

EDNRB基因启动子甲基化状态在胃癌KATO III细胞系中的检测

孙文早, 韩高雄

■背景资料

EDNRB基因编码产物属于G蛋白偶联受体A家族, 位于细胞膜表面, 与配体内皮素结合后将细胞外信号传导至细胞内, 调控许多重要的生物过程, 包括血管的发育与收缩功能、某些激素的产生和刺激细胞生长和分化, 在Waardenburg综合征、先天性巨结肠和肿瘤发病机制中起到关键作用。

孙文早, 仙桃市第一人民医院内分泌科 湖北省仙桃市 433000

韩高雄, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腹腔镜外科 湖北省武汉市 430022

作者贡献分布: 此课题由孙文早与韩高雄设计; 细胞培养与甲基化检测由孙文早完成; 论文写作由孙文早与韩高雄共同完成。

通讯作者: 韩高雄, 主治医师, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腹腔镜外科。

han_gaoxiong@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-07-19 修回日期: 2010-08-16

接受日期: 2010-08-29 在线出版日期: 2010-11-18

Detection of the promoter methylation status of the EDNRB gene in human gastric cancer cell line KATO III

Wen-Zao Sun, Gao-Xiong Han

Wen-Zao Sun, Department of Endocrinology, the First People's Hospital of Xiantao, Xiantao 433000, Hubei Province, China

Gao-Xiong Han, Department of Laparoscopic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Gao-Xiong Han, Department of Laparoscopic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. wuhantongji163@163.com

Received: 2010-07-19 Revised: 2010-08-16

Accepted: 2010-08-29 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To detect the promoter methylation status and mRNA expression of the endothelin receptor type B (EDNRB) gene in human gastric cancer cell line KATO III and to analyze their clinical significance.

METHODS: Genomic DNA and total RNA were extracted from healthy adult peripheral blood samples and KATO III cells. Bisulfite sequencing PCR and reverse transcription-PCR were performed to analyze the promoter methylation status and mRNA expression of the EDNRB gene, respectively.

RESULTS: In KATO III cells, some CG loci

($\leq 20\%$) were not or lowly methylated, while some others ($\geq 50\%$) were hypermethylated. In healthy adult peripheral blood samples, only one CG locus (10%) was methylated, while the others were not methylated. The promoter methylation extent of the EDNRB gene in KATO III cells was higher than that in healthy adult peripheral blood samples. The mRNA expression was inhibited significantly in KATO III cells compared with healthy adult peripheral blood samples.

CONCLUSION: EDNRB gene promoter is hypermethylated in KATO III cells. The promoter methylation of the EDNRB gene may play an important role in the pathogenesis of gastric cancer.

Key Words: Endothelin receptor type B; Promoter; Methylation; Gastric cancer

Sun WZ, Han GX. Detection of the promoter methylation status of the EDNRB gene in human gastric cancer cell line KATO III. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3448-3451

摘要

目的: 探讨胃癌KATO III细胞系内皮素受体B(EDNRB)基因启动子甲基化状态及mRNA表达在临床中的应用。

方法: 提取正常健康人外周血和胃癌KATO III细胞系总DNA和总RNA, 分别进行亚硫酸氢盐测序PCR(bisulfite sequencing PCR, BSP)和逆转录PCR(reverse transcriptase PCR, RT-PCR)扩增, 以正常健康人外周血为对照, 比较EDNRB基因启动子甲基化状态和mRNA表达差异。

结果: 胃癌KATO III细胞系1-9、14和15等CG位点表现为无甲基化或低甲基化状态($\leq 20\%$), 其余位点表现高甲基化状态($\geq 50\%$), 正常健康人外周血EDNRB基因启动子除第22个CG甲基化率为10%外, 其余位点均表现为

■同行评议者

崔莲花, 副教授, 青岛大学医学院公共卫生系

无甲基化状态, 胃癌KATO III 细胞系甲基化发生率显著高于健康人外周血, 且其mRNA表达明显受到抑制。

结论: EDNRB基因启动子甲基化在胃癌发病机制中扮演重要角色。

关键词: 内皮素受体B; 启动子; 甲基化; 胃癌

孙文早, 韩高雄. EDNRB基因启动子甲基化状态在胃癌KATO III 细胞系中的检测. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3448–3451
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3448.asp>

0 引言

EDNRB基因编码产物为含有442个氨基酸的内皮素受体B(endothelin receptor type B, EDNRB), 属于G蛋白偶联受体A家族, 该蛋白质位于细胞膜表面, 与配体内皮素结合后将细胞外信号传导至细胞内^[1], 调控许多重要的生物过程, 包括血管的发育与收缩功能、某些激素的产生和刺激细胞生长和分化, 在Waardenburg综合征、先天性巨结肠和癌症发病机制中起到关键作用^[2,3]。目前很多文献报道表明EDNRB基因启动子在鼻咽癌^[4]、淋巴瘤^[5]、前列腺癌^[6,7]、食管癌^[8]和口腔鳞状细胞癌^[9]等患者中呈现高度甲基化状态, 而在胃癌患者中未见报道。胃癌作为我国最常见的恶性肿瘤之一, 检测和研究胃癌患者中EDNRB基因启动子甲基化状态对阐明胃癌发病机制具有极其重要的意义, 在胃癌早期检测和治疗指导、预后评估中有重要作用。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌KATO III 购自中国典型培养物保藏中心(武汉大学保藏中心)。对照为正常健康人外周血。胎牛血清、DMEM(高糖)为Gibco产品, DNA提取纯化与质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, TaKaRa Ex Taq Hot Start Version、pMD18-T Vector、RNAiso Plus和Prime-Script One Step RT-PCR Kit购自TaKaRa公司, EpiTect Bisulfite Kit购自QIAGEN。甲基化引物合成及测序由宝生物工程(大连)公司完成, PCR仪器为ABI 9700。

1.2 方法

1.2.1 亚硫酸氢盐测序PCR检测EDNRB基因启动子甲基化状态: 在PubMed的GenBank上检索人类EDNRB基因序列, 以转录起始点上游1 500 bp为启动子区域, 延伸至转录起始点下游200 bp, 按照CpG岛的定义预测其中181-1 700 bp为

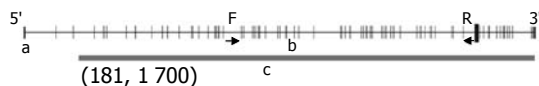


图1 人类EDNRB基因CpG岛。a: 转录起始位点; b: CG位点; c: CpG岛。F: forward primer; R: reverse primer。

CpG岛。用Methyl Primer Express v1.0设计亚硫酸氢盐测序PCR(bisulfite sequencing PCR, BSP)引物, 甲基化引物: forward primer, 5'-AAAAG-TATTTGTTTGATGGTAGTAGAGATT-3', reverse primer, 5'-CCTTCCTAATACCCTCTCAAC-TATTTT-3', 扩增产物长度为809 bp, 含有45个CG位点。CpG岛与引物设计位点见图1。

按照DNA提取试剂盒操作说明提取胃癌KATO III 细胞系和正常健康人外周血总DNA, 重亚硫酸盐将未甲基化C转化为U, BSP总反应体系为25 μ L, 其中引物各1 μ L, 甲基化修饰后的DNA 2 μ L, BSP反应条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min, 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 65 $^{\circ}$ C退火90 s, 72 $^{\circ}$ C延伸90 s, 循环35个周期后, 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min结束, BSP后的产物采用TA克隆将其连接到pMD18-T质粒载体, 转化至DH5 α 感受态细胞后挑选10个阳性克隆测序, 测序结果采用BiQ Analyzer^[10]分析。

1.2.2 RT-PCR检测EDNRB基因mRNA表达: 按照RNAiso plus提取正常健康人外周血和胃癌KATO III 细胞系总RNA后进行RT-PCR扩增, 引物为: forward primer, 5'-CATCAAGCTGCTG-GCAGAGG-3', reverse primer, 5'-GATTCGCA-GATAACTTTTGTAG-3'。整个RT-PCR反应体系为50 μ L, RT-PCR反应条件为: 热启动94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 52 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 循环35个周期后, 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min结束。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内对照, 产物进行琼脂糖凝胶电泳后检测。

2 结果

2.1 EDNRB基因启动子甲基化状态 正常健康人外周血EDNRB基因启动子除第22个CG甲基化率为10%外, 其余位点均表现为无甲基化状态, 胃癌KATO III 细胞系1-9、14和15等CG位点表现为无甲基化或低甲基化状态($\leq 20\%$), 其余位点表现高甲基化状态($\geq 50\%$), 甲基化发生率显著高于健康人外周血, 高甲基化状态主要位于转录起始点上游, 预示该区域可能为EDNRB基因核心启动子(图2)。

2.2 EDNRB基因mRNA表达结果 健康人外周血

■ 研发前沿

EDNRB基因启动子甲基化改变导致肿瘤的发病机制是目前消化系统肿瘤领域的研究热点, 亟待解决的是EDNRB基因启动子区域每个CG位点甲基化状态。

■ 相关报道

目前众多文献报道EDNRB基因启动子在鼻咽癌、淋巴瘤、前列腺癌、食管癌和口腔鳞状细胞癌等患者肿瘤组织中呈高度甲基化状态, 其基因甲基化灭活直接与肿瘤发病机制相关。

■ 创新盘点

本文首次研究揭示EDNRB基因启动子45个CpG位点甲基化状态,证明EDNRB基因启动子甲基化灭活与基因表达缺失之间相关,对胃癌发病机制的进一步研究提供参考数据。

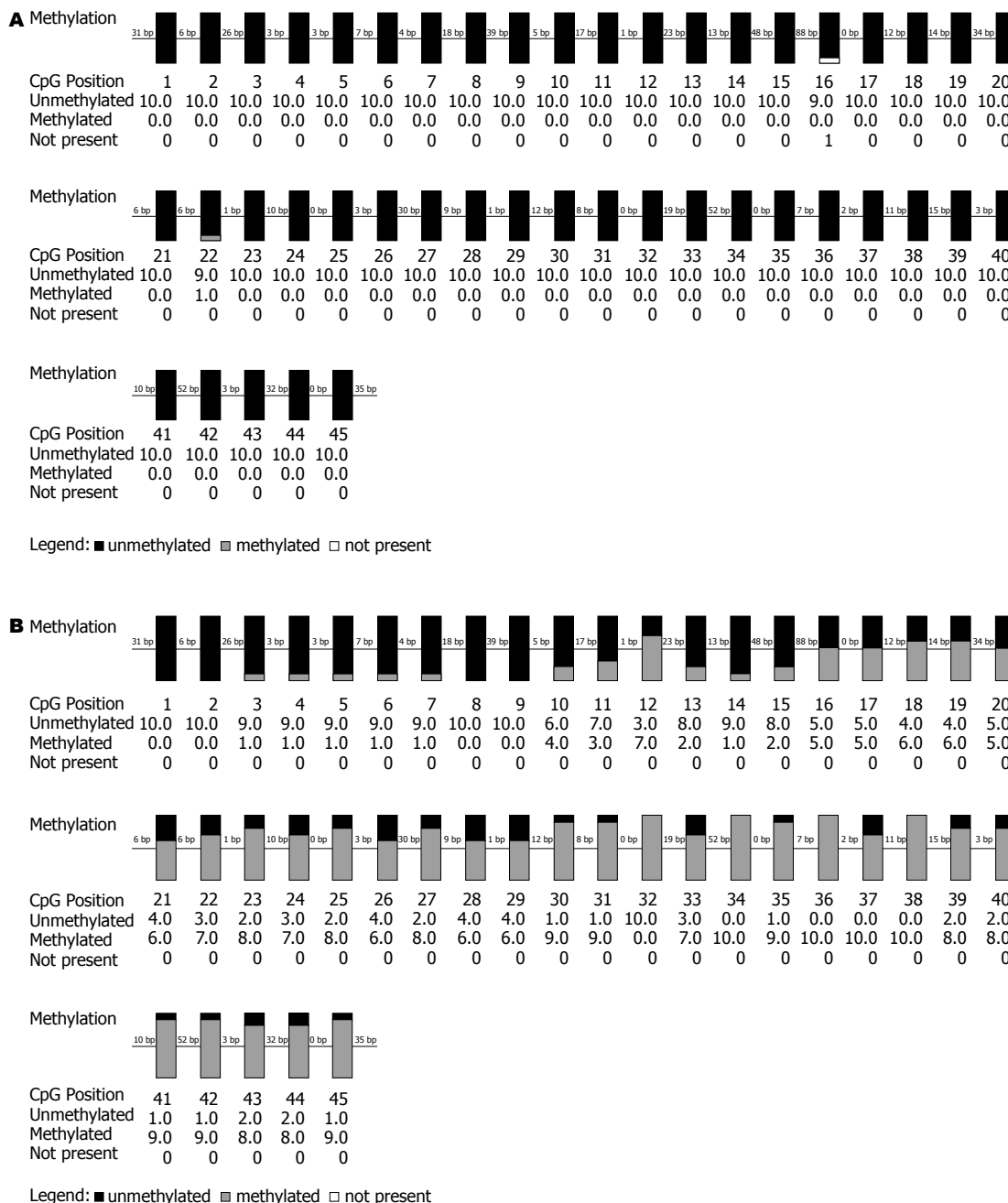


图2 EDNRB基因启动子在正常人外周血和胃癌KATO III细胞系中的甲基化状态。A: 正常人外周血; B: 胃癌KATO III细胞系。黑色: 未甲基化; 灰色: 甲基化; 白色: 缺失位点。

EDNRB基因mRNA表达显著高于胃癌KATO III细胞系, 后者表达明显受到抑制(图3)。

3 讨论

DNA甲基化是最早发现的基因转录前修饰途径之一。在DNA甲基转移酶作用催化下, 5'CpG中的胞嘧啶加上甲基基团而变成5'mCpG^[10]。在真核生物基因组中接近80%的CpG位点均被甲基化, 这些甲基化主要位于启动子区域的CpG岛^[11]。大量研究表明, DNA甲基化能引起染色质结构、DNA构象、DNA稳定性及DNA与蛋白质相互

作用方式的改变, 从而调控基因表达, 已经成为表观遗传学修饰的最重要的作用方式^[12]。

DNA甲基化在癌症的发生机制中扮演重要角色^[13], 许多文献报道DNA启动子区域高甲基化状态抑制或完全灭活基因表达而产生癌症, 大多数肿瘤细胞呈现高甲基化状态, DNA甲基化已经成为肿瘤诊断中的生物标志物^[14]。EDNRB基因介导细胞信号传递, 调控细胞增殖分化, 启动子区域甲基化状态抑制基因表达而导致细胞发生恶性增殖, 最终产生癌症, 目前研究表明鼻咽癌、前列腺癌和结直肠癌等众多癌症

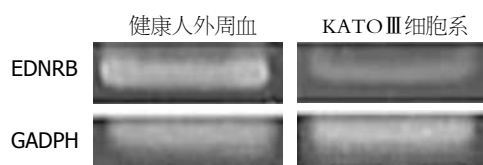


图 3 EDNRB基因mRNA在正常健康人外周血与胃癌KATO III 细胞系中的表达。

与EDNRB启动子高甲基化相关。胃癌KATOIII细胞系建系于1978年,属于腺癌细胞系^[16],目前已经成为研究胃癌发病机制的重要细胞系之一。本实验结果显示在胃癌KATOIII细胞系中, EDNRB基因表现为高甲基化状态,转录起始点上游核心启动子区域甲基化程度更高(甲基化率接近100%),其显著抑制EDNRB转录活性而导致mRNA表达降低,该结果预示胃癌患者EDNRB基因可能呈现高甲基化状态,检测该基因启动子甲基化程度可能为胃癌早期发现、治疗评估和预后预测提供一个重要的生物标志物。

4 参考文献

- 1 Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86: 485-498
- 2 Sánchez-Mejías A, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. New roles of EDNRB and EDN3 in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Genet Med* 2010; 12: 39-43
- 3 张万里, 王国斌, 陶凯雄. 内皮素B受体基因与先天性巨结肠关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2607-2611
- 4 Zhou L, Feng X, Shan W, Zhou W, Liu W, Wang L, Zhu B, Yi H, Yao K, Ren C. Epigenetic and genetic alterations of the EDNRB gene in nasopharyngeal carcinoma. *Oncology* 2007; 72: 357-363
- 5 Hsiao PC, Liu MC, Chen LM, Tsai CY, Wang YT, Chen J, Hsu LS. Promoter methylation of p16 and EDNRB gene in leukemia patients in Taiwan. *Chin J Physiol* 2008; 51: 27-31
- 6 Phé V, Cussenot O, Rouprêt M. Methylated genes as potential biomarkers in prostate cancer. *BJU Int* 2010; 105: 1364-1370
- 7 Ellinger J, Bastian PJ, Jurgan T, Biermann K, Kahl P, Heukamp LC, Wernert N, Müller SC, von Ruecker A. CpG island hypermethylation at multiple gene sites in diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Urology* 2008; 71: 161-167
- 8 Zhao BJ, Sun DG, Zhang M, Tan SN, Ma X. Identification of aberrant promoter methylation of EDNRB gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2009; 22: 55-61
- 9 Kaur J, Demokan S, Tripathi SC, Macha MA, Begum S, Califano JA, Ralhan R. Promoter hypermethylation in Indian primary oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 127: 2367-2373
- 10 Bock C, Reither S, Mikeska T, Paulsen M, Walter J, Lengauer T. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* 2005; 21: 4067-4068
- 11 Nagase H, Ghosh S. Epigenetics: differential DNA methylation in mammalian somatic tissues. *FEBS J* 2008; 275: 1617-1623
- 12 Feng J, Fan G. The role of DNA methylation in the central nervous system and neuropsychiatric disorders. *Int Rev Neurobiol* 2009; 89: 67-84
- 13 Zhang TY, Meaney MJ. Epigenetics and the environmental regulation of the genome and its function. *Annu Rev Psychol* 2010; 61: 439-66, C1-C3
- 14 Grønbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007; 115: 1039-1059
- 15 Qureshi SA, Bashir MU, Yaqinuddin A. Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer. *Int J Surg* 2010; 8: 194-198
- 16 Sekiguchi M, Sakakibara K, Fujii G. Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma. *Jpn J Exp Med* 1978; 48: 61-68

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价

本文选题新颖,对胃癌的临床治疗有一定的指导价值。

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊,并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前,我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录,全文免费向公众开放,见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任:程剑侠 2009-03-26)