

## ALX4 基因在肿瘤中的甲基化与表达

杜兴华<sup>1,2)</sup>, 刘文斌<sup>1)</sup>, 韩飞<sup>1)</sup>, 姜晓<sup>1)</sup>, 刘晋祎<sup>1)</sup>

(1) 第三军医大学军事预防医学院毒理学研究所, 重庆 400038; 2) 云南省中西医结合医院检验科, 云南昆明 650224)

**[摘要]** **目的** 分析 ALX4 基因在肺正常组织、肺癌组织以及多种肿瘤细胞中的甲基化发生情况以及 ALX4 基因甲基化对其表达的影响。 **方法** 采用 MSP 方法检测正常组织和肺癌组织以及肿瘤细胞株中 ALX4 基因甲基化发生情况; 使用去甲基化药物 5-aza-dC 处理肿瘤细胞后, 采用 RT-PCR 法检测 ALX4 基因 mRNA 的表达水平。 **结果** 正常组织中的 ALX4 基因甲基化发生率为 0% (0/10), 肺癌组织中 ALX4 基因甲基化发生率为 55% (11/20); 不同组织来源的肿瘤细胞株甲基化分析显示, ALX4 甲基化发生率为 100% (8/8); 发生甲基化的肿瘤细胞株中 ALX4 基因表达均缺失; 去甲基化药物处理后 ALX4 基因 mRNA 表达均明显升高。 **结论** ALX4 基因在肺癌及不同来源肿瘤细胞中均有高甲基发生, 其甲基化抑制该基因的表达, 提示 ALX4 基因甲基化可能在肺癌的发生过程中起到重要的作用。

**[关键词]** ALX4 基因; 肺癌; DNA 甲基化

**[中图分类号]** R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 04 - 0028 - 04

## DNA Methylation and Expression of ALX4 Gene in Cancer

DU Xing-hua<sup>1,2)</sup>, LIU Wen-bin<sup>1)</sup>, HAN Fei<sup>1)</sup>, JIANG Xiao<sup>1)</sup>, LIU Jin-yi<sup>1)</sup>

(1) Toxicology Institute, School of Military Preventive Medicine, The Third Military Medical University, Chongqing 400038; 2) Dept. of Laboratory Medicine, Yunnan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Kunming Yunnan 650224, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the DNA methylation and expression of ALX4 gene in normal tissue, tumor tissue form lung cancer and cancer cell lines. **Methods** The MSP (methylation specific PCR) was used to detect the DNA methylation of ALX4 gene. The RT-PCR was used to analyze the expression of ALX4 gene in 5-aza-dC-treated tumor cells. **Results** The hypermethylation of ALX4 was detected in lung cancer tissues (55%, 11/20), but not in normal tissues (0%, 0/10). In 8 cancer cell lines, ALX4 showed hypermethylation and its expression decreased. The expression of ALX4 gene was missed in cancer cell lines with methylation. After treatment with demethylation drug, the expression of ALX4 gene was increased in these cell lines. **Conclusion** ALX4 shows hypermethylation in lung cancer and cancer cell lines and the methylation inhibits its gene expression, suggesting that ALX4 gene may play an important role in lung cancer.

**[Key words]** ALX4 gene; Lung cancer; DNA Methylation

肺癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率在全世界的肿瘤性疾病中均排名第一位<sup>[1]</sup>。随着我国人口老龄化和城镇工业化进程的加快以及人类生活环境的污染和破坏, 特别是吸烟

人口的不断增加, 在以后的时间里, 我国肺癌的发病率和死亡率还将持续攀升。从国内外目前的研究进展看, 研究肺癌的发生机制, 寻找好的生物标志物用于肺癌的早期诊断, 对于预防肺癌以及提高肺

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81202238); 重庆市自然科学基金资助项目 (cstc2011jjA10098); 第三军医大学校管课题资助项目 (2011XQN07)

**[作者简介]** 杜兴华 (1973~), 男, 云南永胜县人, 医学学士, 在职硕士研究生, 主管检验师, 主要从事临床检验工作。

**[通讯作者]** 刘晋祎. E-mail:center\_toxic\_tmmu@163.com

癌病人的生存率具有重要意义。

表观遗传学是目前肿瘤研究领域的热点之一<sup>[2,3]</sup>。作为表观遗传学修饰的主要形式, DNA 甲基化在肿瘤发生发展过程中发挥着重要作用, 也是目前最明确的肿瘤表观遗传学机制。我们前期利用全基因组差异甲基化分析发现, ALX4 基因在肺癌组织中高甲基化, 本研究采用甲基化特异性 PCR (MSP) 法分别检测了正常组织、肺癌组织、肿瘤细胞株中 ALX4 基因甲基化的变化情况, 进一步明确该基因甲基化在肺癌发生中是否具有广泛性; 同时分析其甲基化与表达调控的关系, 为进一步分析该基因的功能提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床标本和细胞来源

肺癌肿瘤组织来源于第三军医大学附属医院手术切除肺癌患者组织, 全部标本均经病理证实; 距离肿瘤边缘 5 cm 外组织作为正常对照, 所有标本的采集均经患者知情同意及医院伦理委员会批准同意, 取材后立即置于液氮中速冻后置 -80℃ 冰箱保存。

肿瘤细胞株从中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心购买, 包括肺癌细胞株 A549 和 H446, 胃癌细胞株 SGC7901, 乳腺癌细胞株 MCF7, 结肠癌细胞株 HCT116 和 SW480, 肝癌细胞株 HepG2, 宫颈癌细胞株 HeLa。

### 1.2 DNA 甲基化分析

按照文献描述的甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 方法<sup>[4]</sup>。原理即 DNA 双链变性解链后在亚硫酸氢钠作用下未发生甲基化的胞嘧啶 (C) 转化为尿嘧啶 (U), 而已发生甲基化的胞嘧啶 (C) 则不变。采用 MSP 对各组织和细胞标本进行 ALX4 基因甲基化分析。具体步骤如下: (1) DNA 提取和处理: 采用 Promega 公司 Wizard Genomic DNA Purification Kit 提取试剂盒提取组织和细胞标本 DNA, 产物经琼脂糖凝胶电泳验证后放置于 -20℃ 保存。修饰应用 EZ DNA Methylation-Gold Kit 试剂盒, 按照说明书进行, 经过 DNA 亚硫酸氢盐转变后回收产物用于后续 PCR 扩增; (2) 引物设计和合成: 根据启动子区在线引物设计软件 MethPrimer 设计 MSP 引物, 分别包括甲基化引物 (M) 和非甲基化引物 (U), 甲基化引物, 上游引物: 5'- GTTAGGTATGAATGTTGAG-ATTTGC -3'; 下游引物: 5'- GAATCCCTATACT-TTAACGACGAC -3', 产物长度为 178 bp (退火温

度 55℃)。非甲基化引物, 上游引物: 5'- TAGG -TATGAATGTTGAGATTTGTGT-3', 下游引物: 5'- CAAATCCCTATACTTTAACAACAAC-3', 产物长度为 177 bp (退火温度 54℃)。 (3) PCR 反应条件反应体系 25  $\mu$ L, 修饰后的基因组 DNA 1  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.4  $\mu$ L, 10 mM dNTP 0.5  $\mu$ L, Taq 酶 (5U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L, 双蒸水 18.3  $\mu$ L。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 40 s, 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 72  $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。以甲基转移酶 Sss I 处理和未处理的正常人外周血细胞 DNA 作为阳性对照和阴性对照, 以双蒸水作为空白对照。取 PCR 产物 10  $\mu$ L, 3% 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭 0.5 mg/mL) 中, 以 150 V 进行恒压电泳 30 min, 电泳结束后, 在紫外灯下直接判读结果。每一个样品 PCR 反应均重复两次。应用甲基化引物出现扩增产物者表明存在 DNA 甲基化, 应用非甲基化引物出现扩增产物者即为不存在 DNA 甲基化, 若同时出现扩增产物则考虑存在部分 DNA 甲基化。选取部分甲基化和未甲基化产物, 切胶回收, 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

### 1.3 去甲基化试剂 5-氮-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC)

细胞培养用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 在 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度下孵育培养。将对数生长期的肿瘤细胞以适宜密度接种, 24 h 后加入去甲基化试剂 5-aza-dC 终浓度为 10  $\mu$ M, 24 h 后弃去药液并重新更换含药液的新鲜培养液, 浓度同前, 连续作用 3 d, 以同体积的不含药液的 DMSO 处理的细胞作为对照组。分别收集上述培养细胞, Trizol 试剂一步法提取总 RNA, -80  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.4 mRNA 表达分析

以 1  $\mu$ g 的 RNA 作为模板进行反转录合成 cDNA; 然后进行 PCR 扩增, 以  $\beta$ -actin 作为内参; 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 凝胶成像分析系统扫描分析。实验重复 3 次。

### 1.5 统计学处理

应用 SPSS 统计软件行甲基化率统计学分析, 采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ALX4 基因在正常和肺癌肿瘤组织中甲基化分析

采用 MSP 对正常和肿瘤组织中 ALX4 基因甲基化发生情况进行了分析, 结果发现: 在 10 例正

常组织中均没有发生甲基化, ALX4 基因甲基化发生率为 0%, 而在 20 例肺癌组织中有 11 例发生了甲基化, 甲基化发生率为 55%. 正常组织和肺癌组织中 ALX4 基因的甲基化发生率具有显著的统计学差异 ( $P < 0.05$ ). MSP 产物典型电泳图见图 1. 为了进一步确定 MSP 实验结果, 对部分样品 PCR 产物进行了测序, 结果见图 2. 测序结果与 MSP 电泳结果一致.

### 2.2 ALX4 基因在肿瘤细胞株中甲基化分析

采用 MSP 方法对一系列肿瘤细胞株中 ALX4 基因的甲基化情况进行了分析, 结果发现: 8 种肿瘤细胞株均发生了甲基化, 其中胃癌细胞株 SGC7901、乳腺癌细胞株 MCF7、结肠癌细胞株 HCT116 和宫颈癌细胞株 HeLa 呈完全甲基化状态,

而肺癌细胞株 A549 和 H446、肝癌细胞株 HepG2、结肠癌细胞株 SW480 呈部分甲基化状态见图 3. 结果表明 ALX4 基因在肿瘤细胞中有很高的甲基化发生率.

### 2.3 去甲基化药物处理细胞前后 ALX4 基因的表达分析

为明确 ALX4 基因甲基化是否调控其基因表达, 笔者进行了去甲基化药物处理实验. 实验结果显示; 发生了甲基化的 5 例肿瘤细胞株 MCF7、HepG、HCT116、Hela、H446 中 ALX4 基因表达均缺失, 去甲基化药物处理后 ALX4 基因 mRNA 表达均明显升高 (图 4), 提示 DNA 高甲基化导致该基因在肿瘤中的表达沉默.

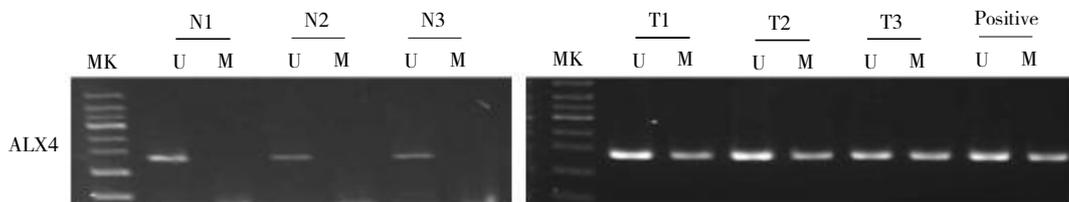


图 1 ALX4 基因在正常和肿瘤组织中甲基化分析典型电泳图

Fig. 1 The typical electropherogram of ALX4 gene methylation in normal and tumor tissue

MK: 分子量标准; U:非甲基化产物; M:甲基化产物; N: 正常组织; T: 肿瘤组织; Positive: 阳性对照.

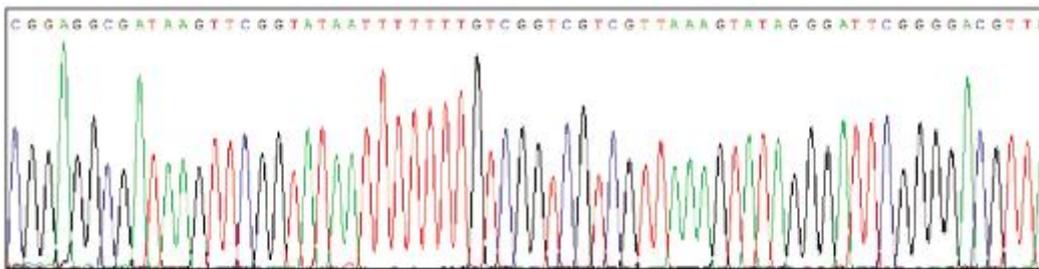


图 2 ALX4 基因甲基化产物测序图

Fig. 2 The sequence figure of ALX4 gene methylation products

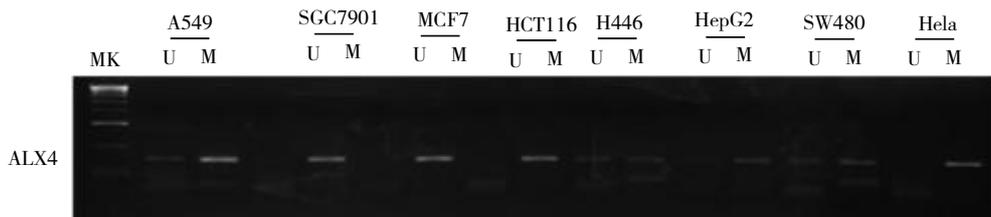


图 3 ALX4 基因在肿瘤细胞株中的甲基化情况

Fig. 3 ALX4 gene methylation in tumor cell lines

MK:分子量标准; U:非甲基化产物; M:甲基化产物.

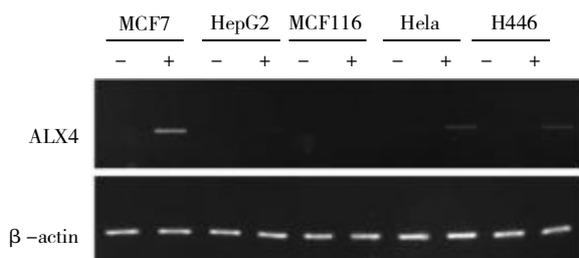


图4 去甲基化药物处理前后 ALX 基因表达情况

Fig. 4 The ALX gene expression after demethylation with drug treatment

MK: 分子量标准; U: 非甲基化产物; M: 甲基化产物; 对照 (DMSO) 处理 +: 去甲基化药物处理 (-) .

### 3 讨论

随着人类基因组计划的完成, 功能基因组学的研究已经成为生命科学的核心. 已有研究表明, 基因表达模式由表观遗传学决定: 即由 RNA 干扰、DNA 甲基化、组蛋白密码、基因印迹等高层次的基因组信息决定<sup>[9]</sup>. 在高等真核生物中, DNA 甲基化广泛地参与了基因的表达调控、胚胎发育、基因组印迹和 X 染色体灭活等生命活动, 是目前最明确的肿瘤表观遗传学机制, 同时 DNA 甲基化也与细胞分化和增生、衰老、肿瘤以及多种疾病发生有密切关系. 因此, 更深入的了解基因发生异常甲基化的机制, 不但有助于肿瘤的早期诊断, 而且也为肿瘤的防治提供新的思路<sup>[6-8]</sup>.

ALX4 基因是笔者前期新发现的一个在肺癌中高甲基化的基因, 到目前为止, 国内外还未见关于该基因甲基化在肺癌发生机制中的研究报告. 笔者通过肺癌组织中该基因甲基化分析表明, 该基因在肺癌中有较高的甲基化发生率 (55%), 文献检索发现, ALX4 在结直肠癌和乳腺癌组织中也呈现高甲基化<sup>[9,10]</sup>. 笔者进一步分析了不同组织来源的肿瘤细胞中该基因的甲基化发生情况, 结果为来源于胃癌、结直肠癌、乳腺癌等肿瘤细胞中该基因均检测出高甲基化, 这无疑表明该基因甲基化具有广泛性, 可能在肿瘤发生中具有重要功能, 有深入研究的必要.

本研究实验结果表明, 该基因甲基化明显抑

制其表达, 去甲基化处理后基因表达恢复, 说明该基因甲基化与其表达呈负相关. 这表明, 在肺癌以及肿瘤的发生过程中, 该基因通过高甲基化失活, 从而参与肿瘤的发生. 由于在多种肿瘤中该基因均有甲基化失活发生, 推测该基因可能是一个潜在的抑癌基因. 因此, 后续有必要扩大临床标本的量, 进一步分析该基因甲基化与临床病理资料间的关系; 同时分析该基因在肿瘤发生中的作用, 为全面了解 ALX4 基因的生物功能提供资料.

### [参考文献]

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, XU J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5):277 - 300.
- [2] NANSEN H H. Treatment of advanced non-small cell lung cancer[J]. BMJ, 2002, 325(7362):452.
- [3] ESTELLER M. Cancer epigenomics:DNA methylomes and histone-modification maps [J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(4):286 - 298.
- [4] HEMAN J G, GRAFT J R, MYOHANEN S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:9821.
- [5] 薛京伦主编. 表观遗传学-原理、技术与实践[M]. 上海: 科学技术出版社, 2006:6 - 15.
- [6] LEONG K J, WEI W, TANNAHILL L A, et al. Methylation profiling of rectal cancer identifies novel markers of early-stage disease[J]. Br J Surg, 2011, 98(5):724.
- [7] LIU W B, LIU J Y, AO L, et al. Dynamic changes in DNA methylation during multistep rat lung carcinogenesis induced by 3-methylcholanthrene and diethylnitrosamine [J]. Toxicology letters, 2009, 189(1):5 - 13.
- [8] 刘晋祎, 安倩, 张建军, 等. 肺癌病人肿瘤组织DNA高甲基化片段的筛选[J]. 遗传学报, 2004, 31(4):60 - 65.
- [9] CHANG H, MOHABIR N, DONE S, et al. Loss of ALX4 expression in epithelial cells and adjacent stromal cells in breast cancer[J]. J Clin Pathol, 2009, 62(10):908 - 914.
- [10] EBERT M P, MODEL F, MOONEY S, et al. Aristaless-like homeobox-4 gene methylation is a potential marker for colorectal adenocarcinomas [J]. Gastroenterology, 2006, 131(5):1418 - 1430.

(2013-03-11 收稿)