

脑胶质瘤组织时钟基因启动子区甲基化状态及意义

杜权 俞文华 董晓巧 朱强 车志豪 王昊 杨定博 沈永锋 江力

【摘要】目的 探讨脑胶质瘤组织中 PER1、PER2、CRY1、CRY2、CLOCK、BMAL1 和 NPAS2 时钟基因启动子区甲基化状态与脑胶质瘤发生、发展的关系。**方法** 采用甲基化特异性 PCR 检测脑胶质瘤组织及其癌旁正常组织(对照)PER1、CRY1、CRY2、CLOCK、BMAL1、NPAS2 等时钟基因启动子区甲基化状态。**结果** 脑胶质瘤组织与癌旁正常组织中 PER1、CLOCK 时钟基因启动子区均未有甲基化;脑胶质瘤组织中 NPAS2、PER2 时钟基因启动子区甲基化频率明显高于癌旁正常组织(均 $P < 0.05$);两种组织中 CRY1、CRY2 和 BMAL1 时钟基因启动子区甲基化频率比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。不同级别脑胶质瘤组织中 PER1、CLOCK 时钟基因启动子区均未有甲基化;高级别脑胶质瘤(Ⅲ~Ⅳ级)组织中 NPAS2 时钟基因启动子区甲基化频率高于低级别胶质瘤(Ⅰ~Ⅱ级)组织($P < 0.05$);不同级别脑胶质瘤组织中 CRY1、CRY2、BMAL1 和 PER2 时钟基因启动子区甲基化频率比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。**结论** NPAS2、PER2 时钟基因启动子区甲基化频率明显增高;NPAS2 时钟基因启动子区甲基化频率越高,脑胶质瘤的恶性程度越高。NPAS2、PER2 时钟基因启动子区 DNA 甲基化修饰可能是脑胶质瘤发生、发展的重要机制。

【关键词】 脑胶质瘤 启动子区 甲基化 时钟基因

Methylation status of clock gene promoter region in glioma patients DU Qian, YU Wenhua, DONG Xiaojiao, et al. Department of Neurosurgery, Hangzhou First People's Hospital, Nanjing Medical University, Hangzhou 310006, China

【Abstract】Objective To investigate the methylation status of PER1, PER2, CRY1, CRY2, CLOCK, BMAL1 and NPAS2 gene promoter regions in glioma tissues and its clinical significance. **Methods** The frequencies of methylation of PER1, PER2, CRY1, CRY2, CLOCK, BMAL1 and NPAS2 gene promoters were determined in glioma tissues and in surrounding non-glioma tissues (control group) were detected by methylation-specific PCR method. **Results** PER1 and CLOCK genes were devoid of methylation in promoter region. Differences in the promoter methylation frequencies of CRY1, CRY2 and BMAL1 genes between glioma and control group were not significant ($P > 0.05$). Promoter methylation frequencies of NPAS2 and PER2 genes were significantly elevated in glioma tissue compared to control group ($P < 0.05$), and moreover, promoter methylation frequency of NPAS2 was enhanced with increasing extent of malignancy ($P < 0.05$). **Conclusion** DNA-methylation modification in the promoter of NPAS2 and PER2 genes may be an important mechanism underlying occurrence and development of glioma.

【Key words】 Glioma Promoter Methylation Clock gene

昼夜节律是自然界所有生物体具有的特征,昼夜节律系统受时钟基因所编码的蛋白质调节^[1-2]。研究发现,时钟基因功能紊乱与肿瘤的发生、发展密切相关^[3]。而基因启动子区甲基化可以改变目的基因的表达状态,从而影响胶质瘤的生长^[4]。新近的研究已证实 PER1、PER2、CRY1、CRY2、CLOCK、BMAL1 和 NPAS2 等时钟基因启动子区甲基化与胃癌、肝癌、乳癌等恶性肿瘤的发生、发

展密切相关^[5-7]。笔者就脑胶质瘤以上时钟基因启动子区甲基化状态进行了研究,并探讨这些变化与脑胶质瘤发生、发展的关系,现将结果报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2005 年 6 月至 2010 年 6 月在本院神经外科手术的 102 例初发脑胶质瘤患者为研究对象。其中男 63 例,女 39 例;年龄 ≤ 60 岁 60 例, > 60 岁 42 例;WHO 分级:Ⅰ~Ⅱ级 49 例,Ⅲ~Ⅳ级 53 例;肿瘤部位:幕上 86 例,幕下 16 例;肿瘤类型:星形细胞瘤 68 例,其他 34 例;肿瘤直径: ≤ 5 cm 70 例, > 5 cm 32 例;术前卡氏功能状态评分(KPS): ≥ 80 分 42 例, < 80 分 60 例。其中肿瘤全部切除 72 例;术后化疗 56 例,术后放疗

doi:10.12056/j.issn.1006-2785.2017.39.19.2016-1656

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2014KYA168)

作者单位:310006 杭州市第一人民医院(南京医科大学附属杭州医院)神经外科

通信作者:俞文华, E-mail: ywh699@126.com

77 例。所有患者为汉族人,均未合并其他恶性肿瘤,直系亲属均排除胶质瘤病史。

1.2 方法 术中收集脑胶质瘤组织及其癌旁正常组织(对照),采用甲基化特异性 PCR 检测 PER1、PER2、CRY1、CRY2、CLOCK、BMAL1 和 NPAS2 等时钟基因启动子区甲基化状态。使用 DNA 组织提取试剂盒(产品规格 250 次,批号 Z3105,由美国 Promega 公司提供)提取肿瘤组织及正常脑组织的基因组 DNA,使用甲基化特异性 PCR 试剂盒(产品规格 60 次,批号 EM101,由美国 Millipore 公司提供)对基因组 DNA 进行亚硫酸氢钠修饰,修饰后的 DNA 进行 PCR 扩增,时钟基因的引物参照文献[8],产物于 4% 琼脂糖凝胶上进行电泳,在紫外仪下观察并记录结果。为了确定甲基化特异性和 PCR 特异性,以甲基转移酶处理的基因组 DNA 作为阳性对

照、未经处理的基因组 DNA 作为阴性对照。

1.3 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件。计数资料用率表示,组间比较采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑胶质瘤组织与癌旁正常组织中时钟基因启动子区甲基化频率的比较 脑胶质瘤组织与癌旁正常组织中 PER1、CLOCK 时钟基因启动子区均未有甲基化;脑胶质瘤组织中 NPAS2、PER2 时钟基因启动子区甲基化频率明显高于癌旁正常组织(均 $P < 0.05$);两种组织中 CRY1、CRY2 和 BMAL1 时钟基因启动子区甲基化频率比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 1。

表 1 脑胶质瘤患者与癌旁正常组织中时钟基因启动子区甲基化频率的比较[例(%)]

时钟基因	n	PER1	PER2	CRY1	CRY2	CLOCK	BMAL1	NPAS2
脑胶质瘤组织	102	0(0.0)	10(9.8)	11(10.8)	8(7.8)	0(0.0)	3(2.9)	20(19.6)
癌旁正常组织	102	0(0.0)	2(2.0)	9(8.8)	6(5.9)	0(0.0)	2(2.0)	6(5.9)
χ^2 值		-	5.667	0.222	0.036	-	0.205	8.640
P 值		-	0.017	0.638	0.849	-	0.651	0.003

2.2 不同级别脑胶质瘤组织中时钟基因启动子区甲基化频率的比较 不同级别脑胶质瘤组织中 PER1、CLOCK 时钟基因启动子区均未有甲基化;高级别脑胶质瘤(Ⅲ~Ⅳ级)组织中 NPAS2 时钟基因启动子区甲基化频率高于低级别胶质瘤(Ⅰ~Ⅱ级)组织($P < 0.05$);不同级别脑胶质瘤组织中 CRY1、CRY2、BMAL1 和 PER2 时钟基因启动子区甲基化频率比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 2。

表 2 不同级别脑胶质瘤组织中时钟基因启动子区甲基化频率的比较[例(%)]

基因	n	PER1	PER2	CRY1	CRY2	CLOCK	BMAL1	NPAS2
Ⅰ~Ⅱ级	49	0(0.0)	4(8.2)	4(8.2)	3(6.1)	0(0.0)	0(0.0)	3(6.1)
Ⅲ~Ⅳ级	53	0(0.0)	6(11.3)	7(13.2)	5(9.4)	0(0.0)	3(5.7)	17(32.1)
χ^2 值		-	0.287	0.673	0.386	-	2.858	10.879
P 值		-	0.592	0.412	0.534	-	0.091	0.001

3 讨论

自然界所有动植物在白天、黑夜会呈现出不同的生理特征。昼夜节律系统调节人体 24h 有序的生理过程,从而保持机体与自然界和谐共存。昼夜节律系统由一系列时钟基因表达的蛋白来调节,这些蛋白不仅是正常生理所必需的,也参与了激素分泌、细胞代谢、生长和凋亡等过程^[1-3]。有研究认为昼夜节律系统的紊乱与肿瘤的发生、发展有着密切关系,而时钟基因功能改变在其中发挥着重要作用^[3]。基因启动子区甲基化是改变基因表达能力的重要方式^[4]。PER1、PER2、CRY1、CRY2、CLOCK、

BMAL1 和 NPAS2 等时钟基因启动子区甲基化与一些恶性肿瘤的发生、发展相关。相关研究证实某些时钟基因可能通过复杂的网络调节系统,最终影响肿瘤的增生或凋亡^[5-7]。

PER1、PER2 均是抑癌基因。Xia 等^[9]研究结果显示脑胶质瘤组织中 PER1、PER2 时钟基因启动子区甲基化频率较癌旁正常组织明显降低,但与脑胶质瘤组织的 WHO 分级无关。放疗可以明显增加胶质瘤细胞 PER1、PER2 表达;因此,PER1、PER2 表达被认为具有放疗、增敏作用^[10]。本研究结果发现,脑胶质瘤组织及其癌旁正常组织中 PER1 时钟基因启动子区为非甲基化;而

PER2 时钟基因启动子区有低频率甲基化,且脑胶质瘤组织中 PER2 时钟基因启动子区甲基化频率明显高于癌旁正常组织,但与肿瘤恶性程度未见相关性。以上结果提示,基因启动子区甲基化可能不是脑胶质瘤细胞 PER1 表达的表观遗传学调控机制,同时脑胶质瘤细胞 PER2 表达也不完全受基因甲基化所控制。时钟基因 CRY1、CRY2 的确切作用目前尚未明确。有研究结果显示这 2 个基因的异常表达会影响时钟基因 PER1、PER2 的功能。Luo 等^[11]研究结果显示脑胶质瘤组织中 CRY1、CRY2 表达较癌旁正常组织明显下调,但与脑胶质瘤 WHO 分级无关。本研究发现,脑胶质瘤组织及其癌旁正常组织中均有低频率的 CRY1、CRY2 时钟基因启动子区甲基化,但两种组织比较差异均无统计学意义。因此,脑胶质瘤细胞 CRY1、CRY2 蛋白的表达也可能受到其他因素的影响。CLOCK、BMAL1 时钟基因是哺乳动物生命活动中重要的 2 个中央时钟元件,它们在肿瘤细胞的增殖、凋亡、生长代谢、治疗等方面发挥着重要作用。人类脑胶质瘤组织 CLOCK 时钟基因表达明显增高,而在高级别胶质瘤组织中该基因的表达更为明显^[12]。体外抑制 CLOCK 时钟基因表达可以促进体外培养人类胶质瘤细胞的凋亡^[13]。而 BMAL1 时钟基因的作用相反,它能够抑制体外培养的胶质瘤细胞生长,发挥肿瘤抑制因子的作用^[14]。本研究结果显示,脑胶质瘤组织与癌旁正常组织中 CLOCK 时钟基因启动子区均未有甲基化;BMAL1 时钟基因启动子区虽有甲基化,但两种组织比较差异无统计学意义。这说明基因启动子区甲基化可能不是脑胶质瘤细胞 CLOCK、BMAL1 表达的表观遗传学调控机制。NPAS2 是昼夜节律系统中重要的时钟基因,是肿瘤抑制基因。NPAS2 的表达与乳腺癌、肝癌、直肠癌、结肠癌的病理分级及预后密切相关^[5-7]。高级别胶质瘤 NPAS2 表达明显下降,NPAS2 高表达胶质瘤患者生存期明显延长^[15]。本研究结果发现,脑胶质瘤组织及其癌旁正常组织中 NPAS2 时钟基因启动子区存有甲基化,而在脑胶质瘤组织中甲基化频率明显升高;同时还发现,脑胶质瘤组织 WHO 分级越高,NPAS2 时钟基因启动子区甲基化频率越高。以上研究结果说明,NPAS2 基因启动子区甲基化可能是脑胶质瘤发生的原因之一。

综上所述,脑胶质瘤患者时钟基因的异常表达可能与时钟基因启动子区甲基化的改变有关。NPAS2、PER2 时钟基因启动子区甲基化频率明显增高;NPAS2 时钟基因启动子区甲基化频率越高,脑胶质瘤的恶性程度越高。NPAS2、PER2 时钟基因启动子区 DNA 甲基化修饰

可能是脑胶质瘤发生、发展的重要机制。

4 参考文献

- [1] Vinciguerra M, Mazzocchi G, Piccoli C, et al. Exploitation of host clock gene machinery by hepatitis viruses B and C[J]. *World J Gastroenterol*, 2013,19(47):8902-8909.
- [2] Partonen T. Clock gene variants in mood and anxiety disorders[J]. *J Neural Transm(Vienna)*, 2012, 119(10):1133-1145.
- [3] Yu E A, Weaver D R. Disrupting the circadian clock: gene-specific effects on aging, cancer, and other phenotypes[J]. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(5):479-493.
- [4] Chen Y, Hu F, Zhou Y, et al. MGMT promoter methylation and glioblastoma prognosis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Arch Med Res*, 2013,44(4):281-286.
- [5] Xue X, Liu F, Han Y, et al. Silencing NPAS2 promotes cell growth and invasion in DLD-1 cells and correlated with poor prognosis of colorectal cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(2):1058-1062.
- [6] Li H X, Fu X J, Yang K, et al. The clock gene PER1 suppresses expression of tumor-related genes in human oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15):20574-20583.
- [7] Jiang W, Zhao S, Jiang X, et al. The circadian clock gene Bmal1 acts as a potential anti-oncogene in pancreatic cancer by activating the p53 tumor suppressor pathway[J]. *Cancer Lett*, 2016, 371(2): 314-325.
- [8] 林庆玲, 蔡彦宁, 丁晖, 等. 帕金森病患者时钟基因启动子区甲基化分析[J]. *首都医科大学学报*, 2011, 32(6): 767-770.
- [9] Xia H C, Niu Z F, Ma H, et al. Deregulated expression of the Per1 and Per2 in human gliomas[J]. *Can J Neurol Sci*, 2010, 37(3):365-370.
- [10] Niu Z F, Li Y H, Fei Z, et al. Circadian genes Per1 and Per2 increase radiosensitivity of glioma in vivo[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(12):9951-9958.
- [11] Luo Y, Wang F, Chen L A, et al. Deregulated expression of cry1 and cry2 in human gliomas[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(11):5725-5728.
- [12] Chen Z, Liu P, Li C, et al. Deregulated expression of the clock genes in gliomas[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2013, 12(1):91-97.
- [13] Wang F, Li C, Yong L, et al. The circadian gene clock plays an important role in cell apoptosis and the DNA damage response in vitro[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2016, 15(3):480-486.
- [14] Jung C H, Kim E M, Park J K, et al. Bmal1 suppresses cancer cell invasion by blocking the phosphoinositide 3-kinase-Akt-MMP-2 signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(6):2109-2113.
- [15] Madden M H, Anic G M, Thompson R C, et al. Circadian pathway genes in relation to glioma risk and outcome[J]. *Cancer Causes Control*, 2014, 25(1):25-32.

(收稿日期:2016-10-17)

(本文编辑:陈丹)