

ANXA7 基因异常甲基化与神经胶质瘤发生相关性的研究

蔡晓平¹ 高丽^{2*} 朱文佳²

1. 北京军区总医院干三科, 北京 100700

2. 解放军总医院神经内科, 北京 100853

摘要:目的 研究 ANXA7 基因异常甲基化与神经胶质瘤发生的相关性。方法 采用硫化测序 PCR (BS-PCR) 引物以及 DNA 甲基化特异性 PCR (MS-PCR) 引物检测 ANXA7 基因在人脑神经胶质组织及正常脑组织中的表达差异, 随后经 PCR 扩增进行电泳以及测序分析。结果 5 例健康标本及 5 例神经胶质瘤患者标本 DNA 经硫化且 BS-PCR 测序分析, 其健康标本甲基化率分别为 1.5%、1%、1%、1.5%、1%, 神经胶质瘤患者甲基化率分别为 92%、78.5%、86%、56%、90%; MS-PCR 分析结果显示: ANXA7 基因在 24 例正常脑组织中呈完全非甲基化状态, 在 60 例神经胶质瘤患者中其甲基化阳性率为 46.67% ($p = 0.000$); 高级别神经胶质瘤患者甲基化阳性率 (56.67%) 高于低级别组 (26.67%) ($P = 0.018$)。结论 ANXA7 基因异常甲基化可能参与神经胶质瘤的发生发展。

关键词: ANXA7 基因; 神经胶质瘤; 甲基化

Significance of ANXA7 gene promoter methylation detection in glioblastoma

Cai Xiaoping¹, Gao Li², Zhu Weijia² 1. General Hospital of Beijing Military Area Command of Chinese PLA. 2. Department of Neurology, Chinese PLA General Hospital

Abstract: Objective The aim of this study was to evaluate the significance of ANXA7 gene promoter hypermethylation in Glioblastoma. **Methods** Sixty patients with Glioblastoma and 24 healthy donors were adopted in this study. DNA was isolated from cerebra tissue, and BS-PCR and MS-PCR methods were used to detect the status of ANXA7 gene methylation in health donors and newly diagnosed Glioblastoma patients in using PCR amplification and sequencing. **Results** The results indicated that the methylated rate of the ANXA7 gene in 5 healthy donors were 1.5%, 1%, 1%, 1.5%, 1% by BS-PCR and sequencing analysis. however, the methylated rate of the ANXA7 gene in 5 Glioblastoma patients were 92%, 78.5%, 86%, 56%, 90%. MS-PCR analysis showed the ANXA7 gene was unmethylated in cerebra tissue samples from health donors. Among 60 newly diagnosed Glioblastoma patients, 25 patients were found in ANXA7 gene methylation by MS-PCR, the positive rate was 41.67% ($p = 0.000$). Furthermore, the positive rate of ANXA7 methylation in the group of high stage disease was higher than in the group of low stage. **Conclusions** The aberrant methylation of the ANXA7 gene was perhaps involved in the occurrence of glioblastoma.

Key words: ANXA7 gene; glioblastoma; MS-PCR

胶质瘤发生于神经外胚层, 是颅内发生率最高的恶性肿瘤, 占颅内肿瘤的 40% ~ 50%^[1]。其呈侵袭性生长, 总体疗效不佳, 尤其是高分级胶质瘤, 具有高度间变的生长特点, 术后复发快、预后差, 严重威胁人类健康, 是神经外科治疗中相对棘手的难治性肿瘤之一^[2,3]。目前研究表明大脑胶质瘤病的发生及发展是多步骤、多因素、多基因变异累积的复杂的病变过程, 与多种基因及其蛋白产

物密切相关^[4]。

ANXA7 基因 (annexin-A7, 膜融合蛋白 7), 是一种肿瘤抑制基因蛋白, 位于 10 号染色体上, 属于钙依赖的磷脂结合蛋白家族, 可以抑制表皮生长因子受体 EGFR 信号活性, 从而抑制细胞的恶性增殖与转化^[5,6]。近年来有研究发现 ANXA7 表达异常可能参与神经胶质瘤的发生^[7], 但是目前对于 ANXA7 基因启动子区甲基化水平未做系统性研究。本研究拟

收稿日期: 2012-09-11; 修回日期: 2013-03-03

作者简介: 蔡晓平 (1978-), 女, 北京军区总医院干三科主治医师, 硕士研究生, 主要从事脑肿瘤, 脑血管病的临床与基础研究。

采用硫化测序 PCR (BS-PCR) 方法以及 DNA 甲基化特异性 PCR (MS-PCR) 方法分析不同级别胶质瘤及脑组织 ANXA7 基因启动子区甲基化阳性率的差异,并结合 24 例脑外伤患者脑组织 ANXA7 启动子区甲基化水平,对其临床意义进行初步探讨。病例采集均无胶质细胞增生,无细胞坏死和水肿,患者本人和家属了解研究内容,能够配合本次研究。

1 资料与方法

1.1 病理资料与实验分组

一般资料 2009 年 10 月至 2011 年 12 月北京军区总医院神经外科手术切除的存档石蜡标本 60 例,男 42 例,女 18 例,年龄 2 ~ 75 岁,平均 (38.21 ± 3.15) 岁;按照 2007 年 WHO 神经系统肿瘤分类标准进行分类^[8]:Ⅰ级 12 例,均为毛细胞型星形细胞瘤;Ⅱ级 18 例,其中星形细胞瘤例 12 例,少突胶质细胞瘤 4 例,室管膜瘤 2 例;Ⅲ级 13 例,其中间变性星形细胞瘤 11 例,间变性室管膜瘤 2 例;Ⅳ级 17 例,均为多形胶质母细胞瘤。所有病例术前均未行放化疗。全部标本经病理科专家阅片复诊。另取行内减压术的脑外伤患者的正常脑组织标本 10 例作为对照,正常脑组织无胶质细胞增生,无细胞坏死和水肿。实验分 3 组:正常脑组织对照组 (24 例)、低级别胶质瘤组 (WHO 分类Ⅰ级胶质瘤组 12 例,Ⅱ级胶质瘤组 18 例)和高级别胶质瘤组 (WHO 分类Ⅲ级胶质瘤组 13 例,Ⅳ级胶质瘤组 17 例)。

1.2 实验方法

DNA 提取用 QIGEN 试剂盒从组织标本中提取基因组 DNA,紫外分光光度仪测 OD 值以确定其浓度与纯度。采用 DNA 硫化修饰试剂盒对 1 μg DNA 进行硫化修饰。BS-PCR 以及 MS-PCR 引物设计均采用 Methy Primer (美国生物应用公司) 软件,ANXA7 基因 BSP 引物、MSP 引物以及扩增片段见表 1 所示。反应条件:95℃ 预变性 15 min,95℃ 50 秒,56℃ 50 秒,72℃ 1 分钟,35 个循环;72℃ 延伸 10 分钟完成扩增。

表 1 ANXA7 基因引物序列与片段大小

	序列	产物大小
ANXA7-BSF	5' TAGTGTTTGGTTATTTTGAGG 3'	
ANXA7-BSF	5' ACCTCCTTATCTCCCTACAAA 3'	462 bp
ANXA7-MSF	5' ACGCGTTGCGAGTTTATAC 3'	
ANXA7-MSR	5' TCGAACGAACGCTACTACAA 3'	175 bp
ANXA7-UMSF	5' GGGATGTGTGTGAGTTTATAT 3'	
ANXA7-UMSR	5' TTCAAACAAACACTACTACAAAT 3'	175 bp

1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 硫化修饰以及 PCR 扩增,测序分析甲基化率

5 例正常人以及 5 例神经胶质瘤患者经硫化修饰以及 PCR 扩增,并测序分析,显示正常人甲基化率分别为 1.5%、1%、1%、1.5%、1%,神经胶质瘤患者甲基化率分别为 92%、78.5%、86%、56%、90% (图 1)。

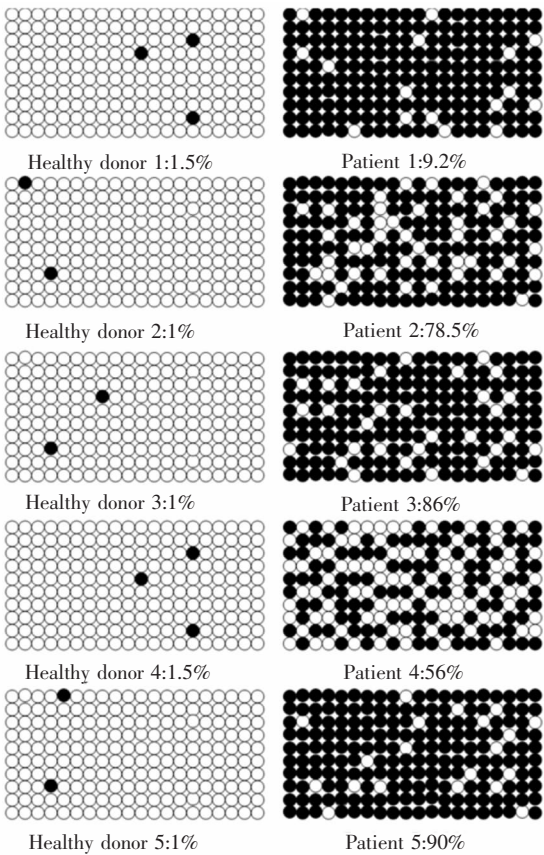


图 1 ANXA7 基因启动子区硫化测序分析 (BSP 扩增并测序分析)。

2.2 硫化测序方法检测甲基化水平

对 2 例低级别神经胶质瘤患者以及 2 例高级别神经胶质瘤患者甲基化水平进行检测,其甲基化率分别为 13%、28%、78%、79.5% (图 2)。

2.3 PCR 检测正常人脑组织及胶质瘤中 ANXA7 基因的表达

24 例正常人脑组织所提取 DNA 用甲基化特异性 PCR (MSP) 扩增后均未见特异性条带,非甲基化

特异性 PCR 扩增后见 175 bp 条带,说明 ANXA7 基因在正常人外周血中呈完全甲基化状态(图 3)。

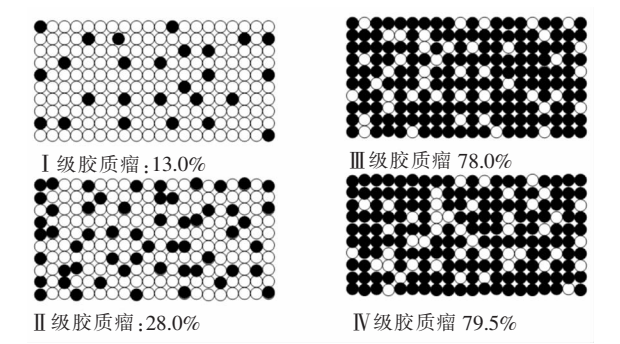


图 2 2 例低级别胶质瘤患者以及 2 例高级别胶质瘤患者甲基化水平。

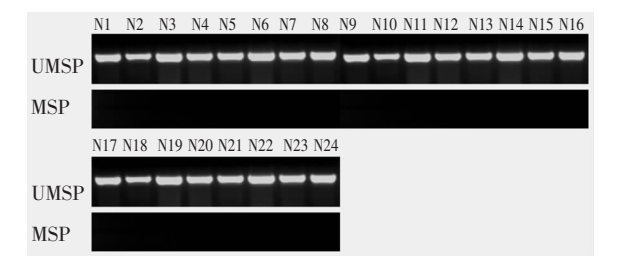


图 3 健康人 ANXA7 基因甲基化特异性 PCR 以及非甲基化特异性 PCR 检测结果(UM1-UM24 为非甲基化特异性 PCR 电泳图;M1-M24 为甲基化特异性 PCR 电泳图)。

2.4 胶质瘤患者 ANXA7 基因启动子区甲基化状态

60 例胶质瘤患者中 ANXA7 基因甲基化阳性例数为 25 例(甲基化阳性率为 41.67%)(图 4)。

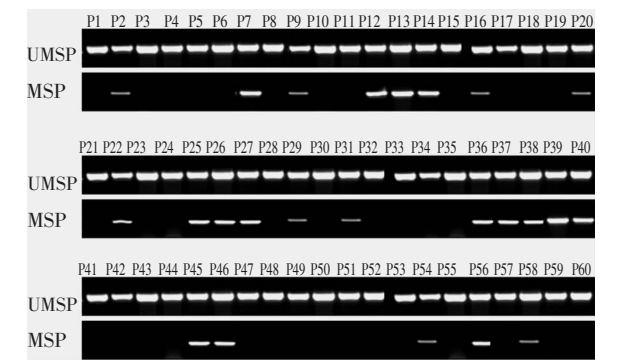


图 4 胶质瘤患者 ANXA7 基因甲基化特异性 PCR 以及非甲基化特异性 PCR 检测结果(UM1-UM60 为非甲基化特异性 PCR 电泳图;M1-M60 为甲基化特异性 PCR 电泳图)。

2.5 甲基化阳性率与不同级别胶质瘤的相关性分析

低级别神经胶质瘤患者 ANXA7 启动子区甲基化阳性率为 26.67%(8/30),高级别神经胶质瘤患者 ANXA7 启动子区甲基化阳性率为 56.67%(17/30);高级别组甲基化阳性率高于低级别组($P=0.018$)。

3 讨论

人脑胶质瘤由于其过度增殖、侵袭性、浸润性的生长方式,导致肿瘤不能全切且易复发。不同级别的星形细胞瘤患者中位生存期相差很大,治疗方法也不相同。而治疗方法的选择取决于诊断的精确性。目前星形细胞瘤的诊断主要决定于传统组织病理学分析。因此,寻找对于星形细胞瘤的分级和预后能够提供参考的客观的分子标记物,明确其与星形细胞瘤的相关程度,将有助于更好地描述肿瘤的生物特征,提高诊断的质量,指导治疗方案的制定。

Annexin 是编码钙离子调节蛋白的多基因家族,具有独特的质膜以及钙离子结合模块。与钙离子结合的 annexin 转位到富含负电荷磷脂的质膜。其主要功能是参与膜转运及膜表面一系列依赖于钙调蛋白的活动,在细胞信号传导、钙离子通道的形成、炎症反应、肿瘤细胞的增殖与分化、细胞骨架蛋白间的相互作用和维持细胞外基质的完整性等方面具有重要作用。

ANXA7 基因作为一种抑癌基因,表达一种膜联蛋白,可以抑制表皮生长因子受体(EGFR)信号活性,从而抑制细胞的恶性增殖与转化广泛存在于几乎所有正常细胞中,尤其在淋巴结转移的肿瘤细胞中,ANXA7 常常失表达或低表达。近年来有学者发现 ANXA7 表达异常以及基因突变可能参与神经胶质瘤的发生,并有一定的预后意义^[9-12]。

本研究首先采用 BS-PCR 方法分析 5 例正常人脑组织以及 5 例神经胶质瘤患者脑组织 ANXA7 基因启动子区甲基化率,发现神经胶质瘤组甲基化率高于对照组,同时本研究分别对 2 例低级别胶质瘤患者以及 2 例高级别胶质瘤患者进行 ANXA7 甲基化率的检测,初步证实了 ANXA7 基因启动子区异常甲基化出现在神经胶质瘤患者,且可能随着疾病进展期甲基化率增高。此外,本研究通过 MS-PCR 方法对 60 例神经胶质瘤患者脑组织进行 ANXA7 基因启动子区甲基化阳性率检测,并对高级别胶质

瘤组以及低级别胶质瘤组进行统计学分析,发现高级别组 ANXA7 基因启动子区甲基化阳性率高于低级别组 ($P = 0.018$),提示 ANXA7 基因启动子区异常甲基化可能提示疾病进展。本研究表明,通过对 ANXA7 进行甲基化水平以及甲基化阳性率进行检测,结合定量 PCR 方法以及测序方法,对 ANXA7 基因 mRNA 水平以及 ANXA7 突变频率进行联合分析,以期从临床检测的角度系统分析 ANXA7 基因在神经胶质瘤的临床意义及预后分析。

参 考 文 献

- [1] Kleihues P, Burger PC, Collins VP, et al. Glioblastoma. In: Kleihues P, Cavenee WK, eds. WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. Lyon: IARC Press, 2011, 29-39.
- [2] Pierallini A, Bonamini M, Pantano P, et al. Radiological assessment of necrosis in glioblastoma: Variability and prognostic value. *Neuroradiology*, 2008, 40: 150-53.
- [3] Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005, 64: 479-89.
- [4] 高进苗, 张晓东. 大脑胶质瘤病的临床诊治进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2012, 39(5): 434-438.
- [5] Srivastava M, Torosyan Y, Raffeld M, et al. ANXA7 expression represents hormone-relevant tumor suppression in dif-

- ferent cancers. *Int J Cancer*. 2007, 121: 2628-2636.
- [6] Torosyan Y, Dobi A, Naga S, et al. Distinct effects of annexin A7 and p53 on arachidonate lipoxygenation in prostate cancer cells involve 5-lipoxygenase transcription. *Cancer Res*. 2006, 66: 9609-9616.
- [7] Srivastava M, Montagna C, Leighton X, et al. Haploinsufficiency of Anx7 tumor suppressor gene and consequent genomic instability promotes tumorigenesis in the Anx7 (+/-) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100: 14287-14292.
- [8] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007, 114(2): 97-109.
- [9] Ajay K. Yadav, Jaclyn J. Renfrow, et al. Monosomy of chromosome 10 associated with dysregulation of epidermal growth factor signaling in glioblastomas. *JAMA*. 2009; 302: 276-289.
- [10] Shirvan A, Srivastava M, Wang MG, et al. Divergent structure of the human synexin (annexin VII) gene and assignment to chromosome 10. *Biochemistry*. 1994, 33(22): 6888-6901.
- [11] Duesberg P, Li R. Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle*. 2003, 2(3): 202-210.
- [12] Bredel M, Scholtens DM, Harsh GR, et al. A network model of a cooperative genetic landscape in brain tumors. *JAMA*. 2009, 302(3): 261-275.