

脑胶质瘤组织中 EDNRB 基因甲基化状态及其蛋白表达的意义

成金民¹ 朱立新² 王 斌¹ 邓鹏程¹ 徐培坤¹

摘要 目的 探讨人脑胶质瘤组织中 EDNRB 基因的甲基化状态及其蛋白表达的关系。方法 采用巢式 PCR、亚硫酸氢盐测序 PCR(BSP) 及免疫组织化学技术方法,检测 50 例脑胶质瘤组织标本中 EDNRB 基因启动子区甲基化状态,分析其甲基化水平、蛋白表达和临床资料之间的相关性。结果 脑胶质瘤组织中 EDNRB 基因启动子区甲基化率为 38% (19/50),其中低级别组(Ⅰ级~Ⅱ级)中 EDNRB 基因甲基化率为 26.5% (9/34),高级别组(Ⅲ级~Ⅳ级) EDNRB 基因甲基化率为 62.5% (10/16),两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。而其中甲基化蛋白表达阳性率为 36.8% (7/19),未甲基化的蛋白表达阳性率为 71% (22/31)。结论 组织

中的 EDNRB 基因启动子区 CpG 岛高甲基化与胶质瘤的发病有关,与胶质瘤的病理级别关系密切,而与患者年龄、性别、肿瘤分型无关;基因甲基化率抑制其蛋白表达。

关键词 脑胶质瘤; 内皮素受体 B; 甲基化; 蛋白表达

中图分类号 R 739.1; R 730.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)07-0984-04

脑胶质瘤是神经系统最常见的恶性肿瘤。目前,国内外研究^[1]已经证实部分基因甲基化与胶质瘤密切相关。EDNRB 基因甲基化现象已在多个系统的恶性肿瘤中被陆续检测出,但脑胶质瘤中尚未见 EDNRB 甲基化的报道。该研究采用巢式 PCR 方法和亚硫酸氢盐监测序 PCR(BSP) 方法研究脑胶质瘤组织中 EDNRB 基因的甲基化状态,分析其与胶质瘤患者年龄、性别、病理分型、病理级别的关系,了解其在脑胶质瘤发生、发展过程中的作用;并通过免疫组化法研究胶质瘤基因发生甲基化与未发生甲基化情况下各自的蛋白表达情况,以分析基因甲基化与

2014-02-17 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:成金民,男,硕士研究生;

徐培坤,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: xpk5909@163.com

MMP-26 mRNA and protein expression in pancreatic cancer and its clinical significance

Wu Nianfu, Tang Zhigang, Chen Jiong, et al

(Dept of Bile Pancreatic Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To detect MMP-26 expression in human pancreatic cancer and to investigate its role and significance in the progression of pancreatic cancer. **Methods** Immunohistochemistry, RT-PCR and Western blot were used to detect MMP-26 mRNA and protein in pancreatic cancer and adjacent normal tissue, to investigate the relationship between the clinical and pathological features of pancreatic cancer with MMP-26. **Results** The positive expression rate of MMP-26 protein was significantly higher in pancreatic cancer (72%) than in adjacent normal tissues (6%) by immunohistochemical method, difference was considered statistically significant ($P < 0.05$). The high expression of MMP-26 was correlated with pancreatic differentiation, TNM stage and lymph node metastasis. RT-PCR detected 10 cases of pancreatic cancer tissues and adjacent normal tissues respectively, in which 7 cases (70%) were discovered the positive expression of MMP-26 mRNA was significantly unregulated in pancreatic tissue than in adjacent normal tissues. Western blot detected 7 cases of pancreatic cancer tissues and adjacent normal tissues respectively, in which 5 cases (71.4%) were discovered the positive expression of MMP-26 mRNA was significantly higher in pancreatic tissue than in adjacent normal tissue. **Conclusion** The expression of MMP-26 is correlated with pancreatic differentiation, TNM stage and lymph node metastasis, may become a novel biomarker and clinical therapeutic target of pancreatic cancer.

Key words pancreatic cancer; MMP-26; protein expression

其蛋白表达的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料 收集2012年1月~2013年1月在安徽医科大学第一附属医院神经外科接受手术治疗的50例胶质瘤患者的组织标本。所有标本均经病理确诊为胶质瘤,术前未进行过放疗及化疗。标本离体后即置于-80℃冰箱内保存备用。标本来源患者中,男21例,女29例,年龄21~73岁,平均36.8岁。按WHO病理分级,分为低级别组:I~II级34例,高级别组:III~IV级16例。其中星形细胞瘤22例、少枝胶质细胞瘤11例、室管膜瘤4例、髓母细胞瘤3例、胶质母细胞瘤10例。

1.2 免疫组化试剂 抗内皮素受体B抗体购自上海研晶实业有限公司,免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 组织DNA提取和测定DNA浓度 使用Qi-amp DNA mini kit试剂盒从冷冻标本组织中提取DNA,再用紫外分光光度计检测提取DNA的含量及纯度。

1.3.2 DNA甲基化修饰 按EpiGENETEK one step DNA Modification kit步骤进行修饰:①取90%乙醇溶液1 ml加入10 μl G3(平衡液),取以上50 μl混合液体加入200 μl G5洗涤DNA 8 min后,离心2 000 r/min;②加入300 μl G4修饰,离心2 000 r/min混匀;③混匀液中加入90%乙醇溶液洗涤2次;④加入18 μl G6。

1.3.3 巢式PCR 根据巢式PCR引物设计原理,设计两套PCR引物,并对其进行两轮PCR扩增反应。EDNRB基因甲基化引物(EDNRB-M) MF: 5'-GGAGAGGTAGTTTTTTTTTCTGT-3', MR: 5'-CCA AAACCTTAATCCTCCTACT-3',扩增片段长度422 bp; EDNRB基因非甲基化引物(EDNRB-U) UF: 5'-GTTGGAAGTAATTTTAAGTTTTG-3', UR: 5'-CCAATT TCCCATTTATCCAAACCA-3',扩增片段长度387 bp。

首轮PCR反应体系为25 μl,包括DNA模板(50~100 ng) 4 μl、Taq酶(5 U/μl) 0.2 μl、10×PCR Buffer 2.5 μl、上下游引物各1.5 μl、MgCl₂ 2.5 μl,加双蒸水至25 μl。PCR反应程序如下:95℃ 10 min预变性,PCR循环99℃ 6 min、65℃ 120 min、72℃ 33 min,30个循环,2 μl首轮产物以1:4加双蒸水稀释,作为样本加入次轮反应,重复上述过程。以无菌蒸馏水代替DNA模板做阴性对比。扩增完

后用2%琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行检测,见图1。

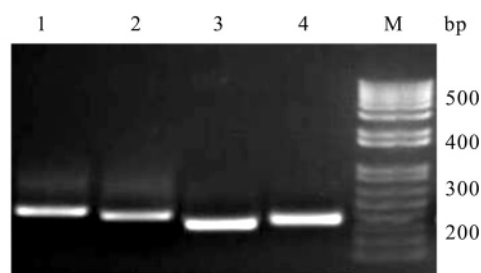


图1 EDNRB基因巢式PCR扩增电泳图

1~4: 标本组织; M: DNA Marker

1.3.4 扩增PCR测序 根据BSP方法对PCR扩增产物进行测序。本研究测序工作由上海生物芯片公司完成,主要仪器为ABI 3730XL全自动DNA测序仪(遗传分析仪)。若原基因序列CpG岛中的胞嘧啶(C)发生了甲基化反应,则测序后应保持不变,见图2;若基因序列中C未发生甲基化,则经过以上反应,测序后C会转变为胸腺嘧啶(T),见图3。

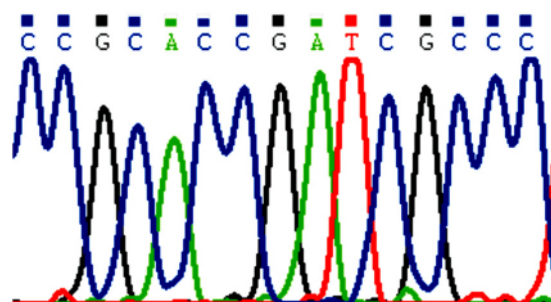


图2 EDNRB发生甲基化

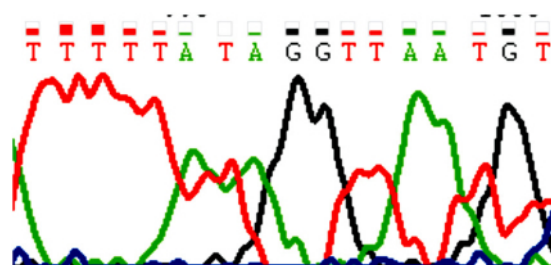


图3 EDNRB未发生甲基化

1.4 免疫组织化学染色

1.4.1 方法 组织标本经甲醛溶液固定、石蜡包埋、连续切片,采用SP法染色,具体步骤按免疫组化试剂盒说明书进行,用自身对照作阳性对照,用PBS液代替一抗作阴性对照。

1.4.2 染色结果评定标准 EDNRB 染色主要以胞质内出现棕黄色颗粒为阳性,在 10 个高倍镜下观察切片,计数阳性细胞占肿瘤细胞百分比, $<10\%$ 为阴性, $\geq 10\%$ 为阳性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,资料均为一般计数资料,采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 基因扩增、甲基化测序结果及其与临床病理特征的相关性 50 例胶质瘤组织标本经过甲基化修饰及测序检测,检测出其中 19 例标本的 EDNRB 基因启动子区发生了甲基化,甲基化率为 38% ($19/50$),其中低级别组 EDNRB 发生甲基化率为 26.5% ($9/34$),高级别组 EDNRB 发生甲基化率为 62.5% ($10/16$),两组比较,差异有统计学意义 ($P = 0.014$)。胶质瘤患者标本组织中 EDNRB 基因发生甲基化与患者病理分级有关,而与年龄、性别及病理分型无关,见表 1。

表 1 EDNRB 基因启动子甲基化状态与临床病理特征的关系 (n)

项目	n	甲基化例数	P 值	χ^2 值
性别				
男	21	9	0.547	0.363
女	29	10		
年龄(岁)				
<40	18	7	0.923	0.009
≥ 40	32	12		
肿瘤类型				
星形细胞瘤	22	8	0.660	0.193
室管膜瘤	4	1		
少枝胶质细胞瘤	11	3		
髓母细胞瘤	3	2		
胶质母细胞瘤	10	5		
肿瘤级别				
低级别(Ⅰ级~Ⅱ级)	34	9	0.014	5.995
高级别(Ⅲ级~Ⅳ级)	16	10		

2.2 EDNRB 蛋白表达情况 EDNRB 蛋白的阳性表达主要在胞质内,少量在细胞膜表达,见图 4。EDNRB 基因发生甲基化的肿瘤标本蛋白表达阳性率 36.8% ($7/19$),未发生甲基化的蛋白表达阳性率

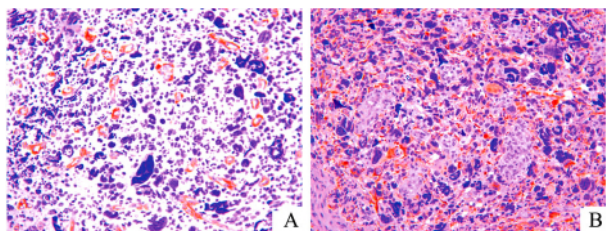


图 4 EDNRB 在人脑胶质瘤中的表达 SP $\times 200$
A: 基因发生甲基化染色; B: 基因未发生甲基化染色

为 71% ($22/31$)。应用 Fishers 确切概率分析:胶质瘤组织中蛋白表达率与相关基因的未甲基化相关 ($\chi^2 = 5.632$, $P = 0.018$)。

3 讨论

本课题组前期研究^[2-3]表明:在胶质瘤组织中 ppENK 基因甲基化的发生率为 40.6% ($13/32$),而在胶质瘤患者血清中 CLDN-7 基因甲基化的发生率为 35.3% ($18/51$)。EDNRB 基因位于 13 号染色体 q22, GenBank ID 1910, 长度约 24 000 bp, 含 7 个外显子和 6 个内含子,其启动子区包含一个 CpG 岛^[4]。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶(DNMT)的作用下,将 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)中的甲基基团转移给 5'CpG 中的 C 而变成 5'mCpG^[5]。由于 C 结构发生改变,使得基因启动子区 CpG 岛发生甲基化导致基因转录沉默,而使其表达缺失。EDNRB 是一种内皮素受体相关抑癌基因,其甲基化现象已经在部分消化道肿瘤中被检测出^[6]。抑癌基因启动子高度甲基化被认为是和突变、缺失一样引起抑癌基因失活的关键机制之一^[7]。EDNRB 基因介导细胞信号转导,其启动子区发生甲基化而抑制其表达,从而导致了肿瘤的发生^[8]。研究^[9-11]表明 EDNRB 基因启动子区域 CpG 岛甲基化与多种癌症如前列腺癌、膀胱癌、肺癌的发生、发展密切相关。另外研究^[12]表明 EDNRB 基因甲基化与先天性巨结肠(HD)的发生关系密切,该基因启动子区 CpG 岛发生甲基化时其功能失活,从而导致体内内皮素信号转导通路发生信号转导异常,影响神经嵴细胞分化、增生及移行,从而导致 HD 的发生。目前在神经系统肿瘤中该基因甲基化的实验研究尚未全面开展,故很有必要对胶质瘤基因甲基化进行深入研究,以实现临床上胶质瘤患者能得到早期的诊断、个体化的治疗。

本研究显示 EDNRB 基因启动子区域 CpG 岛在胶质瘤中也存在着高甲基化率的现象,研究结果表明:胶质瘤中 EDNRB 甲基化水平随着胶质瘤的恶性程度的增高而增高,而与患者的年龄、性别、肿瘤病理分型无关,这说明了 EDNRB 基因启动子区域 CpG 岛甲基化可能在胶质瘤的恶变过程中起着重要作用。抑癌基因甲基化现象抑制了其基因的表达,导致了其自身表达的沉默。本研究中胶质瘤组织 EDNRB 基因启动子区发生甲基化时其蛋白表达率低,而未发生甲基化时其蛋白表达率高,因此可以认为基因甲基化在其蛋白表达调控中起着重要的作

用。

综上所述,EDNRB 基因启动子区甲基化可能与胶质瘤的发生、发展关系密切。基因的甲基化改变具有可逆性^[13] 这一特性为临床上肿瘤的治疗提供了一个新的途径。5-氮杂-2'-脱氧胞苷是目前最常用的甲基化抑制剂,它能与 DNA 甲基转移酶共价结合,降低该酶的生物学活性,从而降低甲基化水平,使甲基化失活的基因恢复原有功能^[14]。目前 5-氮杂-2'-脱氧胞苷已成功应用于急性粒细胞白血病的治疗^[15]。故通过对胶质瘤基因甲基化的深入研究,采用药物或基因芯片技术使已甲基化的基因去甲基化,从而抑制肿瘤的生长,达到治疗肿瘤的目的。

参考文献

- [1] Wakabayashi T, Natsume A, Hatano H, et al. P16 promoter methylation in the serum as a basis for the molecular diagnosis of gliomas [J]. *Eurosurgery*, 2009, 64(3): 455–61.
- [2] 吴开福, 徐培坤, 朱立新, 等. 脑胶质瘤中 P16 基因启动子区的甲基化状态的研究 [J]. *国际神经病学神经外科杂志*, 2011, 38(6): 520–4.
- [3] 刘正, 徐培坤, 朱立新, 等. 脑胶质瘤中 CLDN-7 基因甲基化状态及蛋白表达的研究 [J]. *安徽医药*, 2013, 17(1): 53–5.
- [4] Hyndman K A, Miyamoto M M, Evans D H. Phylogeny, taxonomy, and evolution of the endothelin receptor gene family [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2009, 52(8): 677–87.
- [5] Kurkjian C, Kummar S, Murgo A J. DNA methylation: its role in cancer development and therapy [J]. *Curr Probl Cancer*, 2008, 32(5): 187–235.
- [6] 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(11): 55–61.
- [7] Feinberg A P, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer [J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(1): 21–33.
- [8] Qureshi S A, Bashir M U, Yaqinudding A. Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer [J]. *Int J Surg*, 2010, 8(3): 194–8.
- [9] Chen S C, Lin C Y, Chen Y H, et al. Aberrant promoter methylation of EDNRB in lung cancer in Taiwan [J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(1): 167–72.
- [10] Bastian P J, Ellinger J, Heukamp L C, et al. Prognostic value of CpG island hypermethylation at PTGS2, RAR-beta, EDNRB and other gene loci in patients undergoing radical prostatectomy [J]. *Eur Urol*, 2007, 51(7): 665–74.
- [11] 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.
- [12] Brooks A S, Oostra B A, Hofstra R M. Studying the genetics of Hirschsprung's disease: unraveling an oligogenic disorder [J]. *Clin Genet*, 2005, 67(1): 6–14.
- [13] De Schutter H, Nuyts S. Radiosensitizing potential of epigenetic anticancer drugs [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2009, 9(3): 99–108.
- [14] Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, et al. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia [J]. *Blood*, 2007, 109(1): 52–7.
- [15] Polakova K, Bandzuchova E, Sabty F A, et al. Activation of HLA-G expression by 5-aza-2-deoxycytidine in malignant hematopoietic cells isolated from leukemia patients [J]. *Neoplasma*, 2009, 56(6): 514–20.

Methylation of EDNRB gene and protein expression in glioma

Cheng Jinmin¹, Zhu Lixin², Wang Bin¹, et al

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

Abstract Objective To explore the relation between methylation of EDNRB gene and its protein expression in human brain glial tissues. **Methods** By using nest PCR, bisulfite PCR and immunohistochemistry staining, we investigated the methylation status at EDNRB gene promoter, EDNRB protein expression and their association with patient clinical history. **Results** In this study, we found EDNRB gene promoter methylation among 38% of total glioma samples (19/50), with 26.5% among low grade glioma while 62.5% among high grade gliomas, which was statistically significant. Within the samples with EDNRB gene methylation events detected, 36.8% of these samples showed protein expression detected by IHC while 71% samples without EDNRB gene methylation were IHC positive. **Conclusion** Our study supports the EDNRB gene promoter methylation contributes to gliomagenesis. Moreover, the methylation status correlates with grade of glioma but not with patient age, gender, tumor subtype. The methylation status is negative related to protein expression in gliomas.

Key words glioma; EDNRB; methylation; protein expression