

LGR5 启动子甲基化在胃癌中的表达

陈晓雨¹, 朱耀东², 喻鑫¹, 刘弋¹, 于东风¹

摘要 目的 探究富含亮氨酸的重复序列 G 蛋白偶联受体 5 (LGR5) 甲基化与胃癌发生及相关临床病理参数的关系。方法 利用多重 PCR 和 Methyl Target 技术, 计算 26 组胃癌标本 LGR5 启动子甲基化水平, 并与临床病理参数进行统计分析。结果 LGR5 甲基化水平在胃癌组织中显著降低, 并且与胃癌病理分期、浸润深度、肿瘤大小、淋巴转移、1 年内复发相关。结论 胃癌组织中的 LGR5 甲基化水平有助于胃癌的诊断及对病理参数的初步判断, 为预测短期复发提供参考, 并可能为治疗提供新的靶点。

关键词 胃癌; LGR5; 启动子; 甲基化

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)12-1952-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.023

2018 年全球范围内新增了 100 万名胃癌患者, 而且胃癌在恶性肿瘤中有着第五的发病率和第三的致死率, 高致死率主要是晚期诊断所致^[1], 为治愈带来了巨大的困难, 因此寻找胃癌新的肿瘤标志物及治疗靶点成为了当今的热点问题。富含亮氨酸的重复序列 G 蛋白偶联受体 5 (leucine-rich repetitive G protein-coupled receptor 5, LGR5) 是癌症干细胞 (cancer stem cell, CSC) 肿瘤标志物之一, 在胃癌的发生发展中起着重要作用^[2], 然而 LGR5 表达调控的潜在机制仍不明确。研究^[3]表明胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤 (CpG) 岛在不同基因启动子区域的高(低)甲基化, 可能是多种癌症中肿瘤发生的主要原因。Su et al^[3]发现在结直肠癌中 LGR5 启动子的甲基化控制 LGR5 的表达影响肿瘤的进展, 该研究探讨胃癌中是否存在类似的机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取安徽医科大学第一附属医院

2019-07-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81603439)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 普外科、² 中西医结合肿瘤科, 合肥 230022

作者简介: 陈晓雨 男 硕士研究生;

于东风 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 1162883225@qq.com

高新院区开诊半年内的胃癌手术病例 26 份, 胃癌确诊依据该院病理科提供的术前术后病理报告。将 26 份病例纳入随访, 随访时间 12 个月。肿瘤分期采用 TNM 分期法。纳入患者术前未接受新辅助化疗, 也没有合并其他恶性肿瘤。经安徽医科大学第一附属医院伦理委员会批准, 受试者知情同意并签署知情同意书。

1.2 材料和试剂 新鲜胃癌组织、癌旁组织、正常组织; EZ DNA 甲基化试剂盒(美国加利福尼亚 ZYMO 公司); TIANGEN 凝胶萃取装备(北京 TIAN-GEN 公司); 10 × 反应缓冲液及 HotStartTaq 聚合酶(大连 TaKaRa 公司)。

1.3 方法

1.3.1 提取基因组 DNA 采用标准苯酚-氯仿萃取法, 从胃癌、癌旁、正常组织中提取基因组 DNA。

1.3.2 亚硫酸盐修饰 利用 EZ DNA 甲基化试剂盒对提取后的基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐修饰, 将基因组 DNA 未被甲基化修饰的胞嘧啶 (C) 转化为尿嘧啶 (U)。

1.3.3 样本目标片段多重 PCR 反应 以亚硫酸氢盐处理过的 DNA 为模板, 使用优化后的多重聚合酶链式反应 (PCR) 引物, 以处理后的样品基因组为模板, 进行多重 PCR 扩增。经质控后, 将以同一个样品基因组 DNA 为模板的所有多重 PCR 引物的扩增产物混合, 并确保每个位点引物扩增产物的量相当。引物序列 (5'→3') F: GGTTTTYGGAGTAGTTTTGGTT-GT R: ATAAAACCRAACRAAAAATACCTAAAAA。

1.3.4 样本添加特异性标签序列 利用带有 Index 序列的引物, 通过 PCR 扩增向文库末端引入和 Illumina 平台兼容的特异性标签序列。反应采用 11 个循环数的 PCR 程序, 尽可能降低 PCR 的倾向性。

1.3.5 定量后上机测序 将所有样品 Index PCR 扩增产物等量混合, 并经割胶回收获得最终的 Methyl Target 测序文库, 文库的片段长度分布经 Agilent 2100 生物分析仪验证。文库摩尔浓度精确定量后, 最终于 IlluminaHiSeq 平台, 以 2 × 150 bp 的双端测序模式进行高通量测序, 获得数据。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件, 将计

量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较(分类资料)采用 Fisher 确切概率法统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 本次研究中共纳入 26 份胃癌病例,其中男女比为 9:4,肿瘤位于贲门胃底胃体部与幽门部的病例数基本相等,III ~ IV 期患者占 38.46%,分化好的胃癌仅占 30.77%,癌胚抗原(CEA)阳性的患者也仅占 26.92%,其中 19.23% 的患者 1 年内发现肿瘤的复发。见表 1。

2.2 LGR5 在胃癌标本不同位置的甲基化 测定并计算胃癌组织、癌旁组织、正常组织扩增子中不同位点 LGR5 启动子 CpG 位点的甲基化水平(甲基化水平 = 该位点甲基化的 reads 数目/该位点总的 reads 数目),结果每组胃癌组织中每个 LGR5 测量位点甲基化水平明显降低,其中 1 例见图 1,测定位点数为 15。另外以扩增子为单位,分析胃癌组织、癌旁组织、正常组织中 LGR5 启动子 CpG 位点的单倍型,结果亦得出每组胃癌组织中 LGR5 甲基化水平明显降低。见图 2。注:单倍型类型,假设扩增子序列(5'→3')为:ATCATXGATCXGCTAXGCTTTAXGCCTAT,X 可为 c(甲基化修饰)或 t(未甲基化修

饰),其中一条测序的 read 为:ATCATCGATCTGC-TACGCTTTATGCCTAT,则该 read 对应的扩增子甲基化单倍型为:CTCT。

2.3 LGR5 甲基化与胃癌临床病理参数关系 测定胃癌组织的 LGR5 启动子区域 CpG 岛甲基化水平,LGR5 的甲基化水平较高预示着病理分期早、浸润深度浅、肿瘤小、无淋巴转移、1 年内复发率低,见表 1。

表 1 LGR5 甲基化与胃癌临床病理参数关系

临床病理参数	n	LGR5 甲基化水平	
		>0.032 4	P 值
总数	26	15	
性别			0.380 124 453
男	18	11	
女	8	4	
年龄(岁)			0.485 346 215
≥60	22	13	
<60	4	2	
部位			0.304 222 910
贲门胃底胃体	14	9	
幽门部	12	6	
肿瘤分期			0.000 003 164
I、II	16	14	
III、IV	10	1	
肿瘤深度			0.000 382 808
T1、T2	14	12	
T3、T4	12	3	
肿瘤大小(cm)			0.000 180 555
<5	21	15	
≥5	5	0	
病理分级			0.422 767 993
分化好	8	4	
分化差	18	11	
神经侵犯			0.189 748 674
阳性	16	8	
阴性	10	7	
脉管癌栓			0.250 758 100
阳性	14	7	
阴性	12	8	
淋巴结			0.000 007 270
阳性	16	5	
阴性	10	10	
远处转移			0.052 594 442
有	3	0	
无	23	15	
CEA			0.059 609 137
阳性	7	2	
阴性	19	13	
1年内有无复发			0.004 034 059
有	5	0	
无	21	15	

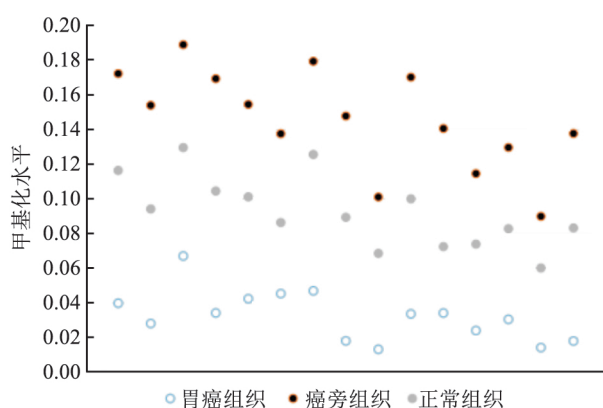


图 1 LGR5 在不同组织中的甲基化水平

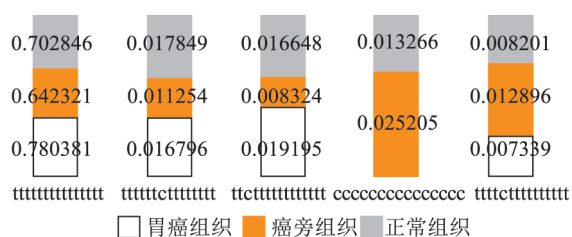


图 2 不同组织中 LGR5 启动子 CpG 位点的单倍型

3 讨论

癌症起源于多种遗传和表观遗传学变化的累积,受影响器官中的干细胞最有可能是癌症的起源细胞,因为它们能够自我更新并在多细胞分裂后长时间存活^[4]。CSC 是一部分起源于未调控的干细胞或去分化的祖细胞并具有自我更新能力的细胞,同时拥有干细胞和上皮间充质转换特征^[5]。一系列的证据表明 CSC 负责肿瘤的发生、发展、维持、侵袭、转移、再生、耐药^[3],对于胃癌干细胞现已证实的标记物有分化抗体群(cluster of differentiation, CD)44、CD24、CD133、LGR5、结合转录因子 4、上皮细胞粘附分子、乙醛脱氢酶 1 等^[2]。

先前有研究^[6-7]表明,LGR5 在胃癌中表达增高,并与 TNM 分期与淋巴转移相关,可作为胃癌侵袭、预后、抗幽门螺杆菌治疗疗效评估的指标。LGR5+ 细胞是胃癌的起源细胞,胃主细胞表达 LGR5,并定植在腺体基底部,可作为上皮损伤后的储备干细胞^[4]。LGR5 可激活 WNT/ β -连环蛋白通路, β -连环蛋白在细胞核中积累,调控多种靶基因的表达,影响胃癌的发生发展^[8]。目前针对结直肠癌以及卵巢上皮癌的研究得出 LGR5 启动子 CpG 岛甲基化程度与肿瘤的发生、相关病理参数、良好的预后负相关^[4,9]。在此,该文探究 LGR5 启动子 CpG 岛甲基化水平在胃癌中是否有相似的关系。

目前测定 DNA 甲基化仍多通过传统方法,如甲基化特异 PCR 和亚硫酸氢盐测序法的方法实现,通量小,且无法准确计算位点/区域的甲基化水平。该研究利用多重 PCR 和 Methyl Target 技术,实现对多个特定 CpG 岛同时捕获测序,并凭借高深度测序数据,能够准确计算每个 CpG 位点的甲基化水平,准确性高,灵活性强。通过对 26 组标本进行测序并与相关临床资料进行统计分析,得出 LGR5 的甲基化水平与胃癌病理分期、浸润深度、肿瘤大小、淋巴转移、1 年内复发呈负相关。以此推断 LGR5 启动子区域 CpG 岛甲基化水平下降导致 LGR5 表达增强,下调了 CSC 的分化,促进了胃癌的生长、转移、再生。与以往关于 LGR5 在胃癌 CSC 表达的研究结果^[7,10-11]基本一致。既往研究^[10]表明分化较差、弥漫性、肠型及有远处转移的胃癌组织中 LGR5 表达较高,与该研究的结果不相符,可能是纳入样本量较少造成了偏倚。并且在临床中有部分 IV 期患者放弃手术治疗,也可能导致了误差。另外,临床上认为 CEA 对于胃癌的诊断并没有特异性,仅作为判断预

后和治疗效果的参考指标,而该研究结果亦显示 LGR5 启动子区域 CpG 岛甲基化水平与患者血清 CEA 水平并没有表现出相关性。

上文提到 LGR5 与 WNT/ β -连环蛋白通路密切相关,在胃癌中 WNT 信号通路的活动水平增强^[7],结合该研究结果,可能是 LGR5 启动子甲基化水平降低所致。LGR5 的表达与胃癌血管形成正相关,与表达在小鼠胚胎的肿瘤坏死因子受体超家族成员负相关,与“叉头”蛋白 O1 负相关,与“刺猬”基因/锌指转录因子 2 信号通路负相关,与锌指蛋白 3 负相关,与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白正相关,与 R-脊椎蛋白正相关,与双肾上腺皮质激素样激酶 1 正相关,与重组人 Nanog 同源框假基因 8 正相关,与 Notch 信号通路正相关^[5,7,9-12]。但这些因子或信号通路与 LGR5 甲基化的关系还未阐明,具有较好的研究前景。然而,DNA 甲基化并不是调节 CSC 的唯一分子机制,组蛋白修饰、microRNA、染色体重塑等也可能在癌变中发挥作用^[3]。

抗 LGR5 抗体缀合物及一些中药如胃痞消与胃癌组织中 LGR5 的表达存在一定的相关性^[13-14]。需要进一步研究这些药物及新的药物与 LGR5 甲基化的关系,为临床药物治疗及新药上市提供依据。

综上,胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一,该研究用定量的方法计算出 LGR5 在胃癌组织中的甲基化水平明显降低,而且 LGR5 的甲基化水平与胃癌病理分期、浸润深度、肿瘤大小、淋巴转移、1 年内复发相关。但是本次结果需要更大的样本量进一步证实,而且与 WNT/ β -连环蛋白通路及其它相关因子的关系还有待探究,以此为胃癌的治疗提供依据及新的方向。

参考文献

- [1] Song M, Rabkin C S. Gastric Cancer: an evolving disease [J]. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 2018, 16(4): 561-9.
- [2] Shamai Y, Alperovich D C, Yakhini Z, et al. Reciprocal reprogramming of cancer cells and associated mesenchymal stem cells in gastric cancer [J]. *Stem Cells* 2019, 37(2): 176-89.
- [3] Su S, Hong F, Liang Y, et al. Lgr5 methylation in cancer stem cell differentiation and prognosis-prediction in colorectal cancer [J]. *PLoS One* 2015, 10(11): e0143513.
- [4] Hata M, Hayakawa Y, Koike K. Gastric stem cell and cellular origin of cancer [J]. *Biomedicine* 2018, 6(4): pii:100.
- [5] Ma X, Wang B, Wang X, et al. NANOGP8 is the key regulator of stemness, EMT, Wnt pathway, chemoresistance, and other malignant phenotypes in gastric cancer cells [J]. *PLoS One*, 2018, 13

(下转第 1959 页)

oma tissues was detected by immunohistochemistry SP method, and collect the clinical data, analyzed the relationship between the expression of Survivin and EphA2 and the prognosis of the patients. The expressions of EphA2 and Survivin proteins were detected by Western blot according to meningioma classification. **Results** With the increase of grade I, II and III of meningioma, the positive rate of EphA2 and Survivin expression in meningioma gradually increased, and it was correlated with the recurrence of meningioma ($P < 0.01$). Western blot confirmed that the expressions of EphA2 and Survivin proteins were correlated with the pathological grading of meningioma. **Conclusion**

The apoptotic inhibitory protein Survivin and VM-related protein EphA2 are involved in the progression and prognosis of meningioma.

Key words meningioma; angiogenic mimicry; apoptotic inhibitory protein; EphA2; Survivin

(上接第 1954 页)

(4): e0192436.

- [6] Yong X, Tang B, Xiao Y F, et al. *Helicobacter pylori* upregulates Nanog and Oct4 via Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote cancer stem cell-like properties in human gastric cancer[J]. *Cancer Lett* 2016, 374(2): 292–303.
- [7] Xi H Q, Zhang K C, Li J Y, et al. RNAi-mediated inhibition of Lgr5 leads to decreased angiogenesis in gastric cancer[J]. *Oncotarget* 2017, 8(19): 31581–91.
- [8] Huang T, Qiu X, Xiao J, et al. The prognostic role of Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 in gastric cancer: a systematic review with meta-analysis[J]. *Clin Res Hepatol Gas* 2016, 40(2): 246–53.
- [9] Kalantari E, Asadi Lari M H, Roudi R, et al. Lgr5High/DCLK1High phenotype is more common in early stage and intestinal subtypes of gastric carcinomas[J]. *Cancer Biomark Markers* 2017, 20(4): 563–73.
- [10] Saberi S, Piryaei A, Mirabzadeh E, et al. Immunohistochemical analysis of LGR5 and TROY expression in gastric carcinogenesis demonstrates an inverse trend[J]. *Iran Biomed J*, 2019, 23(2): 107–20.
- [11] Choi Y, Park J, Ko Y S, et al. FOXO1 reduces tumorsphere formation capacity and has crosstalk with LGR5 signaling in gastric cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(3): 1349–55.
- [12] Qin H, Cai A, Xi H, et al. ZnRF3 induces apoptosis of gastric cancer cells by antagonizing Wnt and Hedgehog signaling[J]. *Panminerva Med* 2015, 57(4): 167–75.
- [13] Gong X, Azhdarinia A, Ghosh S C, et al. LGR5-targeted antibody-drug conjugate eradicates gastrointestinal tumors and prevents recurrence[J]. *Mol Cancer Ther* 2016, 15(7): 1580–90.
- [14] Zeng J H, Pan H F, Liu Y Z, et al. Effects of Weipixiao (胃痞消) on Wnt pathway-associated proteins in gastric mucosal epithelial cells from rats with gastric precancerous lesions[J]. *Chin J of Integr Med* 2016, 22(4): 267–75.

Expression of LGR5 promoter methylation in gastric cancer

Chen Xiaoyu¹, Zhu Yaodong², Yu Xin¹, et al

(¹Dept of General Surgery, ²Dept of Chinese Integrative Medicine Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the relationship between methylation of leucine-rich repetitive G protein-coupled receptor 5 (LGR5) and gastric carcinogenesis and related clinicopathological parameters. **Methods** The methylation levels of LGR5 promoter in 26 groups of gastric cancer specimens were calculated by multiplex PCR and Methyl Target technique, and the clinical and pathological parameters were analyzed. **Results** The methylation level of LGR5 was significantly decreased in gastric cancer tissues, and correlated with pathological stage, depth of invasion, tumor size, lymphatic metastasis and recurrence within one year. **Conclusion** The methylation level of LGR5 in gastric cancer tissues is helpful for the diagnosis of gastric cancer and the preliminary judgement of pathological parameters. It provides a reference for predicting short-term recurrence and a new target for treatment.

Key words gastric cancer; LGR5; promoter; methylation