

鼻咽癌颈淋巴结转移相关甲基化基因的筛选

邹桂年¹, 邱前辉^{2*}, 叶宇东², 严雪原³

(1.广东省龙川县人民医院耳鼻咽喉科, 广东 龙川 517300; 2.广东省人民医院//广东省医学科学院耳鼻咽喉头颈外科, 广东 广州 510080; 3.广东省东莞大朗医院耳鼻咽喉科, 广东 东莞 523770)

摘要:【目的】分析鼻咽癌全基因组基因甲基化状态,筛选鼻咽癌颈淋巴结转移相关的甲基化基因。【方法】收集 I 期(T1N0M0)鼻咽癌石蜡标本及有颈部淋巴结转移的鼻咽癌组织标本(T1-4N1-3M0)各 4 例,分别提取 DNA,富集两组样品基因组甲基化片段后采用甲基化芯片对两组标本进行高通量测序分析,对杂交信号进行扫描及初步数据处理,分析并筛选出两组标本的差异甲基化基因。【结果】NimbleScan v2.5 软件比较分析两组标本数据显示 33 个基因甲基化具有差异性,提示此 33 个基因可能为有颈部淋巴结转移鼻咽癌患者的甲基化基因谱。【结论】初步筛选鼻咽癌颈淋巴结转移相关的 33 个甲基化基因,而 DNA 甲基化芯片是筛选异常甲基化基因的有效方法。

关键词:鼻咽癌;淋巴结转移;基因;甲基化;基因芯片

中图分类号:R73 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2016)04-0530-05

Screening for Cervical Lymph Node Metastasis-related Epigenetically Masked Genes in Nasopharyngeal Carcinoma

ZOU Gui-nian¹, QIU Qian-hui², YE Yu-dong², YAN Xue-yuan³

(1. Department of Otorhinolaryngology, Longchuan County People's Hospital, Longchuan 517300, China; 2. Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck Surgery, Guangdong General Hospital & Guangdong Academy of Medical Science, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Otorhinolaryngology, Dalang hospital, Dongguan 523770, China)

Corresponding to: QIU Qian-hui, Email: qiuqianhui@hotmail.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the status of DNA methylation in nasopharyngeal carcinoma (NPC) for screening out the cervical lymph node metastasis-related epigenetically masked genes. 【Methods】 Four pairs of specimens of stage I NPC and NPC with cervical lymph node metastasis were collected to extracted DNA; The enriched genomic methylation fragments of two group specimens were used for high-throughput sequencing analysis by NimbleGen Human DNA Methylation 3 × 720 K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array. We scanned the hybridization signal, processed preliminary data and identified the differentiated hypermethylated genes between the two groups NPC specimens. 【Results】 33 methylated genes displayed significance of difference between the data of two groups by comparative analysis. It imply that they might be the lymph node metastasis-associated DNA methylation profiles in NPC patients. 【Conclusion】 33 novel cervical lymph node metastasis-related epigenetically masked genes of NPC were preliminary verified and high density DNA methylation microarrays is indentified as an effective method for screening aberrantly methylated genes.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; lymph node metastasis; gene; methylation; DNA microarrays

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(4): 530-534]

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方地区最高发的头颈部恶性肿瘤,其发病与

遗传、环境以及 EB 病毒感染等因素有关,目前治疗方法为以放疗为主的综合治疗。鼻咽癌易早期

收稿日期:2016-03-07

基金项目:中国癌症基金会项目(S2013014);广东省医学科学技术研究基金项目(WSTJJ20131225440982197202101414)

作者简介:邹桂年,副主任医师, E-mail: 13553291281@163.com; 邱前辉,通信作者,博士,主任医师,研究方向:鼻腔鼻窦及颅底肿瘤, E-mail: qiuqianhui@hotmail.com

发生侵袭转移,大部分患者早期既有颈部淋巴结转移,甚至出现远处转移,这是成功治疗肿瘤的最大障碍。虽然鼻咽癌早期发生组织侵袭和淋巴结转移的机制尚不明确,但近年来大量表观遗传学的研究证实基因甲基化是肿瘤发生、发展的重要机制^[1]。本研究通过甲基化芯片技术,对I期NPC标本(NPC-I)及出现颈部淋巴结转移的NPC标本(NPC-NT)进行检测,分析全基因组的甲基化状态,初步构建鼻咽癌颈淋巴结转移相关基因甲基化谱。

1 材料与方法

1.1 研究对象

I期鼻咽癌(T1N0M0)石蜡标本4例(A1-A4)来源于广东省人民医院病理科,有颈部淋巴结转移的鼻咽癌新鲜组织标本(T1-4N1-3M0)4例(B1-B4)来源于广东省人民医院耳鼻喉科门诊,均未接受任何化疗或放疗。组织标本资料信息见附表(表1)。

1.2 DNA甲基化芯片和试剂

DNA甲基化芯片(Roche-NimbleGen CpG promoter芯片),购自美国NimbleGen公司,产品名称Human DNA Methylation 3×720 K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array,芯片格式为3×720 K,单芯片设计覆盖人基因组所有UCSC注释的CpG岛和所有Refseq数据库基因启动子区,也是目前市面上唯一一款将CpG与promoter区域都覆盖的芯片,其探针解析度:覆盖22 532个启动子,上游2.44 ku至下游0.61 ku,以及27 728个CpG islands,共30848条转录本。

DNA抽提试剂盒(DNeasy Blood&Tissue Kit、QIAamp DNA FFPE Tissue kit)、PCR产物纯化试剂盒(QIAquick PCR purification kit)及Taq酶(HotStarTaq DNA polymerase)购自QIAGEN公司, BiomagTM magnetic beads 购自Bangs laboratories公司, DNA甲基化芯片(Roche-NimbleGen CpG promoter芯片)、杂交试剂盒(Hybridization Kit 40)购自NimbleGen公司,全基因组扩增试剂盒(Whole Genome Amplification Kit)购自Sigma公司,双色荧光标记(Cy3/Cy5 dye-labeled random primer)购自TriLink Biotechnologies公司。

1.3 DNA提取和超声打断基因组

参照QIAamp DNA FFPE Tissue kit试剂盒提取I期鼻咽癌石蜡标本基因组DNA,参照DNeasy Blood&Tissue Kit试剂盒提取有颈部淋巴结转移的鼻咽癌新鲜组织标本基因组DNA,琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计检测DNA的纯度和浓度。每份样本11 μg DNA溶于300 μL缓冲液,将基因组DNA超声打断成400~500 bp片段大小。取5 μL DNA琼脂糖凝胶电泳检测gDNA片段大小,评估超声打断基因组的效果。

1.4 甲基化DNA免疫共沉淀

1 μg DNA超声片段样本94℃孵育10 min,然后迅速在冰上冷却,将加热变性后的单链DNA样品分成两份,分别作为空白对照组(input DNA)和免疫共沉淀组(MeDIP DNA)。免疫共沉淀组DNA样本中加入1 μL鼠单克隆抗5'-甲基化胞嘧啶抗体及适量免疫共沉淀缓冲液(含0.5%牛血清蛋白的PBS缓冲液)至400 μL,4℃震荡搅拌过夜,再用免疫磁珠法分离样品中的甲基化DNA片段抗体复合物,样品中其余的非甲基化DNA片段被清洗掉。最后用Qiagen MinElute columns (Qiagen)纯化和回收免疫共沉淀的甲基化DNA。

1.5 扩增及纯化MeDIP DNA片段

用全基因组扩增试剂盒(GenomePlex[®] Complete Whole Genome Amplification (WGA2) kit)来扩增MeDIP DNA片段。最后用快速PCR纯化试剂盒(QIAquick PCR purification kit (Qiagen))纯化和回收扩增的MeDIP DNA。同时也对空白对照组的DNA(input DNA)进行扩增和纯化。

1.6 MeDIP荧光标记及芯片杂交

100 pmol dNTP和100 U Klenow片段(New England Biolabs, USA)后37℃避光孵育2 h,之后用0.5 mol/L EDTA终止反应。每管中加入5 mol/L NaCl,涡旋震荡后转移至含有罗氏双色DNA标记试剂盒(NimbleGen Dual-Color DNA Labeling Kit)对纯化的DNA样本进行荧光标记。用1 OD/42 μL的探针缓冲液稀释Cy3(绿色荧光)和Cy5(红色荧光)标记的9 mer长的探针,将稀释液分别加入0.2 mL的PCR管中,等分每管稀释液到40 μL,-20℃避光保存。将1 μg MeDIP样本和Input样本分别加入到含Cy5引物和Cy3引物的PCR管中,98℃孵育10 min,热变性后快速转移冰上10 min,再加入异丙醇的1.5 mL管中,避光室温孵育10 min,12 000 ×g离心10 min去上清,用500

μL 的 80% 冰乙醇悬浮沉淀物, 12 000 $\times g$ 离心 10 min 去上清。在真空离心蒸发浓缩器中低热避光干燥 5 min, 之后用 25 μL 的纯化水对干燥颗粒进行涡旋, 震荡水化处理。采用 Nanodrop ND1000 紫外分光光度计检测标记的 DNA, 并用 6 μg 标记的 MeDIP/Input DNA 进行芯片杂交反应。MeDIP 样本和 Input 样本在 42 $^{\circ}\text{C}$ 与芯片杂交反应 16 ~ 20 h。杂交完成后, 用洗脱液进行洗脱。

1.7 图像采集和数据分析及处理

芯片结果由 Axon 的 GenePix 4000B 双通道扫描仪进行扫描读取, 获得原始信号值, 再用 GenePix Pro6.0 软件对原始信号值进行标准化等数据分析。将芯片读取后的数据用 NimbleScan v2.5 软件比较分析其 DNA 启动子区的甲基化差异, 再用专业商用分析软件 (SignalMap V1.9) 对杂交结果进行数据提取、标准化、峰值分析、报告。基因的启动子甲基化情况的判断, 通过对启动子区设计的探针的甲基化富集峰值来体现, NimbleScan 检测出的峰值必须至少 2 个探针的 ($-\lg p$) 值大于等于 2。在 500 bp 范围内的峰值叠加来判断甲基化与否 ($\text{peakscore} \geq 2$)。

2 结 果

运用免疫共沉淀 (MeDIP) 甲基化芯片技术对无转移早期组 (A) 和颈部淋巴结转移组 (B) 两组鼻咽癌标本 DNA 进行甲基化的初步筛查, 启动子区中 15 909 个基因在 A 组鼻咽癌标本甲基化数目如下: A1 为 4 648 个, A2 为 4 635 个, A3 为 4 795 个, A4 为 4 529 个; 而 B 组鼻咽癌标本基因甲基化数目如下: B1 为 4 289 个, B2 为 4 162 个, B3 为 4 257 个, B4 为 4 389 个; CpG 岛中 17 199

个基因在 A 组鼻咽癌标本甲基化情况如下: A1 为 2 667 个, A2 为 2 470 个, A3 为 3 302 个, A4 为 1 929 个; 而 B 组鼻咽癌标本基因甲基化情况如下: B1 为 1 881 个, B2 为 1 636 个, B3 为 1 569 个, B4 为 1 934 个。4 例 I 期鼻咽癌标本中均出现甲基化的基因数目是 1 134 个, 而 4 例有颈部淋巴结转移的鼻咽癌标本中均出现甲基化的基因数目是 835 个; 4 例 I 期鼻咽癌标本 (NPC-I) 和 4 例有颈部淋巴结转移的鼻咽癌标本 (NPC-NT) 中均出现甲基化的基因有 396 个。

根据 DNA 甲基化芯片筛查的结果, 比较 A 与 B 两组标本基因甲基化情况数据: 如以 +/− 代表甲基化的发生与否, 则启动子区, NPC-I⁺ 而 NPC-NT[−] 的基因数为 81 个, NPC-I[−] 而 NPC-NT⁺ 的基因数为 29 个。CpG 岛区, 上两种情况则分别为 52 个和 4 个。全基因组 (启动子区和 CpG 岛区) 总计 33 个基因在颈淋巴结转移组全部甲基化而无转移组中无甲基化, 分析软件提示其可能为鼻咽癌颈淋巴结转移相关的甲基化基因。由于本研究标本数较少, 结果中两组甲基化基因其他组合分析未能提供有效信息。表 2 为 33 个差异甲基化基因名称及染色体分布表。

3 讨 论

研究单个基因的甲基化变化从宏观上很难反映鼻咽癌的整体表观遗传学改变; 对已发现的受甲基化调控的候选基因逐个进行筛查, 确定其是否在鼻咽癌中起了类似作用, 该工作量也将非常巨大。然而, 近年来研究肿瘤的表观遗传学改变的技术得到不断完善和发展, 如在肿瘤发生、发展以至转移的基因甲基化研究, 采用高通量全基因组甲

表 1 4 例 I 期鼻咽癌石蜡标本和 4 例有颈部淋巴结转移的鼻咽癌标本

Table 1 4 cases of NPC paraffin specimens and 4 cases of NPC with lymph node metastasis specimens

Sample	Gender	Age/years	TNM-staging	Pathological diagnosis
A1	Male	51	T ₁ N ₀ M ₀	Poorly-differentiated squamous cell carcinoma
A2	Male	58	T ₁ N ₀ M ₀	Non-keratinizing and undifferentiated carcinoma
A3	Male	62	T ₁ N ₀ M ₀	Non-keratinizing and undifferentiated carcinoma
A4	Male	49	T ₁ N ₀ M ₀	Non-keratinizing and undifferentiated carcinoma
B1	Female	47	T ₁ N ₂ M ₀	Non-keratinizing and undifferentiated carcinoma
B2	Female	45	T ₂ N ₂ M ₀	Non-keratinizing and undifferentiated carcinoma
B3	Female	60	T ₁ N ₂ M ₀	Non-keratinizing and undifferentiated carcinoma
B4	Female	43	T ₂ N ₂ M ₀	Non-keratinizing and undifferentiated carcinoma

表2 33个差异甲基化基因染色体分布表

Table 2 The chromosomal location of 33 differentiation methylated genes

Chromosome	Genes	Chromosome	Genes
1	CYP2J2, LOC148413	12	GLT8D2, TPH2
2	ASB1, BAZ2B, SLC8A1	13	LOC144776
4	LIMCH1	14	ABHD4, C14orf159
5	GABRA1, ADAMTS2, PCDHGA1	16	FBXL16, LOC100129637
7	BET1, DPY19L1, SVOPL	17	NUP88, SNORD65
8	KCNV1	19	GIPC3, THOP1, ZNF628
9	DFNB31, SH2D3C	20	BCAS1
10	ACTA2	X	MAGEB1, MAGEB4
11	HSPA8, TRIM5		

甲基化芯片技术的快速发展大大地提升了研究效率,并很有可能发展成人类疾病诊断、预防和治疗的有效工具^[2-3],也为我们研究鼻咽癌全基因组相关基因异常甲基化提供了良好基础。

NimbleGen 甲基化芯片具有灵敏度高、特异性佳、重复性好等优势,已成为近年来研究基因甲基化的新手段^[4]。本课题组前期采用 NimbleGen 甲基化芯片对早期鼻咽癌标本及正常对照鼻咽组织进行检测,已初步构建了早期鼻咽癌的基因甲基化谱^[5]。此次实验采用 NimbleGen 甲基化芯片对 4 例 I 期鼻咽癌标本和 4 例有颈部淋巴结转移的鼻咽癌标本进行检测,4 例 I 期鼻咽癌标本中均出现甲基化的基因数目是 1 134 个,而 4 例有颈部淋巴结转移的鼻咽癌标本中均出现甲基化的基因数目是 835 个,两组鼻咽癌标本中均发生甲基化的基因为 396 个。虽然标本量较小,通过分析软件对照分析芯片筛查的结果,比较早期组(A组)与转移组(B组)两组标本 DNA 甲基化情况数据,最后筛选出两组鼻咽癌标本的差异甲基化基因为 33 个,我们推测至少这 33 个基因的异常甲基化可能与鼻咽癌的侵袭和转移有关。

通过生物信息分析,33 个差异甲基化基因,分布在 17 对染色体上见表 2,其中蛋白质编码基因有 29 个,非编码 RNA 基因 3 个(LOC148413、LOC144776 和 LOC100129637),核仁小 RNA 编码基因 1 个(SNORD65)。聚类分析结果显示,33 个基因编码的蛋白中,已知部分蛋白参与细胞增殖、分化、凋亡等生物过程,如通道转运蛋白、信号通路相关蛋白和酶等,但尚有部分基因的功能知之甚少,有待研究。

本研究结果发现的甲基化差异有显著性的基

因中,部分基因在其他肿瘤的发生、发展过程的作用密切相关,如 MAGE 基因编码肿瘤排斥抗原,其表达并不依赖于组织特异性转录因子,而是由启动子区域的甲基化/去甲基化机制调控^[6],具有加速肿瘤形成,抵抗肿瘤细胞凋亡及促进肿瘤细胞增殖转移等生物学功能,它的甲基化状态在肺癌、结直肠癌和食管癌中研究较多^[7-9],已成为这类肿瘤免疫治疗研究的热点,但在鼻咽癌中的表达及甲基化状态尚未有报道。文献报道^[10-12],NUP88 在许多种恶性肿瘤中过度表达,包括乳腺癌、结直肠癌、子宫内膜癌等,且与肿瘤的组织学分级及 TNM 分期、有无淋巴结转移等临床病理特征有关;本次芯片扫描结果 NUP88 在 B 组 4 个标本中皆出现甲基化,但鼻咽癌中 NUP88 的表达状态及甲基化对其的影响也还是个盲点,尚待进一步研究。另外,BCAS1 在乳腺癌中研究较多,是一个新的候选致癌基因;TRIM5 属于 TRIM 蛋白家族成员,后者参与多种细胞生物学过程,如细胞增殖、分化、发育、抗病毒、癌变和凋亡等。

目前在鼻咽癌中已发现若干由于甲基化而转录表达下调的肿瘤转移相关的抑制基因,如 Zhang 等^[13]研究发现有淋巴结转移的鼻咽癌患者中 RASSF2A 甲基化频率显著高于无转移的患者,并且 RASSF2A 基因能抑制鼻咽癌细胞的迁移运动,提示 RASSF2A 不仅与鼻咽癌的发病有关,也可能和鼻咽癌的侵袭和转移有关;Li 等^[14]在 21 例鼻咽原发癌组织中检测到 23.8%(5/21)的 CDH1 基因启动子出现甲基化,而在 21 例淋巴结转移癌组织中发现高达 61.9%(13/21) CDH1 基因发生甲基化,二者差异有统计学意义($P < 0.01$),这表明在鼻咽癌组织中,CDH1 基因启动子的甲基化也可能

是造成癌细胞浸润和转移的决定因素之一。但是本次实验中上述基因并未有发现,可能由于标本量少造成的误差或其他原因引起的假阴性,因此,需要更多标本进行多次重复实验,从而筛选出更多的颈淋巴结转移相关基因,提高基因甲基化谱的准确性。

甲基化引起基因表达水平的改变是肿瘤发病的重要机制,甲基化不像基因突变和缺失等改变,它不改变 DNA 序列和遗传密码,并且具有可逆性,对 DNA 甲基化抑制剂非常敏感,去甲基化治疗将有可能成为鼻咽癌治疗一重要策略^[15]。未来的研究可以针对鼻咽癌转移相关的甲基化基因采取策略,使特定的基因去甲基化,使沉默的基因重新表达,为鼻咽癌转移和复发的治疗提供新的研究方向。

参考文献

- [1] LO KW, HUANG DP. Genetic and epigenetic changes in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Semin Cancer Biol*, 2002, 12(6): 451-462.
- [2] WENG YI, HUANG TH, YAN PS. Methylated DNA immunoprecipitation and microarray-based analysis: detection of DNA methylation in breast cancer cell lines [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 590(1): 165-176.
- [3] PFEIFER GP, WANG Z, RIGGS AD, et al. Methylated CpG island recovery assay-assisted microarrays for cancer diagnosis [J]. *Expert Opin Med Diagn*, 2007, 1(1): 99-108.
- [4] ZILBERMAN D, HENIKOFF S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns [J]. *Development*, 2007, 134(22): 3959-3965.
- [5] 叶宇东,王贤斌,邱前辉.早期鼻咽癌基因甲基化谱的初步构建[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2014, 35(6): 925-931.
YE YD, WANG XB, QIU QH. Preliminary construction of DNA methylation profiles of early nasopharyngeal carcinoma [J]. *J SUN YAT-SEN Univ (Med Sci)*, 2014, 35(6): 925-931.
- [6] 徐建中,林山. MAGE 基因与恶性肿瘤[J]. *癌症*, 2003, 22(9): 1001-1004.
- XU JZ, LIN S. Melanoma antigen genes (MAGE) and malignant tumors [J]. *Chin J Cancer*, 2003, 22(9): 1001-1004.
- [7] NAGASHIMA H, SADANAGA N, MASHINO K, et al. Expression of MAGE-B genes in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2001, 92(2): 167-173.
- [8] 牟东成,冷希圣,彭吉润,等.黑色素抗原 MAGE-B 亚家族基因在肝细胞癌中的表达 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(1): 40-42.
MOU DC, LENG XS, PENG JR, et al. Expression of MAGE-B genes in hepatocellular carcinoma [J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2004, 26(1): 40-42.
- [9] YANAGAWA N, TAMURA G, OIZUMI H, et al. MAGE expressions mediated by demethylation of MAGE promoters induce progression of non-small cell lung cancer [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(1): 171-175.
- [10] ZHAO ZR, ZHANG LJ, WANG YY, et al. Increased serum level of Nup88 protein is associated with the development of colorectal cancer [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(3): 1789-1795.
- [11] SCHNEIDER J, MARTINEZ-ARRIBAS F, TORREJON R. Nup88 expression is associated with myometrial invasion in endometrial carcinoma [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2010, 20(5): 804-808.
- [12] AGUDO D, GÓMEZ-ESQUER F, MARTINEZ-ARRIBAS F, et al. Nup88 mRNA overexpression is associated with high aggressiveness of breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2004, 109(5): 717-720.
- [13] ZHANG Z, SUN D, VAN DO N, et al. Inactivation of RASSF2A by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(1): 32-38.
- [14] LI Z, REN Y, LIN SX, et al. Association of E-cadherin and beta-catenin with metastasis in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2004, 117(8): 1232-1239.
- [15] RAN Y, WU S, YOU Y. Demethylation of E-cadherin gene in nasopharyngeal carcinoma could serve as a potential therapeutic strategy [J]. *J Biochem*, 2011, 149(1): 49-54.

(编辑 刘清海)