

人脑胶质瘤细胞中 GDNF 基因启动子 1 区甲基化状态的研究 *

任庆先¹ 王建村² 王莉³ 高殿帅⁴ 虞正权^{1△}

(1 苏州大学附属第一医院神经外科 江苏 苏州 215006 ;徐州医学院附属医院 2 神经外科 3 神经内科 ;

4 徐州医学院神经生物实验室 江苏 徐州 221002)

摘要 目的 观察 GDNF 启动子 1 区在人脑胶质瘤细胞中的甲基化修饰状态,以期探讨其对于 GDNF 在胶质瘤中高表达的影响。方法:基因测序检测 10 例胶质瘤与 5 例正常脑组织中 GDNF 基因序列,比较其基因是否有突变发生;重亚硫酸盐修饰后基因测序检测 20 例胶质瘤(10 例低级别和 10 例高级别)与 5 例正常脑组织中 GDNF 启动子 1 区甲基化修饰状态。结果:GDNF 启动子 1 区基因在胶质瘤中没有发生突变;GDNF 启动子 1 区甲基化修饰在正常脑组织、低级别、高级别中发生率分别为 72.25%、86.25%、86.75%。在胶质瘤中的甲基化修饰水平比正常脑组织明显增高($P<0.05$),而高低级别之间无显著性差异。结论:在胶质瘤细胞中,GDNF 启动子 1 区发生了高甲基化修饰,这种修饰很可能会影响 GDNF 基因的表达。

关键词 胶质瘤细胞;胶质细胞源性神经营养因子;启动子;甲基化

中图分类号 R739.41 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)15-2819-03

Study of the Methylation Status of Promoter 1 Region of GDNF Gene in Human Glioma Cells*

REN Qing-xian¹, WANG Jian-cun², WANG Li³, GAO Dian-shuai⁴, YU Zheng-quan^{1△}

(1 Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China; 2 Department of Neurology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China; 3 Department of Neurology Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China; 4 Department of Neurobiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, 221002, China)

ABSTRACT Objective: To observe the methylation status of GDNF promoter 1 region in human glioma, in order to explore the effect of methylation on the expression of GDNF in glioma. **Methods:** Genesequencing detected the GDNF gene order in 10 cases of glioma and 5 normal brain tissues, to compare whether their genetic mutations have occurred; the methylation modified status of GDNF promoter 1 region in 20 cases of glioma (10 cases of low-level and 10 cases of high-level) and 5 cases of normal brain tissues were detected through genesequencing after bisulfite modification. **Results:** The mutations of GDNF gene in promoter 1 region were not observed in glioma; the methylation of GDNF gene in promoter 1 region in normal brain tissues, low-level and high-level glioma were 72.25%, 86.25%, 86.75% respectively. The methylation level in glioma was significantly higher when compared to normal brain tissues ($P<0.05$); while there was no significant differences in high-and low-level tissues. **Conclusions:** Hypermethylation occurred in GDNF promoter 1 region might influence the expression of GDNF in glioma cell.

Key words: Glioma cell; GDNF; Promoter; Methylation

Chinese Library Classification: R739.41 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)15-2819-03

前言

胶质瘤是位于颅内最常见的原发性肿瘤^[1,2],其发生发展是一个复杂的过程。基因突变以及表观遗传学修饰引起一些基因异常表达或沉默对肿瘤的发生至关重要^[3]。其中,肿瘤相关基因启动子区甲基化修饰状态常常影响其基因的表达。在人类的正常细胞中,启动子区的 CpG 岛通常处于非甲基化状态,以使基因能够正常表达^[4],而散在基因组中的 CpG 二核苷酸通常处于甲基化状态,这样能更好地维持染色体结构的稳定性。甲基化状态在基因组中是相对稳定的,但癌细胞中的甲基化状态发生了明显的改变^[5]。为了明确胶质瘤中胶质细胞源性神经营养因

子 GDNF(glial cell line-derived neurotrophic factor)启动子 1 区的甲基化修饰状态,本研究分别比较了胶质瘤与正常脑组织中 GDNF 启动子 1 区的原始基因序列以及重亚硫酸盐修饰后的基因序列,分析了 GDNF 启动子 1 区甲基化修饰在胶质瘤中的变化。为进一步研究胶质瘤中 GDNF 表观遗传修饰奠定基础。

1 材料与方法

1.1 组织样本和试剂

组织和 DNA 样本:5 例正常人脑组织(源自急性脑外伤患者颅内减压术)和 20 例(WHO 等级 1-4)胶质瘤组织取自苏大

* 基金项目:江苏省高校自然科学基金(11KJB180012),青年科学基金项目(81101899)

作者简介:任庆先(1984-),男,硕士研究生,主要研究方向:胶质瘤的发生发展机制,

Tel: 15298899151, E-mail: 272102736@qq.com

△通讯作者:虞正权(1965-),男,博士,硕士研究生导师,主任医师, E-mail: renqingxian521@163.com

(收稿日期:2011-11-08 接受日期:2011-12-05)

附属第一医院,用于原始测序 SNPs 分析和 BSP 甲基化测序分析组织标本为随机选取术前未进行药物治疗的胶质瘤病人进行采集,并将病理分级 1-2 划为低级别胶质瘤,3-4 级划为高级别胶质瘤进行实验结果分析。主要试剂:QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook(德国 QIAGEN),DNA Gel Extraction Kit(上海捷倍思基因技术有限公司),EZ DNA Methylation-Gold™ Kit(美国 Zymo Research 生物科技公司)。

1.2 方法和步骤

1.2.1 基因测序 SNPs 分析

采用 QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook 试剂盒(Qiagen)提取 DNA,大致步骤如下:将组织样分割成约 25 mg,置于 1.5 mL 的 EP 管中,加入 Buffer ATL 180 μ L、蛋白 K 20 μ L 震荡混匀,56 $^{\circ}$ C 水浴至组织完全溶解,小离心机离心后弃掉上清,加入 Buffer AL 200 μ L,70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,小离心机离心后弃掉上清,加入无水乙醇 200 μ L,震荡混匀后小离心机离心,将混合液移至 2 mL QMCS 中,离心 8000 rpm 1min,然后将 QMCS 放入 2 mL 收集器中,加入 Buffer AW1 500 μ L,8000 rpm 1 min。将 QMCS 放入另一个 2 mL 收集器中,加入 Buffer AW2 500 μ L,14000 rpm 3 min,将 QMCS 放入 1.5 mL EP 管中,加入 Buffer AE 200 μ L,室温放置 1 min,8000 rpm 离心 1 min,留置收集液。

针对启动 I 区 DNA 片段设计一对引物进行 PCR 扩增,上游 5'CAGAGAATCTCAAAGGTGCA3' 下游 5'ACGACATCC-CATAACTTC3',98 $^{\circ}$ C 预变性 4min,98 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 10min,30 个循环。将扩增产物进行凝胶电泳分析,紫外灯下切胶回收送检,由基因公司测序分析 SNPs,检测胶质瘤组织中的 GDNF 基因启动子 I 区是否存在异常的 SNPs 位点。

1.2.2 BSP 甲基化测序

采用 QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook 试剂盒(Qiagen)提取 DNA,步骤同上,再经过 EZ DNA Methylation-Gold™ Kit(Zymo)重亚硫酸盐处理,大体步骤如下:每个样本取 1 μ g DNA 进行处理,DNA 体积应不超过 20 μ L,若体积不足 20 μ L 用水补齐。将 130 μ L CT Conversion Reagent 加入到 20 μ L DNA 中,轻弹管壁混匀并离心,将样品放入水浴锅中进行如下反应程序:98 $^{\circ}$ C 10 min,64 $^{\circ}$ C 2.5 h;取出后 4 $^{\circ}$ C 中存放 16 h;将 600 μ L M-Binding Buffer 加入到 Zymo-Spin IC Column 中,并将其放在相应的收集管中,将步骤 3) 的 150 μ L 产物加入到上述 600 μ L 的 Binding Buffer 中,盖严后将柱颠倒数次以充分混合样品,全速(>10,000 g)离心 30 s,弃废液;向吸附柱中加入 200 μ L 的 Wash Buffer 全速离心 30 s;向吸附柱中加入 200 μ L 的 Desulphonation Buffer,室温(20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C)下放置 15-20 min,全速(>10,000 g)离心 30 s;向吸附柱中加入 200 μ L 的 Wash Buffer,全速(>10,000 g)离心 30 s;重复步骤 7,将吸附柱转移到新 1.5 mL 的离心管上,加入 20 μ L Elution Buffer 到柱基质中静置 3-5 min 后全速(>10,000 g)离心来洗脱 DNA。DNA 可立刻进行 PCR 扩增或储存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

针对启动子 I 区制定 2 对 BSP 引物,进行 PCR 扩增,引物 1 上游 5'GAAGGGATTAGGGTTAGAATTTT3' 下游 5'CC-CAAACAAAACRATATTTCT 3',引物 2 上游 5'AT-GYGTGTTGATTT TATTTTAAAGA3' 下游 5'CTACRCRAA-CAAACRAAA 3'。反应体系:10 $\times$ buffer 5 μ L, MgCl₂(50 mM) 2 μ L, dNTP(10 mM)1 μ L,正向引物 2 μ L,反向引物 2 μ L,

DNA 5 μ L, Platinum Taq (Invitrogen)0.3 μ L, ddH₂O 32.7 μ L。循环条件:95 $^{\circ}$ C 5 min $\times$ 1, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s $\times$ 42, 72 $^{\circ}$ C 10 min $\times$ 1。将回收的 PCR 产物与 pMD19-T (Takara 公司)连接,室温连接 2 h 以上,取 10 μ L 连接产物转化 DH5a 感受态细胞,涂布含 Amp 抗性的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜;每个平板挑 8 个克隆进行菌落 PCR 鉴定;将菌落 PCR 呈阳性的 5 个克隆接种于 3 ml LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养;用质粒小量提取试剂盒(Axygen)提取质粒,并送测序;在 <http://quma.cdb.riken.jp/> 网站上对各样本测序结果进行甲基化程度分析。

1.2.3 统计学分析

所有数据利用 SPSS16.0 统计软件包处理,数据均以 mean $\pm$ SD 表示,多组间的比较采用单因素方差分析。P<0.05 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 基因测序

胶质瘤与正常脑组织相比,GDNF 基因没有发生突变。

2.2 重亚硫酸盐修饰后目的片段的 PCR 扩增结果

启动子 1 区两条引物扩增条带分别为引物 1(469bp)和引物 2(507bp)见图 1。

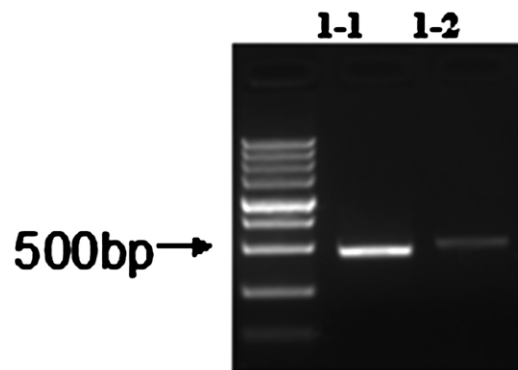


图 1 重亚硫酸盐修饰后目的片段的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification fragment after bisulfite modification

2.3 启动子 1 区甲基化状态结果

GDNF 启动子 1 区是位于外显子 2 前面大约 1000bp(如图 2 A)所示,通过计算机预测启动子 1 区大约有 40 个 CPG 位点(如图 2 B)所示。经重亚硫酸盐修饰后基因测序分析结果(如图 2 C)所示,其中黑色圆圈代表甲基化,白色代表未甲基化。统计学分析后得出正常脑组织、低级别、高级别组甲基化程度分别为 72.25%、86.25%、86.75%。正常脑组织与低、高级别组之间有统计学意义(P<0.05),而低级别与高级别之间无统计学意义(如图 3)所示。

3 讨论

GDNF 属于转化生长因子(TGF- β)超家族,是由 Lin^[6]等于 1993 年从大鼠 B49 胶质瘤细胞系中分离、纯化并成功克隆的一种新的神经营养因子。位于人染色体 5P13.1-P13.3。对于多种细胞都具有营养作用,是一种重要的生物活性营养因子^[7,8]。

在我们的研究中发现,GDNF 原始基因序列在胶质瘤中与

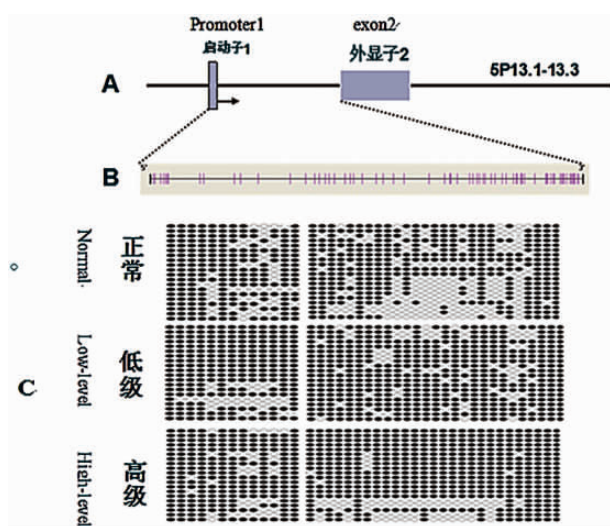


图2 GDNF 启动子1区重亚硫酸盐修饰后基因测序分析结果

Fig.2 DNA sequencing analysis after bisulfite modified in GDNF promoter 1 region

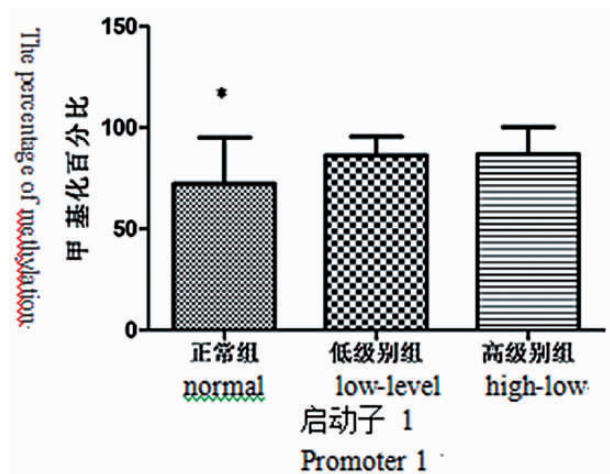


图3 GDNF 启动子1区甲基化统计分析结果

Fig. 3 statistical analysis of methylation results in GDNF promoter 1 region

正常脑组织相比,基因测序结果相同;其启动子1区甲基化水平明显增高。这表明GDNF基因在胶质瘤中并没有发生基因突变,其启动子1区甲基化程度增高很可能导致启动子1在胶质瘤中发生沉默。

表观遗传修饰主要包括DNA甲基化、组蛋白修饰和小体定位以及非编码RNA等。其中,DNA甲基化在哺乳动物表观遗传方面的研究最为深入^[9,10]。它所引起的基因沉默和组蛋白修饰以及核染色质相关蛋白的修饰共同调节基因的表达。肿瘤细胞表观遗传基因显著特点是全基因组广泛低甲基化和启动子区特异位点CPG岛高甲基化^[11]。肿瘤细胞DNA高甲基化可以引起基因沉默已经被证实^[12,13]。自从第一次从抑癌基因Rb启动子发现CpG岛甲基化之后,其他的基因陆续被发现。包括P16、MLH1、BRCA1都发现了在特异肿瘤中由于甲基化发生了沉默^[14,15]。在我们的研究中发现GDNF启动子1区发生了高甲基化修饰,启动子1很可能在胶质瘤中被沉默。然而,大量文献研究表明,GDNF在胶质瘤中的表达明显高于正常脑组织^[16],与启动子1甲基化沉默似乎不相一致。

GDNF是一个具有双启动子的基因,包括启动子1和启动子2。Suter-Crazzola^[17]等研究发现位于外显子2上游的启动子1区包含最高的转录活性位点;而Baecker^[18]等人认为启动子2区在转录起始上发挥主要作用。在不同的组织、发育和疾病过程中,每个启动子的作用地位不同。在我们的研究中发现,胶质瘤中GDNF启动子1区发生了高甲基化修饰,而许多研究显示胶质瘤中GDNF表达显著升高^[16]。由此,我们推测GDNF启动子2很可能发生了低甲基化。在胶质瘤中GDNF启动子1发生高甲基化被沉默,而启动子2发生低甲基化被激活。也有研究GDNF启动子区转录因子时发现,由于其启动子区存在多种抑制因子,导致其启动子的活性很低,其启动子区转录因子的活性在GDNF基因转录表达中发挥重要的作用。

本研究中,我们通过GDNF基因原始测序检测其基因未发生突变,而重亚硫酸盐修饰后基因测序发现其启动子1发生了高甲基化。为进一步研究GDNF在胶质瘤中的表观遗传学修饰奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Ohgaki, H. and P. Kleihues, Epidemiology and etiology of gliomas [J]. Acta Neuropathol, 2005,109(1): 93-108
- [2] 李宣朋,李玉,丁鹏. 趋化因子CXCL12及其受体CXCR4在胶质瘤中的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2011,11(6):1184-1186
Li Xuan-peng, Li Yu, Ding Peng. Progress of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in glioma [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011,11(6):1184-1186(In Chinese)
- [3] Egger, G., et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy [J]. Nature, 2004,429(6990):457-463
- [4] 谢松松,王宝峰,周宗瑶. DNA甲基化的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2009,9(17):3368-3370
Xie Song-song, Wang Bao-feng, Zhou Zong-yao. Progress in the research on DNA methylation [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009,9(17):3368-3370(In Chinese)
- [5] 张沛琪. 癌症的表观遗传决定因素 [J]. 湖南农业科学, 2010, 19: 15-18
Zhang Pei-qi. The Determinants of Epigenetics of Cancer [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2010, 19:15-18(In Chinese)
- [6] Lin, L.F., et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. Science, 1993,260 (5111): 1130-1132
- [7] 姜宇,曾水林,鲁佑瑜. GDNF促进帕金森病大鼠模型脑内移植的中脑源神经干细胞表达Pitx3、Nurr1和TH [J]. 神经解剖学杂志, 2011,27(1):92-97
Jiang Yu, Zeng Shui-lin, Lu You-yu. GDNF promotes to express Pitx3, Nurr1 and TH in transplanted midbrain derived neural stem cells of Parkinsons disease model of rats [J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2011,27(1):92-97(In Chinese)
- [8] 陈宝友. 脑损伤对大鼠脑组织GDNF表达的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2010,16(10):916-918
Chen Bao-you. Effect of Traumatic Brain Injury on Expressions of Glial Cell Line derived Neurotrophic Factor in Brain Tissue of Rats [J]. Chin J Rehabil Theory Pract, 2010,16(10):916-918(In Chinese)
- [9] Esteller M. The necessity of a human epigenome project [J]. Carcinogenesis, 2006,27:1121-1125

(下转第2803页)

3 讨论

TGF- β 家族由一类结构和功能相关的多肽生长因子亚家族组成,在细胞的增殖与分化、胚胎发育、胞外基质形成、骨的形成和重建等方面都起着重要作用^[1]。TGF- β 先与细胞膜上的 TGF- β 型受体结合,然后结合并激活 II 型受体,活化的 II 型受体磷酸化 R-SMAD 如 SMAD2、3,磷酸化的 R-SMADs 从受体上解离下来后与 SMAD4 结合转移到核内,激活下游基因的转录^[1-2]。SMAD2 蛋白是介导 TGF- β 信号转导通路,直接调控 Nanog 的表达,维持胚胎干细胞不分化的关键介质^[6-7]。而 Activin A/Nodal 信号通过 SMAD2/3 不同的转录调控网络,对于 hESCs 向内胚层分化都是必需的^[3-4],因此为进一步研究 hESCs 中 SMAD2 在 TGF- β 作用下启动的不同的信号转导机制,建立一 SMAD2 稳定干扰的细胞株是必要的。RNAi 技术高效、特异地沉默特定基因已经得到广泛应用^[8]。本研究利用带有 GFP 报告基因的逆转录病毒干扰质粒 pRetroSuper-GFP-SMAD2 建立稳定表达 shSMAD2 的 hESCs 细胞系,其有绿色荧光报告基因的表达,表明报告基因可以表达并具有活性。Real-time PCR 进一步验证了 SMAD2 的 mRNA 的表达情况,结果显示 SMAD2 mRNA 平均干扰效果达到 80%。

综上所述,逆转录病毒载体的 RNA 干扰系统对人类胚胎干细胞具有良好的感染效果,并能有效地发挥 RNA 干扰的作用。建立的稳定 SMAD2 干扰人胚胎干细胞系将进一步探讨 SMAD2 对于 TGF- β 信号在人胚胎干细胞维持不分化和向内胚层分化不同的信号转导机制的研究奠定良好的基础。

参考文献(References)

- [1] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. Nature, 2003, 425(6958): 577-584
- [2] Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription [J]. Int J

Biochem Cell Biol. 2008, 40(3):383-408

- [3] Brown S, Teo A, Pauklin S, et al. Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors[J]. Stem Cells, 2011, 29(8):1176-1185
- [4] Tremblay KD, Hoodless PA, Bikoff EK, et al. Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process [J]. Development, 2000,127:3079-3090
- [5] Fei T, Zhu S, Xia K, et al. Smad2 mediates Activin/Nodal signaling in mesendoderm differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. Cell Res, 2010, 20(12):1306-1318
- [6] James D, Levine AJ, Besser D, et al. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells[J]. Development, 2005, 132(6):1273-1282
- [7] Jiang J, Ng HH. TGFbeta and SMADs talk to NANOG in human embryonic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(2):127-128
- [8] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567):550-553
- [9] Lin G, Xie YB, OuYang Q, et al. HLA matching potential of an established human embryonic stem cell bank in China [J]. Cell stem cell, 2009, 5(5): 461-465
- [10] Coutts SM, Childs AJ, Fulton N, et al. Activin signals via SMAD2/3 between germ and somatic cells in the human fetal ovary and regulates kit ligand expression[J]. Dev Biol, 2008, 314(1):189-199
- [11] Sun Y, Yi H, Zhang PF, et al. Identification of Differential Proteins in Nasopharyngeal Carcinoma Cells with p53 Silence by Proteome Analysis[J]. FEBS LETTERS, 2007, 581(1): 131-139
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C_T} (T) [J]. Methods, 2001, 25: 402-408

(上接第 2821 页)

- [10] 刘莎,向佳梅,王立明. DNA 甲基化与乳腺癌的关系研究进展 [J]. 现代生物学进展, 2009,9(5):960-963
Liu Sha, Xiang Jia-mei, Wang Li-ming. Progress on Relationship between DNA Methylation and Breast Cancer [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009,9(5):960-963(In Chinese)
- [11] Jones, P.A. and S.B. Baylin, The fundamental role of epigenetic events in cancer [J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(6): 415-428
- [12] 王震凯. DNA 甲基化与肿瘤 [J]. 医学研究生学报, 2011,24(6): 641-645
Wang Zhen-kai. DNA methylation and tumor [J]. J Med Postgra, 2011,24(6):641-645(In Chinese)
- [13] 李洪艳,佟少明,李艳. 癌症与 DNA 甲基化异常 [J]. 辽宁大学学报, 2011,3(38):219-223
Li Hong-yan, Tong Shao-ming, Li Yan. DNA aberrant methylation

and cancer [J]. Journal of liaoning university, 2011,3(38):219-223(In Chinese)

- [14] Jones, P.A., S.B. Baylin. The epigenomics of cancer [J]. Cell, 2007, 128(4):683-692
- [15] Baylin, S.B. DNA methylation and gene silencing in cancer [J]. Nat Clin Pract Oncol, 2005,2 Suppl 1: S4-11
- [16] Wiesenhofer, B. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptor (GFR-alpha 1) are strongly expressed in human gliomas [J]. Acta Neuropathol, 2000,99(2): 131-137
- [17] Suter-Crazzolara, C, Baecker, P.A. Characterization of a human GDNF gene promoter [J]. Neurosci, 1997,23:90
- [18] Baecker, P.A. Characterization of a promoter for the human glial cell line-derived neurotrophic factor gene [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1999,69(2):209-222