文章编号:1000-5404(2009)24-2469-04

论著

基于寡核苷酸芯片的β-地中海贫血DNA甲基化的研究

高 天[1],梁志清[1],聂艳丽[2],胡 华[1] ([1]第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038;[2]生物芯片北京国家工程研究中心,北京 102206)

摘 要:目的 通过寡核苷酸芯片寻找和分析β-地中海贫血DNA甲基化相关的基因位点,进一步探讨产前筛查及诊断β-地中海贫血的新方法。**方法** 利用含有人30 178个DNA甲基化探针的寡核苷酸芯片,对2例β地中海贫血患儿脐血与2例正常脐血分别配对检测差异基因DNA甲基化情况,并用甲基化特异PCR(methylation-specific PCR, MSP)和荧光定量PCR(RT-PCR)验证芯片结果。采用非监督聚类(hierarchical clustering)等方法发现统计学意义上差异表达的基因。**结果** 两组芯片结果显示,差异基因共209条(ratio≥2.0,ratio≤0.5);其中上调基因共113条,下调基因共96条。验证结果显示,DNA甲基化相关基因成红细胞增多型白血病致病因子(erythroblastic leukemia viral, v-erb-a)与正常血样比较呈高甲基化状态。**结论** 利用DNA甲基化芯片及甲基化特异PCR技术检测并验证出成红细胞增多型白血病致病因子(v-erb-a)在地中海贫血中呈高甲基化。

关键词: β-地中海贫血; DNA甲基化; v-erb-a; 寡核苷酸芯片; MSP
中图法分类号: R394-33; R556.61; R714.55 **文献标识码:** A

DNA methylation in β-thalassemia by oligonucleotide microarray

GAO Tian[1], LIANG Zhi-qing[1], NIE Yan-li[2], HU Hua[1] ([1]Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology, Beijing 102206, China)

Abstract: Objective To search and analyze the DNA methylation-related genes of β-thalassemia by oligonucleotide microarray in order to explore a new method for early diagnosis of β-thalassemia. **Methods** The cord blood samples of 2 children with β-thalassemia and 2 health children were detected by a chip containing human DNA methylation 30 178 oligonucleotide probes. The chip results were verified by the methods of methylation-specific PCR (MSP) and real-time PCR. The statistical significance of differentially expressed genes was found on non-supervised clustering (Hierarchical clustering). **Results** A total of 209 genetic differences (ratio≥2.0 or≤0.5) were showed by 2 groups of chips, and of them 113 genes were up-regulated and 96 genes were down-regulated. The results showed that the methylation-related gene erythroblastic leukemia viral (v-erb-a) was of hypermethylation compared with the normal blood. **Conclusion** A large number of differentially expressed genes are screened out by the technology of High-throughput DNA methylation of the gene chip in thalassemia. The DNA methylation-related gene of v-erb-a is of hypermethylation in thalassemia. Our methods offers a new idea and approach for prenatal diagnosis for thalassemia by the DNA methylation-related microarray.

Key words: β-thalassemia; DNA methylation; v-erb-a; oligo microarry; methylation-specific PCR

β-地中海贫血是一组由于血红蛋白的β-珠蛋白肽链的合成抑制、失衡,引起无效造血和溶血性贫血[1]。对于这类疾病尚无有效的治疗方法,只能通过遗传筛查及产前诊断选择性的淘汰地贫患儿以控制这类疾病的传播。常规的基因和蛋白质组学的已不能满足临床的需要,因为对于反复妊娠发病的或者轻型的地中海贫血患者而言,传统的分子诊断方法不能检测到基因突变或片段缺失,对于这部分病例,经典的遗传学理论无法解释其发病机制。目前,在应用于这种高度异质性遗传病的各种分子诊断方法中,快速简便的基因芯片技术引人注目[1]。应用该技术能够同时检测中国地区最常见的(23.7)、(24.2)和(22SEA)3种缺失型2种非缺失型突变α珠蛋白,以及21种β珠蛋白基因突变点[2]。表观遗传学的进展为地中海贫血寻求和发现新的更简便、更精确、易于推广的诊断方法,提供了可能。本研究拟通过DNA甲基化芯片筛选

作者简介:高 天,女,黑龙江省齐齐哈尔市人,博士研究生,主要从事产前诊断方面的研究。E-mail:cecilia7@sohu.com
通信作者:梁志清,电话(023)68754409,E-mail:zhi.lzliang@gmail.com
收稿日期:2009-09-02;修回日期:2009-10-21

甲基化差异基因,并应用甲基化特异 PCR(methylation-specific PCR, MSP)进一步验证与 DNA 甲基化相关的成红细胞增多型白血病致病因子(erythroblastic leukemia viral,v-erb-a)基因在地中海贫血中的甲基化状态,探讨地中海贫血差异基因启动子甲基化的情况。以期为临床提供新的地中海贫血分子标记。

1 材料与方法

1.1 标本来源

选择第三军医大学西南医院妇产科 2008 年 6 – 10 月采集的 2 例已明确诊断为 β-地中海贫血男性患儿的外周血为实验组。对照组正常血样取自正常体检儿童外周血 2 例。两组儿童均为门诊就诊者,平均年龄 11 岁。患者无任何基础疾病及免疫抑制剂治疗史,取材均征得患者和院方同意。所取标本未经任何药物处理,提取基因组 DNA。

1.2 基因组 DNA 提取

基因组 DNA 提取试剂盒购自 MN 公司。0.8% 琼脂糖凝胶:100 ml 1 × TBE Buffer 中加入 0.8 g 琼脂糖,微波炉中加热溶化,轻轻摇动使琼脂糖充分混匀(肉眼观察无颗粒状悬浮物),冷却至 60 ℃左右时加入 2 μl EB(原液)混匀,倒入制胶器中(15 cm × 15 cm),室温静置 30 min 左右即可使用。提取过程按试剂盒说明提取。

1.3 基因组 DNA 的亚硫酸盐处理

将提取好的地中海贫血和正常血样的基因组 DNA 进行亚硫酸盐处理[3],基因组 DNA 的亚硫酸盐处理所用的试剂盒 CpGenome DNA modification kit 购自 Qiagen 公司。处理过程按试剂盒说明即可将亚硫酸盐修饰的基因组 DNA 放到 4 ℃冰箱储存 24 h,或者 – 20 ℃储存 2 个月。

1.4 DNA 甲基化芯片探针制备

1.4.1 试剂和材料 20 × SSC 的配制:在 800 ml 水中溶解 175.3 g NaCl 和 88.2 g 柠檬酸钠,加入数滴 HCl 溶液调节 pH 值至 7.0,加水定容至 1 L,分装后高压灭菌。10% SDS 的配制:在 900 ml 水中溶解 100 g 电泳级 SDS,加热至 68 ℃助溶,加入几滴浓盐酸调节溶液的 pH 值至 7.2,加水定容至 1 L,分装备用。50 × Denhardt's 的配制:1%(质量体积分数)Ficoll 400,1% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP),1%(质量体积分数)牛血清白蛋白组分 V(Sigma 公司)。

1.4.2 基因组 DNA 的处理流程 基因组 DNA 片段化,即 MseⅠ酶切反应;T_4 DNA 连接反应;菌落 PCR 反应见;四酶混和酶切(*Aci*Ⅰ、*Hin*PⅠ、*Hpy*CH4Ⅳ、*Hpa*Ⅱ),即甲基化敏感性限制性内切酶反应;McrBC 单酶切反应,即甲基化不敏感性限制性内切酶反应);酶切产物 PCR 扩增;荧光标记 37 ℃反应 4.5 h,4 ℃ 保存,纯化后定量。

1.5 杂交、清洗及扫描

标记好的探针与杂交缓冲液充分混合,配制成 80 μl 的杂交液(终浓度:3 × SSC,0.2% SDS,5 × Denhart's,25% 甲酰胺),95 ℃变性 3 min,冰浴 3 min。42 ℃杂交过夜。杂交结束后,先在 42 ℃左右含 0.2% SDS,2 × SSC 的溶液中洗 4 min,然后在 0.2 × SSC 中洗 4 min。离心干燥,用晶芯 LuxScan10K 微阵列芯片扫描仪双通道扫描仪扫描获得芯片杂交图[4]。

1.6 生物信息分析

芯片杂交结束后经过清洗,用双通道激光扫描仪进行扫描,得到的扫描图片用 SpotData 基因芯片数据分析软件(北京博奥生物芯片公司)把图像数据文件转化为数字数据文件。用 LOWESS 方法对双通道芯片的信号比值进行归一化[5]。在本研究中以地中海贫血样本/正常血液样本比值≥2.0 和≤0.5 分别作为显著性上调或显著性下调的筛选标准[6],找出配对样本的差异表达基因,对地中海贫血脐血样本和两类正常对照的差异表达基因取交集。对差异基因进行 CLUSTER 分析。分子注释系统(molecule annotation system,MAS)提供全面生物学功能注释的分析平台系统。

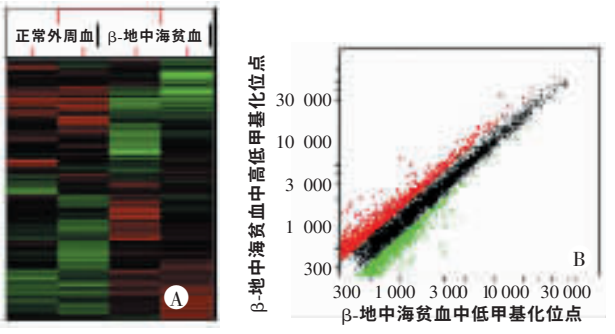
1.7 甲基化敏感性 PCR(MSP)

dNTPs 购自 TaKaRa 公司。DNA 纯化试剂盒购自 MN 公司。Hot star enzyme Kit 购自 Qiagen 公司。甲基化特异性 PCR 引物均由 Invitrogen 公司合成。1.5% 琼脂糖凝胶:80 ml 1 × TBE Buffer 中加入 1.2 g 琼脂糖,微波炉中加热溶化,轻轻摇动使琼脂糖充分混匀(肉眼观察无颗粒状悬浮物),冷却至 60 ℃左右时加入 2 μl EB(原液)混匀,倒入制胶器中(15 cm × 15 cm),室温静置 30 min 左右即可使用。反应过程:酶激活 95 ℃,12 min;扩增反应,第 1 轮反应为变性(95 ℃,45 s)、退火(52 ~ 62 ℃,45 s 每降 1 ℃ 1 个循环)、延伸(72 ℃,45 s)、10 个循环,第 2 轮反应变性(95 ℃,45 s)、退火(56 ℃,45 s)、延伸(72 ℃,45 s)、35 个循环,4 ℃,保存。

2 结果

2.1 DNA 甲基化芯片分析

通过分层聚类分析(hierarchical)并使用 TREEVIEW 软件查看[4],差异基因共 209 条(ratio≥2.0,ratio≤0.5);其中上调基因共 113 条,下调基因共 96 条(图 1A);同时对检测到的基因进行取对数分析进一步筛选差异基因位点(图 1B)。



A:非监督聚类分析结果 红色区域:甲基化程度高的基因位点;绿色区域:甲基化程度低的基因位点;B:比较分析散点图 红点:甲基化程度高的基因位点;绿点:甲基化程度低的基因位点

图 1 差异基因分析结果

2.2 甲基化差异基因功能分群

采用 Pathway 与相关疾病分类,筛选出 11 条有甲基化变化的且与血液病及遗传病直接相关的基因,分别为 CBFB、HDAC3、IL12A、PLAT、RTKN、RAD52、PTGS1、DGUOK、MRE11A 和 THRA。

这些差异位点相关 Pathway 分别为:①RNA 聚合酶Ⅱ启动子激活;②细胞周期;③染色质修复、染色质结构维持;④细胞

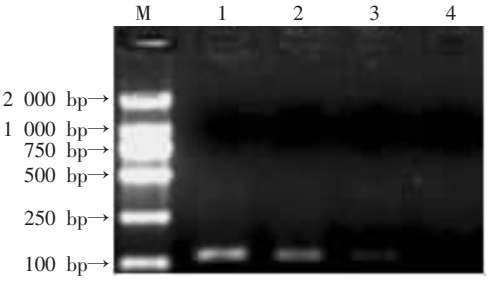
凋亡;⑤血凝系统、血小板淀粉质前体途径;⑥信号转导;⑦DNA 损伤激活应答、DNA 修复;⑧嘌呤代谢、激酶激活;⑨血液淋巴系统;⑩人凝血因子抑制剂。在地中海贫血中所检测到的甲基化差异基因的功能群分布见表 1。

表 1　基因功能群分布

基因	相关途径	相关疾病
CBFB	RNA 聚合酶Ⅱ启动子激活、RNA 聚合酶Ⅱ转录因子激活	血小板病、染色体畸变、各类白血病等
HDAC3	细胞周期、染色质修复、染色质结构维持、负向调控细胞凋亡	白血病等
IL12A	细胞增殖、细胞生长因子激活、	循环系统疾病、HIV
PLAT	血凝系统、血小板淀粉质前体途径	血液凝固障碍、出血等
RTKN	信号转导	白血病等
RAD52	DNA 损伤激活应答、DNA 修复	染色体畸变、白血病等
PTGS1	循环系统	出血时间延长、出血等
DGUOK	嘌呤代谢、激酶激活	毛细胞白血病、白血病等
BCL2A1	血液淋巴系统、负向调控细胞凋亡	白血病等
MRE11A	DNA 损伤激活应答、DNA 修复	染色体断裂综合征、遗传病、范可尼贫血(先天性骨髓发育不全)
v-erb-a	RNA 聚合酶Ⅱ启动子激活、人凝血因子抑制剂	成红细胞白血病等

2.3　甲基化特异 PCR(MSP)验证结果

将芯片所得的目的基因进行 MSP 的验证。结果显示,基因 v-erb-a 在地中海贫血中是高度甲基化的,而在正常外周血中甲基化程度较低(图 2)。



M: 标准(DL2 000); 1、2:地中海贫血; 3、4:正常外周血

图 2　v-erb-a 基因在 β-地中海贫血中甲基化状态

2.4　DNA 实时定量 PCR 分析

将 2 例正常外周血亚硫酸盐处理后 DNA 混合为 1 例对照,与 2 例 β-地中海贫血进行比较,v-erb-a 基因 DNA 实时定量 PCR(Real-time PCR)验证结果显示,与正常外周血比,该基因在地中海贫血中甲基化程度较高,且有显著性差异 (ratio > 2.0),见表 2。

表 2　v-erb-a 基因地中海贫血与正常血样 DNA Real-time PCR 结果

样本/内参	Ct 值	△Ct	归一化前比率	比率
地中海贫血例 1				
actin	20.56	–	6.96	–
v-erb-a	20.89	–	0.88	7.89
地中海贫血例 2				
actin	20.32	-0.18	32.0	–
v-erb-a	18.69	2.8	1.04	30.70
正常外周血				
actin	20.38	0.06	–	–
v-erb-a	23.69	5.0	–	–

3　讨论

通过遗传筛查和产前诊断选择性淘汰地中海贫血胎儿是目前控制该病发生的唯一途径。传统诊断地中海贫血的方法实验周期长,且只能诊断临床上常见的几种基因缺失或点突变所引起的地中海贫血。地中海贫血的基因诊断和产前诊断先后经历了:①DNA 点杂交;②限制性内切酶酶谱分析;③限制性片段长度多态性(RFLP) 连锁分析;④寡核苷酸(ASO) 探针杂交;⑤PCR 体外基因扩增等阶段,特别是 PCR 技术的不断发展和改进,使地中海贫血基因诊断检测技术日趋成熟。但是,迄今大部分患者并未直接受益于此,原因是多方面的,操作较繁杂、费时,对操作者技术水平要求较高等也限制了这些方法的普及,因此费用低廉、结果可靠、使用方便、安全省时的基因诊断技术的开发仍然是人们翘首以待的事情。

随着 DNA 甲基化检测技术的发展和完善,通过寻找受甲基化调控的新位点来诊断和治疗疾病已经逐渐成为相关肿瘤[7]和遗传病的分子诊断和治疗的手段之一。文献[8]报道 β 珠蛋白基因在非红细胞组织中进行甲基化,能使稳定的胎儿基因再激活的化合物对某些成人基因缺陷性疾病(如镰状细胞病或 β-地中海贫血)有较强的治疗作用。以分子杂交为基础的微阵列技术应用于 DNA 甲基化检测中,这种方法是基于杂交的寡核苷酸微阵列[9],是一种在基因组中寻找新位点的方法。表观遗传学即在没有 DNA 序列变化的、可遗传的基因表达改变的情况下,生物体会出现不同的表型和特征[7,10],在发育过程的不同时期发生不同类型的基因转录[11]。已经发现许多基因启动子高甲基化与白血病有关,这些易感基因几乎涉及所有已知的细胞信息通路,如控制细胞周期节点的生长调节因子系列(如 p15、p16、p73)、细胞凋亡因子系列(如 FHIT、DAPK) 、细胞间黏附因子系列(如 E-cadherin)等。这些基因与细胞生长、基因调控密切相关。受此启发,本研究通过微阵列技术分析地中海贫血中相关分子的表观遗传学甲基化修饰规律和特点,以期能寻求和发现新的诊断地中海贫血的方法。

本课题通过 DMH 芯片及其 MAS 系统的 Pathway 功能分类共发现 11 条有甲基化变化的、且与血液病及遗传病直接相关的基因,分别为 CBFB、HDAC3、IL12A、PLAT、RTKN、RAD52、PTGS1、DGUOK、MRE11A 和 v-erb-a。这些在芯片上有甲基化变化的基因均是与各类白血病、贫血、凝血障碍等相关的基因位点。通过 MSP 及 RT-PCR 验证得出 v-erb-a 基因在地中海贫血中甲基化程度明显高于正常外周血 (ratio > 2.0)。

众所周知,DNA 甲基化一般发生在启动子区或第一外显子,而 v-erb-a 是与 RNA 聚合酶Ⅱ启动子激活相关的基因,同时 v-erb-a 是人凝血因子抑制剂。因此,根据本实验结果推测 v-erb-a 基因启动子区发生甲基化后导致其表达降低或基因沉默,从而减弱或失去其凝血抑制作用。β-珠蛋白基因的正确表达依赖三种调控元件:通用的和红系特异的反式因子、β-珠蛋白基因的近端顺式元件(启动子)及 β-基因簇的远端调控元件—基因座控制区(LCR)序列[12]。即便是 LCR 序列元件没有发生表观遗传学变化,但是与红系和凝血相关的因子一旦发生表观遗传学变化,如甲基化程度高于正常就会导致其转录异常[13]。通过在 β-地中海贫血中 v-erb-a 基因启动子区发生甲基化这一重要线索和初步探讨,本课题组将针对基因的甲基化验证及相关功能研究进一步扩大样本量,使其早日运用于临床成为表观遗传学 DNA 甲基化修饰的分子靶标,提高 β-地中海贫血患儿的产前诊断率和筛查准确率,以便早发现、早治疗,为临床早期筛查和诊断地中海贫血胎儿开拓新途径。

参考文献:

[1] 胡章雪, 李 力, 肖 梦, 等. β-地中海贫血与先天性软骨发育不全诊断性基因芯片的构建[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(3): 210 – 212.

[2] 李翠莲, 杨跃煌, 代宏剑. 应用 PCR 结合反向斑点杂交技术检测 β-地中海贫血[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2007, 12(1): 9 – 12, 16.

[3] Xiong Z, Laird P W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(12): 2532 – 2534.

[4] Tang Y, Chen Y, Ni B, *et al*. Up-regulation of the expression of costimulatory molecule CD40 in hepatocytes by hepatitis B virus X antigen [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 384(1): 12 – 17.

[5] Yu J, Zhang L, Chen A, *et al*. Identification of the gene transcription and apoptosis mediated by TGF-beta-Smad2/3-Smad4 signaling[J]. J Cell Physiol, 2008, 215(2): 422 – 433.

[6] Ehrich M, Nelson M R, Stanssens P, *et al*. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(44): 15785 – 15790.

[7] Kiefer C M, Hou C, Little J A, *et al*. Epigenetics of beta-globin gene regulation[J]. Mutat Res, 2008, 647(1 – 2): 68 – 76.

[8] Wu C T, Morris J R. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence[J]. Science, 2001, 293(5532): 1103 – 1105.

[9] Pfister S, Schlaeger C, Mendrzyk F, *et al*. Array-based profiling of reference-independent methylation status (aPRIMES) identifies frequent promoter methylation and consecutive downregulation of ZIC2 in pediatric medulloblastoma[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(7): e51.

[10] Weber M, Davies J J, Wittig D, *et al*. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells[J]. Nat Genet, 2005, 37(8): 853 – 862.

[11] Ginder G D, Gnanapragasam M N, Mian O Y. The role of the epigenetic signal, DNA methylation, in gene regulation during erythroid development[J]. Curr Top Dev Biol, 2008, 82: 85 – 116.

[12] Bottardi S, Ross J, Pierre-Charles N, *et al*. Lineage-specific activators affect beta-globin locus chromatin in multipotent hematopoietic progenitors[J]. EMBO J, 2006, 25(15): 3586 – 3595.

[13] Wannatung T, Lithanatudom P, Leecharoenkiat A, *et al*. Increased erythropoiesis of beta-thalassaemia/Hb E proerythroblasts is mediated by high basal levels of ERK1/2 activation[J]. Br J Haematol, 2009, 146(5): 557 – 568.

(编辑 栾 嘉)

冷怀明编审当选为中国高等学校自然科学学报研究会军队院校期刊专业委员会主任委员

2009 年 11 月 20 日,中国高等学校自然科学学报研究会军队院校期刊专业委员会(下简称“军校期刊专委会”)成立大会暨第 1 次学术交流会在广东省东莞市成功召开。中国高等学校自然科学学报研究会颜帅理事长、郑进宝秘书长和来自军队院校的 47 种科技期刊的代表 60 余人出席了本次大会。《第三军医大学学报》编辑部主任冷怀明编审当选为主任委员。

经过 7 年酝酿、1 年的积极筹备,在中国高等学校自然科学学报研究会领导和军队各兄弟院校的共同努力下,军校期刊专委会正式成立。该专委会为军队院校期刊提供了交流的平台,必将促进军队院校期刊携手并进、共同发展。

在学校和科研部首长的支持下,《第三军医大学学报》编辑部为专委会的筹备和成立做了大量的工作。冷怀明编审被与会代表一致推举并当选为主任委员。《第三军医大学学报》编辑部将以此为契机,虚心向军队兄弟院校学习,努力提高办刊水平、提升学术地位和扩大学术影响,为把我校建设成为具有鲜明军队特色、国内一流、国际知名的创新型医科大学做出应有的贡献。

本刊编辑部