

脑胶质瘤中 ppENK 基因启动子区的甲基化状态研究

吴开福¹ 徐培坤^{1*} 朱立新² 赵庭生¹ 刘正¹

1. 安徽医科大学第一附属医院神经外科, 安徽 合肥 230022

2. 安徽医科大学第一附属医院中心实验室, 安徽 合肥 230022

摘要:目的 检测脑胶质瘤组织中候选抑癌基因 ppENK 基因启动子区的甲基化状态, 探讨 ppENK 基因启动子的异常甲基化水平在脑胶质瘤发生发展中的作用以及与临床病理资料之间的关系。方法 采用巢式聚合酶链反应 (nested polymerase chain reaction nPCR) 方法和亚硫酸氢盐修饰后测序法 (Bisulfite sequence polymerase chain reaction BSP), 检测 32 例脑胶质瘤组织和 10 例正常脑组织中 ppENK 基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态。结果 脑胶质瘤组织中 ppENK 基因启动子甲基化率为 40.6% (13/32), 明显高于正常脑组织中 ppENK 基因启动子甲基化率 0% (0/10), 两者差异存在统计学意义 ($P=0.015$)。在低级别 (I - II 级) 组和高级别 (III - IV 级) 组脑胶质瘤中 ppENK 基因启动子甲基化率分别为 21.1% (4/19) 和 69.2% (9/13), 通过分析表明两者差异存在统计学意义 ($P=0.006$)。结论 ppENK 基因启动子的 CpG 岛在脑胶质瘤中存在高甲基化现象, 可能与胶质瘤发生有关。ppENK 基因启动子的甲基化状态与胶质瘤病理分级有关, 与年龄、性别、病理分型无关。

关键词: ppENK; 甲基化; 胶质瘤

Methylation status of promoter of mismatch repair gene ppENK in glioma

WU Kai-Fu, XU Pei-Kun*, ZHU Li-Xin, ZHAO Ting-Sheng, LIU Zheng. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Anhui Medical College, Anhui 230022, China

Abstract: Objective To explore the methylation status of ppENK promoter region in glioma and discuss the abnormal ppENK gene promoter methylation gliomas occurrence and development, the relationship between role and clinical pathological material. **Methods** Methylation status of the ppENK promoter region was assayed in 32 glioma tissues and 10 normal brain tissues by nested polymerase chain reaction (nPCR) and Bisulfite sequence polymerase chain reaction (BSP). **Results** BSP showed that the ppENK promoter region was hypermethylated in 13 of the 32 glioma tissues and no methylation of ppENK promoter was detected in the 10 normal brain tissues. The promoter hypermethylation ratio of ppENK gene in glioma tissues (40.6%) was significantly higher than that in normal brain tissues (0%, $P=0.015$). Moreover, we found that the aberrant promoter methylation of ppENK gene was significantly correlated with tumor grade ($P=0.006$), but not correlated with age, sex and tumor types of patients ($P=0.154, 0.961$ and 0.694 , respectively). The rate (21.1%) of ppENK promoter methylation in grades I ~ II gliomas was significantly lower than that (69.2%) in grades III ~ IV gliomas ($P<0.05$). **Conclusions** ppENK promoter (CpG island) hypermethylation exists in glioma, which may correlates with the occurrence of glioma. The expression and promoter region methylation of ppENK gene in the gliomas are related to pathological grades, not related to the patient's age, gender and tumor size factors.

Key words: ppENK; Methylation; glioma

前脑啡肽原 ppENK (preproenkephalin), 位于 8q23-24, 其编码的 met-enkephalin 是一种阿片样生长因子的前体, 又是一种抑制因子, 能够抑制肿瘤

生长、细胞更新、生长发育、伤口愈合和血管生成。其产物阿片类生长因子 (Opioid growth factor, F) 通过与阿片类生长因子受体 (Opioid growth factor re-

基金项目: 安徽省卫生厅基金 (2010B013)

收稿日期: 2011-08-04; 修回日期: 2011-11-18

作者简介: 吴开福 (1983-), 男, 硕士, 主要研究方向: 脑胶质瘤研究进展和临床治疗。

通讯作者: 徐培坤 (1959-), 男, 教授, 主任医师, 主要研究方向: 重型颅脑损伤、颅内肿瘤立体放射治疗、胶质细胞瘤。E-mail: xpk5909@163.com.

ceptor, Fr)结合发挥作用,能够在体内和体外条件下抑制肿瘤生长^[1-2]。目前主要在胰腺腺癌、胰管内乳头状粘液瘤和胰腺导管上皮肿瘤中发现了ppENK的甲基化失活^[3],而在脑胶质瘤中ppENK甲基化情况未见有报道。本实验旨在采用nPCR方法和BSP方法研究脑胶质瘤中ppENK基因启动子区的甲基化情况,分析其与胶质瘤病理分级、年龄、性别、病理分型关系,以探索其在脑胶质瘤发生、发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

32例脑胶质瘤标本来源于2010年2月~2011年3月安徽医科大学第一附属医院神经外科手术治疗的脑胶质瘤患者,10例正常脑组织标本来源脑外伤颅内减压手术患者。所有标本均经病理确诊,术前未进行放疗或化疗。标本切除后经液氮冷冻,置-80℃冰箱保存备用。提供该标本患者中男14例,女18例,年龄为25~74岁。按WHO病理分级,I~II级19例,III~IV级13例。其中星型细胞瘤18例,胶质母细胞瘤8例,少突胶质细胞瘤3例,室管膜瘤3例。

1.2 方法

1.2.1 组织DNA提取和测定DNA浓度 采用Qiamp DNA mini kit试剂盒从冷冻标本组织中提取DNA,2%琼脂糖凝胶电泳检测提取的DNA(图1),再用紫外分光光度计检测提取DNA的含量和纯度,DNA样品浓度($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) = OD260 × 稀释倍数 × 50/1000。

1.2.2 DNA甲基化修饰 按EpiGENETEK one step DNA Modification kit步骤进行修饰①取90%乙醇1ml加入10 μl G3(平衡液),取以上50 μl 混合液体加入200 μM 洗涤DNA,8min后,离心2000rpm/1min。②加入300mMG4修饰,离心2000rpm/1min混匀;③混匀液中加入90%乙醇洗涤2次;④加入18 μl G6。

1.2.3 巢式PCR(nested PCR) 根据巢氏PCR引物设计原理,利用引物设计软件设计出ppENK基因的巢式引物(外引物与内引物),然后对巢氏引物进行两轮PCR扩增反应。在第一轮扩增中,外引物用以产生扩增产物,此产物在内引物的存在下进行第二轮扩增。由于巢式PCR反应有两次PCR扩增,从而降低了扩增多个靶位点的可能性(因为与两套引物都互补的引物很少)增加了检测的敏

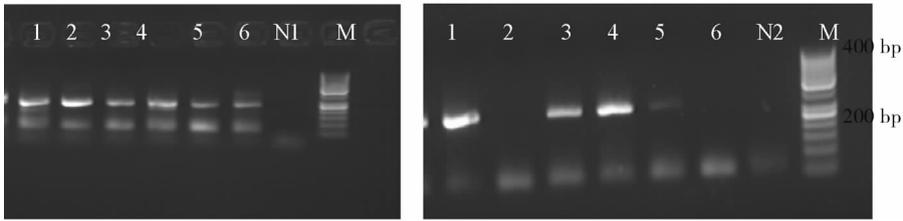
感性;又有两对PCR引物与检测模板的配对,增加了检测的可靠性。外引物ppENK-F1 5'-GTTGGGTTTTAGTATATTTTAGAAG-3' R 5'-CTACTAAACCACCTTTATAATTAACC-3'内引物ppENK-F2 5'-TTAAATTTTTTAATTGTTTTGGGT-3',R 5'-CTACTAAACCACCTTTATAATTAACC-3'外引物的PCR扩增产物大小为385bp,内引物的PCR扩增产物大小为239bp。首轮PCR反应体系为25 μl ,以无菌蒸馏水代替DNA模板作阴性对照。包括DNA模板(50~100ng)4 μl 、10×PCR Buffer 2.5 μl 、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)0.5 μl 、耐热DNA聚合酶(Taq酶)(5u/ μl)0.2 μl 、MgCl₂2.5 μl 、上下游引物各1.5 μl ,加双蒸水至25 μl 。PCR反应流程如下:95℃10分钟预变性,PCR循环99℃6min,65℃120min,72℃33min。首轮PCR为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。扩增完后用2%琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行检测(图2)。

1.2.4 扩增PCR测序 根据BSP方法对扩增PCR产物进行测序,根据测序结果可确定目的片段内每个CpG岛中胞嘧啶(C)的甲基化状态,目前是检测目的基因启动子区CpG岛甲基化水平的金标准。本实验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C即胞嘧啶发生了甲基化反应,则测序后应保持不变(图3);若原基因序列中的胞嘧啶未发生甲基化反应,则经亚硫酸氢盐修饰、PCR扩增和测序后应转变为胸腺嘧啶T(图4)。

1.2.5 统计学分析 用SPSS 13.0统计分析软件包处理数据,两率的比较采用 χ^2 检验,多变量间比较采用单因素logistic回归分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

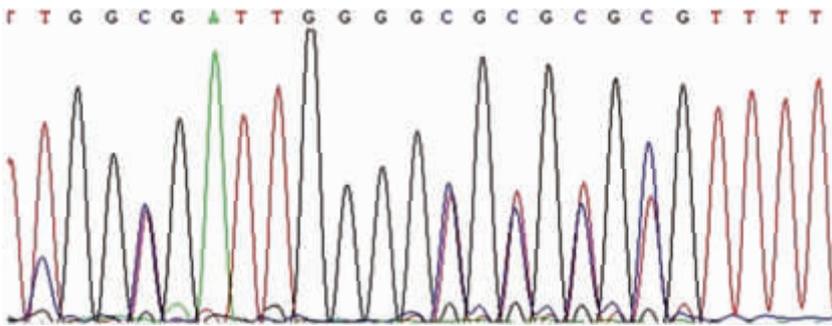
对本组32例脑胶质瘤标本进行甲基化修饰及测序检测,其中13例检测出发生ppENK基因启动子甲基化,甲基化率为40.6%,远高于正常脑组织的甲基化率0%(0/10),两者差异存在统计学意义($P = 0.015$)。低级别组(I-II级)和高级别(III-IV级)胶质瘤中ppENK基因启动子甲基化率分别为21.1%和69.2%,通过分析表明两者之间存在统计学意义($P = 0.006$)。而ppENK基因的甲基化与性别、年龄、病理类型无明显相关性(表2)。



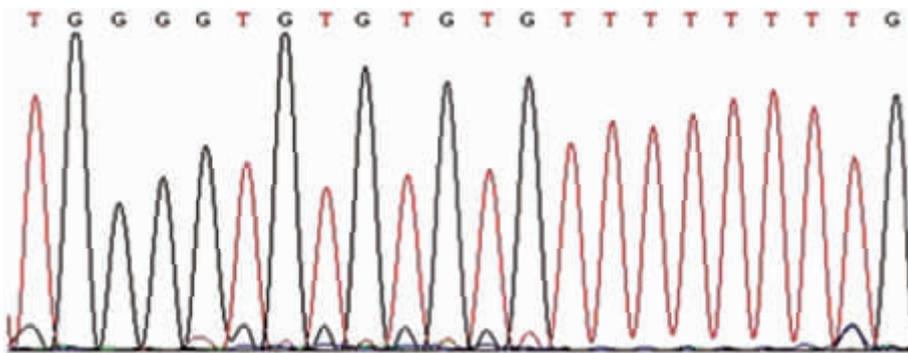
图片 1 (左)标本组织 DNA 提取后对 DNA 质量进行检测电泳图

图片 2 (右)巢式 PCR 扩增后对扩增产物进行检测电泳图

1-6 标本组织, N1、N2-H₂O 阴性对照 M-DNA 片段 Marker



图片 3 发生 ppENK 甲基化的测序图(经亚硫酸氢盐修饰后原 CpG 岛中胞嘧啶 C 仍为胞嘧啶 C)



图片 4 未发生 ppENK 甲基化的测序图(经亚硫酸氢盐修饰后原 CpG 岛中胞嘧啶 C 变为胸腺嘧啶 T)

3 讨论

胶质瘤是神经系统最常见的原发性恶性颅内肿瘤,预后不佳。随着表观遗传学的发展,DNA 甲基化与胶质瘤相关性研究成为近年来研究的热点。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶(DNMT1)的催化作用下,以 S-腺苷蛋氨酸(SAM)为甲基供体将甲基转移到 CpG 二核苷酸的胞嘧啶的 5' 末端,形成 mCpG 的过程。目前研究发现在脑胶质瘤中存在多种基因启动子区域 CpG 岛的高甲基化现象,因此认为 CpG 岛的高甲基化可能是脑胶质瘤发展的一个重要分子机

制,同时也进一步表明了表观遗传学在脑胶质瘤发生发展过程中具有重要的意义^[4,5]。在胰腺癌中,Ueki 等^[6]报告 11 个胰腺癌细胞系 ppENK 全部存在 CpG 岛甲基化,而且胰腺癌病理标本中 ppENK 甲基化检出率高达 91%,但在正常胰腺组织 ppENK 甲基化率为 0%。同时,4 个 ppENK 完全甲基化的胰腺癌细胞系均无相应 mRNA 表达,而所有正常胰腺组织均表达 ppENK mRNA,说明 CpG 岛甲基化抑制了 ppENK 表达。目前已明确这种基因表达的抑制作用是由于 ppENK 启动子区 CpG 岛甲基化干扰了顺式

表1 ppENK 基因启动子甲基化状态与临床病理特征关系

组别	例数	ppENK 甲基化例数	P 值
性别		5	0.154 [#]
男	14		
女	18	8	
年龄			0.961 [#]
<40 岁	10	4	
≥40 岁	22	9	
肿瘤类型			0.694 [△]
星性型细胞瘤	18	8	
少枝胶质细胞瘤	3	1	
室管膜瘤	3	1	
胶质母细胞瘤	8	3	
病理分级			0.006 [#]
低级别	19	4	
高级别	13	9	
实验组与对照组			0.015 [#]
脑胶质瘤组织	32	13	
正常脑组织	10	0	

注:△采用单因素 logistic 回归分析,#采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$, 具有显著性差异。

作用转录因子与启动子的结合造成。本实验通过对 32 例脑胶质瘤标本甲基化状态进行研究,发现 ppENK 基因启动子的 CpG 岛在脑胶质瘤中同样存在高甲基化现象(13/32),而 10 例正常脑组织中均未检测到 ppENK 基因启动子区 CpG 岛的甲基化现象发生(0/10)。通过统计学分析表明在脑胶质瘤组织和正常脑组织中 ppENK 基因启动子的 CpG 岛甲基化率之间存在显著差异($P < 0.05$),可见 ppENK 基因启动子的 CpG 岛异常甲基化在脑胶质瘤组织中具有肿瘤特异性,可能是胶质瘤发生中的频繁事件,与胶质瘤的发生发展密切相关。对 ppENK 基因的深入研究,必将推动脑胶质瘤发生相关机制的探索。

本实验通过研究发现 ppENK 基因启动子的甲基化状态与胶质瘤病理分级有关,与年龄、性别、病理分型无关。32 例脑胶质瘤标本中高级别组 13 例,其中 9 例检测到发生 ppENK 甲基化(69.2%)。低级别组 19 例,仅 4 例检测到发生 ppENK 甲基化(21.1%)。脑胶质瘤中 ppENK 甲基化率在高级别组(III-IV 级)明显高于低级别组(I-II 级),且两者之间差异存在统计学意义,通过这一变化趋势,可以推断 ppENK 甲基化是脑胶质瘤发生发展过程中的中晚期事件。在胰腺癌前病变—胰上皮内瘤(PanIN)和胰腺癌细胞中同样发现 ppENK 过度甲基化。且 PanIN 中 ppENK 甲基化率随 PanIN 病变分期加重而增加,PanIN21A 甲基化率为 7.7%,而 PanIN23 则升

至 46.2%^[7]。Zhang 等^[8] 通过研究发现 ppENK, DKK3, p16 等 6 种基因在恶性胆道狭窄患者胆汁中的甲基化检测率明显高于良性患者,并认为这 6 种基因的甲基化检测有望成为鉴别恶性和良性胆道狭窄的生物学标记。目前已经有研究发现 p16、hM-LH1、SLCSA8 等相关基因启动子区域 CpG 岛的异常甲基化与脑胶质瘤病理分级密切相关,其甲基化率随着脑胶质瘤恶性程度增加而增高^[9-11]。本实验研究认为 ppENK 甲基化率在不同级别脑胶质瘤中同样存在这一变化趋势,ppENK 基因启动子区域 CpG 岛的甲基化有可能成为脑胶质瘤评价恶性程度和预后的生物学标记,因此检测 ppENK 甲基化率具有一定的临床诊断意义。

ppENK 基因与抑制肿瘤细胞生长有关,其编码产物为阿片样生长因子,能延迟细胞周期发展,诱导细胞凋亡^[12],对包括胰腺癌在内的多种肿瘤具有负生长调节作用。因 ppENK 基因在脑胶质瘤中存在较高的甲基化率(40.6%),而正常脑组织中均未检测到甲基化的发生,并且其甲基化率与肿瘤的恶性程度密切相关,因此 ppENK 基因甲基化所致的失活静默可能促使脑胶质瘤发展加速。由于基因启动子区的高甲基化状态能通过特异性去甲基化药物逆转,从而恢复相关基因在脑胶质瘤中的表达,抑制肿瘤的生长。所以作为候选抑癌基因的 ppENK 有望成为脑胶质瘤基因治疗中的靶向基因。

参 考 文 献

[1] Zagon IS, Hytrek SD, McLaughlin PJ. Opioid growth factor tonically inhibits human colon cancer cell proliferation in tissue culture. *Am J Physiol*, 1996, 271(3): 511-519.

[2] Zagon IS, McLaughlin PJ. Opioid growth factor (OGF) inhibits anchorage-independent growth in human cancer cells. *Int J Oncol*, 2004, 24(6): 1443-1451.

[3] Koushiro O, Hiroyuki W, Fan Y, et al. Preproenkephalin hypermethylation in the pure pancreatic juice compared with p53 mutation in the diagnosis of pancreatic carcinoma. *Gastroenterol*, 2006, 41(8): 791-797.

[4] Nagarajan RP, Costello JF. Molecular epigenetics and genetics in neuro-oncology. *Neurotherapeutics*, 2009, 6(3): 436-446.

[5] Nagarajan RP, Costello JF. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. *Semin Cancer Biol*, 2009, 19(3): 188-197.

[6] Ueki T, Toyota M, Skinner H, et al. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreat-

ic carcinoma. *Cancer Res*, 2001, 61(23):8540-8546.

- [7] Rosty C, Ueki T, Argani P, et al. Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation. *Am J Pathol*, 2002, 160(1): 45-50.
- [8] Zhang Y, Yang B, Du Z, et al. Identification and validation of specific methylation profile in bile for differential diagnosis of malignant biliary stricture. *Clin Biochem*, 2010, 43(16-17):1340-1344.
- [9] 侯道荣,马骏,夏龙,等. 脑胶质瘤组织中 p16 基因启动子区 CpG 岛甲基化检测及其临床意义研究. *现代生物医学进展*, 2009, 20(9): 3890-3893.
- [10] 陈新军,袁先厚,江普查,等. 脑胶质瘤中 hMLH1 基因表达及启动子区的甲基化状态研究. *中国临床神经外科杂志*, 2010, 15(5): 286-288.
- [11] 姜政,李新钢,胡锦,等. 脑胶质瘤中 SLCSA8 和 TMS1/ASC 基因启动子区甲基化及 mRNA 表达的研究. *中华医学杂志*, 2007, 87(5): 292-297.
- [12] Zagon IS, Smith JP, McLaughlin PJ. Human pancreatic cancer cell proliferation in tissue culture is tonically inhibited by opioid growth factor. *Int J Oncol*, 1999, 14(3): 577-584.