

脑胶质瘤中 ppENK、EDNRB 和 CLDN-7 基因甲基化状态的研究

徐培坤¹, 邓鹏程¹, 朱立新², 王 斌¹, 成金民¹

摘要 目的 了解脑胶质瘤中 ppENK、EDNRB 和 CLDN-7 3 种基因的甲基化状况。方法 应用巢式聚合链式反应 (nPCR) 方法和亚硫酸氢盐修饰后测序 (BSP) 方法, 分别检测 46 例脑胶质瘤标本和 10 例正常脑组织标本的 3 种基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态, 并分析各基因甲基化程度与临床资料的关系。结果 正常脑组织标本中该 3 种基因无甲基化。脑胶质瘤中 ppENK、EDNRB 和 CLDN-7 3 种基因启动子甲基化率分别为 44.2% (19/43)、22.5% (9/40) 和 0% (0/5)。在低级别 (I ~ II 级) 脑胶质瘤组中 ppENK 基因启动子甲基化率 (33.3%) 低于高级别 (III ~ IV 级) 脑胶质瘤组中 ppENK 基因启动子甲基化率 (69.2%), 两者差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 脑胶质瘤中 ppENK 和 EDNRB 基因启动子区 CpG 岛有甲基化现象, 与脑胶质瘤发生、发展有关。

关键词 CpG 岛; 甲基化; 胶质瘤

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)08-1124-04

脑胶质瘤至今仍是颅内预后最差的肿瘤, 近 30 年来国内外对脑胶质瘤的治疗没有显著的突破。脑胶质瘤的发病机制的不详、治疗方案的不合理是导致其疗效不佳的重要原因。随着表观遗传学的研究发展: 基因甲基化在脑胶质瘤的发生、发展过程中起到了非常重要的作用, 某些基因的甲基化与脑胶质瘤的关系也已得到证实。但脑胶质瘤的发生、发展可能受控于多个基因共同影响, 发现和检测尽可能多的影响基因并在此基础上建立脑胶质瘤的基因甲基化谱可以有效的指导改进脑胶质瘤的治疗。目前在除脑胶质瘤外的很多其他恶性肿瘤中发现 ppENK、EDNRB 和 CLDN-7 基因启动子区高甲基化的现象^[1-4]。该实验采取巢式聚合链式反应 (nested poly-merase chain reaction, nPCR) 方法和亚硫酸氢盐修饰后测序 (bisulfite sequence polymerase chain reaction, BSP) 方法研究脑胶质瘤中 ppENK、EDNRB 和 CLDN-7 3 种基因启动子区的甲基化状态, 并分析

该 3 种基因的甲基化与脑胶质瘤患者的年龄、性别及肿瘤病理分型、分级等临床资料之间的关系, 以探索基因甲基化在脑胶质瘤发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本收集和病理资料 本组 56 例标本均于 2010 年 11 月 ~ 2012 年 11 月来自安徽医科大学第一附属医院神经外科手术中。脑胶质瘤标本 46 例, 其中男 21 例, 女 25 例, 年龄 19 ~ 76 岁, 中位年龄 48 岁。按照世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 神经系统的肿瘤分级标准进行病理分级, I ~ II 级 31 例, III ~ IV 级 15 例。其中胶质母细胞瘤 13 例, 星型细胞瘤为 25 例, 少突胶质细胞瘤 5 例, 室管膜瘤 3 例。肿瘤组织标本均由经验丰富的神经外科主任医师手术提取, 并都由安徽医科大学第一附属医院的病理科检验确诊。患者手术前未进行放、化疗等前期治疗, 可排除其他治疗对本次实验的干扰。另提取 10 例因脑外伤进行开颅减压手术的患者的脑组织标本作为实验对照组, 其中男 6 例, 女 4 例, 年龄 25 ~ 56 岁, 中位年龄 41 岁。提取标本均快速放入液氮罐并转入 -80 °C 冰箱中冷冻备用。

1.2 方法

1.2.1 组织 DNA 提取和测定 DNA 浓度 采用 Qi-amp DNA mini kit 试剂盒 (按说明书操作): ① 分离、溶解标本: 从 -80 °C 冰箱中取出组织标本 10 ~ 20 mg, 剪碎标本后加入裂解液并充分研磨后离心 (4 000 r/min, 10 min), 弃上清液, 打散混匀后加入蛋白酶 k 混匀并水浴; ② 清洗、纯化标本 DNA: 弃上清液, 打散混匀后加入无水乙醇并混匀, 加入 Buffer Awl 并离心 (12 000 r/min, 30 s) (重复一次充分清洗标本 DNA); ③ 提取标本 DNA: 弃上清液; 加入 Buffer AE 并水浴 5 min; ④ 验证提取标本 DNA: 电泳验证 DNA 存在与否, 用分光光度计计算提取的 DNA 的浓度及纯度; ⑤ 保存 DNA: 将提取标本的 DNA 置于 -20 °C 冰箱保存。

1.2.2 组织 DNA 甲基化修饰 按 EpiGENETEK one step DNA Modification kit 方法修饰: ① 取 90% 乙醇 1 ml 加入 10 μ l G3 (平衡液) 混匀, 取混合液体

2014-04-18 接收

基金项目: 安徽省卫生厅基金 (编号: 2010B013)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 神经外科、² 中心实验室, 合肥 230022

作者简介: 徐培坤, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xpkayfy@163.com

50 μ l 加入 200 μ l G1/G2/G3 洗涤前面步骤提取的 DNA,振荡水浴 8 min 后离心(2 000 r/min, 1 min)。
② 加入 300 μ l G4 修饰,离心(2 000 r/min, 1 min)并混匀;③ 向混匀液中加入 90% 乙醇充分洗涤(反复 2 次);④ 向充分洗涤后的混匀液中加入 18 μ l G6。

1.2.3 nPCR 法检测 nPCR 即通过 2 轮的 PCR 反应,使用的是两套引物来扩增特异性的 DNA 片段。引物序列见表 1。其中第 2 对引物的功能是特异性的扩增位于首轮 PCR 产物内的一段 DNA 片段。这种 PCR 可以提高 DNA 扩增的特异性,避免扩增出错误的 DNA 片段。

表 1 3 种基因的引物序列及产物长度

基因	引物序列(5'-3')	产物长度 (bp)
ppENK	外引物 F1: GTTGGGTTTTAGTATATTTTAGAAG	385
	R1: CTACTAAAACCACTTTATAATTAACC	
	内引物 F2: TTAAATTTTAAATGTTTTGGGT	239
	R2: CTACTAAAACCACTTTATAATTAACC	
EDNRB	外引物 F1: GATTGAATTTTATTTGGGGTTT	155
	R1: TATATCAAACCTACATTTTACCCC	
	内引物 F2: AATTATTGATTGAATTTTATTTGGG	247
	R2: CTG GCC GAA AGA AAG AAA TGGT	
CLDN-7	外引物 F1: TTTATTTGGGTAAGGAGGGGT	314
	R1: ACCCTAAACAAACAAAAATAAA	
	内引物 F2: TTTATTTGGGTAAGGAGGGGT	377
	R2: AATAATTCACAAACAAATTAATAATC	

首轮 PCR:反应体系总共为 25 μ l(其中以蒸馏水代替 DNA 模板作对照组):包括 DNA 模板 4 μ l + 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ l + dNTP 0.5 μ l + MgCl₂ 2.5 μ l + Taq 酶 0.2 μ l + 内、外引物各 1.5 μ l,再加双蒸水至 25 μ l。反应体系经过 95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性,再经过 PCR 循环(99 $^{\circ}$ C 6 min,65 $^{\circ}$ C 120 min,72 $^{\circ}$ C 33 min)。

首轮 DNA 的 PCR 为 30 个循环,2 μ l 首轮产物经双蒸水稀释(首轮产物:双蒸水=1:4)后作为目标物加入次轮反应,重复首轮 PCR 的过程。扩增后的目标物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,见图 1。

1.2.4 PCR 产物的测序 本次实验采用 BSP 法,其测序工作由上海生物芯片公司完成。该法是检测基因甲基化的有效手段,根据测序的结果,可确定扩增的 PCR 产物目标片段中每个 CpG 岛中的胞嘧啶(C)的甲基化状态。如果目的片段的 CpG 岛中的 C 发生甲基化,那么测序结果会显示 C 经过亚硫酸氢盐修饰后无改变,见图 2A、C;若目的片段的 CpG 岛

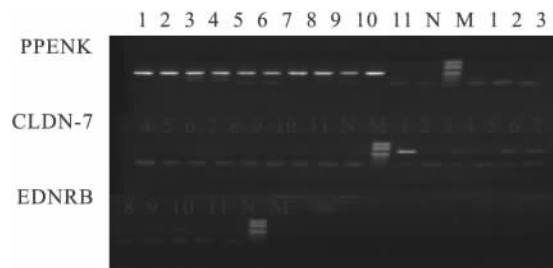


图 1 nPCR 扩增后对扩增产物进行检测电泳图

1~11: 标本组织;N: H₂O 阴性对照;M: DNA 片段 Marker

中的 C 未发生甲基化,那么测序结果会显示 C 经过试验处理后转变成胸腺嘧啶(T)。见图 2B、D。

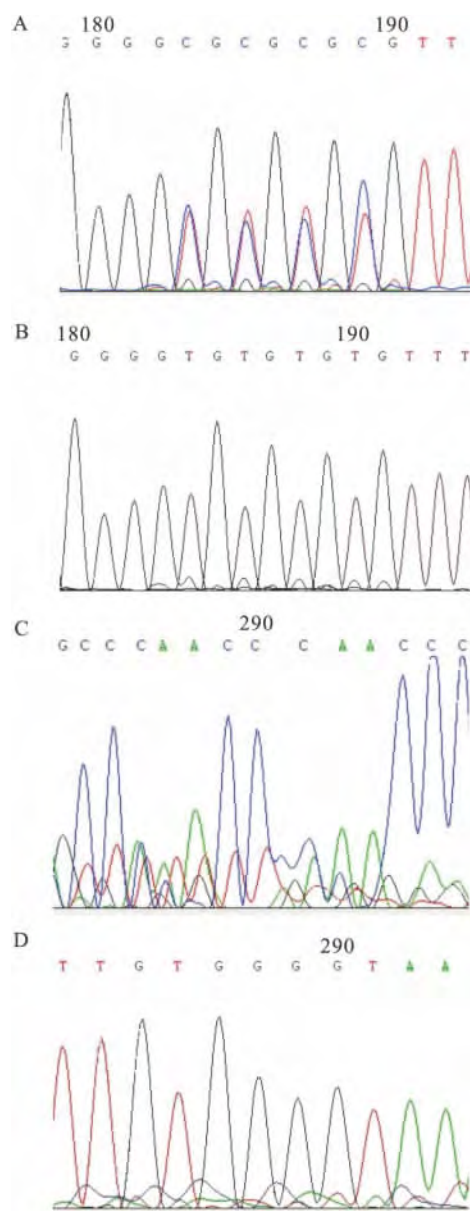


图 2 ppENK(A、B)和 EDNRB(C、D)甲基化测序图
A、C:基因发生甲基化现象;B、D:基因未发生甲基化现象

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件分析, 甲基化率与标本的病理级别、患者的性别、年龄的相关性分析采用 χ^2 检验, 两率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 ppENK、EDNRB 和 CLDN-7 基因甲基化情况

本组 46 例脑胶质瘤标本, 经初步检测有 44 例 DNA 质量合格, 经 nPCR 扩增后检测 3 种基因对应的扩增产物, 扩增成功的例数分别为 43 例、40 例、5 例。对扩增产物进行甲基化测序, 检测出 ppENK 基因甲基化率为 44.2% (19/43), EDNRB 基因甲基化率为 22.5% (9/40), CLDN-7 基因甲基化率为 0% (0/5)。10 例正常脑组织作为对照组, 均未发现基因甲基化现象。

2.2 基因甲基化与临床资料的相关性 脑胶质瘤组织中 ppENK、EDNRB 基因甲基化率与研究对象的年龄、性别、病理分型、病理级别之间相关性的统计学分析见表 2。其中在低级别 (I ~ II 级) 脑胶质瘤和高级别 (III ~ IV 级) 脑胶质瘤中 ppENK 基因 CpG 岛的甲基化率分别为 33.3% 和 69.2%, 两者之间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。CLDN-7 基因对应 nPCR 扩增产物仅为 5 例, 所以其与临床资料之间的关系未进行统计学分析。

表 2 ppENK、EDNRB 基因启动子甲基化与临床病理特征关系

项目	ppENK				EDNRB			
	例数	甲基化数	P 值	χ^2 值	例数	甲基化数	P 值	χ^2 值
性别			0.708	0.140			0.248	0.175
男	19	9			18	3		
女	24	10			22	6		
年龄(岁)			0.462	0.164			0.905	0.014
<40	15	6			14	3		
≥40	28	13			26	6		
肿瘤类型			0.648				0.846	
星形细胞瘤	23	10			21	5		
少枝胶质细胞瘤	5	2			5	1		
室管膜瘤	3	1			2	0		
胶质母细胞瘤	12	6			12	3		
病理分级			0.029	4.739			0.952	0.118
低级别	30	10			27	6		
高级别	13	9			13	3		

3 讨论

肿瘤的发生、发展常涉及到多基因的异常, 导致基因异常的原因有很多如基因突变、启动子甲基化等。基因组 DNA 甲基化修饰与肿瘤的发生、侵袭、

转移、耐药等有着密切关系, 其机制可能与 DNA 修复基因、抑癌基因、细胞周期调控基因、肿瘤侵袭基因等甲基化修饰致其异常表达有关。近年来恶性肿瘤研究^[6-7]显示 hMLH1、hMSH2、MGMT、APC 和 FHIT 等基因存在甲基化现象。随着研究的深入, 一些学者^[8]认为基因甲基化可能成为肿瘤预后、预测标记物, 其对于肿瘤的分子诊断、个性化治疗有着重要的意义。同样, 脑胶质瘤中寻找基因甲基化证据, 为研究脑胶质瘤的发病机制、诊断、治疗提供新的方向。

ppENK 基因位于 8q23-q24, 是控制神经肽分泌的基因, 其编码的甲硫脑啡肽, 与阿片生长因子受体相结合发挥作用, 是一种肿瘤抑制剂。Yang et al^[9]研究发现胰腺癌组织中 ppENK 基因甲基化率为 90.3%, 正常胰腺中却未发现, 而在胰腺癌细胞株中均发现该现象。本实验同样显示标本中 ppENK 基因存在高甲基化现象, ppENK 基因的甲基化率在脑胶质瘤高级别组 (III ~ IV 级) 与低级别组 (I ~ II 级) 存在显著差异。研究^[10]表明胆汁中 ppENK 等 6 种特定基因甲基化可能作为生物标志物用于鉴别诊断恶性和良性胆道狭窄。由此推断该基因是脑胶质瘤病理分级的潜在生物标志物, 有助于判断肿瘤预后, 该基因也可能成为恶性程度高的胶质瘤治疗靶点。

EDNRB 基因位于 13q22.3, 其编码的 ETB receptor 是一种 G 蛋白偶联跨膜蛋白。EDNRB 基因甲基化在恶性肿瘤中广泛存在, Chen et al^[11]研究发现大肠癌中 EDNRB 基因甲基化现象较正常组织更为频繁。本实验也显示肿瘤中存在 EDNRB 基因甲基化现象。研究^[12]表明食管鳞状细胞癌细胞株在去甲基化药物 5-氮杂-2'-脱氧胞苷作用下 EDNRB 基因又可重新表达, 正常细胞株中则不存在该现象, 从另一面显示肿瘤与 EDNRB 基因甲基化是有关系的。同时, 本实验分析 EDNRB 基因甲基化与相关临床资料并无显著相关性, 该现象可能普遍存在胶质瘤中, 由此推断该基因甲基化在胶质瘤的发生发展中是一个重要事件。

CLDN-7 基因由 4 个跨膜蛋白亚型组成及 2 个细胞外环组成的紧密连接蛋白。有研究^[13]表明大肠癌组织中 CLDN-7 基因存在高甲基化状态, 使用去甲基化药物处理后, CLDN-7 基因又得以重新表达, 并通过实验数据分析得出大肠癌的病理等级与 CLDN-7 基因甲基化存在相关性。本实验并未显示该基因甲基化现象 (实验仅扩增出 5 例目的基因),

考虑实验室引物设计或是酶引起的假阴性现象的可能。课题组之后的实验可进一步验证。

综上所述,ppENK 基因甲基化水平与胶质瘤的病理分级呈正相关,其在诊断胶质瘤的病理分级中可能有重要的意义,可能成为恶性程度高的胶质瘤治疗靶点;EDNRB 基因甲基化与胶质瘤发生发展密切相关,其可能普遍存在于胶质瘤中,可能是脑胶质瘤发生发展过程中的一个重要事件。本实验显示胶质瘤发生发展与多基因甲基化相关,而非某一基因。总之,随着更多的基因甲基化的发现,寻找到胶质瘤的 DNA 甲基化谱成为可能,其建立将在胶质瘤的分类、诊断、复发监测、疗效评价和预后判断等方面有着深远的意义。

参考文献

- [1] Ueki T, Toyota M, Skinner H, et al. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(23):8540-6.
- [2] Kaur J, Demokan S, Tripathi S C, et al. Promoter hypermethylation in Indian primary oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(10):2367-73.
- [3] Yates D R, Rehman I, Abbod M F, et al. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(7):2046-53.
- [4] Kojima T, Sawada N. Regulation of tight junctions in human normal pancreatic duct epithelial cells and cancer cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1257(10):85-92.
- [5] Lee K H, Lee J S, Nam J H, et al. Promoter methylation status of hMLH1, hMSH2, and MGMT genes in colorectal cancer associated with adenoma-carcinoma sequence [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2011, 396(7):1017-26.
- [6] Berrada N, Amzazi S, Ameziane El Hassani R, et al. Epigenetic alterations of adenomatous polyposis coli (APC), retinoic acid receptor beta (RAR β) and survivin genes in tumor tissues and voided urine of bladder cancer patients [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2012, Suppl58:OL1744-51.
- [7] Paluszczak J, Misiak P, Wierzbicka M, et al. Frequent hypermethylation of DAPK, RARbeta, MGMT, RASSF1A and FHIT in laryngeal squamous cell carcinomas and adjacent normal mucosa [J]. *Oral Oncol*, 2011, 47(2):104-7.
- [8] Nalejska E, Maczyńska E, Lewandowska M A. Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology [J]. *Mol Diagn Ther*, 2014, 18(3):273-84.
- [9] Yang L, Yang H, Li J, et al. ppENK gene methylation status in the development of pancreatic carcinoma [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2013, 2013:130927.
- [10] Zhang Y, Yang B, Du Z, et al. Identification and validation of specific methylation profile in bile for differential diagnosis of malignant biliary stricture [J]. *Clin Biochem*, 2010, 43(16-17):1340-4.
- [11] Chen C, Wang L, Liao Q, et al. Hypermethylation of EDNRB promoter contributes to the risk of colorectal cancer [J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8(1):199.
- [12] Zhao B J, Sun D G, Zhang M, et al. Identification of aberrant promoter methylation of EDNRB gene in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Dis Esophagus*, 2009, 22(1):55-61.
- [13] Nakayama F, Semba S, Usami Y, et al. Hypermethylation-mediated downregulation of claudin-7 expression promotes the progression of colorectal carcinoma [J]. *Pathobiology*, 2008, 75(3):177-85.

Methylation of ppENK, EDNRB and CLDN-7 gene in glioma

Xu Peikun¹, Deng Pengcheng¹, Zhu Lixin², et al

(¹Dept of Neurosurgery, ²Dept of Central Lab, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To study the methylation of ppENK, EDNRB and CLDN-7 in glioma. **Methods** nPCR and BSP were adopted to investigate the promoter frequency of these genes in 46 cases of glioma and 10 normal brain tissue. The relationship between frequency of methylation of these genes and clinical disease material was analyzed.

Results Normal brain tissue had no genes methylation. In patients with glioma, the frequency of methylation in ppENK, EDNRB and CLDN-7 was 44.2% (19/43), 22.5% (9/40) and 0% (0/5). The rate (33.3%) of ppENK promoter methylation in grades I ~ II gliomas was significantly lower than that (69.2%) in grades III ~ IV gliomas ($P < 0.05$). **Conclusion** ppENK and EDNRB promoter (CpG island) hypermethylation exists in glioma, which may correlate with the occurrence of glioma.

Key words CpG; Methylation; glioma