

基因甲基化导致鼻咽癌组织 14-3-3 σ 表达下调*

谭双香^{1,2)**} 李君^{1)**} 易红¹⁾ 汤参娥¹⁾ 程爱兰¹⁾ 陈主初¹⁾ 李建玲¹⁾ 肖志强^{1)***}

(¹中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008; ²湖南省老年医院-湖南省老年医学研究所, 长沙 410016)

摘要 为探讨 14-3-3 σ 基因甲基化在鼻咽癌发病中的作用, 以 75 例鼻咽癌活检组织和 25 例正常鼻咽黏膜活检组织作为研究对象, 采用甲基化特异性聚合酶链式反应 (MSP) 检测 14-3-3 σ 基因甲基化状态, 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测 14-3-3 σ mRNA 表达, 免疫组织化学染色检测 14-3-3 σ 蛋白质表达。结果发现, 鼻咽癌组织 14-3-3 σ 基因完全甲基化、不完全甲基化和未甲基化的例数分别为 4 例、59 例和 12 例, 正常鼻咽黏膜组织不完全甲基化和未甲基化的例数分别为 7 例和 18 例, 鼻咽癌 14-3-3 σ 基因甲基化频率显著高于正常鼻咽黏膜组织 (84% vs 28%, $\chi^2=28$, $P<0.05$)。RT-PCR 和免疫组织化学染色结果显示: 14-3-3 σ 基因完全甲基化的组织样本无 14-3-3 σ 表达, 不完全甲基化的组织样本 14-3-3 σ 表达显著降低, 14-3-3 σ 基因甲基化与鼻咽癌淋巴结转移及鼻咽癌临床分期正相关。研究结果表明, 鼻咽癌组织 14-3-3 σ 基因存在高频甲基化, 14-3-3 σ 基因甲基化导致 14-3-3 σ 表达降低或缺失, 14-3-3 σ 表达水平与鼻咽癌淋巴结转移及其临床分期相关。

关键词 鼻咽肿瘤, 表观遗传学, 基因表达, 甲基化, 14-3-3 σ

学科分类号 Q5, R73, R76

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00690

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方地区常见的一种恶性肿瘤, 发病率和死亡率均居世界首位, 严重威胁我国人民的生命和健康, 但 NPC 的发病机制仍然不清楚。肿瘤是多基因参与、多阶段的复杂过程, 其中癌基因的激活和抑癌基因的失活是肿瘤发生与发展的重要原因, 而脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)甲基化又是抑癌基因失活的重要机制之一, 它在多阶段癌变过程中发挥重要的作用^[1~3]。

14-3-3 σ 是一种重要的细胞周期负调节蛋白, 受 p53 直接转录调控, 而且能正反馈增强 p53 的活性, 通过 G2/M 期限制点对细胞周期发挥负性调控作用^[4]。研究表明, 在许多人类肿瘤如乳腺癌、前列腺癌、皮肤癌、口腔鳞癌和甲状腺癌中 14-3-3 σ 基因均存在高频甲基化, 并导致其表达缺失/下调, 参与肿瘤的发生发展^[5], 但有关 NPC 14-3-3 σ 基因的甲基化研究未见报道。

Yang 等^[6]的研究显示, 上调 14-3-3 σ 的表达能够抑制 NPC 细胞株的体外生长和体内致瘤能力, 提示 14-3-3 σ 在 NPC 中可能表达下调并发挥致瘤作用。中南大学卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室通过显微切割蛋白质组学研究发现, NPC 组织中

14-3-3 σ 表达降低/缺失^[6], 并推测 14-3-3 σ 表达降低/缺失可能与基因甲基化有关, 本研究通过检测 NPC 组织和正常鼻咽黏膜组织 14-3-3 σ 基因甲基化状态及其表达水平, 分析 14-3-3 σ 基因甲基化与其表达和 NPC 临床病理特征的关系, 揭示 14-3-3 σ 基因甲基化在 NPC 发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本. 鼻咽癌活检组织 75 例(男 49 例, 女 26 例, 年龄 46 $\pm$ 10 岁)、正常鼻咽上皮活检组织 25 例(男 16 例, 女 9 例, 年龄 48 $\pm$ 8 岁)来源于中南大学湘雅医院耳鼻喉科门诊, 同一人的组织标本分为 3 份, 分别用于甲基化特异性聚合酶链式反应(methylation specific polymerase chain reaction,

* 教育部跨世纪优秀人才培养计划基金(教育部科技函[2002]48), 湖南省科技重点科研项目(06SK2004)和芙蓉学者特聘教授科学研究基金(湘教通[2007]362 号)资助项目。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0731-4327239, E-mail: zqxiao2001@hotmail.com

收稿日期: 2008-10-09, 接受日期: 2008-11-25

MSP)、逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcriptional polymerase chain reaction, RT-PCR)和免疫组化分析. 所有临床标本均经病理学证实, 鼻咽癌组织为低分化鳞癌或未分化癌. 两组研究对象的性别和年龄无显著性差异(χ^2 检验, $P > 0.05$).

1.1.2 试剂. 重亚硫酸钠、氢醌、琼脂糖和焦碳酸二乙酯购自 Sigma 公司, DNA 抽提试剂盒(Genomic DNA purification kit)和 DNA 纯化试剂盒(DNA Clean-up System)购自 Promega 公司, 核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)抽提试剂盒 Trizol 购自 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒、DNA Marker、Taq 酶购自 Takara 公司, 小鼠抗人 14-3-3 σ 单克隆抗体、生物素标记的羊抗小鼠 IgG 二抗购自 Abcam 公司, 即用型免疫组织化学超敏检测试剂盒(UltraSensitive™ SP)和 DAB 显色剂购自福州迈新生物技术开发公司.

1.1.3 PCR 引物. 14-3-3 σ cDNA RT-PCR 扩增引物序列参照文献[7], 正向和反向引物序列分别为 5' CCTGCTGGACAGCCACCTCA 3' 和 5' TGTCG-GCCGTCCACAGTGTC 3', 产物长度为 398 bp. 实验扩增磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) cDNA 作为内对照, 其 RT-PCR 扩增引物采用 Primer3 v. 0.4.0 引物设计软件自行设计, 正向和反向引物序列分别为 5' GTCAGTGGTGGACCTGACCT 3' 和 5' TGAG-GAGGGGAGATTCAGTG 3', 产物长度为 400 bp. 14-3-3 σ 基因 MSP 扩增引物序列参照文献[7]. 扩增甲基化 DNA 片段的正向和反向引物序列分别为 5' TGGTAGTTTTTATGAAAGGCGTC 3' 和 5' CCTCTAACCGCCACCACG 3', 产物长度为 104 bp; 扩增非甲基化 DNA 片段的正向和反向引物序列分别为 5' ATGGTAGTTTTTATGAAAGGTGTT 3' 和 5' CCCTCTAACCACCCACCACA 3', 产物长度为 106 bp. PCR 引物委托 Takara 公司合成.

1.2 方法

1.2.1 MSP 检测 14-3-3 σ 基因甲基化. MSP 简要步骤述如下. a. 取活检组织约 10 mg, 参照 Genomic DNA Purification Kit 试剂盒说明提取基因组 DNA, 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性, -80°C 保存备用. b. 重亚硫酸钠修饰 DNA: 2 μg DNA 稀释于 50 μl 水中, 加入 5.5 μl 新鲜配制的 3 mol/L 氢氧化钠, 42°C 变性 30 min, 再加入 520 μl 新鲜配置的 3.6 mol/L pH 5.0 的重亚硫酸钠和 10 mol/L 氢醌 30 μl , 石蜡油覆盖避光 55°C 水浴

16 h. c. DNA 纯化: 参照 DNA Clean-up System 试剂盒说明进行 DNA 纯化回收, 重悬于 50 μl 水中, -80°C 保存备用. d. PCR 扩增: 25 μl 的 PCR 反应体系中依次加入双蒸水 17 μl 、10 $\times$ 缓冲液 2.5 μl 、dNTP 1.0 μl 、甲基化或非甲基化上下游引物各 0.75 μl 、DNA 模板 1.5 μl 、 MgCl_2 1.50 μl . PCR 反应条件如下: 95°C 预变性 5 min 后加入 Taq 酶 1.5 U, 然后 95°C 变性 30 s, 59°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 6 min. e. 取 5.0 μl PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 溴化乙锭)电泳, 以 DL2000 Marker 作为分子质量标准, 紫外凝胶成像系统扫描采集图像. 所有标本均重复 MSP 一次.

1.2.2 RT-PCR 检测 14-3-3 σ mRNA 表达. RT-PCR 简要步骤述如下. a. 取活检组织约 10 mg, Trizol 一步法抽提组织细胞总 RNA, 溶解于经焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的去离子水中, -80°C 保存备用. b. 取 2.0 μg RNA 样品, 参照 RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录和 PCR 扩增, 14-3-3 σ cDNA 扩增 35 个循环, GAPDH cDNA 扩增 25 个循环作为内对照. c. 取 5 μl PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 以 DL2000 Marker 作为分子质量标准, 紫外凝胶成像系统扫描采集图像, 利用图像分析系统(上海 Tanon Gis-2010)对扩增产物条带进行吸光度值半定量, 以 14-3-3 σ 扩增条带与 GAPDH 扩增条带吸光度值比作为 14-3-3 σ mRNA 表达的相对强度.

1.2.3 免疫组织化学染色检测 14-3-3 σ 蛋白表达. 活检组织经 4% 多聚甲醛固定 3h, 常规脱水透明后石蜡包埋切片, 按照免疫组织化学超敏试剂盒说明书步骤进行操作, 一抗浓度稀释比例为 1:125, DAB 显色, 苏木素复染, 以磷酸盐缓冲液替代一抗作为阴性对照. 阳性信号表达部位为细胞膜和细胞浆. 随机选取至少 10 个高倍镜视野($\times 200$), 至少计数 1 000 个细胞, 以积分法计算结果^[8]. 即根据每张切片的染色强度和阳性细胞比例计分. 着色强度: 无色 0 分; 浅黄色 1 分; 棕黄色 2 分; 棕褐色 3 分. 着色细胞比例: 无着色 0 分; $< 30\%$ 为 1 分; $30\% \sim 60\%$ 为 2 分; $\geq 60\%$ 为 3 分. 两者相加 0~2 分为阴性; 3~4 分为阳性; 5~6 分为强阳性.

1.2.4 统计学分析. 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用 t 检验; 组间计数资料比较采用 χ^2 检验; 非计量指标相关性分析采用等级相关分析方法; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结 果

2.1 鼻咽癌组织中 14-3-3 σ 基因存在高频甲基化

凝胶电泳分离每例组织标本的 MSP 产物, 观察目的条带, 甲基化引物和非甲基化引物均能扩增出目的条带表示 14-3-3 σ 基因不完全甲基化, 仅甲基化引物能扩增出目的条带表示 14-3-3 σ 基因完全甲基化, 仅非甲基化引物能扩增出目的条带表示

14-3-3 σ 基因未甲基化(图 1)。鼻咽癌 14-3-3 σ 基因完全甲基化、不完全甲基化和未甲基化的例数分别为 4 例、59 例和 12 例; 正常鼻咽黏膜组织未检测到 14-3-3 σ 基因完全甲基化病例, 不完全甲基化和未甲基化的例数分别为 7 例和 18 例。鼻咽癌和正常鼻咽黏膜组织 14-3-3 σ 基因甲基化频率分别为 84% 和 28%, 前者显著高于后者($\chi^2 = 28, P < 0.05$)。

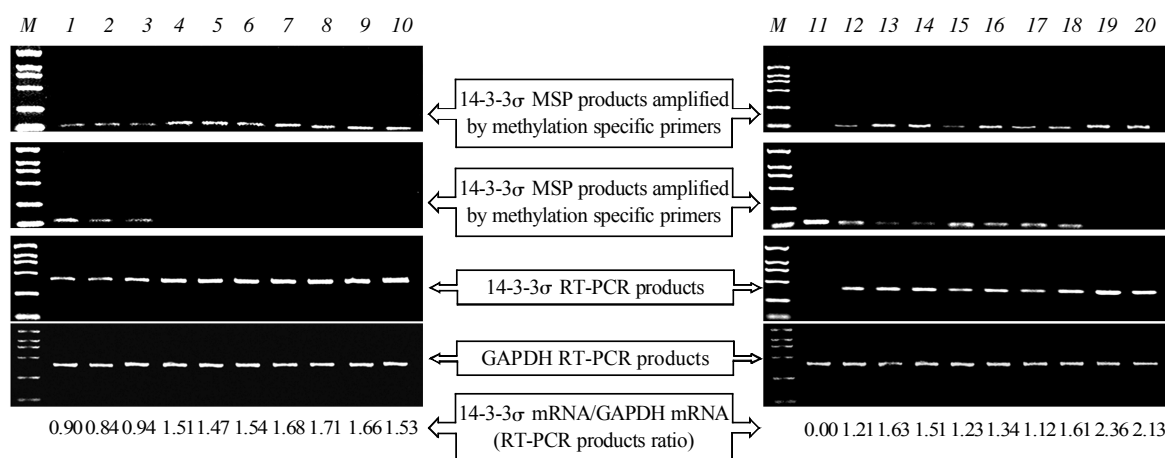


Fig. 1 Representative results of 14-3-3 σ MSP and RT-PCR in nasopharyngeal carcinomas and normal nasopharyngeal mucosal tissues

1~10: Normal nasopharyngeal mucosal tissues. 11~20: Nasopharyngeal carcinoma tissues. M: DL 2000 Marker(100 bp, 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1 000 bp and 2 000 bp). 4~10 and 19~20: From tissues with unmethylated 14-3-3 σ gene and 14-3-3 σ mRNA expression was relatively high. 1~3 and 12~18: From tissues with partial methylated 14-3-3 σ gene and 14-3-3 σ mRNA expression was decreased when compared with 14-3-3 σ gene unmethylated tissues. 11: From tissues with exhaustive methylated 14-3-3 σ gene and 14-3-3 σ mRNA expression was absent.

2.2 14-3-3 σ 基因甲基化使其 mRNA 表达水平缺失或下调

14-3-3 σ 基因甲基化水平与其 mRNA 表达强度有关, 14-3-3 σ 基因完全甲基化的标本 mRNA 表达缺失, 不完全甲基化的标本 mRNA 表达水平出现不同程度降低(图 1)。为避免组织学差异对 14-3-3 σ 表达结果造成偏倚, 我们对鼻咽癌和正常黏膜组织的结果分别进行分析。鼻咽癌组 4 例 14-3-3 σ 基因完全甲基化的标本未检测到 14-3-3 σ mRNA, 14-3-3 σ 基因不完全甲基化标本的 mRNA 表达强度显著低于未甲基化标本(1.36 ± 0.43 vs 2.07 ± 0.32 , $t = 5.41, P < 0.05$)。对照组 14-3-3 σ 基因不完全甲基化标本和未甲基化标本的 mRNA 表达强度分别为 0.83 ± 0.25 和 1.52 ± 0.33 , 前者显著低于后者($t = 4.91; P < 0.05$)。结果说明: 在鼻咽癌和正常

黏膜组织中, 14-3-3 σ 基因甲基化使其 mRNA 表达缺失或下调。

2.3 14-3-3 σ 基因甲基化使其蛋白质表达水平缺失或下调

14-3-3 σ 免疫组织化学染色结果显示, 信号强度与 14-3-3 σ 基因甲基化状况相关, 14-3-3 σ 基因完全甲基化的标本染色均为阴性, 14-3-3 σ 基因不完全甲基化的标本染色强度大部分为阳性, 14-3-3 σ 基因未甲基化的标本染色强度大部分为强阳性, 三组间的免疫组织化学染色结果具有统计学差异($P < 0.05$)(图 2, 表 1), 说明 14-3-3 σ 基因甲基化水平与其蛋白质表达强度有关, 完全甲基化的标本蛋白质表达缺失, 不完全甲基化的标本蛋白质表达水平出现不同程度降低。

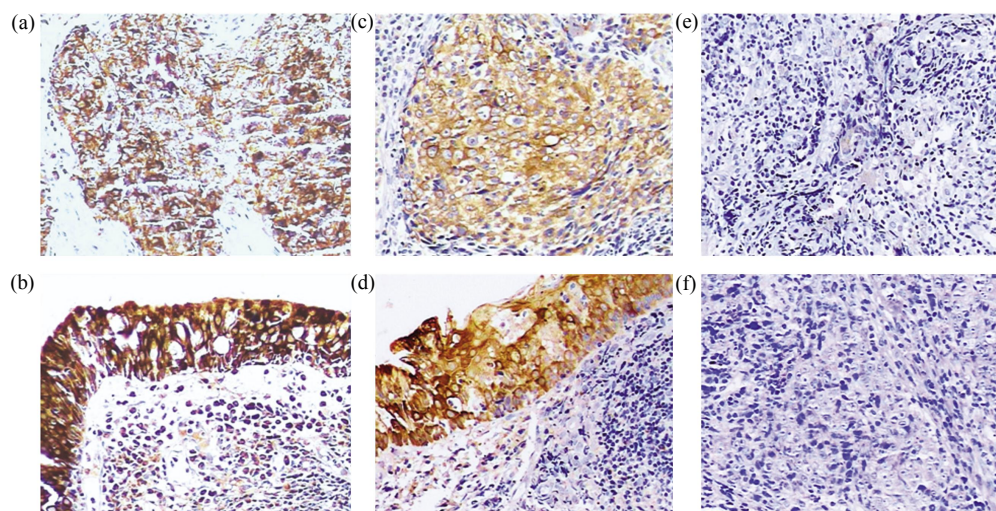


Fig. 2 Representative results of 14-3-3 σ immunohistochemical staining

(a), (c), (e) and (f): Nasopharyngeal carcinoma tissues. (b) and (d): Normal nasopharyngeal mucosal tissues. In tissue (a) and (b), 14-3-3 σ gene was unmethylated and its protein expression was strongly positive; in tissue (c) and (d), 14-3-3 σ gene was partial methylated and its protein expression was positive; in tissue (e), 14-3-3 σ gene was exhaustive methylation and its protein expression was negative. (f) was for negative control. Original magnification: $\times 100$.

Table 1 The relationship between 14-3-3 σ gene methylation status and immunohistochemical staining result

Tissue source	Methylation status	Immunohistochemical staining result			<i>P</i>
		Negative	Positive	Strong-positive	
Nasopharyngeal Carcinoma	UM	0	3	9	0.00
	PM	15	43	1	
	EM	4	0	0	
Normal	UM	0	4	14	0.00
Nasopharyngeal	PM	0	4	3	
Mucosa	EM	0	0	0	

UM: Unmethylation; PM: Partial methylation; EM: Exhaustive methylation.

2.4 14-3-3 σ 基因甲基化与鼻咽癌淋巴结转移和临床分期相关

14-3-3 σ 基因甲基化与 NPC 患者的性别、年龄、原发肿瘤分期、区域淋巴结转移、肿瘤远处转移、肿瘤临床分期的相关性分析见表 2。结果表明：14-3-3 σ 基因甲基化状态与患者性别、年龄、原发肿瘤分期、肿瘤远处转移无相关性，但与区域淋巴结转移和肿瘤临床分期相关。12 例 14-3-3 σ 基因未甲基化患者只有 1 例出现淋巴结转移，59 例不完全甲基化患者中 42 例出现淋巴结转移，而 4 例完全甲基化患者全部出现淋巴结转移，且区域淋巴结转移分期都大于或等于 2。临床分期显示 14-3-3 σ 基因甲基化患者在 II 期及以上临床分期中的比例大于 14-3-3 σ 基因未甲基化患者 ($P < 0.05$)。

Table 2 The result of correlation analysis between 14-3-3 σ gene methylation status and NPC clinical pathological features

Clinical pathological feature		Methylation status			<i>P</i>
		UM	PM	EM	
Gender	Male	9	37	3	0.65
	Female	3	22	1	
Age	< 45y	7	28	1	0.52
	$\geq 45y$	5	31	3	
Tumor	T1	3	21	3	0.20
	T2	4	30	1	
	T3	2	3	0	
	T4	3	5	0	
Lymphnode	N0	11	17	0	0.00
	N1	0	17	0	
	N2	1	21	1	
	N3	0	4	3	
Metastasis	M0	12	58	4	0.84
	M1	0	1	0	
Clinical staging	I	3	5	0	0.02
	II	4	27	0	
	III	2	19	1	
	IV	3	8	3	

UM: Unmethylation, PM: Partial methylation, EM: Exhaustive methylation.

3 讨 论

14-3-3 蛋白是一个序列保守、分子质量 28~33 ku 的酸性多肽家族。哺乳类动物的 14-3-3 蛋白家族至少包括 σ 、 β 、 ε 、 γ 、 η 、 τ 和 ζ 7 个成员, 能够与细胞内 200 多种蛋白质结合, 参与细胞信号传导、周期调控、生长、分化、存活、凋亡、恶性转化、迁移等多种细胞生命活动, 在肿瘤的发生发展中发挥多方面作用^[9]。14-3-3 σ 主要在上皮细胞中表达, 并在多种肿瘤组织中出现表达异常, 与肿瘤的发生、发展和转移具有密切关系, 是多种肿瘤的生物标志^[3, 10, 11]。

研究发现, 多种肿瘤出现 14-3-3 σ 蛋白表达降低/缺失, 肿瘤 14-3-3 σ 蛋白表达降低/缺失的主要机制是 14-3-3 σ 基因甲基化导致转录活性降低^[3, 12, 13], 此外, 蛋白质降解加速是引起部分肿瘤 14-3-3 σ 蛋白表达水平降低的补充机制^[14]。

14-3-3 σ 在肿瘤发生发展中的作用机制尚未完全阐明, 但至少与其以下 3 个方面的功能有关: 有丝分裂过程中蛋白质翻译的分子开关作用、细胞周期负向调节作用和细胞凋亡调节作用。DNA 损伤的细胞如果在损伤没有修复的前提下进入有丝分裂期, 细胞因无法正确进行分裂而在有丝分裂的中后期启动细胞死亡程序, 这种有别于经典凋亡方式的程序性细胞死亡方式称为有丝分裂灾难^[15], 部分细胞逃避有丝分裂灾难后形成非整倍体细胞或者双核细胞, 成为潜在的肿瘤细胞(癌前细胞)。细胞顺利完成有丝分裂过程依赖于各种相关蛋白质在时间上和空间上的精确表达, 14-3-3 σ 是控制该过程中蛋白质表达模式的分子开关^[16], 14-3-3 σ 缺乏在引起有丝分裂灾难的同时将导致非二倍体细胞和双核细胞的产生, 增加肿瘤发生的风险。14-3-3 σ 含有细胞周期蛋白依赖激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)结合基序, 当细胞 DNA 受到损伤时, 抑瘤蛋白 p53 诱导 14-3-3 σ 表达, 上调的 14-3-3 σ 蛋白通过与 CDK1、CDK2、CDK4 等有丝分裂激酶结合而阻止它们进入细胞核, 将细胞周期阻滞于 G2/M 期, 以维持基因组的稳定性, 同时, 14-3-3 σ 通过拮抗 p53 泛素化降解和 p53 核外排, 以及增加 p53 寡聚化而增强 p53 的稳定性和转录调控活性^[14]。14-3-3 σ 参与多条细胞凋亡信号调节通路, 对细胞凋亡的调节作用受细胞种类和凋亡诱导因素的影响^[5, 17, 18]。

目前关于 14-3-3 σ 与 NPC 关系的研究报道很

少见。Yang 等^[9]研究发现, 促进 NPC 细胞株 CNE1 和 CNE2 的 14-3-3 σ 表达能够抑制癌细胞的生长和裸鼠成瘤能力, 并促进其凋亡, 提示 14-3-3 σ 可能具有抑制 NPC 的作用。本实验室前期研究发现 NPC 中 14-3-3 σ 蛋白表达降低/缺失, 其机制尚不明确^[9]。本研究发现, NPC 组织 14-3-3 σ 基因甲基化频率显著高于正常鼻咽上皮组织, 与 14-3-3 σ 基因未甲基化的 NPC 比较, 14-3-3 σ 基因完全甲基化的 NPC 缺乏 14-3-3 σ mRNA 和蛋白质的表达, 14-3-3 σ 基因不完全甲基化的 NPC 14-3-3 σ mRNA 和蛋白质的表达显著降低。结合相关文献, 本研究结果提示, 14-3-3 σ 基因甲基化参与了 NPC 的发病, 其机制推测如下: a. 14-3-3 σ 基因甲基化引起鼻咽黏膜上皮细胞 14-3-3 σ 蛋白质表达降低/缺失, 导致细胞周期 G2/M 检测功能障碍, 一些 DNA 受损的细胞未经正确的 DNA 修复且未能启动凋亡程序而强行通过 G2/M 检测点进行有丝分裂, 其中大部分细胞死于有丝分裂灾难而小部分细胞畸形分裂形成癌前细胞和癌细胞。b. 14-3-3 σ 基因甲基化引起 14-3-3 σ 蛋白质表达降低/缺失, 细胞对凋亡信号的反应性发生改变, 帮助癌前细胞和癌细胞逃避凋亡, 促进肿瘤的发生发展。

14-3-3 σ 参与多种肿瘤的浸润和转移过程, 在不同类型肿瘤中扮演着不同的角色, 其详细的作用机制有待于进一步研究^[10, 11, 19]。本研究通过 14-3-3 σ 基因甲基化与 NPC 临床病理特征相关性分析发现, 14-3-3 σ 基因甲基化状态与患者性别、年龄、原发肿瘤分期、肿瘤远处转移无相关性, 但与区域淋巴结转移和肿瘤临床分期相关, 结果提示, 14-3-3 σ 对 NPC 的转移可能具有抑制作用, 14-3-3 σ 甲基化导致 NPC 14-3-3 σ 蛋白质表达下调/缺失, 加速了 NPC 的转移。由于本研究样本中仅 1 例患者出现 NPC 远处转移, 因此, 14-3-3 σ 基因甲基化与 NPC 远处转移的相关性分析缺乏统计学意义, 进一步进行大样本研究将有助于揭示 14-3-3 σ 基因甲基化与 NPC 远处转移的相关性。

总之, 本研究结果说明, 基因甲基化是引起鼻咽癌组织 14-3-3 σ 蛋白质表达降低或缺失的决定性因素, 并提示 14-3-3 σ 可能能够抑制鼻咽癌转移, 检测 14-3-3 σ 基因甲基化状态可能成为鼻咽癌早期诊断和预后判断的手段。

参 考 文 献

- 1 Gronbaek K, Hother C, Jones P A. Epigenetic changes in cancer.

- APMIS, 2007, **115**(10): 1039~1059
- 2 谭双香, 肖志强. DNA 甲基化与鼻咽癌. 国际肿瘤学杂志, 2007, **34**(12): 904~907
Tan S X, Xiao Z Q. J Int Oncol(China), 2007, **34**(12): 904~907
 - 3 Lodygin D, Hermeking H. Epigenetic silencing of 14-3-3sigma in cancer. Semin Cancer Biol, 2006, **16**(3): 214~224
 - 4 Lee M H, Lozano G. Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 sigma and other proteins. Semin Cancer Biol, 2006, **16**(3): 225~234
 - 5 Yang H, Zhao R, Lee M H. 14-3-3sigma, a p53 regulator, suppresses tumor growth of nasopharyngeal carcinoma. Mol Cancer Ther, 2006, **5**(2): 253~260
 - 6 Cheng A L, Huang W G, Chen Z C, *et al.* Identification of novel nasopharyngeal carcinoma biomarkers by laser capture microdissection and proteomic analysis. Clin Cancer Res, 2008, **14**(2): 435~445
 - 7 Akahira J, Sugihashi Y, Suzuki T, *et al.* Decreased expression of 14-3-3 sigma is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer: its correlation with aberrant DNA methylation. Clin Cancer Res, 2004, **10**(8): 2687~2693
 - 8 Perathoner A, Pirkebner D, Brandacher G, *et al.* 14-3-3 σ Expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. Clinical Cancer Research, 2005, **11**(9): 3274~3279
 - 9 Morrison D K. The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. Trends Cell Biol, 2009, **19**(1): 16~23
 - 10 Neupane D, Korc M. 14-3-3 {sigma} modulates pancreatic cancer cell survival and invasiveness. Clin Cancer Res, 2008, **14**(23): 7614~7623
 - 11 Jing F, Jun L, Yong Z, *et al.* Multigene methylation in serum of sporadic Chinese female breast cancer patients as a prognostic biomarker. Oncology, 2008, **75**(1~2): 60~66
 - 12 Liang S, Xu Y, Shen G, *et al.* Gene expression and methylation status of 14-3-3sigma in human renal carcinoma tissues. IUBMB Life, 2008, **60**(8): 534~540
 - 13 Kunze E, Schlott T. High frequency of promoter methylation of the 14-3-3 sigma and CAGE-1 genes, but lack of hypermethylation of the caveolin-1 gene, in primary adenocarcinomas and signet ring cell carcinomas of the urinary bladder. Int J Mol Med, 2007, **20**(4): 557~563
 - 14 Horie-Inoue K, Inoue S. Epigenetic and proteolytic inactivation of 14-3-3sigma in breast and prostate cancers. Semin Cancer Biol, 2006, **16**(3): 235~239
 - 15 Castedo M, Perfettini J L, Roumier T, *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. Oncogene, 2004, **23**(16): 2825~2837
 - 16 Wilker E W, van Vugt M A, Artim S A, *et al.* 14-3-3sigma controls mitotic translation to facilitate cytokinesis. Nature, 2007, **446**(7133): 329~332
 - 17 Chen J C, Chen Y, Su Y H, *et al.* Celecoxib increased expression of 14-3-3sigma and induced apoptosis of glioma cells. Anticancer Res, 2007, **27**(4B): 2547~2554
 - 18 Samuel T, Weber H O, Rauch P, *et al.* The G2/M regulator 14-3-3 σ prevents apoptosis through sequestration of Bax. J Biol Chem, 2001, **276**(48): 45201~45206
 - 19 Ide M, Saito K, Tsutsumi S, *et al.* Over-expression of 14-3-3sigma in budding colorectal cancer cells modulates cell migration in the presence of tenascin-C. Oncol Rep, 2007, **18**(6): 1451~1456

Hypermethylation Leads to Down-regulated 14-3-3 Sigma Expression in Nasopharyngeal Carcinoma Tissues*

TAN Shuang-Xiang^{1,2)**}, LI Jun^{1)**}, YI Hong¹⁾, TANG Cen-E¹⁾, CHENG Ai Lan¹⁾,
CHEN Zhu-Chu¹⁾, LI Jian-Ling¹⁾, Xiao Zhi-Qiang^{1)***}

⁽¹⁾Key Laboratory of Cancer Proteomics of Chinese Ministry of Health, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

⁽²⁾Hunan Institute of Gerontology, Hunan Province Geriatric Hospital, Changsha 410016, China)

Abstract In order to explore the role of 14-3-3 σ gene methylation in nasopharyngeal carcinoma pathogenesis, biopsy specimens of 75 nasopharyngeal carcinoma tissues and 25 normal nasopharyngeal mucosal tissues were harvested for research. Then, methylation specific PCR (MSP) experiment was introduced to reveal 14-3-3 σ gene methylation status of tissues, and reverse transcriptional PCR (RT-PCR) assay was employed to quantify the expression of 14-3-3 σ mRNA, further more, immunohistochemical staining was undertaken to assess the 14-3-3 σ protein expression level. The MSP experiment results indicate 14-3-3 σ gene methylation status in nasopharyngeal carcinoma tissues was 4 exhaustive methylation, 59 partial methylation and 12 unmethylation, while in normal nasopharyngeal mucosal tissues was 7 partial methylation and 18 unmethylation. The frequency of 14-3-3 σ methylation in nasopharyngeal carcinoma tissues was significantly higher than that in normal nasopharyngeal mucosal tissues (84% *vs* 28%, $\chi^2=28$; $P < 0.05$). The results of RT-PCR and immunohistochemical staining discovered that 14-3-3 σ gene exhaustive methylation leads to absent 14-3-3 σ mRNA as well as protein expression in nasopharyngeal carcinoma tissues and normal nasopharyngeal mucosal tissues. Tissues characterized with partial methylation 14-3-3 σ gene represented remarkable down-regulated 14-3-3 σ mRNA and protein expression level when compared with tissues characterized with unmethylation 14-3-3 σ gene. Graded correlation analysis discovered that 14-3-3 σ gene hypermethylation status is positively correlated with NPC lymphoid node metastasis and NPC clinical staging. The research demonstrated that 14-3-3 σ gene was frequently hypermethylated in nasopharyngeal carcinoma tissues and leads to decreased or depleted gene expression, 14-3-3 σ expression level was correlated to nasopharyngeal carcinoma lymphoid node metastasis and NPC clinical staging.

Key words nasopharyngeal neoplasm, epigenetic, gene expression, methylation, stratifin

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00690

*This work was supported by grants from Trans-century Excellent Talent Foster Program Foundation of Chinese Ministry of Education (Science and Technology Letter of Chinese Ministry of Education [2002]48), Key Science and Technology Research Program of Hunan Province (06SK2004) and Furong Scholar(Invited Professor) Research Foundation (Bulletin of Education Department of Hunan Province [2007]362).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-731-4327239, E-mail: zqxiao2001@hotmail.com

Received: October 9, 2008 Accepted: November 25, 2008