

ANKRD18B 基因在大肠癌中的甲基化与表达

张明谦¹⁾, 刘文斌²⁾, 陈洪强²⁾, 刘晋祎¹⁾

(1) 第三军医大学军事预防医学院毒理研究所, 重庆 400038; 2) 昆明医科大学附属延安医院急救医学科, 云南昆明 650051)

[摘要] **目的** 分析 ANKRD18B 基因在大肠癌组织中的甲基化发生情况及其对其表达的影响. **方法** 采用 MSP (methylation specific) 方法检测癌旁正常组织和大肠癌组织以及大肠癌肿瘤细胞株 ANKRD18B 基因甲基化发生情况; 采用去甲基化药物 5-aza-dC 处理大肠癌肿瘤细胞后, 采用 RT-PCR 法检测 ANKRD18B 基因 mRNA 的表达水平. **结果** 癌旁正常组织中的 ANKRD18B 基因甲基化发生率为 0% (0/20), 大肠癌组织中 ANKRD18B 基因甲基化发生率为 59% (24/41); 去甲基化药物 5-aza-dC 处理大肠癌肿瘤细胞株后 ANKRD18B 基因 mRNA 表达均明显升高. **结论** ANKRD18B 基因在大肠癌中均发生甲基化, 其甲基化的发生抑制该基因的表达. 提示 ANKRD18B 基因甲基化可能在结直肠发生过程中起到重要的作用.

[关键词] ANKRD18B 基因; 大肠癌; DNA 甲基化

[中图分类号] R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 11-0021-04

ANKRD18B Methylation and Expression in Colorectal Cancer

ZHANG Ming-qian¹⁾, LIU Wen-bin²⁾, CHEN Hong-qiang²⁾, LIU Jin-yi¹⁾

(1) Institute of Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; 2) Dept. of Emergency Medicine, Yan'an Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Kunming 650051, China)

[Abstract] **Objective** To analyze ANKRD18B gene methylation and expression in colorectal cancer. **Methods** Methylation specific PCR was used to detect the DNA methylation of ANKRD18B gene. The RT-PCR was used to analyze the expression of ANKRD18B gene in tumor cells with 5-aza-dC-treated treatment. **Results** The hypermethylation of ANKRD18B was detected in colorectal cancer tissues (59%, 24/41) and (0%, 0/20) in normal tissues. ANKRD18B showed hypermethylation and its expression decreased in colon cancer cell line SW480 and HT29. After treatment with demethylation drug, the expression of ANKRD18B gene increased. **Conclusion** ANKRD18B gene hypermethylated, which inhibited the expression of the gene in colorectal cancer. ANKRD18B gene methylation may play an important role in colorectal cancer.

[Key words] ANKRD18B gene; Colorectal cancer; DNA Methylation

大肠癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 在全世界范围内, 大肠癌的发病率男女均处于恶性肿瘤的第 3 位. 在西方发达国家, 大肠癌是仅次于肺癌的第 2 位恶性肿瘤^[1]. 在我国, 随着生活水平的不断提高, 饮食习惯的改变, 大肠癌的发病率呈上升趋势, 排在恶性肿瘤的第 4 位^[2]. 大肠癌好发部位为直肠及直肠与乙状结肠交界处, 占

60%. 发病多在 60~70 岁, 50 岁以下不到 20%. 男女之比为 2:1. 近年来, 国内外对大肠癌进行了深入的研究, 从目前的研究进展来看, 寻找新的生物标志物用于大肠癌的早期诊断, 早期治疗, 对于提高大肠癌患者的生存率有着重要意义.

现有研究表明, DNA 甲基化异常在肿瘤发生、发展过程中发挥着重要作用, 笔者前期利用全基

[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); 第三军医大学校管科研基金资助项目 (2011XQN07)

[作者简介] 张明谦 (1975~), 男, 云南昆明市人, 医学学士, 第三军医大学在职研究生, 副主任医师, 主要从事急诊重症医学、预防医学工作.

[通讯作者] 刘晋祎. E-mail: jinyiliutmmu@163.com

基因组差异甲基化分析发现, ANKRD18B 基因在大肠癌组织中和肿瘤细胞中呈现高甲基化, 本研究才用甲基化特异性 PCR (methylation specific, MSP) 法分别检测了正常组织、大肠癌组织、肿瘤细胞株中 ANKRD18B 基因甲基化的情况, 同时分析了该基因甲基化与表达调控的关系, 为进一步深入研究该基因在生长发育、疾病发生、信号通路等方面的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 临床标本和细胞来源

大肠癌组织来源于昆明医科大学附属延安医院选取 2010 年 10 月至 2013 年 12 月行手术切除大肠癌患者 41 例, 分别采集大肠癌组织标本 41 例。对应癌旁正常结直肠粘膜 20 例 (距离肿瘤边缘 > 5 mm), 标本离体后 2 h 内放置在液氮罐中速冻后放置 -80℃ 保存, 并做成组织石蜡包埋蜡块。全部标本术前均未接受放、化疗, 术后所有标本均经病理明确诊断。所有标本采集均经患者知情同意及医院伦理委员会批准同意。

大肠癌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, 包括结肠癌细胞株 HT29 和 SW480,

1.2 DNA 甲基化分析

采用甲基化特异性 PCR (MSP) 法。其基本原理是基于 DNA 经亚硫酸氢钠处理后, 所有未甲基化的胞嘧啶发生脱氨基变为尿嘧啶, 而甲基化的胞嘧啶则不变。基于这种碱基的改变, 然后设计针对甲基化和非甲基化序列的引物并进行聚合酶链反应 (PCR) 扩增, 最后通过琼脂糖凝胶电泳分析, 确定与引物互补的 DNA 序列的甲基化状态。采用 MSP 对大肠癌组织、正常组织及肿瘤细胞进行 ANKRD18B 基因甲基化分析, 具体步骤如下: (1) DNA 提取和处理: 先采用二甲苯脱蜡法对石蜡包埋组织进行脱蜡处理。然后采用 Promega 公司 Wizard G 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, 严格按照说明书进行, 经 DNA 亚硫酸氢盐修饰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'-CGCATCTTTACTTGCA-AGCGAGCC-3'; 下游引物: 5'-CCGCTTCTTGCC-CCTGTGCTCT-3', 产物长度为 287 bp (退火温度 58℃)。非甲基化引物, 上游引物: 5'-GGCATGGAGGTCCTGTGG-3', 下游引物: 5'-AGAAGCATTGCGGTGG-3', 产物长度为 144bp (退火温度 54℃); (3) PCR 反应条件: 在紫外灯下直接判读结果, 每个样品 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表明不存在 DNA 甲基化, 若同时出现扩增产物则表明存在部分 DNA 甲基化。选取部分 DNA 甲基化和未甲基化产物, 切胶回收, 送上海生物工程技术服务有限公司测序。

1.3 5-杂氮 -2'-脱氧胞苷 (5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC) 去甲基化实验

用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 在 37℃, 5% 二氧化碳, 饱和湿度下孵育培养 ANKRD18B 基因甲基化的大肠癌细胞株, 待细胞生长旺盛 (对数生长期) 时以适宜密度接种, 24 h 后加入去甲基化试剂 5-杂氮 -2'-脱氧胞苷 (5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC) 至终浓度为 10 μM, 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, 以相同体积的不含药液的培养液处理的细胞作对照组。第 4 天收获细胞。Trizol 试剂提取总 RNA, -80℃ 保存备用。

1.4 肿瘤株细胞 mRNA 表达分析

1.4.1 引物设计 根据 Genbank 中的 mRNA 序列采用 Primer Premier 5.0 进行引物设计, 引物序列见表 1。

表 1 引物设计与合成

Tab. 1 The design and synthesis of primers

基因	引物序列	长度(bp)	温度(℃)
ANKRD18B (RT-PCR)	正向: CGCATCTTTACTTGCAAGCGAGGC	287	58
	反向: CCGCTTCTTGCCCTGTGTGCTCT		
β-actin (RT-PCR)	正向: GGCATGGAGTCTCTGTGG	325	58
	反向: AGAAGCATTGCGGTGG		

1.4.2 cDNA 的合成和 RT-PCR 用 1 μg 的 RNA 为模板进行反转录合成 cDNA, 然后进行 PCR 扩增, 以 β -actin 作为内参照; 用 PCR 产物 8 μL 加 5 \times Loading Buffer 2 μL , 取 2% 琼脂糖凝胶电泳电压 120 V, 30 min 溴化乙锭染色, 凝胶成像仪成像并保存结果. 实验重复 3 次.

1.5 统计学处理

应用 SPSS 统计软件对实验结果进行统计学分析, 应用 χ^2 检验和 Fisher's 确切概率法. 分析 ANKRD18B 基因甲基化与各因素的相关性. $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 ANKRD18B 基因在癌旁正常组织和结肠癌组织中的甲基化分析

采用甲基化特异性 PCR (MSP) 法, 笔者对 41 例大肠癌组织及 20 例对应癌旁正常组织进行了 ANKRD18B 基因甲基化情况进行分析, 结果发现: 在 20 例癌旁正常组织中 ANKRD18B 基因均未发生甲基化, 在 41 例大肠癌组织中, ANKRD18B 基因甲基化发生率为 59%. 经统计学分析, 癌旁正常组织和结肠癌组织中 ANKRD18B 基因甲基化发生率有显著统计学差异 ($P < 0.01$). MSP 检测显示有 ANKRD18B 基因甲基化阳性条带, 非甲基化无阳性条带, 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 ANKRD18B 基因在结肠癌细胞株中的甲基化分析

采用甲基化特异性 PCR (MSP) 法, 对 SW480 和 HT29 大肠癌细胞株中 ANKRD18B 基因甲基化发生情况进行了分析, 结果发现: 在 SW480 和 HT29 大肠癌细胞株中 ANKRD18B 基因均不同程度发生了甲基化, 其中 SW480 呈现完全甲基化状态, HT29 呈现部分甲基化状态, 结果表明 ANKRD18B 基因在结肠癌细胞株中也发生高甲基化, 见图 3.

2.3 去甲基化药物 (5-aza-dC) 处理结肠癌细胞株后 ANKRD18B 基因表达情况

经过去甲基化药物 (5-aza-dC) 处理结肠癌细胞株后 ANKRD18B 基因表达均明显升高, 提示 ANKRD18B 基因甲基化调控其基因表达, DNA 高甲基化抑制该基因的表达, 见图 4.

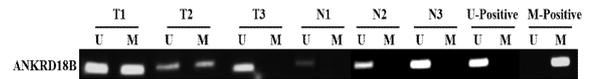


图 1 ANKRD18B 基因在正常和肿瘤组织中甲基化分析典型电泳图

Fig. 1 Typical electropherogram of ANKRD18B methylation in normal and tumor tissue

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.

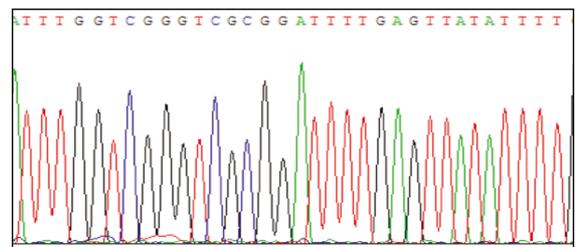


图 2 ANKRD18B 基因甲基化产物测序图

Fig. 2 Sequence of methylated ANKRD18B gene promoter

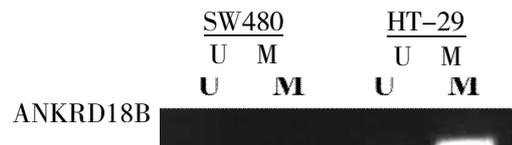


图 3 ANKRD18B 基因在肿瘤细胞株中的甲基化情况

Fig. 3 Methylation of ANKRD18B gene in tumor cell lines

U: 非甲基化产物; M: 甲基化产物.

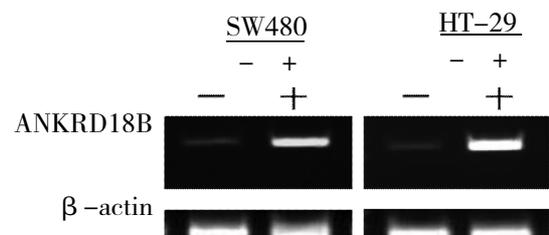


图 4 去甲基化药物处理前后 ALX 基因的表达情况

Fig. 4 Expression of ANKRD18B gene in treated or untreated cell lines with 5-aza-dC

-:对照(DMSO)处理 +:去甲基化药物处理.

3 讨论

目前, 作为严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 其表观遗传学研究在近 20 a 引起了众多学者的关注和参与. DNA 甲基化是表观遗传学中重要的研究内容. DNA 甲基化是指在甲基转移酶的催化下, DNA 的 CG 两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, 这常见于基因的 5'-CG-3' 序列. 是最早发现的修饰途径之一. 现有研究表明, DNA 甲基化异常在肿瘤发生、发展过程中发挥着重要作用, 已被认为是继杂合性缺失 (Loss of heterozygosity) 和基因突变 (Gene mutation) 之外肿瘤发生的“第三条途径”. 其中抑癌基因启动子区的 CpG 岛高甲基化, 是造成相关基因的表达失活的主要原因之一^[3,4]. DNA 甲基化研究, 不但加深了对肿瘤发生的分子机理的认识, 而且在高危人群的筛选、肿瘤分子诊断、抗癌药物筛选等方面均显示出广阔的应用前景^[5,6].

锚蛋白重复序列是普遍存在于真核、原核及病毒中的一种蛋白质序列模体. 典型的 ANK 重复序列一般含有 33 个残基, 不同数目的 ANK 单元串联起来, 形成许多大的 ANK 结构域 (ANK repeat domain), 锚蛋白重复序列功能主要是参与蛋白质与蛋白质的相互作用. 由于该蛋白质家族成员中 ANK 在数目、一级序列以及空间结构上都存在差异, 使得 ANK 模体能够与多种配体结合, 包括 DNA 结合蛋白、序列结合蛋白、细胞周期调控蛋白、转录因子等, 广泛参与了细胞生长、细胞周期调控、信号转导等生命活动, 也与多种疾病的发生密切相关^[7-9]. ANKRD18B 基因含有典型的 ANK 结构域, 是笔者前期新发现的一个在肺癌中高甲基化的基因. 在体外培养肿瘤细胞验证试验中, 笔者发现该基因在结直肠癌细胞株 SW480 和 HT29 中, 高甲基化最为明显^[10], 提示该基因可能与结直肠癌发生相关. 因此进一步分析在结直肠癌组织及正常组织中的该基因甲基化情况, 对了解该基因在生长发育、疾病发生、信号通路等方面有着重要意义.

本研究实验通过 MSP 法分别对 41 例大肠癌及 20 例癌旁正常组织 ANKRD18B 基因启动子甲基化状况进行了检查, 结果发现在结直肠癌组织该基因甲基化发生率为 59% (24/41), 而对应的癌旁正常组织中该基因甲基化率仅为 0% (0/20). 两者间差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 同时经过去甲基化药物 (5-aza-dC) 实验, 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, 该基因

甲基化与其表达呈负相关. 这一结果提示 ANKRD18B 基因甲基化与结直肠癌发生密切相关, 该基因通过高甲基化失活, 从而参与肿瘤的发生. 此外, 本研究还观察到 ANKRD18B 基因甲基化与结直肠癌临床分期密切相关, 表明该基因甲基化在结直肠癌发展中起着重要作用, 提示 ANKRD18B 基因可能为一个抑癌基因. 但目前对于 ANKRD18B 基因抑制肿瘤发生和发展的机制尚不十分清楚, 有待今后进一步的研究.

[参考文献]

- [1] SHIKATA K, NINOMIYA T, KIYOHARA Y. Diabetes mellitus and cancer risk: review of the epidemiological evidence [J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(1):9-14.
- [2] 郑树, 蔡善荣. 中国人大肠癌的流行病学研究 [J]. *中德临床肿瘤学杂志(英文版)*, 2003, 2(2):72-75.
- [3] 凡时财, 张学工. DNA 甲基化的生物信息学研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(2):143-150.
- [4] 孙树汉. 肿瘤的表现遗传学研究 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(1):8-13.
- [5] 刘晋祎, 安倩, 许冠东, 等. 肺癌患者外周血血浆中 p16 基因异常甲基化的检测 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(3):154-157.
- [6] 杜兴华, 刘文斌, 韩飞, 等. ALX4 基因在肿瘤中的甲基化与表达 [J]. *昆明医科大学学报*, 2013, 34(4):28-31.
- [7] 刘海明, 李世拥, 蔡慧云, 等. 癌性锚蛋白重复序列在结直肠癌组织的表达及临床意义 [J]. *中华普外科手术学杂志(电子版)*, 2014, 5(2):164-167.
- [8] 张燕捷, 王碧君, 程芄, 等. 癌性锚蛋白重复序列在胃癌细胞凋亡中的作用 [J]. *中华消化杂志*, 2010, 30(1):33-36.
- [9] 刘海明, 李世拥. 癌性锚蛋白重复序列蛋白在结直肠癌的研究进展 [J]. *中华普外科手术学杂志(电子版)*, 2013, 7(4):301-303.
- [10] LIU W B, HAN F, JIANG X, et al. Epigenetic regulation of ANKRD18B in lung cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2013, 19(3):21-22.

(2014-08-14 收稿)