

• 论 著 •

黑色素瘤抗原基因 MAGE-A3 5'端 CpG 岛异常甲基化检测

毛 恺¹, 丁肖华², 邱 耕³, 叶松山³, 杨晓菲³, 何蕴韶^{3△}

(1. 河南省新乡市中心医院胸瘤二科 453000; 2. 新乡医学院三全学院检验系, 河南新乡 453003; 3. 中山大学达安基因科研部, 广州 510080)

摘 要:目的 研究黑色素瘤抗原基因 MAGE-A3 5'端 CpG 岛异常甲基化状态, 探讨其作为肝细胞肝癌(HCC)肿瘤标志物的可行性。方法 利用重亚硫酸盐测序聚合酶链反应(BSP)分析 HCC 细胞株 HepG2 和健康对照者来源白细胞基因组中 MAGE-A3 基因 5'端 CpG 岛异常甲基化状态, 寻找 HCC 细胞 MAGE-A3 5'端 CpG 岛去甲基化位点。结果 HepG2 细胞和健康对照者来源白细胞基因组 MAGE-A3 5'端 CpG 岛存在不同的甲基化状态, 前者存在特异性去甲基化位点。结论 MAGE-A3 5'端 CpG 岛去甲基化位点的检测可用于 HCC 的早期诊断。

关键词:肿瘤; 肝细胞; 去甲基化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.12.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)12-1294-03

The 5'CpG island methylation patterns of melanoma antigen gene MAGE-A3

Mao Kai¹, Ding Xiaohua², Qiu Geng³, Ye Songshan³, Yang Xiaofei³, He Yunshao^{3△}

(1. The Central Hospital of Xinxiang, He'nan 453000, China; 2. SAN QUAN Medical College, Xinxiang He'nan 453003, China; 3. Department of Anatomy, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective To study the 5'CpG island methylation patterns of melanoma antigen gene MAGE-A3, and relative application as tumor marker of hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** BSP was used for the detection of the methylation /demethylation status of CpG site among the 5'CpG island of MAGE-A3 in genomic DNA from HepG2 cells and white blood cells(WBC) of healthy controls to identify the HCC cells specific demethylation sites of CpG islands. **Results** Several CpG sites in MAGE-A3 promoters were found with different methylation patterns in HCC cells, as compared to those in WBC of healthy controls, and demethylation patterns of CpG island specific for HepG2 cells were indentified. **Conclusion** Demethylation pattern of MAGE-A3 5'CpG islands could be used as tumor marker for the early diagnosis of HCC.

Key words: neoplasms; hepatocytes; demethylation

DNA 甲基化是表观遗传学三个组成部分之一, 其在肿瘤领域的研究最为深入^[1-2]。表观遗传学研究表明, 肿瘤的形成往往伴随着多种抑癌基因启动子区域 CpG 岛的异常甲基化修饰^[3]。CpG 岛特定位点甲基化与否, 或者几个这样的位点构成的甲基化模式的组合成为肿瘤细胞的标志物。肿瘤细胞与 DNA 甲基化之间的联系提示 DNA 甲基化标志物将为肿瘤相关研究提供全新的领域, 因为 DNA 甲基化标志物相对于 DNA 突变、RNA 以及蛋白质等其他分子标志具有独特的优越性^[4]。

黑色素瘤抗原(melanoma antigen, MAGE)家族 DNA 编码序列位于 X 染色体长臂末端(Xq28), 由至少 12 个基因成员组成。MAGE-A3 作为 MAGE 家族成员之一, 在肝癌组织中呈特异性高表达, 而单纯肝硬化和正常肝组织中不表达, 而 MAGE-A3 编码基因的表达主要受 5'端 CpG 岛甲基化/去甲基化的调控^[5], 从而使 MAGE-A3 编码基因 5'端的甲基化模式可能成为肝细胞肝癌(简称肝癌)早期诊断的肿瘤标志物。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂 肝癌细胞株 HepG2 由中山大学附属二院感染科提供; QIAmp Blood Mini kit DNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司; 克隆载体 PMD18-T、琼脂糖购自宝生物工程(大连)有限公司; Taq DNA 聚合酶、大肠杆菌 DH5 α 和 100 bp DNA 分子标记 D505A 购自和康生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 运用 DNA 提取试剂盒抽提健康人外周血白细胞基因组 DNA, HepG2 细胞 DNA 的提取采用中山

大学达安基因有限公司生产的 DNA 提取试剂盒。操作过程严格按说明书所述。

1.2.2 MAGE-A3 甲基化状态分析 (1)MAGE-A3 甲基化位点的分析及重亚硫酸盐测序聚合酶链反应(bisulfite-sequencing polymerase chain reaction, BSP)引物的确定: 以在线分析(<http://www.urogene.org/methprimer/>)的方式, 对 MAGE-A3 编码基因转录起始位点前后 1.5 kb, 共 3 kb 的 DNA 序列进行甲基化岛分析。结合文献报道的主要启动子区域甲基化改变状况设计 BSP 引物。引物序列如下, 上游引物(F): 5'-ATT TAG GTA GAA TTT AGT TTT ATT TTT GT-3'; 下游引物(R): 5'-CAT TAA ACT CTA TCC CCA AAA TTC C-3'。(2)DNA 甲基化修饰: 采用经典亚硫酸氢钠法进行 DNA 修饰^[6]。

1.2.3 甲基化/去甲基化阳性模板制备 对来源于 HepG2 细胞及健康对照白细胞的基因组用 BSP 进行分析。BSP 扩增反应在 50 μ L 体系中进行, 包括: 修饰后的 DNA 模板 4 μ L, 10 \times Taq DNA 聚合酶缓冲液 5 μ L, 200 μ mol/L dNTP 1 μ L, 100 nmol/L 引物各 1 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 6 μ L, 1 U/ μ L TaqDNA 聚合酶 2 μ L, 灭菌去离子水 30 μ L。采用降落聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR): 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 退火温度从 62 $^{\circ}$ C 降落至 53 $^{\circ}$ C, 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s(每一退火温度循环 2 次); 再于退火温度 52 $^{\circ}$ C 循环 40 次; 72 $^{\circ}$ C 7 min。用含溴化乙锭的 1.7% 琼脂糖凝胶中电泳扩增产物。用胶回收试剂盒回收、纯化 MAGE-3 目的片段, 并与 PMD18-T 连接, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α 。根据氨苄青霉素抗性试验筛选出阳

\triangle 通讯作者, E-mail: xhding5@163.com。

性克隆,并以 PCR 反应进行初步鉴定。阳性菌液送上海生物工程有 限公司进行测序。

2 结 果

2.1 MAGE-A3 基因 5'端 CpG 岛及 CpG 位点在线分析结果 见图 1。

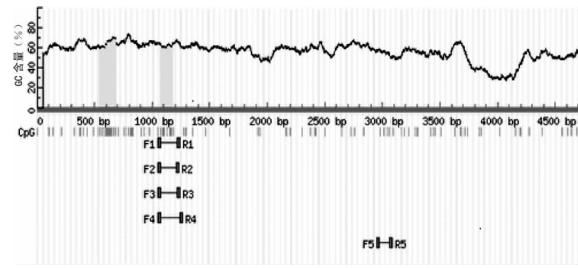
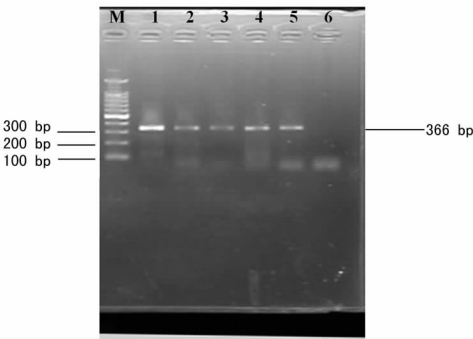


图 1 在线分析 MAGE-A3 基因中 CpG 岛及 CpG 位点分析图

2.2 BSP 扩增目的片段电泳结果 见图 2。



M:DNA 分子标记;1~5:BSP 扩增目的片段;6:阴性对照。

图 2 BSP 扩增目的片段电泳图

2.3 BSP 测序结果 HepG2 细胞 MAGE-A3 编码基因 5'端 CpG 岛目的序列测序结果为:ATT TAG GTA GAA TTT AGT TTT ATT TTT GTT TGG AAT TTA GGG TAG TAT TGT TGT TAG GAT GTG ATG TTA TTG ATT TGT GTA TTG GAG GTT AGA AGA TTG TGA GAT TTT TGT TTT GAG TAA TAA GTG ATG GTT TGA TGT TGG TGG AGG GAA GTT GGT TTA GGT TTG GTG AGG AGG TAA GGT AAG ATG TTG AGG GAG GAT TGA GGT GGG TTT TAT TTT AGA TAG AGG GTT TTA AAT AAT TTA GTG TTG TTT TTG TTG TTG GGT TTG GGT TAT TTT GTA GGG GAA GAT TTT TAG GTT GGG TTG TTA TTA TTT TAT TTT GTT GAT TTT TGT TGT TTT AGT TAT GGG GAA TTT TGG GGA TAG AGT TTA ATG。健康人外周血白细胞 MAGE-A3 编码基因 5'端 CpG 岛目的序列测序结果为:TAT TTA GGT AAA TTT AGT TTT ATT TTT GTT CGG AAT TTA GGG TAG TAT CGT TGT TAG GAT GTG ACG TTA TTG ATT TGC GTA TTG GAG GTC AGA AGA TCG CGA GAT TTT CGT TTT GAG TAA CGA GCG ACG GTT TGA CGT CGG CGG AGG GAA GTC GGT TTA GG1 CTC GGT GAG GAG G2C AAG GTA AGA CGT TGA GGG AGG ATT GAG GCG GGT TTT ATT TTA GAT AGA GGG TTT TAA ATA ATT TAG TGT TGT TTT TGT TGT CGG GTT TGG GTT ATT TCG TAG GGG AAG ATT TTT AGG TTG GGT CGT TAT TAT TTT ATT TCG TCG ATT TTC GTC GTT TTA GTT ACG GGG AAT TTT GGG GAT AGA GTT

TAA TG。

3 讨 论

表观遗传学相关研究表明,DNA 甲基化、组蛋白去乙酰化和 RNA 介导是导致基因沉默的三大主要原因。DNA 甲基化是指生物体在 DNA 甲基转移酶的催化下,以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,将甲基转移至特定碱基的过程^[7]。高等真核细胞通常是对 DNA 分子上 5'-CpG-3'序列的胞嘧啶进行甲基化修饰。5-甲基胞嘧啶占有核苷酸碱基的 0.75%~1%,大约 70%~80%的 5-甲基胞嘧啶存在于 CpG 序列中,CpG 二核苷酸集中的区域称之为 CpG 岛。CpG 岛一般含有几百至一千个碱基,通常位于基因的 5'端启动区,也可延伸至基因的外显子区。许多研究显示,启动子 CpG 的高甲基化与基因的转录抑制有关,与启动子相关的 CpG 岛的高甲基化能导致基因表达丢失和基因沉默^[8]。

MAGE 家族由至少 12 个基因成员组成,它们只在肿瘤中表达,正常组织(除睾丸和胎盘)均不表达^[9-10]。MAGE-A 的表达特异性受其启动子区 CpG 岛的甲基化/去甲基化机制调控^[11]。MAGE-A3 在肝癌组织中的表达率是 70%,在癌旁组织中没有表达,且 MAGE-A3 的表达与平均年龄相关,证明 MAGE-A3 的组织特异性^[12]。也有研究显示,MAGE-A3 在肝硬变和正常肝活检组织中不表达,只有个别原发性肝癌癌旁组织标本可检出 MAGE-A3 mRNA^[5]。这进一步证实 MAGE-A3 具有组织特异性。

本研究利用 BSP 对基因组 DNA 进行测序,从而分析 MAGE-A3 编码基因 5'端 CpG 岛的去甲基化状态。其原理为:单链 DNA 在 HSO₃⁻的作用下将 C 转变成 U,而 m5C 则保持不变,随后对靶序列进行 PCR 扩增、克隆和测序,此时所有的 U 和 T 残基均可被测定。由于 HSO₃⁻使 DNA 中未甲基化的 C 转变成 U,而甲基化的 C 保持不变,这种甲基化与非甲基化的差异,其本质为单碱基变异。BSP 的目的在于通过测序确认目的片段中 CpG 位点甲基化状态,因此 BSP 引物不能包含 CpG 位点,从而使扩增过程不受目的片段甲基化修饰状态的影响,通过分析测序结果中的去甲基化位点。这种正常基因组和肿瘤细胞基因组截然不同的表现,为寻找肿瘤细胞特异性 DNA 甲基化标志物提供了方便。

培养的肿瘤细胞株具有试验费用低、重复性好、基因组相对单一等优点,是用来研究肿瘤表观遗传现象的常用模型。Ueki 等^[13]的研究表明,肿瘤细胞株的 CpG 岛异常甲基化现象主要是来源于细胞分离培养时的原位肿瘤组织。但对于抑癌基因而言,肿瘤细胞株的甲基化程度普遍比其来源的原位肿瘤组织高^[14]。本研究之所以选取健康人外周血白细胞作为对照的原因已有报道,因此不再赘述^[15]。笔者认为,从肝癌细胞株中分析得到的 MAGE-A3 编码基因的异常甲基化现象,如果能够在肝癌患者来源的肿瘤组织中得到证实,则说明该甲基化现象可作为能够应用于临床诊断的肿瘤标志。

由本研究结果可以看出,HepG2 细胞 MAGE-A3 编码基因 5'端 CpG 岛的序列和正常基因组 DNA 中对应的 5'端 CpG 岛的序列存在多个碱基位点变异,其实是碱基的突变(C→T)。通过检测这些位点碱基的突变,可实现肝癌的早期诊断。本研究,不同细胞来源的 MAGE-A3 编码基因测序结果显示,甲基化的 C 和未甲基化的 C 通过亚硫酸盐的修饰后甲基化的 C 保持不变,而未甲基化的 C 最终转变成 T。因此,可以针对这些不同变化的碱基序列设计探针,检测 MAGE-A3 启动子区域的甲基化,从而有助于肝癌的诊断^[15]。对肝癌细胞基因组 DNA 的 BSP 产物进行直接测序的过程中存在两个问

题:(1)这些 BSP 产物比普通 PCR 产物更难以测序,一个 BSP 产物常需多次测序才能获得成功;(2)测序结果经常在 CpG 位点部位出现套峰现象。这些表现可能与肿瘤基因组 DNA 的 BSP 产物处于杂合状态有关。

本研究仅针对 HepG2 细胞 MAGE-A3 编码基因 5'端 CpG 岛进行了探讨,采用 BSP 确定了目的片段的异常甲基化位点。针对这些异常甲基化位点,笔者拟设计一系列可用于肝癌早期诊断的探针。当然,这项技术真正应用到临床还有许多方面需要探索,还需要进一步筛查并确定 MAGE-A3 编码基因 5'端 CpG 岛的甲基化图谱,针对其中具有普遍意义的异常甲基化位点建立一套特异的检测方法,并需以大量的临床样本进行验证。

参考文献

[1] Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, et al. Aberrant patterns of DNA methylaiton, chromatin formation and gene expression in cancer[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(7): 687-692.

[2] Esteller M. Epigenetics in cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 358(11): 1148-1159.

[3] Pali SS, Robertson KD. Epigenetic control of tumor suppression [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2007, 17(4): 295-316.

[4] Antonia R, Sepulveda, Jones D, et al. CpG Methylation analysis-current status of clinical assays and potential applications in molecular diagnostics: a report of the association for molecular pathology[J]. J Mol Diagn, 2009, 11(4): 266-278.

[5] 蔡胜利,赵海涛,冷希圣,等. 黑色素瘤抗原-3 基因在肝细胞癌中的研究[J]. 中华外科杂志, 2000, 38(9): 693-696.

[6] Chan MW, Chu ES, To KF, et al. Quantitative detection of meth-

ylated SOCS-1, a tumor suppressor gene, by a modified protocol of quantitative real time methylation-specific PCR using SYBR Green I and its use in early gastric cancer detection[J]. Biotechnol Lett, 2004, 26(16): 1289-1293.

[7] 董林,沈佐君. DNA 甲基化与肿瘤的侵袭和转移[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(2): 132-134.

[8] 赵玉凤,李锦峰,曹玉文,等. 乳腺癌相关基因启动子甲基化的研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2010, 26(3): 350-352.

[9] 马全,武正炎,查小明,等. Mage-A3 抗原肽负载 DC 过继免疫治疗乳腺癌的实验研究[J]. 实用临床医药杂志, 2006, 10(2): 2-4.

[10] Atanackovic D, Altorki NK, Stockert E, et al. Vaccine-induced CD4+ T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients[J]. J Immunol, 2004, 172(5): 3289-3296.

[11] 桑梅香,单保恩,耿翠芝,等. 肿瘤抗原 MAGE-A4 在乳腺癌组织和细胞系中的表达及其作用[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(4): 407-410.

[12] 陈红松,覃柳亮,丛旭,等. 肿瘤特异性肿瘤睾丸抗原在肝癌组织中的表达[J]. 中华肝病杂志, 2003, 11(3): 145-148.

[13] Ueki T, Walter KM, Skinner H, et al. Aberrant CpG island methylation in cancer cell lines arises in the primary cancers from which they were derived[J]. Oncogene, 2002, 21(13): 2114-2117.

[14] Paz MF, Fraga MF, Avila S, et al. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines[J]. Cancer Res, 2003, 63(5): 1114-1121.

[15] Qiu G, Fang J, He Y. 5' CpG island methylation analysis identifies the MAGE-A1 and MAGE-A3 genes as potential markers of HCC [J]. Clin Biochem, 2006, 39(3): 259-266.

(收稿日期:2011-01-10)

(上接第 1293 页)

现假阴性结果。本研究采用玻璃制品作为反应容器,理论上有可能固相激活内源性凝血途径,进而依次激活外源性凝血途径、共同凝血途径、凝血酶和血小板,并最终因纤维蛋白形成而产生混合液凝固的现象,导致假阳性结果^[8-10]。但该凝固过程中,多种凝血因子的激活都依赖于钙离子,在缺乏钙离子时,个别凝血因子即使被激活也不能导致混合液的凝固^[10]。本研究以 3.8%枸橼酸盐抗凝血浆作为反应成分之一,此时血液中的钙离子已与枸橼酸盐形成螯合物,可明显降低血浆中的钙离子浓度^[11-12],使得凝血因子无法被激活,可避免因内源性或外源性凝血途径被激活所导致的混合液凝固,进而避免了由此所导致的假阳性结果。因此,血小板毛细血管交叉配型法中出现的混合液流体阻力增大的现象与凝血途径被激活无关,仅与抗体和血小板间的免疫反应有关。采用血清标本进行血小板毛细血管交叉配型时,因血清中不含纤维蛋白原,因此,可排除因凝血因子或血小板被激活而形成纤维蛋白对检测结果的影响。如果血制品标本不合格,理论上也有可能因标本自凝而出现假阳性结果,因此确保血制品质量十分重要。受标本量的限制,笔者未能以对血小板毛细血管交叉配型法进行大量重复性研究,因此虽然本次试验中血小板毛细血管交叉配型法与 MGT 的检测结果完全相符,但尚可能存在未能发现的问题。本项研究仅能为广大同行提供新的研究思路和试验探讨,望广大同行能够针对该方法的应用进行相关试验研究、结果统计和分析,以期临床提供更为科学、有效的配型方提供参考意见。

参考文献

[1] Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, et al. Nomenclature of

human platelet antigens[J]. Vox Sang, 2003, 85(3): 240-245.

[2] 蒋灵霓. 成分输血的组成、储存及临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 846-848.

[3] 高加良,周琼秀,丁显平. 血小板配型在临床血小板输注无效中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(12): 1152, F3.

[4] 赵惠彦. 血小板配型的现状及研究进展[J]. 现代保健:医学创新研究, 2008, 5(6): 26.

[5] 李勇,张利身. 血小板配型:微柱凝胶免疫检测[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(4): 227.

[6] 李执如,廉维,宿兰. 血小板抗原多态性和配型输注[J]. 现代临床医学, 2007, 33(2): 143-145.

[7] 陈志新,陈建森. SYSMEX XE-2100 血液分析仪激光散射法计数血小板的可靠性评价[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(5): 518-519.

[8] 鞠萍,张茂海. 不同检测系统测定纤维蛋白原结果的可比性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 195, 198.

[9] 孙振华,孔红,肖琪. 浅谈凝血四项检测的质量控制[J]. 医学信息, 2011, 24(2): 469-470.

[10] 张鑫,沈志滨. 凝血酶激活的纤溶抑制物的临床应用进展[J]. 重庆医学, 2010, 39(23): 3276-3278.

[11] 韩德智,张建荣,石小霞,等. 影响离子钙检测因素的研究[J]. 中国误诊学杂志, 2001, 1(5): 666-667.

[12] 曾平,刘虹,刘运双. 真空采血管内添加物对常见生化项目测定结果的影响[J]. 四川医学, 2010, 31(7): 993-995.

(收稿日期:2010-11-26)