



ALX4 基因甲基化及在肺癌发生中作用

彭 倩 谭双香^{通讯作者} 湖南省老年医学研究所 410000

摘要：目的 从 DNA 甲基化开始，利用化合物诱导大鼠肺癌的模型进行研究，对肺癌发生过程中的甲基化异常开展全基因组筛选，探索 ALX4 (Aristaless-like Homeobox 4) 基因的甲基化在肺癌的过程中，探索基因甲基化是否与肺癌有关。同时进一步通过文献检索，探索该基因表现出在大肠癌和乳腺癌组织高甲基化，通过对 ALX4 基因进行分析，探究其在肺癌组织、正常组织以及多种肿瘤细胞中的发展情况以及对基因实际甲基化表达的影响。**方法** 利用甲基化特异性 PCR 法对肺癌组织、肺癌细胞株以及正常组织中的 ALX4 基因甲基化进行检测并观察它们的变化。利用 5-杂氮-2'-脱氧胞苷 (5-aza-dC) 等去甲基化药物处理肿瘤细胞，并通过 RT-PCR 分析肿瘤细胞中 ALX4 基因的表达情况，同时评价 ALX4 基因甲基化对其表达调控。组建 ALX4 低表达以及高表达的细胞模型，采用细胞增殖实验、流式细胞分析等具体实验方法。对在肺癌发生过程中 ALX4 基因的功能做出初步的判断。**结果** 利用 MSP 方法对 ALX4 的肿瘤组织以及正常组织的甲基化进行分析结果表明，在 10 例正常组织没有表现出 ALX4 基因甲基化，甲基化发生率为 0%，20 例肺癌组织中出现了 11 例 ALX4 基因的甲基化，发生的甲基化的概率为 55%；在肺癌组织以及正常组织 ALX4 基因的甲基化方面存在显著的统计学差异 ($P < 0.05$)，同时为了证明 MSP 实验结果的确切性，对上述样品进行了 PCR 产物测序，MSP 电泳结果与所得测序结果一致。使用 MSP 方法对一系列 ALX4 的基因甲基化的肿瘤细胞系进行分析。结果表明：8 种肿瘤细胞株出现补体程度的甲基化，MCF7 乳腺癌细胞株、Hela 宫颈癌细胞株、SGC7901 胃癌细胞株、HCT116 结肠癌细胞株表现出完全甲基化；HepG2 肝癌细胞株、SW480 结肠癌细胞株、H446 和 A549 肺癌细胞株表现出部分甲基化现象。这些结果表明 ALX4 基因在肿瘤细胞中具有很高的甲基化的发病率。为了确定 ALX4 基因甲基化是否调节基因的表达，为此开展去甲基化相关药物实验，实验结果表明：H446、HepG、Hela、MCF7、HCT116 等 5 例发生甲基化的肿瘤细胞株都出现了 ALX4 基因表达缺失，当使用了去甲基化药物后，ALX4 基因的 mRNA 表达出现了显著提升。提示 DNA 高甲基化导致该基因在肿瘤中的表达沉默。**结论** 1. ALX4 基因是在肿瘤细胞和肺癌组织中高度甲基化的，肿瘤恶性程度与其甲基化发生率呈负相关，这是诊断肺癌的候选相关标志物。2. ALX4 基因甲基化可以调节基因的表达，并且甲基化与表达表现出负相关程度。3. ALX4 基因能明显抑制肿瘤细胞的生长，初步研究表明，抑制肿瘤细胞生长的机理是 ALX4 基因可诱导细胞凋亡，是一种潜在的肿瘤抑制基因。

关键词：ALX4 基因 肺癌 DNA 甲基化

中图分类号：R734.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1009-5187 (2016) 12-001-02

基金项目：湖南省自然科学基金 (No. 11JJ3110)

1 材料与方法

1.1 临床标本和细胞来源

本实验所采用的癌组织均来源于本医院肺癌患者手术切除的癌组织。以上样品都经过病理证实。作为参照组织的是距离肿瘤组织 5 厘米的正常组织。所有收集的标本经医院伦理委员会的批准同时还经病人知情同意。癌组织取样后均经液氮中冷冻后立即放入 -80°C 的冰箱中进行保存。肿瘤细胞株通过外部购买获得包括 SGC7901 胃癌细胞株、H446 和 A549 肺癌细胞株、Hela 宫颈癌细胞株、SW480 和 HCT116 结肠癌细胞株以及 HepG2 肝癌细胞株。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组的 DNA 提取

提取基因组的 DNA 时采用 Promega wizard genomic DNA purification kit 试剂盒。具体步骤如下：(1) 收集细胞，并转移到 1.5 毫升的离心管中。如果它是贴壁细胞，收集细胞前利用胰蛋白酶消化分离。(2) 13, 000-16, 000 $\times g$ 首先进行离心操作 10 分钟之后将细胞沉淀。(3) 将上清舍去，将沉淀以及 10-50 微升残留液体留下。(4) 加入 200 微升 PBS 清洗细胞。离心并丢弃 PBS。使用涡旋振荡器，使细胞重新悬挂。(5) 通过加入 600 微升核裂解液，反复吸放使得细胞裂解，直到可见细胞块消失了。(6) 在室温下，通过蛋白质沉淀和液体涡旋振荡器高速振荡 20 秒加入到样品中，然后冷却 5 分钟。(7) 在 13000-16000 $\times g$ 下离心 4 分钟，形成致密的蛋白沉淀。(8) 在一个干净的 1.5 毫升小离心管中，在室温下放入 600 微升异丙醇。小心取出上一步的上清 (含 DNA) 到这个小的离心管中，不要将蛋白质沉淀吸入。以防止 DNA 被蛋白质污染，剩余部分上清，不要讲上清完全吸走。(9) 将溶液慢慢震荡混匀直至线状白色 DNA 形成团块。(10) 在室温下以 13000-16000 $\times g$ 的转速离心 1 分钟，可见白色小片 DNA 沉淀。将上清液小心去除。(11) 在室温下加入 600 微升 70% 的乙醇，轻轻颠倒离心管几次清洗沉淀 DNA，在室温下 13000-16000 $\times g$ 进行离心 1 分钟。(12) 使用测序加样枪头或巴斯德吸管将乙醇溶液小心移走，沉淀 DNA 很蓬松，需要更加小心，避免

将沉淀留在管内。(13) 将离心管倒放在干净的水吸水纸，使其自然干燥 10-15 分钟。(14) 加入 100 微升 DNA Rehydration Solution 于离心管中，65 摄氏度孵育 1 小时，以溶解 DNA，在溶解的过程中，可以轻弹管壁几次使混合溶液混匀。或者是在室温下或 40°C 下温育过夜。(15) 在 -20°C 的环境下存放 DNA。

1.2.2 修饰后 DNA 纯化回收

(1) 将移液器枪头插入的石蜡油中，首先轻轻压使一部分石蜡油排出，然后取该混合物于一个干净的 EP 管中。(2) 采用 Promega Wizard Cleanup 方法对 DNA 进行净化和回收处理。A. ddH₂O 在 70 摄氏度下进行水浴预热，配制 80% 异丙醇；B. 加入 1 毫升的 Promega's Wizard DNA Clean-up resin，慢慢的震荡均匀，使 DNA 与树脂充分结合；C. 使用移液器将上述混合物转移到针筒内，收废液使用 EP 管进行接收，安装针螺栓，轻轻的压，液体挤出，使树脂沉积白色列可见；D. 将小柱与注射器分离后将针栓拔出，然后将小柱与针筒连接，将 2 毫升 80% 的异丙醇加入到针筒内，同时将针栓插入，缓慢挤压，挤出异丙醇；E. 将小柱与注射器分离，小柱放在干净的 1.5 毫升的 EP 管上，离心 2 分钟，转速为 12000 转每分。通过这种方法将异丙醇残余成分去除，将树脂进行干燥处理。此时，该修饰的 DNA 是与树脂处于粘接的状态；F. 将小柱放在在另一个干净的 1.5 毫升的 EP 管中，通过移液器吸取 50 微升已经预热完成的 ddH₂O，在室温环境下放置 5 分钟；G. 以每分钟 12000 转的速度离心 20 秒，进行洗脱，在 EP 管中的液体就是被修饰的 DNA 溶液中，终体积为 50 微升。(3) 加入 5.5 微升新配置的 3mol/L 的氢氧化钠溶液，放入室温环境存放 15 分钟。(4) 取 10mol/L 的乙酸铵溶液 33 微升用于中和氢氧化钠溶液，使混合溶液的 pH 值约为 7。(5) 取 10mg/ml 糖原溶液 4 微升，由于糖原溶液和乙醇混合可以产生沉淀，因此可以作为指标剂，容易再离心后加以区分，以防止剩余的乙醇回收。(6) 加冰无水乙醇 270 微升，在 -20°C 左右，进行沉淀。(7) 在 40 摄氏度环境下，以每分钟 12000 转的速度离心 30 分钟，舍去上清液，收集沉淀，不需吸净。(8) 取 70% 乙醇 500 微升加入到上述沉淀中，特定注意勿将沉淀吹



起,只要添加乙醇,将EP管缓慢倾斜,旋转一圈,在40摄氏度环境下,以每分钟12000转的速度再次离心5分钟,舍去上清液,加入相同剂量的70%乙醇,再次进行离心,洗涤2次。(9)丢弃上清液,并在室温下短暂离心后,将管壁的乙醇缓慢移动到EP管底,使用移液器将剩余的液体吸净,在室温环境下干燥5分钟。或干燥过程中沉淀由不透明向半透明或透明发生变化时,加入20微升-30微升双蒸水,将沉淀进行溶解。此时,已将修饰后DNA的纯化回收过程完成。将得到的修饰的DNA溶液,其可用于进一步的实验。(10)在-200摄氏度的环境下将DNA溶液进行保存。

1.2.3 引物设计和序列合成

MSP引物通过MethPrimer引物设计软件进行在线设计,分别包括甲基化引物、甲基化引物(M)、下游引物:5'-GAATCCCTATACTTAACGACGAC-3'、上游引物5'-GTTAGGTATGAATGTTGAGATTGC-3'、非甲基化引物(U),在55摄氏度下进行退火,产物长度约为178bp;非甲基化引物,5'-CAATCCCTATACTTAACAACAAC-3'下游引物:5'-TAGGTATGAATGTTGAGATTGTGT-3',上游引物。在54摄氏度下进行退火,产物长度约为177bp。

1.2.4 从细胞中抽提RNA采用Trizol法

具体步骤如下:(1)RNA提取试剂制备:氯仿,75%的乙醇,异丙醇,没有水或0.5%的SDS或无RNase的水。(2)直接在培养板加入1毫升的TRIzol裂解细胞,吸打几次。(3)转移到1.5毫升的EP管中。反向混合,冰浴5分钟。(4)1毫升TRIzol混合0.2毫升氯仿使用,在室温下振荡15秒,静置3分钟。(5)在40摄氏度的环境下,以每分钟10000转的速度进行离心操作15分钟,样品会被分为三层:底层是黄色的有机相,上层是一种无色的水相和一个中间层。RNA是主要在水相中,水相的所占体积约是TRIzol试剂的60%。(6)将三层溶液中的水相转移到干净的新管中,假如要将有机相中的蛋白质和DNA分离保留,可进一步进行操作,水相中的RNA应用异丙醇进行沉淀,1毫升的TRIzol试剂混合0.5毫升的异丙醇,在室温环境中静置10分钟。(7)在40摄氏度的环境下,以每分钟10000转的速度进行离心操作10分钟,在进行离心前无法观察到沉淀RNA,离心结束后,后再管底以及管侧生成胶状沉淀,舍去上清液。(8)用75%的乙醇洗涤沉淀中的RNA,1毫升的TRIzol试剂混合1毫升75%乙醇,在2-8摄氏度的环境下,7500Xg离心5分钟,舍去上清液。(9)将沉淀RNA真空抽干或在室温环境下干燥,大约10分钟左右,不能真空离心干燥,否则RNA的溶解性会大大降低,假如25-200微升的无RNase的水,使用枪头进行几次吸打,在55-60摄氏度环境下搁置10分钟使得RNA能够溶解,并在-70摄氏度环境下进行保存。(10)利用紫外分光光度仪检测浓度以及纯度,凝胶成像仪观察28S rRNA和18S的完整性,甲醛-琼脂糖电泳。

1.2.5 去甲基化实验

在37摄氏度,5%二氧化碳,饱和湿度的环境下,使用含10%小牛血清的RPMI1640对甲基化的ALX4基因肺癌细胞株进行培养,当细胞处于对数生长期时采取适宜的密度进行接种,生长24小时后加入5-杂氮-2'-脱氧胞苷去甲基化试剂直至浓度保持在10 μmol/L。24小时后更换含药液的新鲜培养液弃去药液,浓度一致,连续培养3天,用相同体积的自由液体培养基处理的细胞作为对照组。第四天收获细胞,通过DNA提取试剂盒(Promega)中的DNA,采用Trizol法提取RNA以及DNA。采用逆转录PCR、MSP、荧光定量RT-PCR用于检测ALX4基因的甲基化和mRNA的表达水平。

2 结果

2.1 ALX4基因在肺癌肿瘤和正常组织中甲基化分析

利用MSP方法对ALX4的肿瘤组织以及正常组织的甲基化进行分析结果表明,在10例正常组织没有表现出ALX4基因甲基化,甲基化发生率为0%,20例肺癌组织中出现了11例ALX4基因的甲基化,发

生的甲基化的概率为55%;在肺癌组织以及正常组织ALX4基因的甲基化方面存在显著的统计学差异($P<0.05$),同时为了证明MSP实验结果的确定性,对上述样品进行了PCR产物测序,MSP电泳结果与所得测序结果一致。

表1: ALX4基因在肺癌肿瘤和正常组织中甲基化统计结果

组织	样本量	甲基化例数	甲基化发生率(%)
正常组织	10	0	0
肿瘤组织	20	11	55

2.2 在肿瘤细胞株中ALX4基因甲基化分析

使用MSP方法对一系列ALX4的基因甲基化的肿瘤细胞系进行分析。结果表明:8种肿瘤细胞株出现补体程度的甲基化,MCF7乳腺癌细胞株、Hela宫颈癌细胞株、SGC7901胃癌细胞株、HCT116结肠癌细胞株表现出完全甲基化;HepG2肝癌细胞株、SW480结肠癌细胞株、H446和A549肺癌细胞株表现出部分甲基化现象。这些结果表明ALX4基因在肿瘤细胞中具有很高的甲基化的发病率。

2.3 ALX4基因的表达在去甲基化药物处理细胞前后分析

为了确定ALX4基因甲基化是否调节基因的表达,为此开展去甲基化相关药物实验,实验结果表明:H446、HepG、Hela、MCF7、HCT116等5例发生甲基化的肿瘤细胞株都出现了ALX4基因表达缺失,当使用了去甲基化药物后,ALX4基因的mRNA表达出现了显著提升。提示DNA高甲基化导致该基因在肿瘤中的表达沉默。

3 讨论

随着人类基因组计划的完成,功能基因组学已经成为生命科学研究的核心理。有研究表明,基因表达受到RNA干扰,DNA甲基化,组蛋白代码,基因印迹等基因组信息共同决定。在高级别的整合生物中,DNA甲基化广泛参与基因表达调控、基因组印迹、胚胎发育、X染色体灭活等生命活动,是目前最清晰的肿瘤表观遗传学机制,同时也与细胞分化和增殖、衰老,DNA甲基化,肿瘤及许多疾病密切相关。因此,对基因发生异常以及甲基化的机制进行更加深入的了解,不仅有助于肿瘤的早期诊断,而且还提供用于预防和治疗癌症的新的想法。ALX4作为在肺癌的早期基因的新发现的高甲基化基因,到目前为止,关于在肺癌的机构报告的基因甲基化的研究还比较少。通过分析在肺癌基因甲基化表明,该基因在肺癌(55%)的甲基化发生率较高,文献检索发现显示,ALX4在乳腺癌以及大肠癌等组织中的甲基化也呈现高发趋势。通过对来自不同组织肿瘤细胞如结直肠癌、胃癌、乳腺癌等肿瘤细胞在基因甲基化方面的进一步分析,结果表面在这些肿瘤细胞中都检测出高甲基化,这毫无疑问表明因甲基化是广泛性发生的,可以在肿瘤发生中发挥重要作用,有必要进一步研究。研究结果表明,该基因的甲基显著抑制基因的脱甲基化的表达,在甲基化表达治疗后表达恢复,这表明该基因的甲基化和表达呈负相关。这表明,在肺癌以及形成肿瘤期间,所述基因甲基化失活,参与到发生肿瘤的过程中,因为在各种肿瘤细胞中都会发生甲基化灭活,据推测该基因可能是潜在的肿瘤抑制基因。因此,有必要扩大后续临床样品,进一步研究基因甲基化与临床病理之间数据之间的关系,同时还要对该基因在肿瘤的发生过程中的功能,为ALX4基因的生物功能的全面理解提供的数据。

参考文献

- [1] 郑丹,刘彬彬,刘银坤.肿瘤表观遗传学研究进展[J].世界华人消化杂志.2007(24)
- [2] 张丽丽,吴建新.DNA甲基化——肿瘤产生的一种表观遗传学机制[J].遗传.2006(07)
- [3] 武立鹏,朱卫国.DNA甲基化的生物学应用及检测方法进展[J].中华检验医学杂志.2004(07)
- [4] 苏长青,单祥年.CDKN-2/p16基因甲基化失活与肺癌关系的研究[J].中华医学遗传学杂志.2000(01)
- [5] 刘晋祚,安倩,张建军,雷文东,程书钧,高燕宁.肺癌病人肿瘤组织DNA高甲基化片段的筛选[J].遗传学报.2004(04)