

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201602002

· 论著 ·

颈静脉球体瘤中多种凋亡相关基因启动子 甲基化状态及意义分析

陈庆峰^{1,2,3}, 李熙烨^{1,2}, 朱伟栋^{1,2}, 汪照炎^{1,2}, 吴皓¹

(1. 上海交通大学医学院耳科学研究所, 上海 200092; 2. 上海交通大学医学院附属新华医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200092; 3. 上海交通大学医学院附属新华医院崇明分院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 202150)

摘要: **目的** 探讨颈静脉球体瘤中凋亡相关基因诱捕受体1 (decoy receptor 1, DcR1), 诱捕受体2 (DcR2), 死亡受体4 (death receptor 4, DR4), 死亡受体5 (DR5) 启动子甲基化状态及其临床意义。**方法** 采用甲基化特异性PCR (MSP) 检测12例颈静脉球体瘤中四个凋亡相关基因 DcR1、DcR2、DR4、DR5 启动子甲基化状态。同期收集腮腺良性肿瘤手术切除的正常耳大神经组织作为对照。**结果** 12例颈静脉球体瘤均存在甲基化, DcR1、DcR2、DR4、DR5 在颈静脉球体瘤中均存在不同程度的甲基化, 甲基化比率为 DcR1 36.4%、DcR2 41.7%、DR4 75.0%、DR5 33.3%; 正常对照中均无甲基化。且甲基化水平较高 (MI > 0.50) 的患者较甲基化水平低 (MI ≤ 0.05) 的患者发病年龄早 ($P = 0.0189$)。**结论** DcR1、DcR2、DR4、DR5 在颈静脉球体瘤中均存在甲基化, 且与肿瘤的发生相关, 甲基化水平高提示患者发病早, 疾病较为严重。DNA 甲基化是可逆过程, 可能成为今后靶向治疗的有效靶点。

关键词: 颈静脉球体瘤; DNA 甲基化; 甲基化特异性 PCR (MSP)

中图分类号: Q78; R739.91 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2016)02-0091-04

Hypermethylation and clinical significance of DcR1, DcR2, DR4, DR5 promoters in jugular paragangliomas

CHEN Qing-feng, LI Xi-ye, ZHU Wei-dong, WANG Zhao-yan, WU Hao

(Ear Institute, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China)

Abstract: **Objective** To analyze the methylation status of DcR1, DcR2, DR4, DR5 gene promoters in jugular paraganglioma and to study their clinical significance. **Methods** Methylation-specific PCR (MSP) was used to analyze the methylation of the 4 promoters in 12 jugular paragangliomas specimens. Great auricular nerve specimens obtained from patients suffering from benign tumor of parotid gland were chosen as control. **Results** All the four genes showed methylation of promoters in jugular paraganglioma with respective methylation rates of 36.4%, 41.7%, 75.0% and 33.3%. Nomethylation of promoters could be detected in the normal nerves. Patients with high methylation index (MI > 0.05) were younger at diagnosis than those with low methylation index (MI ≤ 0.05, $P = 0.0189$). **Conclusions** Methylation of DcR1, DcR2, DR4 and DR5 promoters exists in jugular paragangliomas and maybe associated with the genesis and development of this tumor. Due to its reversibility, methylation is a potential target for further targeted therapy of tumor.

Key words: Jugular paragangliomas; DNA methylation; Methylation-specific PCR

颈静脉球体瘤是一种少见的起源于胚胎神经嵴的头颈部副神经节瘤, 为无内分泌功能的副交感神经肿瘤。其发病率低于颈动脉体瘤, 常表现为搏动性耳鸣, 后组脑神经障碍^[1]。副神经节瘤多数为良

性肿瘤, 生长缓慢, 虽然属于良性肿瘤, 但由于周围存在重要神经血管结构, 手术难度大, 常预后不良^[2]。大部分的副神经节瘤为散发性, 来源于头颈部以下的副神经节瘤称为嗜铬细胞瘤, 最常见于肾上腺组织, 具有分泌儿茶酚胺类激素的内分泌功能。遗传性副神经节瘤患者常同时存在副神经节瘤与嗜铬细胞瘤。表观遗传学主要研究由非 DNA 序列改变引起的基因表达的可遗传改变, 目前有报道在嗜

基金项目: 国家自然科学基金资助 (81371086)。
作者简介: 陈庆峰, 男, 研究生在读, 主治医师。
通信作者: 汪照炎, Email: wzyent@163.com

铬细胞瘤、副神经节瘤和其他神经来源肿瘤中存在 DNA 甲基化,组蛋白甲基化等表观遗传修饰现象^[3-4]。本研究收集了颈静脉球体瘤患者 12 例,采用甲基化特异的 PCR (MSP) 检测 4 个凋亡相关基因诱捕受体 1 (decoy receptor 1, DcR1)、DcR2、死亡受体 4 (death receptor 4, DR4)、DR5 的启动子甲基化情况,初步探讨 DcR1、DcR2、DR4、DR5 基因启动子甲基化与散发性 HNPGL 的发生发展的关系,为今后靶向治疗寻找可能的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 标本来源 收集从 2013 年 9 月~2015 年 9 月上海交通大学附属新华医院耳鼻咽喉头颈外科采用手术治疗的 12 例颈静脉球体瘤患者的组织标本,男 2 例,女 10 例;年龄 24~57 岁,平均 42.6 岁。其中单发性颈静脉球体瘤 9 例,颈静脉球体瘤合并双侧颈动脉体瘤 3 例。所有患者临床资料完整,均经术前影像学诊断、术中确认肿瘤来源和术后病理证实。同期收集腮腺良性肿瘤手术切除的正常耳大神经组织作为对照。所有标本收集后于液氮中保存。

1.1.2 主要试剂 血液组织细胞基因组提取试剂盒, DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒, 甲基化特异性 PCR 试剂盒, 琼脂糖购自天根生化科技有限公司; SssI 甲基转移酶购自 New England Biolabs 公司; Gel-red 购自 Biotium Inc 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 组织基因组 DNA 提取及 DNA 亚硫酸氢盐处理 按照 DNA 提取试剂盒说明提取副神经节瘤组织、正常耳大神经标本的基因组 DNA, 所得 DNA 浓度 100 ng/ μ L, 于 -20°C 保存。取 1 μ g 正常耳大

神经基因组 DNA 经 SssI 甲基转移酶处理用作阳性对照。按照重亚硫酸盐转化试剂盒说明处理 1 μ g 组织标本基因组 DNA 或甲基化处理的基因组 DNA 用于后续 PCR 实验, 于 -20°C 保存。

1.2.2 甲基化特异性 PCR (MSP) DcR1、DcR2、DR4、DR5 基因启动子甲基化检测采用 MSP 法, PCR 引物及反应条件参考相关文献^[5-6]。取 5 μ L PCR 产物于 Gel-red 预染的 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外光成像。以正常耳大神经 DNA 为阴性对照, 经 SssI 甲基转移酶处理的耳大神经 DNA 为阳性对照, 纯水为空白对照。仅非甲基化特异性引物有扩增产物, 为非甲基化 (U), 甲基化特异性引物有扩增产物, 为甲基化 (M)。

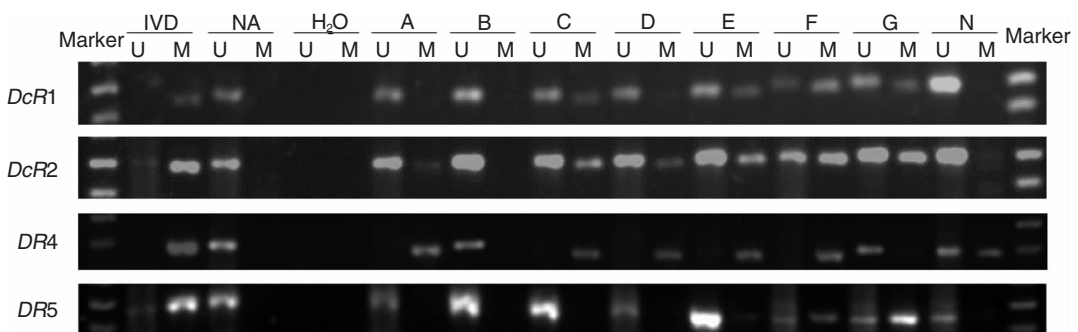
1.3 统计学处理

所有数据均采用 SAS 8.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以频数表示, Fisher 确切概率法及 Wilcoxon 秩和检验用于统计分析, 所有检验均为双侧, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DcR1、DcR2、DR4、DR5 基因启动子在颈静脉球体瘤中甲基化情况

部分组织标本 MSP 结果如图 1 所示, 阴性对照即正常耳大神经 DNA 四个基因启动子均为非甲基化状态。而在 12 例颈静脉球体瘤组织标本中有 11 例 (91.7%) 肿瘤组织中 DcR1、DcR2、DR4、DR5 基因启动子呈现不同甲基化程度, 甲基化百分比分别为 DcR1 (36.4%)、DcR2 (41.7%)、DR4 (75.0%)、DR5 (33.3%)。以甲基化指数 (methylation index, MI) 即甲基化基因数/检测基因数, 评定肿瘤个体甲基化情况, 12 例颈静脉球体瘤 $MI = 0.46 \pm 0.30$ 。



U: 非甲基化特异性条带; M: 甲基化特异性条带; IVD: 阳性对照; NA: 阴性对照; H₂O: 空白水对照; Marker: DNA Ladder

图 1 4 种基因在颈静脉球体瘤中 MSP 结果

2.2 DcR1、DcR2、DR4、DR5 基因启动子在颈静脉球体瘤甲基化与临床联系

按照 MI 指数,将 12 例颈静脉球体瘤分为两组。其中 $MI \leq 0.50$ 组 8 例(75%), $MI > 0.50$ 组 4 例(25%),两组患者的临床资料统计见表 1。两组患者肿瘤 4 个基因甲基化程度不同,患者性别、侧别以及合并颈动脉体瘤多发差异无统计学意义($P > 0.05$)。 $MI > 0.50$ 的患者较 $MI \leq 0.50$ 患者发病年龄为(29.5 ± 6.4)岁、(45.6 ± 10.5)岁,差异具有统计学意义($P = 0.0189$),即肿瘤甲基化程度高患者发病早,但两组患者肿瘤大小无明显差异。12 例中有 9 例为单侧颈静脉球体瘤,3 例为颈静脉球体瘤合并双侧颈动脉体瘤即多发性副神经节瘤。单发性组与多发性组相比,发病年龄,肿瘤大小,MI 差异均无统计学意义($P > 0.05$),具体临床资料见表 2。

表 1 不同甲基化程度颈静脉球体瘤临床资料统计分析 ($\bar{x} \pm s$)

临床资料	$MI \leq 0.50$	$MI > 0.50$	P
男/女(例)	1/7	1/3	1.0000
平均发病年龄(岁)	45.6 ± 10.5	29.5 ± 6.4	0.0189
肿瘤最大直径(mm)	32.7 ± 12.7	31.25 ± 5.8	0.8322
单发/多发(例)	3/2	6/1	0.5227
右侧/左侧(例)	5/3	2/2	1.0000

表 2 单发性与多发性颈静脉球体瘤临床资料统计分析 ($\bar{x} \pm s$)

临床资料	单发性	多发性	P
男/女(例)	2/7	0/3	1.0000
平均发病年龄(岁)	39.33 ± 11.00	43.00 ± 17.06	0.6681
肿瘤最大直径(mm)	32.76 ± 12.15	30.67 ± 4.51	0.7826
右侧/左侧(例)	6/3	1/2	0.5227
MI	0.42 ± 0.28	0.58 ± 0.38	0.4282

3 讨论

DNA 甲基化是一种重要的表观遗传学修饰,在真核生物中胞嘧啶 5' 碳基位共价结合一个甲基基团,会显著影响基因表达^[7]。DNA 甲基化修饰与表观遗传学的基因印记、X 染色体失活、染色体结构修饰等现象都密切相关,在细胞分化、胚胎发育、肿瘤形成、细胞衰老等过程也发挥重要作用^[8-9]。与基因改变不同,DNA 甲基化修饰是一个可逆的过程。启动子区域的高甲基化将会导致转录抑制以及基因表达沉默^[10]。颈静脉球体瘤作为头颈部副神经节

瘤,与嗜铬细胞同样来源于胚胎神经嵴细胞,但无内分泌功能。目前有报道嗜铬细胞瘤中存在多个抑癌基因的甲基化现象,且与肿瘤恶性行为相关^[3,11]。因此,DNA 甲基化对颈静脉球体的发生发展相关。

DcR1、DcR2、DR4、DR5 是肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)的 4 个受体,在正常细胞中均有表达,对细胞凋亡调控发挥着重要的作用^[5]。DR4、DR5 与 TRAIL 结合能够促进细胞凋亡,而 DcR1、DcR2 由于缺少功能性结构域,虽能与 TRAIL 结合但是不能诱导细胞凋亡,在正常细胞中 DcR1、DcR2、DR4、DR5 共同作用调节细胞凋亡。TRAIL 能够选择性诱导促进肿瘤细胞的凋亡,而不影响正常细胞。正常细胞中 DcR1、DcR2、DR4、DR5 均无甲基化,而多个肿瘤细胞中都存在甲基化现象,并且有表达下调^[5-6]。在嗜铬细胞瘤及神经母细胞瘤中也存在 DcR1、DcR2、DR4、DR5 不同程度甲基化。

本文对 12 例颈静脉球体瘤进行了 DcR1、DcR2、DR4、DR5 甲基化情况分析,与嗜铬细胞瘤相似,在颈静脉球体瘤中存在 DcR1、DcR2、DR4、DR5 甲基化,其中 DR4 甲基化为 75.0% 高于 50%,提示在颈静脉球体瘤中 DR4 甲基化较为常见。不同颈静脉球体瘤个体中,呈现不同的甲基化状态,按照 MI 指数分为两组,甲基化水平高的一组($MI > 0.50$)较甲基化水平低的一组($MI \leq 0.50$)发病早,提示 DcR1、DcR2、DR4、DR5 甲基化在颈静脉球体瘤的发生发展中发挥重要作用,其原因可能是由于启动子甲基化抑制基因表达,导致细胞凋亡调控的改变。

单发性组与多发性组相比,临床资料及甲基化程度均无显著性差异。副神经节瘤中 30% 为遗传性,与编码琥珀酸脱氢酶的 SDHx 基因突变有关,遗传性副神经节瘤患者常表现为多发性肿瘤,而散发性则为单发性^[12]。因此单发性组与多发性组甲基化程度无显著性差异,可能存在基因突变的遗传学变异,而 DNA 甲基化作为一种表观遗传学调控,是对基因改变的一种补充机制,有待于今后更深层次进一步研究。

DNA 甲基化等表观遗传学改变,极大地丰富了生物体基因的多变性。因其不涉及 DNA 序列改变,DNA 甲基化与组蛋白修饰都是可逆过程,靶向干预相关酶的药物今后有望成为新的有效的治疗手段。

参考文献:

- [1] Offergeld C, Brase C, Yaremchuk S, et al. Head and neck paragangliomas: clinical and molecular genetic classification[J]. Clinics (Sao Paulo), 2012, 67 Suppl 1: 19-28.
- [2] Boedeker CC, Ridder G J and Schipper J. Paragangliomas of the head and neck: diagnosis and treatment[J]. Fam Cancer, 2005, 4(1): 55-59.
- [3] Geli J, Kiss N, Karimi M, et al. Global and regional CpG methylation in pheochromocytomas and abdominal paragangliomas; association to malignant behavior [J]. Clinical Cancer Research, 2008, 14(9): 2551-2559.
- [4] Margetts CD, Astuti D, Gentle DC, et al. Epigenetic analysis of HIC1, CASP8, FLIP, TSP1, DCR1, DCR2, DR4, DR5, KvDMR1, H19 and preferential 11p15.5 maternal-allele loss in von Hippel-Lindau and sporadic pheochromocytomas[J]. Endocr Relat Cancer, 2005, 12(1): 161-172.
- [5] Noesel MM, Bezouw S, Salomons GS, et al. Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation[J]. Cancer Res, 2002, 62(7): 2157-2161.
- [6] Venza M, Visalli M, Catalano T, et al. Impact of DNA methyltransferases on the epigenetic regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in malignant melanoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 441(4): 743-750.
- [7] Jones P A. The DNA methylation paradox[J]. Trends in Genetics, 1999, 15(1): 34-37.
- [8] De Smet C, Lurquin C, Lethe B, et al. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line-and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(11): 7327-7335.
- [9] Baysal BE. Genomic imprinting and environment in hereditary paraganglioma[J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2004, 129C(1): 85-90.
- [10] Liu L, Wylie RC, Andrews LG, et al. Aging, cancer and nutrition; the DNA methylation connection[J]. Mechanisms of ageing and development, 2003, 124(10): 989-998.
- [11] Kiss N, Geli J, Lundberg F, et al. Methylation of the p16INK4A promoter is associated with malignant behavior in abdominal extra-adrenal paragangliomas but not pheochromocytomas [J]. Endocr Relat Cancer, 2008, 15(2): 609-621.
- [12] Neumann HP, Erlic Z, Boedeker CC, et al. Clinical predictors for germline mutations in head and neck paraganglioma patients: cost reduction strategy in genetic diagnostic process as fall-out [J]. Cancer Res, 2009, 69(8): 3650-3656.

(收稿日期:2015-12-01)

· 消息 ·

敬请关注《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》官方微信平台



《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》官方微信已正式上线启动(微信号: ebyhld2016),通过微信平台,可在线浏览杂志官方网站、当期杂志摘要、目录索引、过刊内容、投稿须知等信息,敬请关注!

请扫描二维码,或是搜索“中国耳鼻咽喉颅底外科杂志”即可进入我刊官方微信平台。