

早期鼻咽癌基因甲基化谱的初步构建

叶宇东¹, 王贤斌¹, 邱前辉^{2*}

(1.南方医科大学研究生学院, 广东 广州 510515; 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)

摘要:【目的】分析早期鼻咽癌的基因甲基化状态,初步构建早期鼻咽癌的基因甲基化谱。【方法】收集 I 期(T1N0M0)鼻咽癌石蜡标本及炎性增生性鼻咽组织各 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(NimbleGen)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】4 例鼻咽癌石蜡标本中均出现甲基化的基因数目为 1 134 个,而 4 例炎性增生性鼻咽组织中均出现甲基化的基因有 2 091 个,4 例鼻咽癌标本全部发生甲基化但 4 例炎性增生性鼻咽组织全未发生甲基化的基因有 218 个,提示此 218 个基因可能为早期鼻咽癌患者的甲基化基因谱。另外,4 例鼻咽癌标本全未发生甲基化而 4 例炎性增生性鼻咽组织全部发生甲基化的基因数目为 1 558 个。【结论】本研究初步构建了早期鼻咽癌的基因甲基化谱,为进一步建立更为精确的甲基化谱奠定了基础,同时也为寻找鼻咽癌新的分子标志物提供了可能。

关键词:早期鼻咽癌;基因芯片;甲基化谱

中图分类号:R78

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2014)06-0925-07

Preliminary Construction of DNA Methylation Profiles of Early Nasopharyngeal Carcinoma

YE Yu-dong¹, WANG Xian-bin¹, QIU Qian-hui^{2*}

(1.Graduate School, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2.Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Guangdong General Hospital//Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To analyze the status of DNA methylation in early nasopharyngeal carcinoma, and to find out the DNA methylation profile of early nasopharyngeal carcinoma preliminarily. 【Methods】 Four pairs of paraffin specimens of NPC (T1N0M0) and inflammatory nasopharyngeal tissues were collected to extract DNA; The enriched genomic methylation fragments of two group specimens were used for high-throughput sequencing analysis by NimbleGen Human DNA Methylation 3 × 720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array. We scanned the hybridization signal, processed preliminary data and analyzed the genomic DNA methylation differences between early stage NPC and matched normal nasopharyngeal tissues. 【Results】 The number of methylated genes in all four cases of NPC paraffin specimens are 1134, and the number of methylated genes in the inflammatory nasopharyngeal tissues are 2260. Among the early stage NPC and compared specimens, the number of differentiation methylated genes are 218, and they might be the DNA methylation profiles of early stage NPC patients. In addition, the number of methylated genes in the four inflammatory nasopharyngeal tissues but not in the NPC paraffin specimens is 1558. 【Conclusion】 In this study, the DNA methylation profiles of early stage NPC were initially built. It laid a foundation for the further development of more precise profiles, meanwhile, it also provides possibility for looking for new molecular markers of NPC.

Key words: early nasopharyngeal carcinoma; microarrays; methylation profile

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(6):925-931]

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方地区发病率最高的头颈部恶性肿瘤,其预

后与分期密切相关,早、晚期患者的 5 年生存率相差甚远。但是鼻咽癌的早期诊断率低于 30%(I 期

收稿日期:2014-07-23

基金项目:广州市科技计划项目(2011J4300067)

作者简介:叶宇东,硕士生, E-mail: yeyudong1989@163.com; 通信作者:邱前辉,教授,研究方向:鼻腔鼻窦及颅底肿瘤, E-mail: qiuqianhui@hotmail.com

约 4.8%、Ⅱ期约 25.2%)^[1-2],因此提高鼻咽癌早期诊断是提高生存率的关键因素之一,寻找更加特异和敏感的指标来筛查、诊断早期鼻咽癌,成为临床亟待解决的问题。目前认为鼻咽癌是由遗传因素、EB 病毒感染及环境因素等共同作用所致,其发生、发展乃至转移等是一个多基因参与的过程。近年来针对鼻咽癌的表现遗传学研究显示,甲基化是相关抑癌基因失活的重要机制之一,在肿瘤的发生发展中发挥作用。许多研究开始关注高通量测序筛选鼻咽癌甲基化基因,寻找早期诊断、转移、预后等的分子生物指标。我们采用甲基化基因芯片对早期 NPC 标本及炎性增生性鼻咽组织进行高通量测序,分析全基因组的甲基化状态,初步构建早期鼻咽癌基因甲基化谱。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 组织标本 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,对照鼻咽黏膜组织新鲜标本 (-80 ℃低温保存)4 例(B1-B4) 来源于广东省人民医院耳鼻咽喉科门诊。全部组织标本资料信息见附表(表 1)。

1.1.2 DNA 甲基化芯片 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 3×720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array,芯片格式为 3×720K,单芯片设计覆盖人基因组所有 UCSC 注释 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 kb 至下游 0.61 kb,以及 27 728 个 CpG islands,共 30 848 条转录本。

1.1.3 试 剂 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,Biomag™ 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。

1.2 DNA 的提取

参照 QIAamp DNA FFPE Tissue kit 试剂盒提取鼻咽癌石蜡标本基因组 DNA,参照 DNeasy Blood&Tissue Kit 试剂盒提取炎性增生性鼻咽组织标本基因组 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。

1.3 超声打断基因组

每份样本 11 μg DNA 溶入 300 μL 缓冲液进行超声打断;超声仪调至低速档;将 DNA 试管周围的容器装满冷水,不断补充的 0.5 cm 大小的碎冰降温;超声 10 个循环,每个循环设置 30 开,30 停;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

MeDIP 样本和拟免疫共沉淀样本(mock Immunoprecipitation,mock IP)(各 5 μg 基因组DNA) 用 IP 缓冲液调到 500 μL,本底对照样本(input)用 IP 缓冲液调到 200 μL;将 DNA 在 250 r/min(半径

表 1 4 例鼻咽癌石蜡标本和 4 例对照鼻咽黏膜组织标本
Table 1 4 cases of NPC paraffin specimens and 4 cases of nasopharyngeal tissues

Sample	Gender	Age/years	TNM-staging	Pathological diagnosis
A1	Male	51	T1N0M0	Papillary squamous cell carcinoma
A2	Male	58	T1N0M0	Non-keratinizing and undifferentiated carcinoma
A3	Male	62	T1N0M0	Non-keratinizing and undifferentiated carcinoma
A4	Male	49	T1N0M0	Non-keratinizing and undifferentiated carcinoma
B1	Female	61	/	Inflammatory hyperplastic tissue
B2	Female	49	/	Inflammatory hyperplastic tissue
B3	Male	58	/	Inflammatory hyperplastic tissue
B4	Male	62	/	Inflammatory hyperplastic tissue

$r = 14 \text{ cm}$)转速下, 94°C 孵育 10 min; 然后在 4°C 下迅速冷却并做一个迅速的旋转; 加入 $5 \mu\text{g}$ 抗 5' 甲基化胞嘧啶抗体于 MeDIP 样本中, $5 \mu\text{g}$ 鼠 IgG 抗体与拟免疫共沉淀样本中, 本底对照样本不加任何试剂; 在 4°C 旋转震动孵育过夜; 加入 $50 \mu\text{L}$ 偶联抗鼠 IgG 抗体的磁珠混匀, 在 4°C 反复涡旋 2 h; 孵育后, 在 4°C 用磁珠分离试剂富集磁珠 2 min; 去上清和废弃液; 采用三种冲洗液按顺序冲洗磁珠。采用 1 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH } 8.0$)、 0.5 mmol/L EDTA ($\text{pH } 8.0$)、 10% 十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 配制洗脱液, 向“MeDIP”和“mock IP”管各加入 $200 \mu\text{L}$ 的洗脱液; 65°C 洗脱 15 min; 分离的磁珠转移到另外的管子里; 酚氯仿法提取 MeDIP-DNA 和实验参照 DNA; 用 Nanodrop ND-1000 测定其质量和浓度。

1.5 MeDIP 与 Input DNA 片段线性扩增

1.5.1 文库制备 MeDIP 和 Input 样本各 10 ng , 用水调至各 $10 \mu\text{L}$ 总量; 在 MeDIP 和 Input 样本中再各加入 $2 \mu\text{L}$ 的文库制备缓冲液, 然后贴壁转移至 0.2 mL 的 PCR 反应管中; 各加入 $1 \mu\text{L}$ 文库稳定液、混匀, 快速旋转、转移热循环仪 95°C 2 min; 立刻在冰上冷却, 再次快速旋转; 再加 $1 \mu\text{L}$ 文库制备酶, 混匀; 热循环仪孵育, 反应设置: 16°C , 20 s; 24°C , 20 s; 37°C , 20 s; 75°C , 5 s; 4°C 保温; 快速旋转, -20°C 保温 3 d。

1.5.2 扩增及纯化 DNA 片段 参照 Whole Genome Amplification Kit 试剂盒进行扩增, 配好 $60 \mu\text{L}$ 的反应混合物加入到每份样本中, 涡旋混匀。按以下热反应流程来孵育扩增: 95°C 预变性 3 min, 1 个循环; 94°C 变性 15 s, 65°C 退火、延伸 20 s, 设置 14 个循环; 4°C 保温。最后参照 QIAquick PCR purification kit 试剂盒, 对扩增的 DNA 进行纯化回收。

1.6 荧光标记

按照罗氏芯片标记手册步骤操作, 用 $1 \text{ OD}/42 \mu\text{L}$ 的 9 mer 随机探针缓冲液来稀释 Cy3 (绿色荧光) 和 Cy5 (红色荧光) 标记的 9 mer 长的探针, 将稀释液到 0.2 mL 薄壁的 PCR 管中, 等分每管稀释液到 $40 \mu\text{L}$, -20°C 避光保存。将 MeDIP 样本和 Input 样本分别放入到 PCR 管中。 98°C 10 min 热变性, 快速转移冰上 10 min, 加入 $20 \mu\text{L}$ dNTP/Klenow 混合物到各管中, 充分吸打 10 次, 并将底部震荡防止 DNA 沉淀到管底。避光 37°C 孵育 2

h。之后用 0.5 mol/L EDTA 终止反应, 每个管中加入 5 mol/L NaCl, 简单的涡旋震荡后转移至含有异丙醇的 1.5 mL 管中, 避光室温孵育 10 min, $12\,000 \times g$ 离心 10 min 去上清, 用 $500 \mu\text{L}$ 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, 地热避光干燥 5 min。在打开前简单的震荡环氧树脂 (epoxy epoxide) EP 管, 然后用 $25 \mu\text{L}$ 的纯化水对干燥颗粒进行涡旋, 震荡水化处理。采用 Nanodrop ND1000 检测标记的 DNA, 并用 $6 \mu\text{g}$ 标记的 MeDIP/Input DNA 进行芯片杂交反应。

1.7 芯片杂交

设置杂交系统恒温至 42°C , 将 $6 \mu\text{g}$ 的 MeDIP 样本和 $6 \mu\text{g}$ 的 Input 样本悬浮与 $5 \mu\text{L}$ 水中。加入合适的 NimbleGen 杂交液至每个管中, 涡旋震荡 15 s, 转移到收集管中, 95°C 避光孵育 5 min。涡旋震荡后将样本管放置于 42°C 恒温杂交系统中。将 NimbleGenChip 混合液迅速放入精密混合物比对仪 (Precision Mixer Alignment Tool, PMAT) 杂交仪中, 并将芯片放入 PMAT 仪中。使用 Gilson Microman M100 移液器将 $15 \mu\text{L}$ 样本慢慢加入到芯片槽中。MeDIP 样本和 Input 样本在 42°C 芯片杂交反应 16 ~ 20 h。杂交完成后, 用洗脱液进行洗脱。

1.8 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。使用 GenePix Pro6.0 软件分析芯片结果原始信号值进行标准化等数据分析。将芯片读取后的数据采用 NimbleScan v2.5 软件进行诱导的 ELC 组与 ESC 组进行比较分析其 DNA 启动子区的甲基化差异。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 P 值的 ($-\log_{10}$) 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 ($\text{peakscore} \geq 2$)。

为了避免技术可变性和评价样品之间甲基化的差异, 从原始数据获得的 the $\log_2$ -ratio 比值应标准化。我们利用 Bioconductor 对数据进行中位数的确定, 分位数标准化和线性平滑分析。标准化之后, 每个标本中又重新建立了一个标准化数据 $\log_2$ -ratio data (*_ratio.gff file), 它可以被用来进一步作峰值分析。

我们采用软件对芯片结果的原始信号值确定

中位数、分位数标准化、线性化处理,用于后期的数据分析。用以上分析软件产生的 $\log_2$ 标准化值应用于固定检测长度的染色质中所在探针的富集信号强度。每个探针有相关的 P 值分数 ($-\log_{10}$), 并设定一个样本中某个启动子区域内是否甲基化的阈值。

1.9 SignalMaP 软件数据分析

用高解析度芯片扫描仪检测杂交信号,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。鼻咽癌标本及对照鼻咽组 DNA 经甲基化芯片信号扫描,原始数据收集,数据标准化,明确信号峰值,峰值信号包括:基因启动子富集峰值(Enrichment Peaks in Gene Promoter)、高密度 CpG 序列启动子富集峰值[Enrichment Peaks in HCP (high CpG-containing promoter)]、中密度 CpG 序列启动子富集峰值[Enrichment Peaks in ICP (intermediate CpG-containing promoter)]、低密度 CpG 序列启动子富集峰值[Enrichment Peaks in LCP (low CpG-containing promoter)]。

2 结 果

运用免疫共沉淀(MeDIP)甲基化芯片技术对鼻咽癌标本及对照炎性增生性鼻咽组织标本 DNA 进行甲基化的初步筛查,启动子区中 18 205 个基因在鼻咽癌石蜡标本甲基化数目如下:A1 为 5 162 个(28.35%),A2 为 5 180 个(28.45%),A3 为 5 305 个(29.14%),A4 为 5 035 个(27.66%);而炎性增生性鼻咽组织基因甲基化数目如下:B1 为 7 906 个(43.43%),B2 为 8 280 个(45.48%),B3 为 7 357 个(40.41%),B4 为 5 898 个(32.40%);CpG 岛中 21 838 个基因在鼻咽癌石蜡标本甲基化情况如下:A1 为 4 067 个(18.62%),A2 为 3 805 个(17.42%),A3 为 4 890 个(22.39%),A4 为 3 073 个(14.08%);而炎性增生性鼻咽组织基因甲基化情况如下:B1 为 11 344 个(51.94%),B2 为 11 995 个(54.93%),B3 为 10 354 个(47.41%),B4 为 8 628 个(39.51%)。4 例鼻咽癌石蜡标本中均出现甲基化的基因数目是 1134 个,而 4 例炎性增生性鼻咽组织中均出现甲基化的基因数目是 2 091 个;4 例鼻咽癌石蜡标本和 4 例炎性增生性鼻咽组织中均出现甲基化的基因有 300 个。

根据 DNA 甲基化芯片筛查的结果,比较 A 与 B 两组样本基因甲基化情况数据,对比启动子区,4 例鼻咽癌石蜡标本中全部发生甲基化而 4 例炎性增生性鼻咽组织全未发生甲基化的基因数目为 200 个,4 例鼻咽癌石蜡标本全未发生甲基化而 4 例炎性增生性鼻咽组织中全部发生甲基化的基因数目为 577 个;对比 CpG 岛区,4 例鼻咽癌石蜡标本全部发生甲基化而 4 例炎性增生性鼻咽组织全未发生甲基化的基因有 18 个,4 例鼻咽癌石蜡标本全未发生甲基化而 4 例炎性增生性鼻咽组织中全部发生甲基化的基因数目为 981 个。

甲基化芯片筛选出的鼻咽癌标本与对照鼻咽组织的差异甲基化基因为 218 个,这些基因位于不同的染色体上,其中定位在 19 号染色体上的基因最多,有 33 个,占 15.14%;另外定位在 1、2、11、15、16、17 号染色体上的基因数目也较多,分布均在 10 个以上;而定位在 4 号及 8 号染色体上的基因最少,各为 2 个。218 个差异甲基化基因染色体分布及其分类见表 2、表 3。

3 讨 论

表观遗传学的改变在鼻咽癌多阶段癌变过程中发挥重要的作用,其研究的是非 DNA 序列变化的可遗传改变,包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和 RNA 干扰等,它们在基因表达及转录调控中扮演着重要角色^[3]。这些表观遗传的标志可通过细胞分裂遗传到下一代,通过不断积累最终决定细胞的表型。DNA 甲基化是基因沉默、抑癌基因失活的主要机制之一,在多种肿瘤的发生中起重要作用,已成为肿瘤研究的一大热点。目前研究最为广泛的是肺癌和乳腺癌^[4],在肺癌中包括 APC、CDKN2A/P16、DAPK1、MGMT、RASSF1A 等,而在乳腺癌中高甲基化的基因也很多,如 APC、BRCA1、E-cadherin、ER、GSTP1 和 RASSF1A;有的基因在很多肿瘤中皆出现异常甲基化,如 RASSF1A^[5-6]和 P16^[7];而有的基因仅在特定肿瘤发生甲基化,如超过 90% 的前列腺癌组织中 GSTP1 都存在高甲基化现象^[8]。

近年来,研究表观遗传学改变的技术得到不断发展和完善,而随着人类基因组计划的完成,一个以功能基因组学和蛋白质组学为代表的后基因组时代已经来临,越来越多生物学技术应用到此

表 2 218 个差异甲基化基因染色体分布表
Table 2 The chromosomal location of 218 differentiation methylated genes

Chromosome	Genes
1	A2BP1, AJAP1, ACOT7, B4GALT2, BARHL2, C1orf83, CACNA1E, CD164L2, CELA2A, DARC, FBLIM1, HAO2, IGSF21, IGSF3, LCE1D, LENEP, MIR320B1, OR2T29, RPS6KA1, SNORD103A, TMEM59, UBXN10
2	ALS2CR12, C2orf90, C2orf54, CAPN14, CD8A, CYP26B1, GGT8P, GPR55, LOC100134259, LOC400940, NCRNA00152, PDE11A, SIX3, SP9
3	EGOT, IQCG, LMLN, SNORD66
4	CXCL6, KIAA1530
5	APBB3, CAMLG, PCDHGC4, SLC35A4
6	BAT3, FOXO3, KCNK16, MOCS1, PKIB, SERINC1, TTBK1, UNC5CL
7	ATXN7L1, PAX4, PVRIG, SP8
8	DOK2, ZNF623
9	ADAMTS13, AQP7P1, AQP7P2, DMRT2, ENG, FAM102A, OR1J1, TMEM203, TRPM3
10	ANXA8, C10orf84, ANXA8L1, HK1, HSD17B7P2, LOC729668, MTG1
11	BDNFOS, C11orf87, AP2A2, GPHA2, GPR44, IFITM5, INSC, LIN7C, LOC100133315, OR51D1, PGA4, PRDM11, PRG2, RNF121, SLC02B1, SPON1, TRIM66, TSPAN18, UEVLD
12	C12orf57, PITPNM2, LOC100130238
13	C13orf35, STK24, MCF2L
14	BATF, BEGAIN, BCYRN1, LTB4R2, RTL1, SLC39A2, TPPP2
15	AGPHD1, ARHGAP11B, AHRR, DNM1P35, RCCD1, SNORD115-11, SNORD115-20, SNORD115-21, SNORD115-29, SNORD115-30, SNORD115-33, SNORD115-34, SNORD115-36, SNORD115-4, SNORD115-40, SNORD115-41, SNORD115-43, SNORD115-7, SNORD115-8, SNORD116-17, SNORD116-18, SNORD116-19, SNORD116-23, SNORD116-3, SNORD116-5, SNORD116-7, SNORD116-9
16	C16orf3, CLN3, C16orf55, IQCK, KCNG4, MAPK8IP3, OSGIN1, RAB11FIP3, SLC38A8, SNX29, TRAF7, ALOX12B, BTBD17, ARHGAP23, GOSR1, GP1BA, HILS1, KRT17, LOC339240, MRPL45, NME2, RAB5C, RPH3AL, RPL26, SEPT9
18	GNAL, TCEB3B, MC5R, TCEB3CL
19	AXL, C19orf69, APLP1, CYP2A6, CYP2B6, CYP4F11, DMKN, DUS3L, FTL, GEMIN7, IRGC, KIR3DL3, KIR3DP1, KLKP1, LOC126536, LOC148189, LPAR2, MAP3K10, OR2Z1, OR7G3, PAX2, PDE4A, PEPD, PLAUR, PSG11, PSG2, PSG5, PSG7, RAB11B, RTBDN, SBN02, SLC1A6, ZNF471
20	AVP, CST5, C20orf197, FITM2, L3MBTL, LOC647979, SNORA71C
21	COL18A1, POTES, TFF2
22	APOBEC3A, IL2RB, ISX, L3MBTL2, LRP5L, PVALB, RGL4, SAMM50
X	CNGA2, FTSJ1, NAPIL2

领域，其中生物芯片作为一种高通量基因筛选工具，在后基因组时代的肿瘤研究领域发挥着越来越重要的作用^[9-11]。根据 DNA 预处理方法不同，甲基化芯片技术的甲基化谱研究方法可大致分为三类^[12-14]。第一类为基于去甲基化药物处理后的表达芯片的分析方法，第二类为基于限制性内切酶结合芯片的分析方法，第三类为基于免疫共沉淀结合芯片的分析方法，最终利用甲基化芯片筛查基因，从而筛选出肿瘤细胞中 DNA 异常甲基化的区域；同样也能利用基因表达谱芯片筛选出药物

处理后肿瘤细胞中表观遗传沉默逆转后重新表达的基因。通过这些新的技术手段，越来越多肿瘤中甲基化模式发生异常改变的基因被发现。

高通量全基因组甲基化芯片研究的公司主要有四家，分别是 Illumina, Aglient, Affmetrix 和 NimbleGen^[15]。Zhang 等^[9]利用 NimbleGen 甲基化芯片筛选舌鳞状细胞癌异常化基因，初步构建了舌鳞状细胞癌甲基化谱；而本研究采用的 NimbleGen 甲基化芯片不仅探针长，而且芯片密度高，具有较高的灵敏度及特异度特性，而且

表 3 218 个差异甲基化基因功能分类
Table 3 The gene function classification of 218 differentiation methylated genes

Classification	Genes
Regulatory gene	A2BP1, AHRR, APBB3, AXL, BATFCAPN14, CLN3, DUS3L, GNAL, KCNG4, L3MBTL, MAPK8IP3, OSGIN1, PDE4A, RAB11B, RAB11FIP3, RPH3AL, SEPT9, TCEB3B
Structural gene	ACOT7, ADAMTS13, ALOX12B, ANXA8, ANXA8L1, APLP1, APOBEC3A, ARHGAP23, AVP, B4GALT2, B4GALT2, BCYRN1, CACNA1E, CAMLG, CD8A, CELA2A, CNGA2, COL18A1, CST5, CYP26B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP4F11, DARC, DOK2, ENG, FBLIM1, FITM2, FOXO3, FTL, FTSJ1, GEMIN7, GOSR1, GP1BA, GPHA2, GPR55, HAO2, HILS1, HK1, IFITM5, IGSF21, IL2RB, INSC, ISX, KCNK16, KIAA1530, KRT17, LPAR2, MAP3K10, MC5R, MCF2L, MOCS1, MRPL45, NAP1L2, NME2, OR1J1, OR2T29, OR2Z1, OR51D1, OR7G3, PAX2, PAX4, PCDHGC4, PDE11A, PEPD, PITPNM2, PKIB, PLAUR, PRG2, PSG11, PSG2, PSG5, PSG7, PVALB, RAB5C, RNF121, RPL26, RPS6KA1, RTBDN, RTL1, SAMM50, SIX3, SLC39A2SLCO2B1, SP8, STK24, TFF2, TRAF7, TRPM3
Function unknown gene	AGPHD1, AJAP1, ALS2CR12, AP2A2, AQP7P1, AQP7P2, ARHGAP11B, ATXN7L1, BARHL2, BAT3, BDNFOS, BEGAIN, BTBD17, C10orf84, C11orf87, C12orf57, C13orf35, C16orf3, C16orf55, C19orf69, C1orf83, C20orf197, C2orf54, C2orf90, CD164L2, CXCL6, DMKN, DNM1P35, EGOT, FAM102A, GGT8P, GPR44, HSD17B7P2, IGSF3, IQCG, IQCK, IRGC, KLKP1, L3MBTL2, LCE1D, LENEP, LIN7C, LMLN, LOC100130238, LOC100133315, LOC100134259, LOC126536, LOC148189, LOC339240, LOC400940, LOC647979, LOC729668, LRP5L, MIR320B1, MTG1, NCRNA00152, PGA4, POTED, PRDM11, PVRIG, RCCD1, RGL4SBN02, SERINC1, SLC1A6, SLC35A4, SNORA71C, SNORD103A, SNORD115-11, SNORD115-20, SNORD115-21, SNORD115-29SNORD115-30, SNORD115-33, SNORD115-34, SNORD115-36, SNORD115-4, SNORD115-40SNORD115-41, SNORD115-43, SNORD115-7, SNORD115-8, SNORD116-17, SNORD116-18, SNORD116-19, SNORD116-23, SNORD116-3, SNORD116-5, SNORD116-7, SNORD116-9, SNORD66, SNX29, SP9, SPON1, TCEB3CL, TMEM203, TMEM59, TPPP2, TRIM66, TSPAN18, TTBK1, UBXN10, UEVLD, UNC5CL, ZNF471, ZNF623

NimbleGen 公司还提供了可供分析原始数据的 SignalMap 软件,具有简洁、直观等特点,方便试验后数据分析处理。利用甲基化免疫共沉淀技术(MeDIP)结合 NimbleGen 公司高通量甲基化芯片,对 4 对 I 期鼻咽癌石蜡标本及炎性增生性鼻咽组织标本继续高通量筛查,通过甲基化芯片初步筛选,在 4 例鼻咽癌石蜡标本中均出现甲基化的基因数目是 1 134 个,而在 4 例炎性增生性鼻咽组织中均出现甲基化的基因有 2 091 个,早期鼻咽癌与炎性增生性鼻咽组织间的差异甲基化基因为 218 个。分析数据获得预期结果,说明通过 MeDIP 结合高通量甲基化芯片筛选鼻咽癌标本及炎性增生性鼻咽组织差异甲基化基因的方法是可取的。4 例早期鼻咽癌标本中全部发生甲基化基因的数目小于在 4 例炎性增生性鼻咽组织中全部发生甲基化基因的数目,这与一直以来国内外对 DNA 甲基化

与肿瘤的认识是一致的:全基因组的低甲基化和区域性的高甲基化是肿瘤发生、发展的重要机制和特性^[16-17]。另外,有研究显示表观遗传学特别是 DNA 甲基化在变应性鼻炎及其他变应性疾病的发生发展过程中也同样发挥着重要作用,存在某种程度的相关性^[18],说明也可能由于其它原因导致本研究中正常组甲基化基因数高于肿瘤组。

目前关于鼻咽癌的甲基化研究还仍然局限于肿瘤组织、细胞系等的检测,无鼻咽癌早期标本的研究,但组织与细胞系来源不同,不同标本间临床分期不同,其获得的甲基化基因很难预测其在鼻咽癌肿瘤发生中的作用,因而很难应用于早期诊断。本研究 4 例鼻咽癌标本均为临床确诊的 I 期(T1N0M0)病例,标本获得前均未进行放疗和(或)化疗,对照组为炎性增生性鼻咽组织,通过全基因组甲基化芯片,筛选获得了差异甲基化基因(差异

甲基化基因是指在4例炎性增生性鼻咽组织中全未发生甲基化,而在4例鼻咽癌标本中全部发生甲基化的基因)。初步构建了早期鼻咽癌的基因甲基化谱,为了解鼻咽癌发生初始的启动基因变化状况,研究鼻咽癌发病的分子生物学机制同时为寻找鼻咽癌早期诊断的分子标志物提供了可能。

当然,全基因组甲基化芯片筛选构建早期鼻咽癌甲基化谱仍有一定局限性,如不足之处在于其假阳性及假阴性的存在,需要更多标本、更多芯片进行多次重复实验,从而一定程度上提高基因甲基化谱的准确性。譬如本次实验,通过4组标本的筛选扫描,获得的甲基化差异基因中未发现一些经典的在鼻咽癌中发生高甲基化的抑癌基因,如RASSF1A、P16、DAPK1、CDH1、CDH13等,推测可能是探针设计不足,或是样本量不足的误差导致。因此芯片获得的结果仍还需进一步扩大样本进行甲基化谱的分析。而本研究仅仅是构建鼻咽癌基因甲基化谱的开端。

参考文献:

- [1] Hong MH, Mai HQ, Min HQ, et al. A comparison of the Chinese 1992 and fifth-edition International Union Against Cancer staging systems for staging nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer*, 2000, 89(2): 242-247.
- [2] 洪明晃, 闵华庆, 郭翔, 等. 从鼻咽癌分层综合治疗的结果来验证'92分期的合理性[J]. *癌症*, 2000, 19(05): 460-462.
Hong MH, Min HQ, Guo X, et al. To prove the rationality of '92 staging with results of nasopharyngeal carcinoma treated by stratified multitherapies [J]. *Cancer*, 2000, 19(05): 460-462.
- [3] 刘华英, 彭书平, 周鸣, 等. 鼻咽癌的表现遗传学研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(7): 673-681.
Liu HY, Peng SP, Zhou M, et al. The epigenetics research progress in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Progr Biochem Biophys*, 2007, 34(07): 673-681.
- [4] Das PM, R Singal. DNA methylation and cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(22): 4632-4642.
- [5] Lo KW, Chung GT, To KF. Deciphering the molecular genetic basis of NPC through molecular, cytogenetic, and epigenetic approaches [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(2): 79-86.
- [6] Fendri A, Masmoudi A, Khabir A, et al. Inactivation of RASSF1A, RARbeta2 and DAP-kinase by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(5): 444-451.
- [7] Xiang YN, Zhang WY. The clinical significance of p16 protein non-expression and p16 gene inactivation by deletions and hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2005, 34(6): 358-361.
- [8] Nakayama M, Gonzalgo ML, Yegnasubramanian S, et al. GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular biomarker for prostate cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 91(3): 540-552.
- [9] Zhang S, Feng XL, Shi L, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in tongue squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(5): 1819-1826.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Li J, Protopopov A, Wang F, et al. NotI subtraction and NotI-specific microarrays to detect copy number and methylation changes in whole genomes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(16): 10724-10729.
- [13] Lippman Z, Gendrel AV, Colot V, et al. Profiling DNA methylation patterns using genomic tiling microarrays [J]. *Nat Methods*, 2005, 2(3): 219-224.
- [14] Adorjan P, Distler J, Lipscher E, et al. Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(5): e21.
- [15] Zilberman D, Henikoff S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns[J]. *Development*, 2007, 134(22): 3959-3965.
- [16] Issa JP. Aging, DNA methylation and cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1999, 32(1): 31-43.
- [17] Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(2): 143-153.
- [18] North ML, Ellis AK. The role of epigenetics in the developmental origins of allergic disease[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2011, 106(5): 355-362.

(编辑 刘清海)