

网络出版时间: 2020-9-4 09:32 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200903.1449.029.html>

宫颈癌 ING4 基因启动子区甲基化状态及其临床意义

陈 艳¹, 牛三强², 胡卫平¹, 钱莉莉¹

摘要 目的 探讨生长抑制因子 4 (ING4) 基因甲基化与宫颈癌发生的关系及其临床意义。方法 收集确诊的 80 例宫颈癌患者组织标本, 并以同期的子宫良性病变行子宫全切患者的 50 例宫颈组织标本作为对照组。采用甲基化特异性 PCR (MSP) 技术检测子宫颈癌组织及对照组宫颈组织中 ING4 基因启动子的甲基化状态, 并使用实时定量逆转录酶-聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测了 ING4 基因的 mRNA 表达水平, 分析 ING4 基因启动子的甲基化状态与宫颈癌临床病理特征的关系。结果 宫颈癌组织中 ING4 基因的甲基化率为 82.5% (66/80), 高于对照组 12% (6/50) ($P < 0.01$)。宫颈癌组织中 ING4 的 mRNA 表达 (0.41 ± 0.07) 低于对照组中 ING4 的 mRNA 表达 (0.87 ± 0.16)。此外, ING4 启动子区甲基化的宫颈癌组织中 ING4 mRNA 水平 (0.37 ± 0.06 , $n = 66$) 低于 ING4 启动子区未甲基化宫颈癌患者组织中 ING4 mRNA 水平 (0.46 ± 0.11 , $n = 14$)。宫颈癌组织中 ING4 基因启动子区甲基化与年龄、淋巴结状态、宫颈癌的病理学分类和临床分期等变量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 ING4 基因启动子区的高甲基化可能与宫颈癌的发生发展有关。

关键词 宫颈癌; 生长抑制因子 4; 甲基化

中图分类号 R 737.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)10-1620-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.028

宫颈癌(cervical cancer, CC)是最常见的妇科恶性肿瘤之一,全球每年估计有 50 万例新病例,其中有 30 万人死亡^[1]。近年来,相关报道表明,CC 的发病正在向年轻化方向发展。CC 与高危 HPV 感染有关。研究^[2-3]表明,单一的高危 HPV 感染不足以引起 CC,遗传因素和免疫因素在 CC 的发展中也起着重要作用。在过去的几十年中,对癌症表观遗传修饰,特别是 DNA 甲基化及其对肿瘤致癌作用的研究一直在不断增加^[4];然而,表观遗传因素对 CC 的影响仍然未知,DNA 甲基化经常发生在多种癌症中,例如结肠癌、乳腺癌和 CC^[5-7]。尽管认为生长抑制因子 4 (growth inhibitory factor 4, ING4) 启动子区的 CpG 岛甲基化是 ING4 产生的负转录调节因子,但尚未在 CC 中研究此类事件。因此,该研究的目的是评估 CC 组织中 ING4 启动子区甲基化情况与 CC 发生的临床意义,并为研究 CC 的发生和发展提供新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 一般资料 收集安徽省立医院 2018 年 1 月 ~ 2019 年 10 月确诊的 80 例 CC 患者组织标本(CC

2020-08-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81902632)

作者单位: ¹ 中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院) 妇产科, 合肥 230001² 亳州市人民医院妇产科, 亳州 236800

作者简介: 陈 艳, 女, 硕士, 主治医师;

胡卫平, 女, 教授, 主任医师, 责任作者, E-mail: ahslyycy@163.com

group and three-branch lesion group ($P > 0.05$)。③ The levels of plasma LXA4, RvD1 and PD1 were negatively related to C-reactive protein and interleukin-6 (IL-6) ($\rho = -0.263, -0.367; -0.247, -0.229; -0.251, -0.302, P < 0.01$), but positively related to IL-10 ($\rho = 0.258, 0.245, 0.211, P < 0.01$)。The levels of plasma RvD1 and PD1 were negatively related to Gensini score ($\rho = -0.227, -0.229, P < 0.01$), however, there was no correlation between LXA4 and Gensini score ($\rho = -0.100, P > 0.05$)。Stepwise multiple linear regression showed that the levels of plasma LXA4, RvD1 and PD1 had little effect on Gensini score。Stepwise multiple logistic regression showed that plasma PD1 and IL-10 were the protective factors for CHD。④ Compared with poor prognosis group, the level of plasma PD1 was significantly higher at 3 months of follow-up in the good prognosis group ($P < 0.01$)。Conclusion The level of plasma PD1 can effectively judge the clinical severity of CHD patients, which is a protective factor of CHD and has predictive value for short-term prognosis of CHD patients。The values of plasma LXA4 and RvD1 are weak。

Key words lipoxin A4; resolvin D1; protectin D1; coronary heart disease; MACE

组) 并以同期在该院治疗的子宫良性病变行子宫全切患者的 50 例标本作为对照组。以上患者均无术前治疗及放化疗。所有患者均经病理证实。标本收集后保存在 -80°C 直至分析使用。所有患者在收集样品前均已获得知情同意。该协议由中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)伦理委员会批准。根据 WHO 标准对肿瘤的组织学类型和等级进行分类。根据国际妇产科联合会(FIGO)标准确定每种癌症的分期。

1.2 方法

1.2.1 组织 DNA 提取和亚硫酸氢盐处理

按照组织 DNA 提取试剂盒步骤获取组织标本中 DNA,并用分光光度仪测定核酸浓度。通过亚硫酸氢盐处理, DNA 的未甲基化胞嘧啶被转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则保持未修饰。使用亚硫酸氢盐转化试剂盒(EZ DNA Methylation-Gold Kit)对提取的基因组 DNA 进行修饰。修饰的 DNA 保存在 -80°C 存储以备后用。

1.2.2 甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP)

MSP 是使用甲基化或未甲基化 DNA 的特异性引物对经过亚硫酸氢盐处理 DNA 进行 PCR 扩增,从而得到 DNA 是否甲基化的信息。通过 MSP 方法分析所有样品。同时使用 UCSC 网站获取 ING4 基因上游启动子序列约 1 000 bp, Methprimer 进行 MSP 引物的设计见图 1。引物序列、退火温度和预期的产物大小见表 1。聚合酶链反应(PCR)在总体积为 20 μl 模板 2 μl (200 ng), $10\times$ PCR buffer 2 μl , Mg^{2+} 1.6 μl , dNTP mix 0.4 μl , DMSO 0.4 μl , MSP 上下游引物(10 pmol/ μl 2 μl), HS-Taq 酶 0.2 μl 灭菌双蒸水 11.4 μl 。PCR 条件为 95°C 预变性 5 min, 开始循环 95°C 变性 20 s, 使用各引物退火温度退火 20 s, 72°C 延伸 20 s, 循环 40 次, 最后 72°C 延伸 5 min。反应在 PCR 仪(G-Storm GSI PCR 扩增仪)中进行。使用经过 SssI 甲基化酶(北京 NEB 公司)处理后的人外周血 DNA 作为甲基化阳性 DNA 对照, 该酶甲基化了 DNA 中 CpG 二核苷酸的每个胞嘧啶。每个试验都包括水空白。PCR 产物在溴化乙锭染色的 2% 琼脂糖凝胶上可视化。仅将未甲基化引物的阳性扩增解释为未甲基化。将甲基化引物或甲基化和未甲基化引物的正扩增视为甲基化。

1.2.3 RNA 提取和实时定量逆转录酶-聚合酶链反应(qRT-PCR)

根据制造商的说明使用 TRIzol (上海玉博生物科技有限公司)提取总 RNA。使用 GoScriptTM 逆转录系统试剂盒(北京 Promega 生物技

表 1 ING4 基因 MSP 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	退火温度	长度(bp)
ING4	MF: GAGGGGTTAGGTATAGTGGTTTC	56 $^{\circ}\text{C}$	122
	MR: AAAAATAAAATTTCTCCATATCGAT		
	UF: AGAGGGGTTAGGTATAGTGGTTTGT	59 $^{\circ}\text{C}$	122
	UR: AAAAATAAAATTTCTCCATATCAAT		

MF: 甲基化正向引物; MR: 甲基化负向引物; UF: 非甲基化正向引物; UR: 非甲基化负向引物

术有限公司)从 5 μg 总 RNA 中制备 cDNA。使用 PCR 试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)从 5 μg cDNA 中扩增 ING4 基因。循环条件为在 94°C 下预变性 3 min, 然后进行 45 轮循环(94°C 下变性 30 s, 在 57°C 下进行 20 s 退火, 并在 72°C 下延伸 30 s)最后的延伸步骤在 72°C 下进行 10 min, 并将产品存储在 4°C 下。ING4 引物序列为 5'-CACAAGTCCTGAGTATGGGAT-3' (正向) 和 5'-AGGGATGTGGAAGAACTGT-3' (反向), 预期大小为 295 bp。GAPDH 引物序列为 5'-CAGGGCTGCTTTTAACTCTG-3' (正向) 和 5'-CTGTTGTCTGGAGTTCTAGTAG-3' (反向), 预期大小为 385 bp。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算相对基因表达, 并用内源性 GAPDH 标准化表达数据。所有实时 PCR 重复 3 次。

1.3 统计学处理

使用软件 SPSS 19.0 进行分析, 进行方差齐性检验、正态性检验。计量资料实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单变量两组资料之间的比较采用 t 检验, 计数资料比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CC 组和对照组临床病理特征

80 例 CC 患者和 50 例对照组的临床病理特征见表 2。根据现有的留存病理报告, CC 组与对照组在年龄、初潮年龄、绝经状态、妊娠次数、分娩次数、癌症家族史等方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 ING4 的异常启动子甲基化

ING4 基因的 MSP 反应的代表性谱带见图 2。在 CC 组中, ING4 启动子甲基化率为 82.5% (66/80), 在对照组中 12.0% (6/50), CC 组中 ING4 基因启动子的甲基化率高于对照组($P < 0.001$)。

2.3 CC 组和对照组患者组织标本中 ING4 基因表达

qRT-PCR 检测结果显示, CC 组中 ING4 mRNA 表达(0.41 ± 0.07) 低于对照组中 ING4 mRNA 表达(0.87 ± 0.16) ($t = 22.53$, $P < 0.01$)。此外, ING4 启动子区甲基化的 CC 患者组织中 ING4 mRNA 水平

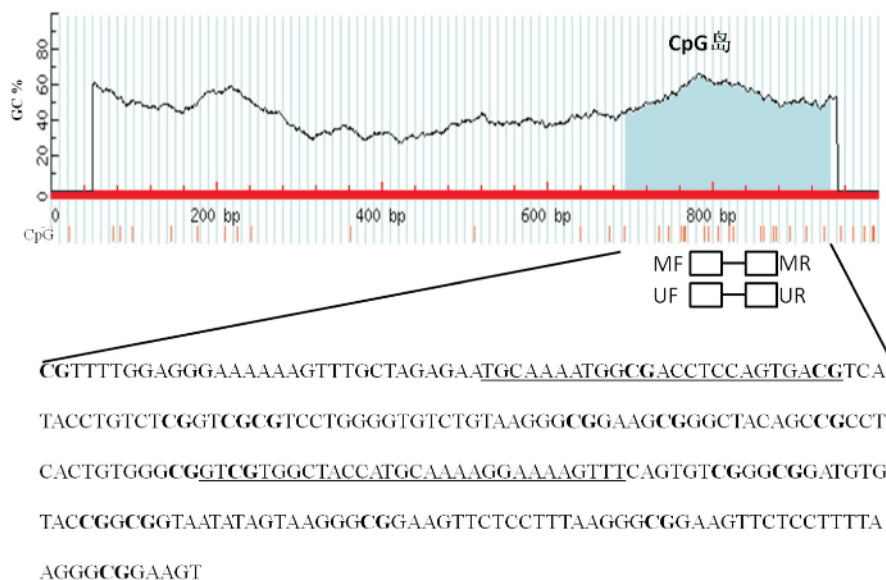


图1 ING4 基因的 MSP 引物设计示意图

阴影部分: ING4 基因启动子区的一个 CpG 岛; MF、MR 和 UF、UR: 甲基化和非甲基化引物; 碱基下方的横线: 甲基化和非甲基化引物的序列所在位点, 加粗字体代表 CG 位点

表2 CC 组和对照组的部分临床特征

变量	宫颈癌组 (n=80)	对照组 (n=50)	t/ χ^2 值	P 值
年龄(岁 $\bar{x} \pm s$)	46.5 $\pm$ 8.9	45.5 $\pm$ 7.5	0.661	0.509
初潮年龄(岁 $\bar{x} \pm s$)	15.4 $\pm$ 2.1	16.1 $\pm$ 3.1	1.535	0.127
绝经状态(n)			0.314	0.575
是	25	18		
否	55	32		
妊娠次数(n)			0.471	0.493
0~1	53	36		
2	27	14		
分娩次数(n)			0.391	0.532
0~1	60	35		
2	20	15		
癌症家族史			0.107	0.743
是	6	3		
否	74	47		

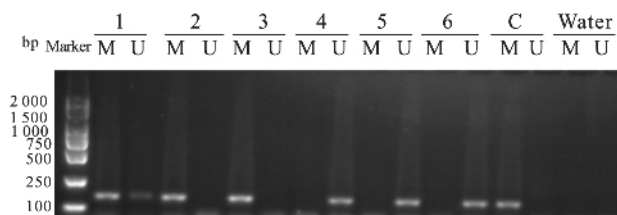


图2 ING4 基因启动子区部分 MSP 结果

Marker: DNA 条带标记; C: 甲基化阳性对照; Water: 阴性对照; 1~5: 部分 CC 标本甲基化结果; M: 甲基化引物; U: 非甲基化引物; 4~6: 部分对照组结果

平 (0.37 ± 0.06 , $n=66$) 低于 ING4 启动子区未甲基化 CC 患者组织中的 ING4 mRNA 水平 (0.46 ± 0.11 , $n=14$), 差异有统计学意义 ($t=4.318$, $P<0.01$)。

2.4 ING4 高甲基化与 CC 临床病理特征的关系

根据甲基化状态, 对 CC 组织中 ING4 启动子区域进行多变量分析, 结果见表 3。ING4 启动子区的甲基化与以下临床病理特征之间差异无统计学意义: 包括年龄、淋巴结转移、淋巴管侵犯、切缘侵犯、FIGO 分期、组织学分型、肿瘤大小和 HPV 感染 ($P>0.05$)。

3 讨论

CC 是全球女性中第三大最常被诊断的癌症, 也是第四大导致癌症死亡的主要原因, 并且目前仍然是主要的公共卫生问题^[8]。CC 的发展是一个多基因、多步骤的癌变过程, 涉及复杂的遗传和表观遗传机制。DNA 甲基化是表观遗传修饰的一种常见形式, 而通过其启动子(尤其是 CpG 岛)的超甲基化而沉默, 与多种肿瘤的发生有关^[5, 9]。Paz et al^[9]报道在所分析的 70 个肿瘤细胞系中, 至少每个都存在一个高甲基化基因。此外, 研究表明肿瘤中的癌症干细胞基因由于甲基化而被下调, 例如在膀胱癌^[10]、大肠癌^[5]和 CC^[11]。因此, 基因甲基化状态的改变是参与致癌的关键因素之一。

表3 ING4 甲基化状态与 CC 中临床病理特征的关系 [n(%)]

变量	ING4 启动子区 甲基化阳性	ING4 启动子区 甲基化阴性	χ^2 值	P 值
年龄(岁)			0.216	0.643
≤47	28(84.80)	5(15.20)		
>47	38(80.85)	9(19.15)		
FIGO 分期			1.870	0.172
I	39(78.00)	11(22.00)		
II	27(90.00)	3(10.00)		
淋巴管侵犯			0.047	0.828
阴	49(83.05)	10(16.95)		
阳	17(80.95)	4(19.05)		
淋巴结转移			0.839	0.356
阴	49(80.32)	12(19.68)		
阳	17(89.47)	2(10.53)		
肿瘤大小(cm)			0.016	0.897
<4	46(82.14)	10(17.86)		
≥4	20(83.33)	4(16.67)		
切缘侵犯			0.030	0.864
阴	44(83.12)	9(16.98)		
阳	22(81.48)	5(18.52)		
HPV 感染			0.049	0.824
阴	8(80.00)	2(20.00)		
阳	58(82.85)	12(17.15)		
组织学类型			0.086	0.769
鳞状细胞癌	45(81.81)	10(18.19)		
腺癌	21(84.00)	4(16.00)		

基因表达的表观遗传修饰是环境暴露可能影响疾病的新机制,通过修饰调节基因转录的启动子区域表达。最近,有关表观遗传调控机制在 CC 研究重要性的证据不断涌现。DNA 甲基化模式的改变,尤其是基因启动子区域的改变,可能对基因表达产生深远的影响。DNA 甲基化的特征是在胞嘧啶-磷酸鸟嘌呤(CpG) 岛内的胞嘧啶中添加了甲基。未甲基化的 CpG 岛与转录活性区有关,而甲基化的 DNA 募集甲基结合蛋白,这些蛋白促进染色质聚集并阻止转录因子的结合。有研究^[12]报道,CC 中 ING4 mRNA 的表达水平明显低于正常 CC 旁组织。ING4 可能通过抑制细胞生长、抑制肿瘤血管增生等途径抑制肿瘤的生长。

ING4 是具有 249 个氨基酸的生长抑制剂(ING4) 家族的成员,该氨基酸由位于 12q13-31 号染色体上的基因编码。ING4 包含 3 个核定位信号和 1 个高度保守的 C 端植物同源域(PHD) 锌指基序。通过消减杂交筛选,最初将 ING 鉴定为肿瘤抑制候选物。ING4 在多种细胞过程中起重要作用,包括细胞增殖、细胞周期控制、细胞衰老和凋亡^[13-14]。此外,已经证明 ING4 与组蛋白乙酰转移酶(HAT) 和组蛋白脱乙酰酶(HDAC) 相互作用以调节基因转

录。研究^[15]表明,ING4 与富含 A-U 的结合元件因子(AUF1) 相互作用,从而下调原癌基因 MYC。但是,仍需要阐明 ING4 对癌症进展的作用的分子机制。本研究检测了对照组和 CC 组织标本中 ING4 基因的甲基化模式。这些数据为本研究提供了一定的证据,CC 组织中的 ING4 甲基化高于对照组,由此推测启动子区域的 DNA 甲基化可能影响 CC 发生过程中的基因激活。

为了验证 ING4 产生的表观遗传调控的假说,根据 MSP 状态评估,ING4 启动子甲基化率为 82.5%,对照组中甲基化率为 12.0%,本研究表明 CC 组织中 ING4 mRNA 基因表达水平明显低于对照组。且发生甲基化组 ING4 mRNA 表达较未发生甲基化组低。这些数据表明,ING4 基因启动子高甲基化状态可能是导致 ING4 mRNA 表达降低的一个原因,从而影响了 CC 的发生。尽管没有在这项研究中调查整个表观基因组,但很可能多个基因的表观遗传修饰参与 CC 发生发展。

本研究结果显示 ING4 基因启动子区的甲基化与 CC 患者的年龄、淋巴结状态、病理学分类和 CC 的临床分期等无明显关联。但是 ING4 基因启动子区甲基化表现出与 ING4 较低表达的显著相关性。在后续的研究中,加大样本量,同时进一步研究更多细胞因子的甲基化状态,以确定它们的甲基化状态与 CC 发生之间的关系。此外,还需要认识到 ING4 基因在 CC 的发生、发展和治疗反应中所起的关键作用。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [3] Juan C, Hua Q, Ruping Z, et al. miRNA-489 as a biomarker in diagnosis and treatment of cervical cancer [J]. Bratisl Lek Listy, 2018, 119(5): 278-83.
- [4] Li Y S, Zou Y, Dai D Q. MicroRNA-320a suppresses tumor progression by targeting PBX3 in gastric cancer and is downregulated by DNA methylation [J]. World J Gastrointest Oncol, 2019, 11(10): 842-56.
- [5] Hahn-Stromberg V, Askari S, Ahmad A, et al. Expression of claudin 1, claudin 4, and claudin 7 in colorectal cancer and its relation with CLDN DNA methylation patterns [J]. Tumour Biol, 2017, 39(4): 1010428317697569.
- [6] Li J, Zhang M, He T, et al. Methylation of DACT2 promotes

- breast cancer development by activating Wnt signaling [J]. *Sci Rep* 2017 7(1): 3325.
- [7] Siegel E M, Riggs B M, Delmas A L, et al. Quantitative DNA methylation analysis of candidate genes in cervical cancer [J]. *PLoS One* 2015 10(3): e0122495.
- [8] Torre L A, Siegel R L, Ward E M, et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016 25(1): 16–27.
- [9] Paz M F, Fraga M F, Avila S, et al. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines [J]. *Cancer Res* 2003 63(5): 1114–21.
- [10] Wu X, Xu Q, Chen P, et al. Effect of SMYD3 on biological behavior and H3K4 methylation in bladder cancer [J]. *Cancer Manag Res* 2019 11: 8125–33.
- [11] Jiao X, Zhang S, Jiao J, et al. Promoter methylation of SEPT9 as a potential biomarker for early detection of cervical cancer and its overexpression predicts radioresistance [J]. *Clin Epigenetics*, 2019 11(1): 120.
- [12] Yuan J, Han Y L, Wang T Y, et al. The expression of inhibitor of growth 4 is reduced in cervical cancer tissues [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016 20(15): 3178–85.
- [13] Yuan S, Jin J, Shi J, et al. Inhibitor of growth-4 is a potential target for cancer therapy [J]. *Tumour Biol*, 2016 37(4): 4275–9.
- [14] Cui S, Gao Y, Zhang K, et al. The emerging role of inhibitor of growth 4 as a tumor suppressor in multiple human cancers [J]. *Cell Physiol Biochem* 2015 36(2): 409–22.
- [15] Lu M, Pan C, Zhang L, et al. ING4 inhibits the translation of proto-oncogene MYC by interacting with AUF1 [J]. *FEBS Lett*, 2013 587(11): 1597–604.

Methylation status of ING4 gene promoter region in cervical cancer and its clinical significance

Chen Yan¹, Niu Sanqiang², Hu Weiping¹, et al

(¹Dept of Obstetrics and Gynecology, Anhui Provincial Hospital,

The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001;

²Dept of Obstetrics and Gynecology, Bozhou People's Hospital, Bozhou 236800)

Abstract Objective To investigate the relationship between the methylation of growth inhibitory factor 4 (ING4) gene and cervical carcinogenesis and its clinical significance. **Methods** Tissue specimens of 80 patients with cervical cancer diagnosed were collected, and 50 cervical tissue specimens from patients with benign uterine lesions undergoing total hysterectomy during the same period were used as the control group. Methylation-specific PCR (MSP) technique was used to detect the methylation status of the ING4 gene promoter in cervical cancer tissues and cervical tissues of the control group, and the mRNA expression level of ING4 gene was detected by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The expression level of ING4 mRNA was analyzed, and the relationship between the methylation status of ING4 gene promoter and the clinical case characteristics of cervical cancer was analyzed. **Results** The methylation rate of ING4 gene in tissue of cervical cancer (66/80, 82.5%) was significantly higher than that of control group (6/50, 12%) ($P < 0.01$). The mRNA expression of ING4 in cervical cancer tissue (0.41 ± 0.07) was lower than that in control group (0.87 ± 0.16). In addition, the mRNA level in cervical cancer tissues methylated by the ING4 promoter region (0.37 ± 0.06 , $n = 66$) was lower than that in tissues of cervical cancer patients with unmethylated ING4 promoter region (0.46 ± 0.11 , $n = 14$). There was no statistically significant difference between the methylation of ING4 gene promoter region and age, lymph node status, pathological classification and clinical stage of cervical cancer in cervical cancer tissues ($P > 0.05$). **Conclusion** Hypermethylation of the ING4 gene promoter region may be associated with the occurrence and development of cervical cancer.

Key words cervical cancer; growth inhibitory factor 4; methylation