

. 实验研究 .

脑膜瘤 MLH1 启动子甲基化水平及临床意义

袁国强 周旺宁 魏乃礼 王晓清 马克君 苏 愚 梁文涛 潘亚文

【摘要】目的 探讨脑膜瘤 mutL 同源基因 1 (MLH1) 启动子甲基化水平与脑膜瘤侵袭性的相关性。**方法** 从我院标本库随机选取 64 例脑膜瘤石蜡包埋组织标本, 其中侵袭性脑膜瘤 26 例, 非侵袭性脑膜瘤 38 例。应用逆转录-PCR 检测 MLH1 mRNA 表达水平, 应用特异高分辨率熔解 (MS-HRM) 曲线检测不同侵袭性脑膜瘤 MLH1 启动子甲基化水平。**结果** 侵袭性脑膜瘤 MLH1 mRNA 含量比非侵袭性脑膜瘤显著降低 ($P<0.05$)。MS-HRM 曲线分析显示, 侵袭性脑膜瘤 MLH1 启动子区高度甲基化水平为 0~1% 所占比例 (7.7%, 2/26) 显著低于非侵袭性脑膜瘤 (55.3%, 21/38; $P<0.05$)。**结论** MLH1 启动子区甲基化可能下调 MLH1 的表达, 进而调控脑膜瘤侵袭性行为。

【关键词】 脑膜瘤; 侵袭性; mutL 同源基因 1; 启动子; 甲基化
【文章编号】 1009-153X(2015)03-0158-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Level of MLH1 pomoter methylation and its clinical meanings in meningiomas

YUAN Guo-qiang¹, ZHOU Wang-ning², WEI Nai-li², WANG Xiao-qing¹, MA Ke-jun³, Pan Ya-wen¹. 1. Neurology Institute, The Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China; 2. Department of Neurosurgery, The Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China; 3. Center Laboratory, The Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China

【Abstract】 Objective To establish a method to determine mut L momolog1 (MLH1) promoter methylation level in the meningiomas and analyze the relationship between MLH1 methylation level and meningioma invasiveness. **Methods** DNA was extracted from 64 samples of the meningiomas, of which, 26 were invasive meningiomas and 38 non-invasive ones, and the methylation modification of DNA was performed according to instruction book. The standard methylation MLH1 DNA was diluted by non-methylation MLH1 DNA in different proportion of 100%, 50%, 25%, 12.5% and 1% to establish the standard methylation sensitive high resolution melting curve. MLH1 promoter methylation level was determined quantitatively by the method of MS-HRM method in all the invasive meningiomas and non invasive meningiomas. The relationship of MLH1 promoter methylation level with meningioma invasiveness was analyzed. **Result** MLH1 promoter methylation level was significantly higher in the invasive meningiomas than that in the non invasive meningiomas ($P<0.01$). **Conclusion** The present result suggests that MLH1 promoter methylation level may play an important role in the pathogenesis of the invasiveness of the meningiomas.

【Key words】 Meningioma; Invasiveness; MLH1 promoter; Methylation; Level

脑膜瘤起源于覆盖大脑和脊髓的脑膜, 属于中枢神经系统肿瘤。根据世界卫生组织脑膜瘤组织学分类标准, 脑膜瘤分为良性 (Ⅰ级)、非典型性 (Ⅱ级) 和间变性或恶性 (Ⅲ级), 分别占脑膜瘤的 80%、15% 和 5%^[1-3]。恶性脑膜瘤通常呈侵袭性生长, 容易复发, 患者无进展生存期和总体生存期明显缩短。由于恶性脑膜瘤的诊断水平远不及良性或非典型性脑膜瘤, 任何遗传或表观遗传的进步, 包括恶性的转

化, 也能提供新的诊断和治疗思路。DNA 甲基化是在 DNA 甲基化转移酶的作用下将 CpG 二核苷酸 5' 端的胞嘧啶转变为 5'-甲基胞嘧啶, 是基因表观修饰方式之一。这种 DNA 修饰方式虽没改变基因序列, 但却调控基因表达, 能关闭某些基因活性^[4]。DNA 甲基化与肿瘤形成密切相关。已发现人类多种肿瘤热点区域 (包括 CpG 岛) DNA 高度甲基化^[5, 6]。

mutL 同源基因 1 (mutL homolog 1, MLH1) 是一个错配修复基因, 负责纠正 DNA 复制过程中发生错配的片段, 在维持遗传稳定性方面发挥重要作用。研究显示 MLH1 启动子甲基化与其表达降低有关, 是肿瘤发生的早期事件。MLH1 启动子甲基化是脑膜瘤表观遗传学改变, 与脑膜瘤级别有关^[7]。我们将用甲基化特异高分辨率熔解 (methylation sensitive high resolution melting, MS-HRM) 曲线检测 MLH1 启

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2015.03.010
基金项目: 兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金 (lzujbky-2013-146)
作者单位: 730030 兰州, 兰州大学第二医院神经病学研究所 (袁国强、王晓清、潘亚文), 神经外科 (周旺宁、魏乃礼、苏 愚、梁文涛), 中心实验室 (马克君)
通讯作者: 潘亚文, E-mail: panyawen666@sohu.com

动子甲基化水平,并探讨其与脑膜瘤侵袭性的关系。

1 资料与方法

1.1 样本来源 随机从兰州大学第二医院神经病学研究所标本库中选取脑膜瘤石蜡标本 64 例,所选标本均经过临床诊断和病理学证实。按照曾令成等^[8]脑膜瘤侵袭性行为判断标准,将所选标本分为侵袭性脑膜瘤(26 例)和非侵袭性脑膜瘤(38 例)。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 检测 MLH1 mRNA 的表达 TRIzol 法提取组织总 RNA, Nanodrop2000(美国 Thermo 公司)测定纯度和浓度,取总 RNA 2 ng,反转录合成 cDNA,以 15 μl 体系进行 PCR 扩增,反应条件:95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 15 s; 60 ℃ 退火延伸 30 s;72 ℃ 终末延伸 30 s, 40 个循环,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)作为内参,引物由生物工程(上海)股份有限公司合成。MLH1 引物上游序列为 5'-TGTGCTGGCAATCAAGGGAC-3',下游序列为 5'-TGTCCACGGTTGAGGCATTG-3';内参 GAPDH 引物上游序列为 5'-TGCA CCACCAACTGCTTAG-3',下游序列为 5'-GAGGCA GGGATGATGTTC-3'。

1.2.2 石蜡组织 DNA 提取 使用 QIAamp-DNA-FPE-Tissue-Kit 试剂盒(德国 QIAGEN 公司)从石蜡包埋组织提取 DNA。采用 Nanodrop2000 测定 DNA 浓度,并定量至 5 ng/μl,置于-20 ℃ 冰箱待用。

1.2.3 亚硫酸钠进行基因组 DNA 甲基化修饰 取上述 DNA 样本 10 ng,使用 CpGenome 甲基化试剂盒(德国 QIAGEN 公司),按照 Bisulfite-Kit 试剂盒(德国 QIAGEN 公司)说明书进行甲基化修饰,之后用 Nanodrop2000 定量至 5 ng/μl。

1.2.4 标准品的配制和 MS-HRM 曲线的建立 使用软件 MethyPrimer 设计 MLH1 启动子区引物,并由生物工程(上海)股份有限公司合成。上、下游引物分别是:5'-AGTTTTTAAAAACGAATTAATAGGAAGAG-3' 和 5'-ACTACCCGCTACCTAAAAAATATAC-3',扩增长度 81 bp。PCR 反应体系为:总反应体积为 25 μl, 2×HRM PCR Master Mix 12.5 μl,引上、下游引物各 1.9 μl, DNA 模板 2 μl,灭菌水补足 25 μl。反应程序:预变性 95 ℃ 5 min;扩增 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 15s, 72 ℃ 25s,共 50 个循环;熔解 95 ℃ 1 min, 40 ℃ 1 min, 65 ℃ 1 s。HRM 条件为:95 ℃ 2 min, 40 ℃ 预处理 2 min 后,解链温度 72~90 ℃,每升高 0.1 ℃ 采集 1 次数据。

以 Cp Genome universal methylated 作为 100% 甲基化的标准品,以 100% 非甲基化的健康人组织 DNA 作为稀释剂,将两者浓度调至相同水平,按不同比例分别配成甲基化程度为 100%、50%、25%、12.5% 和 1% 系列浓度的标准曲线。用 MS-HRM 方法检测 0~100% 标准品得到的荧光信号的强度。据此建立标准曲线。同时以修饰后标本的 DNA 为模板,用上述相同方法检测,根据待测标本在标准曲线上的位置判定其甲基化程度。每份标本重复检测 3 次,最后结果为其平均甲基化程度。

1.2.5 统计学分析 用 SPSS 10.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑膜瘤 MLH1 基因 mRNA 表达的比较 非侵袭性脑膜瘤均可见 MLH1 表达,而在 26 例侵袭性脑膜瘤中 4 例未见 MLH1 表达,22 例可检测到 MLH1 mRNA 表达。侵袭性脑膜瘤 MLH1 mRNA 基因表达阳性率(84.6%, 22/26)明显低于非侵袭性脑膜瘤(100%, 38/37; *P* < 0.05)。侵袭性脑膜瘤 MLH1 mRNA 表达水平(0.139 ± 0.010)显著低于非侵袭性脑膜瘤(0.550 ± 0.039; *P* < 0.05)。见图 1。

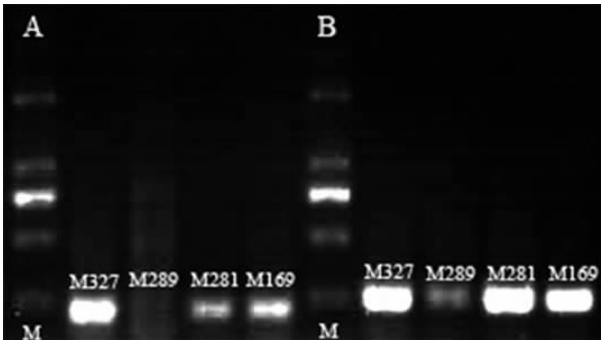


图 1 脑膜瘤组织 MLH1 mRNA 表达的电泳图
A. MLH mRNA; B. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 mRNA;
M327 和 M289 为侵袭性脑膜瘤;M281 和 M168 为非侵袭性脑膜瘤;M 为 Marker;MLH1:mutL 同源基因 1

2.2 MS-HRM 法绘制甲基化标准曲线和检测肿瘤标本甲基化程度结果 1%、12.5、25%、50% 和 100% 甲基化标准品的 HRM 曲线从左往右依次排列,而后通过测定曲线位置判定所有标本中 MLH1 启动子甲基化程度。检测结果显示,MLH1 启动子甲基化水平 50%~100% 在侵袭性脑膜瘤标本中有 4 例,而非侵袭性脑膜瘤未发现;MLH1 启动子甲基化水平 25%~50% 在侵袭性脑膜瘤标本中有 8 例(30.8%),而在非

侵袭性脑膜瘤 2 例(5.3%),两者差异显著($P<0.05$); MLH1 启动子甲基化水平 0%~1%在侵袭性脑膜瘤标本中有 2 例(7.7%),而在非侵袭性脑膜瘤 21 例(55.3%),两者差异显著($P<0.01$)。详见表 1。

表 1 侵袭性与非侵袭脑膜瘤 MLH1 基因启动子甲基化水平比较(例)

甲基化水平	侵袭性脑膜瘤	非侵袭性脑膜瘤
50%~100%	4(15.4%)	0
25%~50%	8(30.8%)*	2(5.3%)
12.5~25%	5(19.2%)	4(10.5%)
1%~12.5%	7(26.9%)	11(28.9%)
0%~1%	2(7.7%)*	21(55.3%)

注:与非侵袭性脑膜瘤相应值比,* $P<0.05$;MLH1:mutL 同源基因 1

3 讨论

肿瘤抑制基因 DNA 的甲基化导致该基因转录失活,这一重要作用机制在人类癌症发生过程中已被证实^[9]。研究显示,结肠癌 MLH1 特殊位点单核苷酸多态性倾向于促进包括 MLH1 启动子在内的片段发生甲基化,引起启动子沉默,进而 MLH1 蛋白和基因表达降低,最后导致微卫星不稳定性^[10,11]。

本研究发现在不同侵袭性脑膜瘤间 MLH1 mRNA 含量存在显著性差异,侵袭性脑膜瘤表达水平较非侵袭性脑膜瘤低,提示 MLH1 基因表达下调可能参与脑膜瘤的侵袭。MS-HRM 法检测结果显示,MLH1 启动子甲基化水平 50%~100%在侵袭性脑膜瘤标本中有 4 例,而非侵袭性脑膜瘤未发现; MLH1 启动子甲基化水平 25%~50%在侵袭性脑膜瘤标本中有 8 例(30.8%),而在非侵袭性脑膜瘤 2 例(5.3%),两者差异显著($P<0.05$)。可见 MLH1 启动子甲基化水平影响脑膜瘤侵袭性行为,提示启动子区 CpG 岛甲基化是 MLH1 转录失活的可能机制。在部分甲基化水平 50%~100%的病例中,同样检测到 MLH1 mRNA 的表达,可能与基因启动子区域 CpG 岛甲基化的密度相关,低密度的 CpG 岛甲基化只能使部分(67%~90%)的转录被抑制,只有 CpG 岛呈高度甲基化时,才表现为基因转录的完全抑制。

我们推测,MLH1 启动子区在侵袭性脑膜瘤中异常高甲基化,可能是 MLH1 基因表达下调的重要机制之一,进而调控脑膜瘤侵袭性行为。这不仅为

研究脑膜瘤的发病机制提供了线索,而且对侵袭性的诊断和治疗也具有重要的意义。

【参考文献】

[1] Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G. Molecular pathogenesis of meningiomas [J]. J Neurooncol, 2004, 70: 183-202.

[2] Mawrin C, Perry A. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas [J]. J Neurooncol, 2010, 99: 379-391.

[3] Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, et al. "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications [J]. Cancer, 1999, 85: 2046-2056.

[4] Dahl C, Goldberg P. DNA methylation analysis to techniques [J]. Biogerontology, 2003, 4(4): 233-250.

[5] de Bustros A, Nelkin BD, Silverman A, et al. The short arm of chromosome 11 is a "hot spot" for hypermethylation in human neoplasia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 5693-5697.

[6] Berman BP, Weisenberger DJ, Aman JF, et al. Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains [J]. Nat Genet, 2011, 44: 40-46.

[7] Chen MN, Wang P, Zhang J, et al. Analysis of the role of hMLH1 hypermethylation and microsatellite instability in meningioma progression [J]. Genet Mol Res, 2012, 11(4): 3933-3941.

[8] 曾令成,欧一博,雷霆,等. LRIG1 在脑膜瘤中的表达及与其生物学行为的关系[J]. 中国临床神经外科杂志, 2007, 12(10): 601-604.

[9] Issa JP. CpG island methylation phenotype in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4: 988-993.

[10] Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability [J]. Cancer Res, 1998, 58: 3455-3460.

[11] Mrkonjic M, Roslin NM, Greenwood CM, et al. Specific variants in the MLH1 gene region may drive DNA methylation, loss of protein expression, and MSI-H colorectal cancer [J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13314.

(2014-10-28 收稿, 2014-12-10 修回)