

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.11.015

UNC5C 基因启动子的甲基化状况与大肠癌 UNC5C 的相关性分析*

孙冬生¹,高春艳¹,王志刚²,刘 宁¹,贾风洁¹

(1. 河北省唐山市开滦总医院肿瘤科,河北唐山 063000;2. 内蒙古大学生命科学学院,内蒙古呼和浩特 010021)

[摘要] **目的** 探讨 UNC5C 基因启动子的甲基化状况与大肠癌 UNC5C 的相关性。**方法** 选择河北省唐山市开滦总医院肿瘤科 2010 年 2 月至 2013 年 3 月共 54 例散发性大肠癌及相关正常黏膜组织,以及 6 个大肠癌细胞株和纤维细胞株(FCL)作为研究对象。对研究对象实施基因 mRNA 和甲基化分析。**结果** UNC5A 和 UNC5B 的 mRNA,在所检测的大肠癌细胞株中均有表达。而 UNC5C 除 FCL 外,所有的癌细胞株中均无 mRNA 表达。在大肠癌组织中 UNC5C 的甲基化明显高于正常黏膜,差异有统计学意义($P<0.05$)。UNC5C 基因在 I~II 期,以及 III~IV 期的甲基化水平均显著高于未甲基化水平,均差异有统计学意义($P<0.05$)。依照 Spearman 法进行相关性分析,UNC5C 缺陷与大肠癌疾病呈正相关($r=0.856, P<0.05$)。**结论** Netrin-1 受体 UNC5C 缺陷与大肠癌具有一定相关性。

[关键词] Netrin-1 受体;UNC5C 缺陷;结直肠肿瘤;相关性

[中图分类号] R735.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)11-1487-03

Correlation analysis of methylation status of UNC5C gene promoter with colorectal cancer UNC5C*

Sun Dongsheng¹,Gao Chunyan¹,Wang Zhigang²,Liu Ning¹,Jia Fengjie¹

(1. Department of Oncology, Kailuan General Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. College of Life Science, Neimenggu University, Huhehaote, Neimenggu 010021, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between methylation status of UNC5C gene promoter with colorectal cancer UNC5C. **Methods** 54 cases of sporadic colorectal cancer and related normal mucosal tissue, as well as 6 colon cancer cell lines and fiber cell lines(FCL) in the oncology department of the Kailuan General Hospital from February 2010 to March 2013 were selected as the research objects and performed the mRNA and methylation analysis for exploring the correlation between the netrin-1 receptor UNC5C defects with colorectal cancer disease. **Results** mRNA of UNC5A and UNC5B was expressed in the detected colorectal cancer cell lines. Except FCL for UNC5C, all of the cancer cell lines had no mRNA expression. In colorectal cancer tissue, UNC5C methylation was significantly higher than that in the normal mucosa, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The methylation levels of UNC5C gene in the stage I to II, and the stage III to IV were significantly higher than non-methylation levels, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The correlation analysis by the Spearman method showed that the UNC5C defects was positively correlated with colorectal cancer disease ($r=0.856, P<0.05$). **Conclusion** Netrin-1 receptor UNC5C defect has certain correlation with colorectal cancer disease.

[Key words] Netrin-1 receptor; UNC5C defects; colorectal neoplasms; relevance

UNC5 同源蛋白(uncoordinated-5 homologue, UNC5H)是 Netrin-1 的一种依赖型受体,在缺少 Netrin-1 配体时,可诱导有关细胞凋亡,在与配体结合后通常可抑制凋亡。而 UNC5C 作为 UNC5H 家族的一员,主要位于人类染色体 4q21-q23。有研究报道,其广泛表达于正常细胞中,但在大肠癌和其他肿瘤组织内表达下降,表明 UNC5C 可发挥肿瘤抑制基因效果^[1]。本文旨在研究 UNC5C 缺陷与大肠癌的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择河北省唐山市开滦总医院肿瘤科 54 份散发性大肠癌及相关正常黏膜组织(石蜡标本),以及 6 个大肠癌细胞株(SW48、HCT116、DLD1、WiDr、LS174T、HT29)和纤维细胞株(fibroblast cell line, FCL)作研究对象。54 份标本均于该院从 2012 年 2 月到 2013 年 3 月行大肠癌手术的患者中

部分切除所得。其中男 34 例,女 20 例;年龄 32~83 岁,平均(59.5±2.2)岁。结肠癌 29 例,直肠癌 25 例。54 份标本均由病理学证实。患者在手术前无放、化疗及其他生物治疗史。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 全部标本均源于患者大肠癌组织(避免在肿瘤中心处的坏死区采集)及手术的切缘组织(取自标本的近切端相应切缘处)。标本在离体之后快速置于一196℃的液氮内冷冻,之后置于-85℃的冰箱内保存备用。另取部分组织放置在 10%中性甲醛液内固定并以石蜡包埋。

1.2.2 主要仪器及试剂 仪器:德国 Analytik Jena AG 公司的 flexcycler PCR 仪;美国 Bio-Rad 公司 PowerPac™ Basic Power Supply 型电泳仪;美国 Bio-Rad 公司 Sub-Cell GT 电泳槽;加拿大 Carestream 公司的 Gel Logic 212 PRO 型凝胶成像

* 基金项目:中国煤炭工业协会 2012 年度科学技术研究指导性计划项目(MTKJ 2012-420)。 作者简介:孙冬生(1963-),副主任医师,博士研究生,主要从事基因甲基化与肿瘤关系研究。

的分析系统;美国 Thermo 公司 Ulthro freeze 3410 超低温冰箱;中国宁波永新光学股份有限公司 NIB-100 型显微镜等。试剂:PCR 扩增引物中各序列均由上海英骏生物技术有限公司设计合成;琼脂糖产于美国的 Promega 公司;宝生物 NucleoSpin® RNA 试剂盒;宝生物 TEXPAT 试剂盒;PBS 液 0.1 mol, pH 为 7.2~7.4;SP9000 试剂盒;DAB 显色试剂盒等。

1.2.3 检测方法 对研究对象实施基因 mRNA 和甲基化分析,其中 RNA 提取使用宝生物 NucleoSpin® RNA 试剂盒,石蜡标本 DNA 提取使用宝生物 TEXPAT 试剂盒,严格按照试剂盒的说明书进行仔细操作。根据 RT-PCR 实验步骤对两者行电泳分析,其中甲基化引物使用 COBRA 法并结合重亚硫酸盐限制性内切酶法。

1.2.4 mRNA 引物 UNC5A:上游引物为 5'-TGA CCA CGG CCA ACT ACA CCT-3',下游引物为 5'-CCA GTG GGT GCA GTC CAG-3',退火温度 55℃,扩增长度为 142 bp,45 个循环。UNC5B:上游引物为 5'-CTG TCG GAC ACT GCC AAC TA-3',下游引物为 5'-CTG TCG GAC ACT GCC AAC TA-3',退火温度 55℃,扩增长度为 132 bp,45 个循环。UNC5C:上游引物为 5'-TGC AAA TGC TCG TGC TAC CT-3',下游引物为 5'-TGT GGT CCT TCT GAT GAA CCC-3',退火温度 55℃,扩增长度为 258 bp,45 个循环。Beta-actin:上游引物为 5'-TCA CCA TGG ATG ATG ATA TCG CC-3',下游引物为 5'-CCA CAC GCA GCT CAT TGT AGA AGG-3',退火温度 55℃,扩增长度为 294 bp,45 个循环。

1.2.5 甲基化引物 UNC5C:上游引物为 5'-TTT AGT GGG GTT TTT AGT TGT TTG-3',下游引物为 5'-TAT CCC AAT CCC AAT CCR CAA C-3',退火温度(循环次数)为 56℃(5),54℃(10),52℃(30),每次循环时间均为 30 s;产物长度(酶):125 bp(HhaI)酶 37℃,12 h。

1.2.6 测定标准 严格按照 SP9000、DAB 显色试剂盒说明书进行操作,PBS 振洗、DAB 显色后观察统计。于高倍镜下对每一切片挑选 10 个代表视野,并对每个视野中 100 个癌细胞进行计数,共计 1 000 个细胞。阳性染色信号主要定位于细胞质中,呈现为黄色颗粒,且界限清楚,并无明显的背景着色。阳性计分标准:(1)根据染色强度判定,0 分为无色;1 分为淡黄色;2 分为棕黄色;3 分为黄褐色。(2)根据阳性染色的细胞百分率判定,≤10%为 0 分;＞10%~50%为 1 分;＞50%~75%为 2 分;＞75%为 3 分。此两项得分所乘结果大于 3 分为阳性病例(记为+),≤3 分为阴性病例(记为-),最后通过两位资深病理医务人员以双盲法判定,所得一致意见即为最终结果。

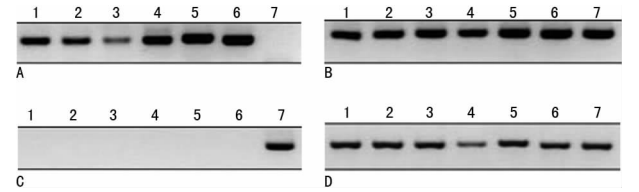
1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件分析,数据比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞株 mRNA 电泳及甲基化电泳结果 细胞株(SW48, HCT116, DLD1, WiDr, LS174T, HT29, FCL)mRNA 电泳结果显示,其中 UNC5A 除 FCL 外,其他指标均有表达;UNC5B 及 Beta-actin 各项指标均有表达,但 UNC5C 除 FCL 有表达外,其他各项指标均无表达(图 1)。细胞株 UNC5C 甲基化,大肠癌及正常组织的甲基化结果,见图 2、3。

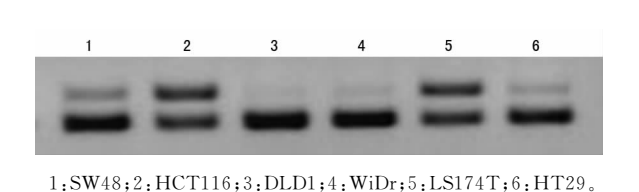
2.2 UNC5A、UNC5B 及 UNC5C 在大肠癌细胞株及 FCL 中

的表达比较 UNC5A 和 UNC5B 的 mRNA,在所检测的大肠癌细胞株中均有表达。而 UNC5C 除 FCL 外,所有的癌细胞株中均无 mRNA 表达,见表 1。



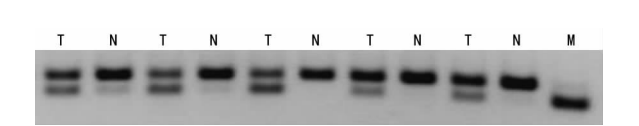
A: UNC5A; B: UNC5B; C: UNC5C; D: Beta-actin; 1: SW48; 2: HCT116; 3: DLD1; 4: WiDr; 5: LS174T; 6: HT29; 7: FCL。

图 1 细胞株 mRNA 电泳结果



1:SW48;2:HCT116;3:DLD1;4:WiDr;5:LS174T;6:HT29。

图 2 细胞株 UNC5C 的甲基化结果



T:大肠癌;N:正常组织;M:标记物。

图 3 大肠癌及正常组织的甲基化结果

表 1 UNC5A、B、C 的 mRNA 在两种细胞株中的表达比较

细胞株	个 数	UNC5A		UNC5B		UNC5C		Beta-actin	
		阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
大肠癌细胞株	6	0	6	0	6	6	0	0	6
FCL	1	1	0	0	1	0	1	0	1

2.3 UNC5C 在大肠癌组织及正常黏膜的甲基化情况比较 在大肠癌组织中 UNC5C 的甲基化明显高于正常黏膜,差异有统计学意义($\chi^2=52.90, P<0.05$)。提示 UNC5C mRNA 表达的缺失可能和基因启动子的甲基化有关,见表 2。

表 2 UNC5C 在两组组织中的甲基化比较[n(%), n=54]

组别	甲基化	未甲基化
大肠癌组织组	40(74.07) ^a	14(25.93) ^a
正常黏膜组	3(5.56)	51(94.44)

^a: $P<0.05$, 与正常黏膜组比较。

2.4 UNC5C 甲基化与肿瘤进展关系 UNC5C 基因在 I~II 期,以及 III~IV 期的甲基化水平均显著高于未甲基化水平,均差异有统计学意义($P<0.05$)。提示 UNC5C 基因甲基化于肿瘤早期即出现,且与肿瘤的进展程度无关,见表 3。

表 3 UNC5C 甲基化与肿瘤进展关系[n(%), n=54]

FIGO 分期	n	甲基化	未甲基化	χ^2	P
I~II 期	36	28(77.78)	8(22.22)	22.22	<0.05
III~IV 期	18	12(66.67)	6(33.33)	4.00	<0.05

2.5 UNC5C 缺陷与大肠癌疾病的相关性分析 依照 Spearman 法进行相关性分析,UNC5C 缺陷与大肠癌疾病呈正相关($r=0.856,P<0.05$)。提示 UNC5C 在大肠癌发生、发展中起着关键的调节作用。

3 讨 论

伴随大肠癌疾病发展,患者症状会逐渐显现,主要有腹痛、便血、肠梗阻以及腹部包块等症状,加之肿瘤转移和浸润将导致受累器官发生变化,对患者身体造成严重影响^[2-3]。UNC5H 在人类群体中,主要即为 UNC5A、C,编码产物均为 I 类跨膜蛋白,可由胞外区和跨膜区以及胞内区等功能区构成^[4]。

有资料表明,UNC5H 在除神经系统之外的其他大部分人体组织中均有表达^[5]。虽然国内外对于 UNC5H 在人体的表达有诸多报道,但关于 UNC5C 于大肠癌组织内表达的报道则较为少见。本研究结果发现,UNC5A 和 UNC5B 的 mRNA,在所检测的大肠癌细胞株中均有表达。而 UNC5C 除 FCL 外,所有的癌细胞株中均无 mRNA 表达。在大肠癌组织中 UNC5C 的甲基化明显高于正常黏膜,且 UNC5C 基因在大肠癌的 I~II 期,以及 III~IV 期的甲基化水平均显著高于未甲基化水平。表明 UNC5C 基因启动子的甲基化状况与 UNC5C mRNA 水平密切相关。同时,分析 UNC5C 基因启动子的甲基化状况与 UNC5C mRNA 水平的相关性发现,UNC5C 缺陷与大肠癌疾病呈正相关,与 Coissieux 等^[6]报道一致,这可能是因为 UNC5C 是一种条件性的抑癌基因,抑制肿瘤作用主要依赖于 Netrin-1 型配体,而后者常常仅局限在肠隐窝基底部位。Netrin-1 存在时,UNC5C 与之结合能够阻止细胞产生凋亡,此过程可能有 2 个步骤:(1)阻断 Caspases 切割受体胞内区,在 UNC5C 受体和 Netrin-1 结合之后,可诱导受体发生二聚化,促使其胞内区(含死亡域)产生结构变化,最终阻断 Caspases 切割。(2)触发了抗凋亡的信号通路。对于配体缺乏区,UNC5C 存在可诱导细胞产生凋亡,并直接促使细胞死亡及肿瘤退化。人类机体即可能利用此类机制对肿瘤浸润及转移产生抑制。但对于大肠癌患者而言,UNC5C 基因显著减少或是缺失,细胞凋亡水平下降,但细胞增殖却仍然较强,这就促使肿瘤浸润及转移变成了可能,因此在一定程度上导致了大肠癌疾病的发生和进展。

Hibi 等^[7]报道表明,人类大肠癌病患 UNC5C 基因的位点上含抑癌基因位点 LOH,加之该基因常常会产生错义突变,因此可能导致 UNC5C 表达减少。据统计,大于 80% 的直肠癌及大于 49% 的结肠癌患者机体中 UNC5C 的表达明显减少,这无法单纯依靠 LOH 加以解释,但因 Tanikawa 等^[8]已证实 UNC5B 基因为 p53 直接转录的目标,可调节 p53 所诱导的有关细胞凋亡。而对于 UNC5C 和 p53 之间是否亦存在此种联系,还需深入研究,有研究对诸多肿瘤患者研究后发现,p53 活性缺失与 UNC5C 表达缺陷呈正相关,而 UNC5C 表达缺陷亦与大肠癌疾病本身呈正相关联系^[9-14],与本文研究结果相一致,表明 Netrin-1 受体 UNC5C 缺陷与大肠癌具有一定相关性,值得临床重视。

参考文献

[1] 武洁,陈学军,薛占瑞,等. 大肠癌组织中 unc5c 基因启动子甲基化的分析[J]. 肿瘤防治研究,2010,37(6):683-686.

[2] 蔡艳,魏万里. 神经突起生长导向因子 Netrin-1 与肿瘤的关系[J]. 现代肿瘤医学,2013,21(4):878-880.

[3] 杨昀,王勇,杜燕,等. 轴突导向因子 netrin-1 在滋养层细胞侵袭中的作用[J]. 中华妇产科杂志,2009,44(2):131-134.

[4] 武洁,王光川,陈学军. UNC5C 蛋白在大肠癌中的表达及其与预后的关系[J]. 医学与哲学,2012,33(8):46-48.

[5] 文灿. 神经突起导向因子 Netrin-1 参与肿瘤发生研究进展[J]. 局解手术学杂志,2011,20(1):78-80.

[6] Coissieux MM,Tomsic J,Castets M,et al. Variants in the netrin-1 receptor UNC5C prevent apoptosis and increase risk of familial colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2011,141(6):2039-2046.

[7] Hibi K,Mizukami H,Shirahata A,et al. Aberrant methylation of the netrin-1 receptor genes UNC5C and DCC detected in advanced colorectal cancer[J]. World J Surg, 2009,33(5):1053-1057.

[8] Tanikawa C,Matsuda K,Fukuda S,et al. p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis[J]. Nat Cell Biol,2003,5(3):216-223.

[9] Hibi K,Sakata M,Sakuraba K,et al. Changes in UNC5C gene methylation during human gastric carcinogenesis[J]. Anticancer Res,2009,29(11):4397-4399.

[10] David W. Sharp. Personalized therapy arrives for patients with colorectal cancer[J]. SCI, 2009, 319(5322):1918-1920.

[11] Wetzel-Smith MK,Hunkapiller J,Bhangale TR,et al. A rare mutation in UNC5C predisposes to late-onset Alzheimer's disease and increases neuronal cell death[J]. Nat Med,2014,20(12):1452-1457.

[12] Kürý S,Garrec C,Airaud F,et al. Evaluation of the colorectal cancer risk conferred by rare UNC5C alleles[J]. World J Gastroenterol,2014,20(1):204-213.

[13] Daubaras M,Dal Bo G,Flores C,et al. Target-dependent expression of the netrin-1 receptor,UNC5C,in projection neurons of the ventral tegmental area[J]. Neuroscience, 2014,28(260):36-46.

[14] Purohit AA,Li W,Qu C,et al. Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM) associates with uncoordinated-5C (UNC5C) in netrin-1-mediated growth cone collapse[J]. J Biol Chem,2012,287(32):27126-27138.