): 361-366.
- [6] JONES P A, BAYLIN S B. The fundamental role of epigenetic events in cancer [J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(6): 415-428.
- [7] HESSON L B, COOPER W N, LATIF F. The role of *RASSF1A* methylation in cancer [J]. Dis Markers, 2007, 23(1-2): 73-87.
- [8] 汪姗姗, 王宁, 于啸, 等. 宫颈癌细胞系*RASSF1A*基因启动子及第1外显子区甲基化状态的研究 [J]. 中国癌症杂志, 2013, 23 (10): 777-783.
- [9] HESSON L B, DUNWELL T L, COOPER W N, et al. The novel *RASSF6* and *RASSF10* candidate tumour suppressor genes are frequently epigenetically inactivated in childhood leukaemias [J]. Mol Cancer, 2009, 8: 42. doi: 10.1186/1476-4598-8-42.
- [10] SCHAGDARSURENGIN U, RICHTER A M, WOHLER C, et al. Frequent epigenetic inactivation of *RASSF10* in thyroid cancer [J]. Epigenetics, 2009, 4(8): 571-576.
- [11] HILL V K, UNDERHILL-DAY N, KREX D, et al. Epigenetic inactivation of the *RASSF10* candidate tumor suppressor gene is a frequent and an early event in gliomagenesis [J]. Oncogene, 2011, 30(8): 978-989.
- [12] HELMBOLD P, RICHTER A M, WALESCH S, et al. *RASSF10* promoter hypermethylation is frequent in malignant melanoma of the skin but uncommon in nevus cell nevi [J]. J Invest Dermatol, 2012, 132(3 Pt 1): 687-694.
- [13] D ANSRAN J AVIN T, W A G E N L E H N E R F, GATTENLOEHNER S, et al. Epigenetic down regulation of *RASSF10* and its possible clinical implication in prostate carcinoma [J]. Prostate, 2012, 72(14): 1550-1558.
- [14] LI Z, CHANG X, DAI D, et al. *RASSF10* is an epigenetically silenced tumor suppressor in gastric cancer [J]. Oncol Rep, 2014, 31(4): 1661-1668.
- [15] LU D, MA J, ZHAN Q, et al. Epigenetic silencing of *RASSF10* promotes tumor growth in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Discov Med, 2014, 17(94): 169-178.
- [16] WEI Z, CHEN X, CHEN J, et al. *RASSF10* is epigenetically silenced and functions as a tumor suppressor in gastric cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 432(4): 632-637.
- [17] JONES P A, LAIRD P W. Cancer epigenetics comes of age [J]. Nat Genet, 1999, 21(2): 163-167.
- [18] SANSOM O J, MENIEL V S, MUNCAN V, et al. *Myc* deletion rescues *Apc* deficiency in the small intestine [J]. Nature, 2007, 446(7136): 676-679.
- [19] HE T C, CHAN T A, VOGELSTEIN B, et al. *PPARdelta* is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs [J]. Cell, 1999, 99(3): 335-345.
- [20] KANWAR S S, YU Y, NAUTIYAL J, et al. The Wnt/ β -catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres [J]. Mol Cancer, 2010, 9: 212. doi: 10.1186/1476-4598-9-212.
- [21] HE T C, SPARKS A B, RAGO C, et al. Identification of *c-MYC* as a target of the APC pathway [J]. Science, 1998, 281(5382): 1509-1512.

(收稿日期: 2014-05-27 修回日期: 2014-07-11)