

肿瘤发病机制与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000064

鼻咽癌变前后 ADAM23、MIMT1、FAM150B、GRIN2A、LRRC4 甲基化研究

周小军¹, 陈江华², 王士贞³, 王书芹⁴, 张丽娟¹

(1. 广州中医药大学附属中山市中医院耳鼻喉科, 中山 528400; 2. 广州中医药大学附属中山市中医院检验科, 中山 528400; 3. 广州中医药大学第一临床医学院耳鼻喉科, 广州 510405; 4. 广州中医药大学附属中山市中医院病理科, 中山 528400)

【摘要】目的:研究鼻咽癌变前后 ADAM23、MIMT1、FAM150B、GRIN2A、LRRC4 甲基化特征。**方法:**12 例鼻咽癌 10 例鼻咽炎作为研究对象, 抽提鼻咽组织 DNA, 以特异识别 5-甲基胞嘧啶的抗体免疫沉淀 DNA, 实时荧光定量 PCR 分别检测 5 个基因含量, 并设置不用 5-甲基胞嘧啶抗体(非 MeDIP-qPCR 实验)及使用非特异性抗体 IgG 进行免疫沉淀作为双重对照。**结果:**无论鼻咽癌还是鼻咽炎患者, 5 个基因在使用非特异性抗体 IgG 实验时均未检测到甲基化, 非 MeDIP-qPCR 实验显示 5 个基因在鼻咽癌及鼻咽炎荧光定量值无明显差异($P>0.05$); MeDIP-qPCR 实验显示, 鼻咽癌 5 个基因均呈现明显的甲基化, ADAM23、MIMT1、FAM150B、GRIN2A、LRRC4 在鼻咽癌校正值分别为: 3.39 ± 2.28 , 6.03 ± 3.93 , 3.68 ± 1.81 , 7.12 ± 3.17 , 3.10 ± 1.94 , 在鼻咽炎分别为 0.00 ± 0.00 , 0.01 ± 0.01 , 0.25 ± 0.49 , 0.20 ± 0.20 , 0.00 ± 0.00 (均 $P<0.01$)。**结论:**ADAM23、MIMT1、FAM150B、GRIN2A、LRRC4 5 个基因甲基化为鼻咽癌变的重要特征。

【关键词】鼻咽癌; DNA 甲基化; ADAM23; MIMT1; FAM150B; GRIN2A; LRRC4

【中图分类号】R765

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-05-02

Study on methylation of ADAM23, MIMT1, FAM150B, GRIN2A, LRRC4 before and after nasopharyngeal carcinoma canceration

Zhou Xiaojun¹, Chen Jianghua², Wang Shizhen³, Wang Shuqin⁴, Zhang Lijuan¹

(1. Department of Otolaryngology, the Affiliated Zhongshan Hospital; 2. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Zhongshan Hospital; 3. Department of Otolaryngology, the First School of Clinical Medicine; 4. Department of Pathology, the Affiliated Zhongshan Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】Objective: to study ADAM23, MIMT1, FAM150B, GRIN2A, LRRC4 DNA methylation feature while nasopharyngeal epithelium canceration. **Methods:** Totally 12 patients with nasopharyngeal carcinoma and 10 patients with nasopharyngitis were chose as the research objects. Nasopharyngeal tissue DNA was extracted and was used to specifically identify 5-methyl cytosine antibody immune precipitation DNA. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the contents of five genes respectively. Non 5-methyl cytosine antibody(non MeDIP-qPCR experiment) and nonspecific antibody IgG immune precipitation were set up as dual controls. **Results:** Regardless of the patients with nasopharyngeal carcinoma or nasopharyngitis, methylation was not detected in five genes when using nonspecific antibody IgG experiment. Non MeDIP-qPCR experiment showed that there was no difference in fluorescence quantitative value of five genes in nasopharyngeal carcinoma and nasopharyngitis($P>0.05$). MeDIP-qPCR experiment showed that all five genes in nasopharyngeal carcinoma presented significant methylation. Corrected values of real-time fluorescence quantification of ADAM23, MIMT1, FAM150B, GRIN2A, LRRC4 were 3.39 ± 2.28 , 6.03 ± 3.93 , 3.68 ± 1.81 , 7.12 ± 3.17 , 3.10 ± 1.94 in nasopharyngeal carcinoma and were 0.00 ± 0.00 , 0.01 ± 0.01 , 0.25 ± 0.49 , 0.20 ± 0.20 , 0.00 ± 0.00 in nasopharyngitis(all $P < 0.01$). **Conclusion:** ADAM23, MIMT1, FAM150B, GRIN2A, LRRC4 gene methylation are important characteristics of nasopharyngeal carcinoma.

【Key words】nasopharyngeal carcinoma; DNA methylation; ADAM23; MIMT1; FAM150B; GRIN2A; LRRC4

作者介绍: 周小军, Email: zd1232@126.com,

研究方向: 鼻咽癌中西医结合研究。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81072847); 中山市科技局资助项目(编号: 20122A014)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000064.html>

鼻咽癌为我国南方常见恶性肿瘤,癌变机理复杂,涉及到多种因素。大量研究证实,DNA 甲基化在细胞癌变中发挥重要作用,作者前期经对 3 例鼻咽癌癌变前后病例研究发现^[1],鼻咽癌癌变后鼻咽上皮细胞存在着明显的 DNA 高甲基化特征,且发现了一批甲基化程度较高的基因(ADAM23、MIMT1、FAM150B、GRIN2A、LRRC4)。本项目拟扩大样本并行实时荧光定量 PCR 进行验证,报道如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

研究对象共 22 例,包括 10 例鼻咽炎患者,男 5 例,女 5 例,平均年龄 46 岁;12 例鼻咽癌患者,男 6 例,女 6 例,平均年龄 49 岁,均为分化型角化型癌。22 例中包括 3 例鼻咽炎患者,约在 1 年左右发展为鼻咽癌(3 例),即癌变前后配对患者。

1.2 主要试剂及仪器

2X PCR master mix(Superarray),洁净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),TaKaRa PCR Thermal Cycler(宝生物工程(大连)有限公司),引物设计软件:Primer 5.0,ABI PRISM7900 system(Applied Biosystems)。

1.3 实验方法

常规从石蜡包埋的鼻咽组织提取 DNA,实验显示 DNA 纯度良好。超声打断基因组,将研究标本基因组 DNA 用超声打断成 200~500 bp DNA 片断,实验显示 DNA 质量良好。热变性成单链 DNA。此时样本分为等量两份,一份为甲基化样品:用特异识别 5-甲基胞嘧啶的抗体免疫沉淀 DNA,再进行实时荧光定量 PCR,即 MeDIP-qPCR 实验;另一份为非甲基化对照样品,实验时不用 5-甲基胞嘧啶的抗体免疫沉淀 DNA,其余实验步骤同前。非甲基化对照实验的目的在于解决由于基因拷贝数的变化、上样量等差异带来的影响。另外,为了避免抗体非特异性的结合到一些基因片段,作者又加了一组非特异性实验,以使用非特异性抗体 IgG 进行免疫沉淀,以去除假阳性基因。

选择前期鼻咽癌癌变前后甲基化芯片实验中发现的在所有 3 例鼻咽癌前均无甲基化而癌变后均有甲基化的 5 个基因即 MIMT1、FAM150B、ADAM23、GRIN2A、LRRC4 进行荧

光定量 PCR,其引物列表见表 1。

实验过程简述如下:

将所有 cDNA 样品分别配置实时荧光定量 PCR 反应体系。体系配置如下:2 × Master Mix 5 μl,10 μmol/L 的 PCR 特异引物 F 0.5 μl,10 μmol/L 的 PCR 特异引物 R 0.5 μl,加水至总体积为 9 μl,轻弹管底将溶液混合,5 000 r/min 短暂离心。

将 9 μl 混合液加到 384-PCR 板对应的每个孔中,再加入对应的 1 μl cDNA,小心黏上封口膜,并短暂离心混合。

将上述 PCR 板置于实时荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应,温度为 95 ℃,时间为 10 min,共 40 个 PCR 循环[95℃,10 s;60 ℃,60 s(收集荧光)]。

2 结果

2.1 鼻咽癌与鼻咽炎 ADAM23、MIMT1、FAM150B、GRIN2A、LRRC4 5 个基因非特异性实验结果

无论鼻咽癌还是鼻咽炎患者,5 个基因在使用非特异性抗体 IgG 实验时均未检测到甲基化。实验结果符合预期,因为从理论上说它是不会结合甲基化基因的,可以排除假阳性基因影响甲基化实验结果。

2.2 鼻咽癌与鼻咽炎 ADAM23、MIMT1、FAM150B、GRIN2A、LRRC4 5 个基因甲基化实验结果

MeDIP-qPCR 实验显示,鼻咽癌 5 个基因均呈现明显的甲基化(检测的数据越大,说明甲基化程度越小),与鼻咽炎相比较,其差异具有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

2.3 鼻咽癌与鼻咽炎 ADAM23、MIMT1、FAM150B、GRIN2A、LRRC4 5 个基因非甲基化对照实验结果

采用非 MeDIP 实验,即不用特异识别 5-甲基胞嘧啶的抗体免疫沉淀 DNA,同时也进行实时荧光定量 PCR,此对照实验显示,5 个基因在鼻咽癌及鼻咽炎荧光定量值无明显差异,均为 $P>0.05$,见表 3。排除了由于实验样本基因拷贝数的变化、上样量等差异带来的影响。

2.4 鼻咽癌与鼻咽炎 ADAM23、MIMT1、FAM150B、GRIN2A、LRRC4 5 个基因 MeDIP-chip 校正结果

以校正值= $2(t_{\text{非甲基化对照}} - t_{\text{甲基化}}) \times \text{稀释因子} (1/5) \times 100\%$ 为校正公式,计算 5 个基因的甲基化校正结果,见表 4。结果显示,5 个基因在鼻咽癌患者中均呈现明显的甲基化,与鼻咽炎相比较,其差异具有统计学意义($P<0.01$)。

表 1 5 个基因实时定量 PCR 使用引物列表

Tab.1 List of five genes using real-time quantitative PCR primers

基因名	双向引物序列	退火温度(℃)	引物长度(bp)
MIMT1	F:5'-CTGGCAACAGGGATAGCATT-3'; R:5'-GGGGCATTAGGGCAGACA-3'	60	79
FAM150B	F:5'-CCCTCCGTTCTCTCACTTG-3'; R:5'-CTCACCCGCCATCTCCT-3'	60	275
ADAM23	F:5'-TGCTTCTCTGCTCTCTCTGTC-3'; R:5'-CGCCCTTCGCTTTCCTCT-3'	60	145
GRIN2A	F:5'-AGGCACAGGGAGAAGCATTG-3'; R:5'-GCTGCTCTCCGTGCTGTG-3'	60	225
LRRC4	F:5'-ACCACGCCAGTGCTTTTCCT-3'; R:5'-TCTCCCAACCCACCCTCAAG-3'	60	120

表 2 鼻咽癌与鼻咽炎 5 个基因 MeDIP–chip 结果

Tab.2 MeDIP–chip results of nasopharyngeal carcinoma and five genes of nasopharyngitis						
基因	样本 (<i>n</i>)	ADAM23 (Ct)	MIMT1 (Ct)	FAM150B (Ct)	GRIN2A (Ct)	LRRC4 (Ct)
鼻咽癌	12	29.55 ± 3.55	27.51 ± 1.14	29.56 ± 1.39	27.88 ± 0.55	29.78 ± 4.88
鼻咽炎	10	40.00 ± 0.00	38.03 ± 1.71	37.09 ± 3.18	35.39 ± 3.97	40.00 ± 0.00
<i>t</i> 值		9.27	17.25	7.43	6.50	6.60
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 3 鼻咽癌与鼻咽炎 5 个基因非 MeDIP 实验(对照)结果

Tab.3 Non MeDIP experiment (control) results of nasopharyngeal carcinoma and five genes of nasopharyngitis						
基因	样本 (<i>n</i>)	ADAM23 (Ct)	MIMT1 (Ct)	FAM150B (Ct)	GRIN2A (Ct)	LRRC4 (Ct)
鼻咽癌	12	25.73 ± 0.59	25.45 ± 0.33	26.79 ± 0.41	26.08 ± 1.70	25.42 ± 1.16
鼻咽炎	10	26.08 ± 0.86	25.66 ± 0.55	27.08 ± 0.80	26.89 ± 0.87	25.44 ± 0.83
<i>t</i> 值		1.13	1.09	1.08	1.36	0.04
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

表 4 鼻咽癌与鼻咽炎 5 个基因实时荧光定量校正值比较

Tab.4 Real–time fluorescence quantitative correction values of nasopharyngeal carcinoma and five genes nasopharyngitis						
基因	样本 (<i>n</i>)	ADAM23	MIMT1	FAM150B	GRIN2A	LRRC4
鼻咽癌	12	3.39 ± 2.28	6.03 ± 3.93	3.68 ± 1.81	7.12 ± 3.17	3.10 ± 1.94
鼻咽炎	10	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.25 ± 0.49	0.20 ± 0.20	0.00 ± 0.00
<i>t</i> 值		4.69	4.80	5.8	6.86	5.04
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨 论

DNA 甲基化是指在甲基转移酶的催化下,DNA 2 个核苷酸的胞嘧啶被选择性地添加甲基,形成 5–甲基胞嘧啶。DNA 甲基化主要发生在 CpG 二核苷酸,CpG 二核苷酸序列重复出现的区域被称为 CpG 岛,通常 CpG 岛位于这些基因上游调控区的启动子中,正常情况下,这些启动子区的 CpG 岛由于被保护大都处于非甲基化状态,DNA 的甲基化可引起基因的失活,启动子区 CpG 岛的异常高甲基化是抑癌基因失活的重要机制,因此 DNA 甲基化目前成为肿瘤研究的热点之一^[2]。前期选择鼻咽癌癌变前后 3 例患者通过基因芯片筛查发现,无论在 CpG 岛还是启动子区基因均存在着明显的甲基化倾向,本项目在扩大的鼻咽癌样本通过实时荧光定量 PCR 检测 5 个代表性基因的甲基化情况,证实了其在鼻咽癌癌变的高表达情况。

实时荧光定量 PCR 技术是在 PCR 反应体系中加入荧光试剂,利用荧光信号积累实时检测 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。MeDIP–qPCR 技术为先通过特异识别 5–甲基胞嘧啶的抗体免疫沉淀 DNA 技术 (MeDIP) 富集到甲基

化的 DNA 片段,再利用实时荧光 PCR 技术进行检测,经过数据分析处理得到检测的生物样品中特定位点的甲基化水平的精确数值。此技术优点为:高特异性,针对感兴趣的基因启动子或 CpG 岛设计实时定量 PCR 引物;可以进行高通量检测,不需要标记探针,精确度高,重复性好,灵敏度高,实现了完美结合 MeDIP 技术和实时荧光定量 PCR 技术。

ADAM23,即属于 ADAM 家族成员,是一种跨膜糖蛋白,基因号:8745,定位于 2q33。它主要介导细胞间及细胞基质间的黏附融合,其功能受抑会加速肿瘤细胞的生长和迁移,被认定为一种抑癌基因,该基因失活机制与其启动子区 CpG 岛甲基化修饰异常高度相关,其表达缺失与肺癌、头颈癌、结直肠癌等^[3–5]多种恶性肿瘤有密切关系。GRIN2A 基因,基因号:2903,定位于 16p13.2。Wei 等^[6]发现,此基因的突变与黑素瘤有关。胶质瘤抑癌基因 LRRC4,即基因号:64101,定位于 7q31.3。多项研究^[7]显示此基因在恶性胶质瘤细胞中表达缺失,并可能成为恶性胶质瘤的预后及治疗指标^[8]。这些研究显示,ADAM23、GRIN2A 及 LRRC4 3 基因低表达或缺失与肿瘤关系密切,本课题研究发现,此 3 个基因在鼻咽癌癌变后发生了明显的甲基化,提示其低表达亦可能为

肿瘤发病机制与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000048

转铁蛋白修饰共载紫杉醇和金雀异黄素脂质体抑制卵巢癌株和荷瘤裸鼠肿瘤的生长

胡琢瑛, 唐良药, 楼 梦, 李克花

(重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016)

【摘要】目的:制备转铁蛋白修饰共载紫杉醇(paclitaxel, PTX)和金雀异黄素(genistein, Gen)脂质体(liposome, LP), 并对其 A2780 细胞及对荷瘤裸鼠的治疗效果进行初步评价。**方法:**采用薄膜分散法制备普通载药 LP, 后采用插入法制备转铁蛋白修饰载药 LP。考察 LP 的粒径, 电位以及包封率; 通过细胞摄取实验考察卵巢癌细胞对普通 LP 和转铁蛋白修饰脂质体(transferrin conjugated liposome, TFLP)的摄取效率。MTT 实验考察不同 LP 对耐药卵巢癌细胞的细胞毒性; 构建卵巢癌细胞肿瘤球模型, 考察不同 LP 对肿瘤球的穿透能力以及不同载药 LP 对肿瘤球的生长抑制能力。构建卵巢癌裸鼠异位模型, 考察不同载药 LP 对肿瘤生长抑制效果。**结果:**TFLP-PTX/Gen 的粒径在 (115.0 ± 9.5) nm, 电位为 (-4.00 ± 2.15) mV, PTX 与 Gen 的包封率分别为 83.4% 和 79.6%。细胞摄取实验结果显示, A2780 细胞对 TFLP 的摄取效率是 LP 的 2.8 倍; MTT 实验表明 TFLP-PTX/Gen 对耐药卵巢癌细胞的毒性显著强于 TFLP-PTX、TFLP-Gen 和 LP-PTX/Gen; 肿瘤球抑制实验和荷瘤裸鼠肿瘤生长抑制实验结果都表明 TFLP-PTX/Gen 具有良好的抗肿瘤效果。**结论:**转铁蛋白修饰共载 PTX 和 Gen LP 具有良好的卵巢癌细胞靶向性和抗卵巢癌作用, 是一种潜在的卵巢癌靶向给药系统。

【关键词】转铁蛋白; 紫杉醇; 金雀异黄素; 脂质体**【中图分类号】**R737.31**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-09-03

作者介绍: 胡琢瑛, Email: huzhuoying@sina.com,

研究方向: 妇科肿瘤。

基金项目: 重庆市卫生局医学科研项目 (编号: 2012-2-015)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000048.html>

鼻咽癌变重要机制之一。

MIMT1 基因, 基因号: 100073347, 定位于 19q13.43, 它是一个比较保守的与种族进化有关的基因^[9]。FAM150B 基因, 基因号: 285016, 定位于 2p25.3。目前有关此 2 基因与肿瘤关系的研究比较少, 本课题发现, 此 2 基因亦在鼻咽癌癌变后发生了明显的甲基化, 提示其低表达亦可能为鼻咽癌变重要机制之一。

通过基因芯片及荧光定量 PCR 证实, ADAM23、MIMT1、FAM150B、GRIN2A、LRRC4 5 个基因在鼻咽癌发病前后发生了明显甲基化变化, 这仅是 RNA 表达层面的研究, 今后实验宜扩大样本, 从蛋白表达层面进一步验证。

参 考 文 献

[1] 周小军, 陈江华, 王士贞, 等. 鼻咽上皮细胞癌变与 DNA 甲基化特征的相关性研究[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2013, 21(1): 22-26.

[2] Esteller M, Corn PG, Baylin SB, et al. A gene hypermethylation profile of human cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61: 3225-3229.

[3] 胡春燕, 周建华, 邓征浩, 等. ADAM23、 $\alpha v \beta 3$ 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2010, 26(4): 433-437.

[4] Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, et al. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2007, 173: 31-37.

[5] 王夫景, 张 强, 于洪亮, 等. ADAM23 基因在结直肠癌中的表达及其意义[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(30): 3406-3409.

[6] Wei X, Walia V, Lin JC, et al. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma[J]. Nat Genet, 2011, 43(5): 442-446.

[7] 武明花, 李小玲, 黄 琛, 等. LRRC4 基因在脑胶质瘤细胞系中表达缺失[J]. 中南大学学报(医学版), 2007, 32(2): 231-234.

[8] Tang H, Wang Z, Liu X, et al. LRRC4 inhibits glioma cell growth and invasion through a miR-185-dependent pathway[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2012, 12(8): 1032-1042.

[9] Kim J, Bergmann A, Choo JH, et al. Genomic organization and imprinting of the Peg3 domain in bovine[J]. Genomics, 2007, 90(1): 85-92.

(责任编辑: 关蕴良)