

胶质瘤组织和细胞系中 Nanog 基因启动子区甲基化检测

汪炎^{1,2}, 牛朝诗^{1,2,3}, 李仲颖^{1,2}, 杨洋^{1,2}, 贺虎^{1,2}, 程传东^{1,2}, 李静^{1,2}

摘要 目的 检测胶质瘤组织和细胞系中 Nanog 基因启动子区甲基化状态与 Nanog 基因的表达,并探讨其在胶质瘤发展中的作用。方法 采用甲基化特异性 PCR(MSP)法分别检测正常脑组织、胶质瘤组织、胶质瘤癌旁组织、胶质瘤细胞系 U87 和 U251 中 Nanog 基因启动子区甲基化状态,实时定量 PCR(RT-PCR)法检测相应组织和细胞系中 Nanog 表达情况。结果 MSP 法检测胶质瘤组织 Nanog 基因启动子区呈非甲基化状态,且非甲基化检出率(58.82%)高于癌旁组织(13.63%),差异有统计学意义($\chi^2 = 14.852, P < 0.01$)。对 MSP 法检测结果行灰度值分析,高级别胶质瘤中 Nanog 基因启动子区非甲基化程度高于低级别组。U87 和 U251 细胞系中 Nanog 基因启动子区呈非甲基化状态。RT-PCR 结果显示高级别胶质瘤中 Nanog mRNA 相对表达量高于低级别组, U87 和 U251 细胞系中 Nanog mRNA 的转录明显增多。结论

胶质瘤中 Nanog 基因启动子区呈非甲基化状态,且可能促进 Nanog 基因的转录,影响胶质瘤的发生与发展。

关键词 胶质瘤; Nanog; DNA 甲基化

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)08-1068-04

胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,复发率及死亡率高,其发病机制至今尚不明确,探索其发病机制,寻找有效的治疗措施,一直是神经外科的研究重点。Nanog 基因是维持胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)自我更新和亚全能性的关键因子,在胶质瘤组织和胶质瘤干细胞(glioma stem cells, GSCs)中皆呈阳性表达,促进着胶质瘤的恶性生物学行为^[1-3]。基因启动子区 CpG 岛的非甲基化状态是癌基因激活的一种重要机制。已有研究^[4]表明在生殖细胞肿瘤中, Nanog 基因启动子区 CpG 岛呈非甲基化状态促进 Nanog 的转录,维持着肿瘤细胞未分化的特性。该研究探讨人脑胶质瘤组织及胶质瘤

细胞系中 Nanog 启动子区甲基化状态与 Nanog 基因表达的关系,为研究胶质瘤的发生与发展提供可能的分子依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源 选用安徽医科大学附属省立医院神经外科 2012 年 2 月~11 月手术切除胶质瘤标本 51 例和相应癌旁组织 22 例。51 例胶质瘤标本术后经病理检查确诊,根据 WHO 2007 中枢神经系统肿瘤分类标准进行分级: I 级 7 例, II 级 10 例, III 级 16 例, IV 级 18 例。正常脑组织标本 12 例取自颅脑损伤行内减压术的病患,术后病理检查证实均为正常脑组织,无胶质细胞增生和坏死。标本取得后于 10 min 内置入 -80 °C 冰箱中冷冻保存。

1.2 细胞系与主要试剂 人脑胶质瘤细胞系 U87、U251(中国科学院上海细胞所)。细胞培养液 DMEM/F12、进口胎牛血清及胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); DNA 提取试剂盒(中国天根公司); EZ DNA Methylation Kit(美国 ZYMO RESEARCH 公司); Oligod(T) 18、Ex Taq DNA 聚合酶、Marker D2000、SYBR Premix Ex Taq™ II 实时定量试剂盒、Prime-Script RT-PCR Kit、Nanog 和 GAPDH Real-time PCR 引物设计合成(日本 TaKaRa 公司); Nanog 甲基化和非甲基化引物合成由上海生工生物公司完成;其他常规试剂为进口或国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人脑胶质瘤细胞系 U87、U251 置于 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养,常规传代。

1.3.2 甲基化特异性聚合酶链式反应(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP)

1.3.2.1 DNA 提取 使用 DNA 提取试剂盒,按照说明书操作,分别从胶质瘤组织、癌旁组织、正常脑组织及细胞中提取基因组 DNA。使用酶标仪(瑞士 TECAN Infinite 200)测定提取 DNA 样本的纯度和浓度。

1.3.2.2 DNA 甲基化修饰 每份标本取 5 μg DNA 作为模板,加 ddH₂O 至 20 μl。使用 EZ DNA

2015-04-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81172407);安徽省重点实验室绩效考核项目(编号:1306c083028)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院¹ 神经外科、² 脑功能与脑疾病安徽省重点实验室、³ 安徽省脑立体定向神经外科研究所,合肥 230001

作者简介:汪炎,男,硕士研究生;

牛朝诗,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: niuchaoshi@163.com

Methylation Kit 试剂盒,对样本进行亚硫酸盐处理并纯化,甲基化修饰后的 DNA 保存于 -20°C 备用。

1.3.2.3 PCR 扩增 以甲基化修饰后的 DNA 为模板,分别用 Nanog 基因启动子区特异甲基化和非甲基化引物行 PCR 扩增反应,ddH₂O 替代 DNA 样本作为阴性对照。引物设计参考文献^[5],其中甲基化引物序列: 5'-TTAATTTATTGGGATTATAGGGGTG-3'(上游) 5'-AAACCTAAAAACAAACCCAACAAC-3'(下游),非甲基化引物序列: 5'-ACTGTCTCTCCTCT-TCCCTC-3'(上游) 5'-CCTGTTTGTAGCTGAGGTTTC-3'(下游)。PCR 反应体系(10 μl): cDNA 模板 1 μl ,上下游引物各 0.5 μl ,Ex Taq DNA 聚合酶 5 μl ,ddH₂O 3 μl 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min 后,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 35 个循环 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取 PCR 产物 10 μl 置于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,采用 BIO-RAD 凝胶成像系统进行凝胶成像,Quantity One 软件行灰度值分析。

1.3.3 Real-time PCR 检测 Nanog 表达 TRIzol-氯仿-异丙醇法提取胶质瘤组织和细胞系中的总 RNA。按照反转录试剂盒说明书将提取的总 RNA 反转录成 cDNA。在美国 ABI Prism 7500 快速实时定量 PCR 仪上进行 Real-time PCR 反应,条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s 后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 34 s,共 35 个循环。反应体系(20 μl): cDNA 模板 2 μl ,上下游引物各 0.8 μl ,SYBR Premix EX TaqTM II (2 \times) 10 μl ,ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μl ,ddH₂O 6 μl 。所有样品设 3 个复孔。记录每个反应管中的荧光信号达到阈值所经历的循环数 Ct 值,以 GAPDH 为内参,得到 Nanog 的相对表达量。Nanog 上游引物: 5'-CCTGTGATTTGTGGGCCTGA-3',下游引物: 5'-CTCTGCAGAAGTGGGTTGTTTG-3',片段大小为 168 bp。GAPDH 上游引物 5'-GCACCGTCAAGGCT-GAGAAC-3',下游引物: 5'-TGGTGAAGACGCCAGT-GGA-3',片段大小为 138 bp。PCR 结果判断: $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{内参}}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{nanog}} - \text{Ct}_{\text{gapdh}})_{\text{高级别}} - (\text{Ct}_{\text{nanog}} - \text{Ct}_{\text{gapdh}})_{\text{低级别}}$, $\text{RQ}_{\text{nanog}} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ^[6]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用两独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 胶质瘤组织中 Nanog 基因启动子区甲基化状态 Nanog 基因启动子区甲基化引物和非甲基化引

物扩增片段长度分别为 213 bp 和 225 bp。51 例胶质瘤标本中,30 例标本检测出 Nanog 基因启动子区呈非甲基化状态,而 22 例癌旁组织中仅有 3 例检测出非甲基化,两者差异有统计学意义($\chi^2 = 14.852$, $P = 0.000$)。正常脑组织中未检测出非甲基化的表现。Nanog 启动子区非甲基化率在胶质瘤 WHO I 级、WHO II 级、WHO III 级、WHO IV 级标本中分别为 42.9% (3/7)、50.0% (5/10)、62.5% (10/16)、66.7% (12/18),各病理级别之间差异无统计学意义($\chi^2 = 1.605$, $P = 0.658$)。对目的条带行灰度值分析,III ~ IV 级胶质瘤的灰度值明显高于 I ~ II 级胶质瘤($t = 6.988$, $P = 0.000$)。Nanog 启动子区非甲基化程度随着胶质瘤病理级别的增加而升高。见图 1。

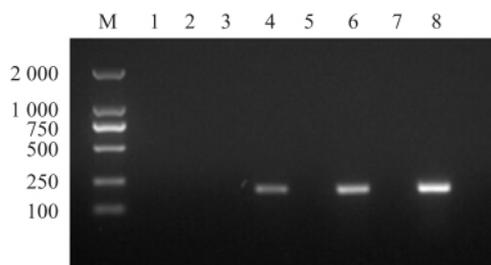


图 1 MSP 法检测胶质瘤组织 Nanog 启动子区甲基化状态

M: Marker; 1: 正常脑组织甲基化扩增条带; 2: 正常脑组织非甲基化扩增条带; 3: 癌旁组织甲基化扩增条带; 4: 癌旁组织非甲基化扩增条带; 5: WHO I + WHO II 甲基化扩增条带; 6: WHO I + WHO II 非甲基化扩增条带; 7: WHO III + IV 甲基化扩增条带; 8: WHO III + IV 非甲基化扩增条带

2.2 胶质瘤组织中 Nanog 启动子甲基化和其 mRNA 表达的关系 Nanog 和 GAPDH 扩增产物的溶解曲线显示均为单峰,表明扩增产物单一,无非特异性扩增;扩增曲线显示 Nanog 呈指数增长,并进入平台期,表明扩增效率高。见图 2、3。Nanog 启动子区非甲基化阳性的 30 例标本中检测出 28 例发生 Nanog 的转录,而未发生非甲基化的 21 例中有 15 例检测出 Nanog 的转录,两者差异有统计学意义($\chi^2 = 4.482$, $P = 0.034$)。癌旁组织和正常脑组织中均未检测出 Nanog 的表达。以 GAPDH 为内参,低级别中 Nanog 表达量为基准,低级别和高级别胶质瘤中 Nanog 的相对表达量分别为(1.24 \pm 0.61)、(4.53 \pm 0.91),高级别胶质瘤 Nanog 表达相对于低级别胶质瘤明显升高($t = 11.41$, $P = 0.00$)。见图 4。

2.3 胶质瘤细胞系中 Nanog 启动子甲基化和其 mRNA 表达的关系 MSP 法检测显示 U87、U251 细胞系中 Nanog 启动子区非甲基化引物扩增出目的

条带,而甲基化引物未扩增出条带。说明 U87、U251 细胞系中 Nanog 启动子区呈非甲基化状态。Real-time PCR 结果显示,在 U87、U251 细胞系中发生了 Nanog 基因的转录。见图 5。

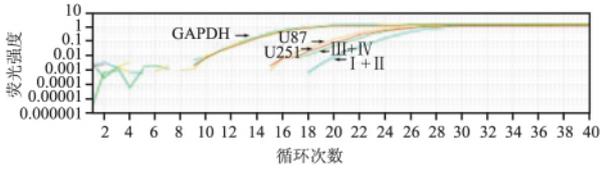


图2 Nanog 和 GAPDH 扩增曲线

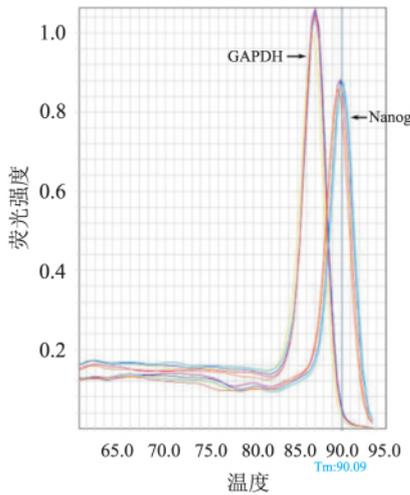


图3 Nanog 和 GAPDH 溶解曲线

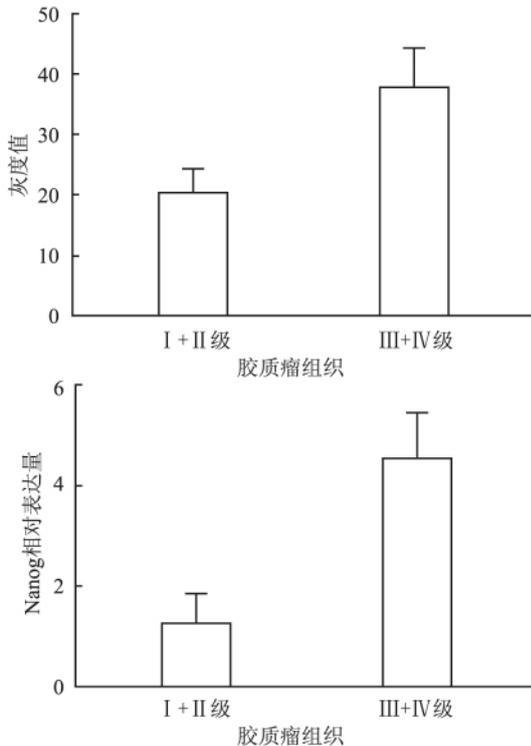


图4 Nanog 启动子区非甲基化程度分析与 Nanog mRNA 相对表达量分析

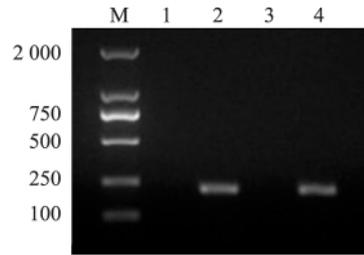


图5 MSP 法检测胶质瘤细胞系 Nanog 启动子区甲基化状态

M: Marker; 1: 甲基化扩增条带 U87 细胞系; 2: 非甲基化扩增条带 U87 细胞系; 3: 甲基化扩增条带 U251 细胞系; 4: 非甲基化扩增条带 U251 细胞系

3 讨论

Nanog 是近年来在 ESCs 内发现的一个重要转录因子,该因子对维持 ESCs 的自我更新及亚全能性起着关键作用,是全能性或多能性干细胞标志物^[6]。本课题组前期研究^[1-3]显示,Nanog 在胶质瘤中高表达并随着病理级别的增高其表达增多;在 GSCs 中 Nanog 亦呈高表达,且显著高于 U87 胶质瘤细胞系,表明 Nanog 是一种与分化紧密相关的重要调节因子,并作为候选癌基因调节胶质瘤的生物学行为。

肿瘤是由于表观遗传和遗传异常共同作用,导致基因表达失调而发生的。表观遗传学包括组蛋白修饰、RNA 干扰、DNA 甲基化、染色质重塑等,精确调控着基因表达,而不改变基因的序列^[7]。基因启动子区 CpG 岛的呈现非甲基化状态是激活癌基因的一种重要机制。Nanog 启动子区散在分布着组织依赖差异的 DNA 甲基化区域(T-DMR)。T-DMR 在 ESCs 中非甲基化,使 Nanog 得以表达,而在滋养层干细胞(trophoblast stem cells, TSCs)中呈高甲基化,使 Nanog 表达失活^[8]。在胚胎癌细胞中 Nanog 启动子区 CpG 位点未发生 DNA 甲基化,而在 293T 细胞中有 67% 甲基化,将 293T 用胚胎癌提取物处理 4 周后,甲基化的 CpG 位点下降到 39%^[9]。Nettersheim et al^[4]发现在生殖细胞肿瘤中 OCT4 与 SOX2 介导的 Nanog 表达可以被 Nanog 启动子区 CpG 岛的高甲基化所沉默,并且发现生殖细胞肿瘤的分化状态与 Nanog 启动子区 CpG 岛的甲基化程度密切相关。

本研究显示,脑胶质瘤中 Nanog 启动子区非甲基化率明显高于癌旁组织和正常脑组织,表明 Nanog 启动子区非甲基化在胶质瘤中是一个频发事件且有着显著的肿瘤特异性。非甲基化阳性组中 Nanog mRNA 的表达明显高于阴性组,高级别胶质

瘤中 Nanog 启动子区非甲基化程度高于低级别组, Nanog mRNA 的转录水平亦明显升高, 前期的免疫组化和 Western blot 结果显示, Nanog 的蛋白表达强度随着胶质瘤组织的病理级别的升高而增强, 提示 Nanog 启动子区非甲基化是导致 Nanog 蛋白表达增强的重要机制^[1]。Nanog 启动子区在 U87、U251 细胞系中皆呈非甲基化状态, 且在 U87、U251 细胞系亦检测到 Nanog 基因的转录, 进一步证明 Nanog 启动子区非甲基化状态促进 Nanog 的表达, 维持肿瘤细胞的低分化或未分化状态。

本实验中扩增的 Nanog 启动子区片段是位于其转录起始位点上游 -200 bp 区域, 此区域中包含着与转录因子 Oct4/Sox2 的结合位点(-104 bp ~ -108 bp)^[7], 对 Nanog 的调控起着重要作用。有研究者利用电泳迁移变动分析和染色质免疫共沉淀实验证明, Oct4 和 Sox2 确实能在体外和体内结合到 Nanog 的启动子上^[18]。对该位点进一步的诱变分析表明, Oct4/Sox2 对于 Nanog 启动子活性是必不可少的, 并能在多能性细胞中提高 Nanog 的转录。结合本研究结果, 在胶质瘤中该区域的 CpG 岛呈非甲基化状态, 更有利于 Oct4、Sox2 与 Nanog 启动子区的结合, 促进 Nanog 的表达。

综上所述, 人脑胶质瘤中 Nanog 基因启动子区非甲基化模式与 Nanog 的表达有着密切的相关性。通过改变胶质瘤中 Nanog 启动子区原有甲基化模

式, 是否能够下调 Nanog 的表达从而抑制胶质瘤细胞的恶性生物学活性还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Niu C S, Li D X, Liu Y H, et al. Expression of NANOG in human gliomas and its relationship with undifferentiated glioma cells [J]. *Oncol Rep* 2011, 26(3): 593-601.
- [2] 李冬雪, 牛朝诗, 刘于海, 等. Nanog 基因在脑肿瘤干细胞中的表达及其意义 [J]. *中华神经外科杂志* 2011, 27(2): 125-30.
- [3] 李冬雪, 牛朝诗, 刘于海, 等. 胶质瘤组织中 Nanog 基因的表达及其意义 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志* 2010, 8(6): 504-8.
- [4] Nettersheim D, Biermann K, Gillis A J, et al. NANOG promoter methylation and expression correlation during normal and malignant human germ cell development [J]. *Epigenetics* 2011, 6(1): 114-22.
- [5] Deb-Rinker P, Ly D, Jezierski A, et al. Sequential DNA methylation of the Nanog and Oct-4 upstream regions in human NT2 cells during neuronal differentiation [J]. *J Biol Chem* 2005, 280(8): 6257-60.
- [6] Silva J, Nichols J, Theunissen T W, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state [J]. *Cell* 2009, 138(4): 722-37.
- [7] Jones P A, Baylin S B. The epigenomics of cancer [J]. *Cell* 2007, 128(4): 683-92.
- [8] Hattori N, Imao Y, Nishino K, et al. Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells [J]. *Genes Cells* 2007, 12(3): 387-96.
- [9] Freberg C T, Dahl J A, Timoskainen S, et al. Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract [J]. *Mol Biol Cell* 2007, 18(5): 1543-53.

Analysis and significance of Nanog promoter methylation status in gliomas and glioma cells

Wang Yan^{1,2}, Niu Chaoshi^{1,2,3}, Li Zhongying^{1,2}, et al

¹ Dept of Neurosurgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

² Anhui Province Key Laboratory of Brain Function and Brain Disease, Hefei 230001;

³ Anhui Provincial Stereotactic Neurosurgical Institute, Hefei 230001)

Abstract Objective To detect the methylation status of Nanog gene promoter and the expression of Nanog mRNA in gliomas and glioma cell lines, and to explore the function of Nanog in glioma. **Methods** MSP and RT-PCR were conducted to detect Nanog gene promoter's methylation status and its mRNA expression in normal brain tissues, glioma tissues, paracancerous tissues, glioma cell lines U87 and U251. **Results** Nanog gene promoter was hypermethylated in gliomas, and the presence was significantly higher in gliomas than that in the paracancerous tissues (58.82% vs 13.63%) ($\chi^2 = 14.852$, $P < 0.01$). Nanog gene promoter unmethylation state was higher in grade III and grade IV glioma compared with grade I and grade II tumors. Nanog gene promoter was hypermethylated in U87 and U251 cell lines. Nanog mRNA expression levels in high-grade (III + IV) gliomas were higher than the low-grade (I + II) group, Nanog mRNA expression was significantly increased in U87 and U251 cell lines. **Conclusion**

Unmethylation state of Nanog gene promoter regions is one of the most important mechanisms that up-regulate its protein expression and influence the occurrence and development of gliomas.

Key words glioma; Nanog; DNA methylation