文章编号:1000-5404(2012)09-0817-04

论著

甲基化修饰致 PCDH10 基因在多发性骨髓瘤中沉默

李 颖[1],陈建斌[1],宋君君[1],杨泽松[2],向廷秀[3],黄宗干[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:血液科[1],血液科实验室[2],分子肿瘤及表观遗传学实验室[3])

[摘要] **目的** 研究 PCDH10 基因在多发性骨髓瘤(multiple myeloma,MM)患者及细胞系 KM3、RPMI-8226 中的甲基化状态,分析甲基化对其沉默的影响。**方法** 常规骨髓穿刺术获取 MM 患者骨髓样本,培养骨髓瘤细胞系 KM3、RPMI-8226,以增生性骨髓象骨髓样本作为对照。RT-PCR 检测其中 PCDH10 基因表达水平,甲基化特异性 PCR(methylation-sensitive PCR,MSP)法检测 PCDH10 基因甲基化状态,通过 5-氮杂-2′-脱氧胞苷和组蛋白去乙酰化酶抑制剂[5-aza-2′-deoxycytidine (Aza) and trichostatin A (TSA),A+T]处理 MM 细胞系,检测药物处理前后 PCDH10 甲基化状态及表达水平。**结果** PCDH10 基因在正常人群中表达,但在 MM 患者骨髓及细胞系中广泛低表达,且 77.27%(34/44)的 MM 患者 PCDH10 呈甲基化状态。PCDH10 基因可经 A+T 试验逆转甲基化状态并恢复表达。**结论** DNA 甲基化可能在多发性骨髓瘤的 PCDH10 基因沉默中发挥作用,从而参与骨髓瘤的发生。

[关键词] 多发性骨髓瘤;PCDH10;DNA 甲基化
[中图法分类号] R394-33; R73-362; R738.1 [文献标志码] A

Methylation induces protocadherin-10 silence in multiple myeloma

Li Ying[1], Chen Jianbin[1], Song Junjun[1], Yang Zesong[2], Xiang Tingxiu[3], Huang Zonggan[1] ([1]Department of Hematology, [2]Laboratory of Hematology, [3]Laboratory of Molecular Oncology and Epigenetics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the methylation status of protocadherin-10 (PCDH10) in multiple myeloma (MM) patients and MM cell lines KM3 and RPMI-8226, and investigate the effect of its methylation on PCDH10 silence. **Methods** A total of 44 MM tissue samples from January to December 2010 hospitalized in our department were collected. Bone marrow tissues of 9 age- and sex-matched patients with mild anemia obtained by conventional bone marrow biopsy served as control. The expression of PCDH10 gene was detected by RT-PCR in above tissue samples, and multiple myeloma cell lines KM3 and RPMI-8226. Methylation-sensitive PCR (MSP) was used to test the methylation of PCDH10 CpG islands. Then, after the KM3 and RPMI-8226 cells were treated with 5-aza-2′-deoxycytidine and trichostatin A (Aza and TSA, A+T), the changes of PCDH10 were studied by RT-PCR and MSP. **Results** PCDH10 was expressed well in normal population while extensive mildly expressed in MM patients and cell lines. Among the 44 patients (23 females, 21 males), 77.27% (34/44) whom presented methylation of PCDH10. Furthermore, A+T restored PCDH10 expression in myeloma cell lines. **Conclusion** DNA methylation may play a key role in the silence of PCDH10 gene in multiple myeloma, and may be involved in the incidence of myeloma.

[**Key words**] multiple myeloma;protocadherin-10;DNA methylation

Supported by the Key Project of 2011 Medical Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-1-032) and the Project of Medical Scientific Research of Chongqing(2010-2-108). Corresponding author: Chen Jianbin, Tel: 86-23-89012918, E-mail: cqchenjianbin2007@126.com

[基金项目] 重庆市卫生局2011年医学科研计划重点项目(2011-1-032);重庆市医学科研计划(2010-2-108)
[通信作者] 陈建斌,电话:(023)89012918,E-mail: cqchenjianbin2007@126.com

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是浆细胞的恶性肿瘤,在血液系统恶性肿瘤中发病率高,约占癌症总死亡率的2%[1]。PCDH10基因又名原钙黏素,属δ2组钙黏素家族,位于4q28.3。该家族参与了各种重要角色,包括细胞分化、识别、排斥和诱导细胞-细胞黏附等[2-3]。多发性骨髓瘤中黏附基因的异常表达参与了骨髓瘤的发生与发展,促进骨髓瘤前体细胞的归巢和骨髓瘤细胞生长因子以及破骨细胞激活因子的产生[4-5]。通过黏附,syndecan-1可促进骨髓瘤细胞的生长和生存,诱导基质金属蛋白酶(MMP)-1的产生,促进骨的吸收和肿瘤的浸润。骨髓瘤细胞和纤连蛋白的黏附可上调p27和其他相关基因表达,介导细胞耐药[5-6]。骨髓瘤细胞和基质细胞的黏附以及MM细胞本身分泌的TNF、TGF-β、VEGF共同促进了基质细胞NF-κB依赖的IL-6的转录和分泌,促进了多发性骨髓瘤的发生发展[6-7]。PCDH10基因编码的黏附蛋白沉默在许多人类癌症显现出重要的作用,与增殖、迁移和浸润等机制相关,其甲基化与肿瘤的发生、发展具有密切关系[8-9]。本研究探讨PCDH10基因甲基化与多发性骨髓瘤的相关性,以及恢复PCDH10基因表达的可行性。

1 资料与方法

1.1 主要试剂和仪器

RPMI-8226、KM3细胞系由上海第二军医大学长征医院血液科侯健教授惠赠。RPMI1640、胎牛血清(Gibco公司,美国),二甲基亚砜(DMSO,Sigma公司),DNA Marker2000(天根生物公司),Trizol reagent (Invitrogen公司),逆转录及PCR试剂盒(TaKaRa公司),DNA提取试剂盒(Genration Capture Column Kit,QIAamp美国),Go-*Taq*(Promega公司, 美国),其余试剂均为国产分析纯。

1.2 骨髓样本采集和细胞培养

44例MM标本取自重庆医科大学附属第一医院血液科2010年按WHO诊断标准(2008)确诊为多发性骨髓瘤的住院患者,排除并发其他恶性肿瘤可能,其中女性23例,男性21例,年龄43~78岁,中位年龄65岁。对照组骨髓标本采自轻度贫血(90 g/L < Hb < 119 g/L)患者(女性5例,男性4例,年龄40~60岁,中位年龄52岁),骨髓涂片检查示增生性骨髓象。经伦理委员会同意并患者签署知情同意书。骨髓样本于重庆医科大学附属第一医院肿瘤及表观遗传学实验室组织细胞库保存。RPMI-8226、KM3细胞系标准培养于含10%小牛血清(Gibco公司, 美国)的RPMI1640培养基,37 ℃、5%的CO_2、饱和湿度条件下传代培养。取生长良好的细胞用于进一步实验。

1.3 半定量反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

随机取12例MM患者骨髓及6例正常骨髓样本进行RT-PCR反应。RNA提取采用Trizol法(Invitrogen公司),并参照逆转录试剂盒(reverse transcription system A3500,Promega公司)说明书将RNA逆转录成cDNA。PCR总反应体系为12.5 μl,反应条件:95 ℃ 10 min,1个循环。94 ℃ 30 s,53 ℃ 30 s(内参为51 ℃),72 ℃ 30 s, PCDH10基因32个循环,β-actin基因23个循环,最后72 ℃延伸3 min。PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳。PCDH10及内参β-actin基因的引物序列如表1所示。

表1 RT-PCR引物序列、退火温度及产物长度

基因名称	引物序列(5′→3′)	退火温度	产物长度
PCDH10	上游:ACTGCTATCAGGTATGCCTG	53 ℃	219 bp
	下游:GTCTGTCAACTAGATAGCTG		
β-actin	上游: CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	51 ℃	268 bp
	下游: GCTGTCACCTTCACCGTTCC		

1.4 MSP甲基化分析

采用QIAGEN公司生产的Generation Capture Column Kit(50)(159914)试剂盒提取DNA。取1 μg DNA经氢醌、亚硫酸氢钠(均为Sigma公司试剂盒)处理纯化后进行MSP反应。参照文献[9]设计MSP引物序列(表2)。亚硫酸修饰后DNA的PCR反应条件:95 ℃预变性10 min,1个循环;94 ℃变性30 s,甲基化引物退火60 ℃(非甲基引物退火58 ℃)30 s,72 ℃延伸30 s,共计40个循环,最后72 ℃继续延伸5 min。用亚硫酸修饰的正常骨髓的DNA作为非甲其化的阳性对照,用乳腺癌细胞系MB231[9]的已修饰的DNA作为甲基化的阳性对照。阴性对照均采用灭菌双蒸水取代处理后的DNA进行PCR。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳。

表2 MSP引物序列、退火温度及产物长度

基因名称	引物用途	引物序列(5′→3′)	退火温度	产物长度
PCDH10	MSP-M	上游: TCGTTAAATAGATACGTTACGC	60 ℃	153 bp
		下游: TAAAAACTAAAAACTTTCCGCG		
	MSP-U	上游: GTTGTTAAATAGATATGTTATGT	58 ℃	155 bp
		下游: CTAAAAACTAAAAACTTTCCACA		

M:甲基化;U:非甲基化

1.5 A+T药物处理

取生长良好的RPMI-8226、KM3,每10^6细胞加入1 μmol/L Aza(Sigma公司,美国)孵育。含有Aza的细胞培养基每隔24小时更换1次,共处理72 h,然后加入1 μl TSA(100 ng/ml,Sigma公司,美国)孵育24 h,收获细胞进行PCR及MSP反应。

1.6 临床样本分析

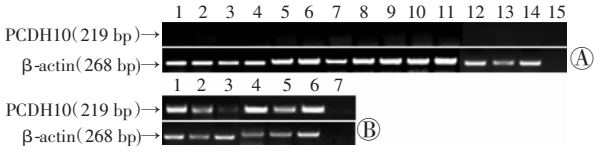
整理临床样本信息,包括年龄、性别、ISS分期、Plt、Hb、血清钙、血肌酐等。应用SPSS 16.0统计软件整理分析PCDH10基因甲基化与临床信息间统计学意义,组间差异比较用t检验。

2 结果

2.1 RT-PCR检测PCDH10基因表达

对照组在219 bp处均可见特异性扩增条带,而在骨髓瘤细胞系KM3、RPMI-8226及12例骨髓瘤患者样本未见特异性扩

增产物条带,内参条带可见 268 bp 扩增产物 β-actin（图 1）。在对照组 PCDH10 基因可以稳定表达,而在多发性骨髓瘤患者及其 KM3、RPMI-8226 细胞系中 PCDH10 基因出现沉默。

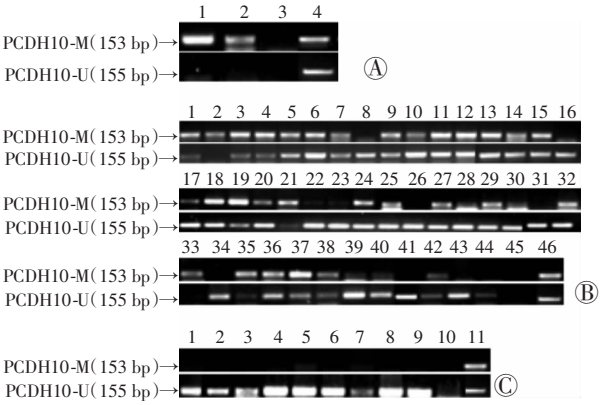


A:KM3、RPMI-8226 细胞及 MM 骨髓样本　1:KM3;2:RPMI-8226;3~14:MM 骨髓样本;15:阴性对照(H_2O);B:正常骨髓样本 1~6:正常骨髓样本;7:阴性对照(H_2O)

图 1　RT-PCR 检测 KM3、RPMI-8226 细胞、MM 骨髓样本和正常骨髓样本 PCDH10 mRNA 表达

2.2　MSP 分析

34 例(77.27%)MM 患者样本出现了甲基化,而 9 例对照组样本中均未检测出 PCDH10 基因甲基化(图 2)。PCDH10 基因甲基化状态与患者年龄、性别、ISS 分期、Plt、Hb、血清钙、血肌酐等无统计学差异($P>0.05$,表 3)。



M:甲基化;U:非甲基化;A:MM 细胞系　1:KM3;2:RPMI-8226;3:阴性对照(H_2O);4:阳性对照;B:MM 骨髓样本　1~44:MM 骨髓样本;45:阴性对照(H_2O);46:阳性对照;C:正常骨髓样本 1~9:正常骨髓样本;10:阴性对照(H_2O);11:阳性对照

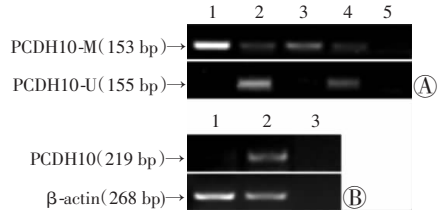
图 2　MM 细胞系、MM 骨髓样本及正常组 PCDH10 基因启动子甲基化状态的检测

表 3　PCDH10 甲基化状态与患者临床资料分析

患者临床资料	甲基化($n=34$)	非甲基化($n=10$)	P 值
年龄(岁)	62.3±9.4	68.7±6.9	0.074
性别			0.546
女	19(43.2%)	4(9.1%)	
男	15(34.1%)	6(13.6)	
ISS 分期			0.153
Ⅰ	12(27.3%)	3(6.8%)	
Ⅱ	15(34.1%)	3(6.8%)	
Ⅲ	7(15.9%)	4(9.1%)	
Plt($\times10^9$)	162.1±77.1	231.1±86.5	0.885
Hb(g/L)	95.7±23.0	93.2±25.2	0.800
血清钙(mg/dl)	2.2±0.4	2.2±0.2	0.599
血肌酐(mg/dl)	128.0±124.9	117.0±116.3	0.801

2.3　A+T 实验

在 KM3、RPMI-8226 骨髓瘤细胞系中经甲基化特异性引物扩增后,均可见特异性扩增产物条带,经过 A+T 处理后特异性扩增产物条带减弱。用非甲基化特异性引物扩增,2 株细胞系均未扩增出非甲基化产物,而经 A+T 处理后均扩增出非甲基化产物。而 RT-PCR 显示 A+T 处理后可以扩增出 PCDH10 特异性产物条带(图 3),证明 A+T 处理后 KM3 细胞中恢复了 PCDH10 的表达。



M:甲基化;U:非甲基化;A:去甲基化前后的 MSP 结果　1:KM3;2:KM3 经 A+T 处理后;3:RPMI-8226;4:RPMI-8226 经 A+T 处理后;5:阴性对照(H_2O);B:去甲基化前后的 RT-PCR 结果 1:KM3;2:KM3 经 A+T 处理后;3:阴性对照(H_2O)

图 3　A+T 处理 MM 细胞系前后 PCDH10 甲基化状态及其 mRNA 的表达

3　讨论

表观遗传机制调节的 PCDH10 沉默发生在多种人类癌症[3,10-12]。Ying 等[3]发现了 PCDH10 基因广泛沉默的分子机制,在鼻咽癌等肿瘤中 PCDH10 高频率甲基化而沉默。位于 PCDH10 启动子 5′-侧 462 bp 片段的区域具有高密度的 CpG 岛,而 CpG 岛正是 DNA 甲基化发生的区域。也有学者发现 Sp1/Sp3 和 CBF/NF-Y 转录因子在人类 PCDH10 基因的表达中发挥关键的作用[10]。PCDH10 基因的沉默可能减弱了机体对癌细胞迁移的抑制作用,从而有助于癌症的发展[2-3,10,13]。

本研究发现,PCDH10 基因在 12 例 MM 患者及 KM3、RPMI-8226 细胞系中低表达或不表达,但在 6 例对照组正常表达,其沉默机制引起了我们的关注。采用高灵敏度的 MSP 实验方法发现在 KM3、RPMI-8226 骨髓瘤细胞系中均可见特异性扩增产物条带,77.27% MM 患者(34/44)153 bp 处发现甲基化扩增产物。由此推测甲基化在多发性骨髓瘤 PCDH10 基因沉默中可能发挥一定作用。因此,我们用 A+T 药物处理尝试恢复 PCDH10 基因的表达,发现 MM 细胞系经过 A+T 处理后甲基化特异性扩增产物条带减弱,同时恢复了非甲基化特异性引物扩增条带。RT-PCR 验证 A+T 处理后 KM3 细胞中恢复了 PCDH10 基因的表达。而 10 例 MM 患者未出现 PCDH10 基因的甲基化也存在该基因的沉默现象,可能与其他的基因沉默机制相关。综上,甲基化修饰可能是致 PCDH10 基因在多发性骨

髓瘤中沉默的重要原因之一。

甲基化修饰导致的PCDH10基因沉默频繁发生在骨髓瘤细胞系和骨髓瘤患者骨髓样本中。但临床统计分析表明,PCDH10基因甲基化状态与患者年龄、性别等基本信息未见明显统计学差异($P>0.05$,表1),与MM可能预后相关的因素如Plt、Hb、ISS分期、血肌酐、血清钙等分析后均未见明显统计学差异($P>0.05$),推测可能在MM发病早期PCDH10甲基化已经广泛存在,并可能与某些未发现的肿瘤致病因素相关。由于尚未检测出对照组非肿瘤患者中PCDH10基因的甲基化[3,5],PCDH10甲基化的检测可能作为肿瘤特异性较高的标志物应用于临床。

在各种恶性血液病中,DNA甲基化修改了基因的转录活性,是表观遗传学的主要分子发病机制[11,14-16]。有研究证实甲基转移酶抑制剂5-氮杂胞苷(Aza)发挥去甲基化作用,在恢复抑癌基因表达的同时,具有启动细胞损伤机制致使细胞死亡的作用机制[15-18]。5-氮杂胞苷有效提高了某些患者的生存率,可能机制是阻断了白细胞介素6(IL-6)和胰岛素样生长因子(IGF-I)对MM细胞的生长支持,或剥离了瘤细胞对骨髓基质干细胞的生长黏附[19-20]。我们有理由相信PCDH10可能成为骨髓瘤分子诊断的一个表观遗传机制的肿瘤标志物。

志谢 感谢香港中文大学陶谦教授给予我们理论和实验的悉心指导

参考文献:

[1] Hatzimichael E, Dasoula A, Benetatos L, *et al*. Study of specific genetic and epigenetic variables in multiple myeloma[J]. Leuk Lymphoma, 2010, 51(12): 2270-2274.

[2] Bertrand K C, Mack S C, Northcott P A, *et al*. PCDH10 is a candidate tumour suppressor gene in medulloblastoma[J]. Childs Nerv Syst, 2011, 27(8): 1243-1249.

[3] Ying J, Li H, Seng T J, *et al*. Functional epigenetics identifies a protocadherin PCDH10 as a candidate tumor suppressor for nasopharyngeal, esophageal and multiple other carcinomas with frequent methylation [J]. Oncogene, 2006, 25(7): 1070-1080.

[4] Podar K, Chauhan D, Anderson K C. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy[J]. Leukemia, 2009, 23(1): 10-24.

[5] Kim J S, Yu H K, Ahn JH, *et al*. Human apolipoprotein(a) kringle V inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo* by interfering with the activation of focal adhesion kinases[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(3): 534-540.

[6] Vacca A, Ribatti D. Angiogenesis and vasculogenesis in multiple myeloma: role of inflammatory cells[J]. Recent Results Cancer Res, 2011, 183: 87-95.

[7] Zhang Y, Daaka Y. PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA Cγ pathway[J]. Blood, 2011, 118(19): 5355-5364.

[8] Wolverton T, Lalande M. Identification and characterization of three members of a novel subclass of protocadherins[J]. Genomics, 2001, 76(1/3): 66-72.

[9] Narayan G, Freddy A J, Xie D, *et al*. Promoter methylation-mediated inactivation of PCDH10 in acute lymphoblastic leukemia contributes to chemotherapy resistance[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2011, 50(12): 1045-1053.

[10] Li Z, Xie J, Li W, *et al*. Identification and characterization of human PCDH10 gene promoter[J]. Gene, 2011, 475(1): 49-56.

[11] Yuregir O O, Yurtcu E, Kizilkilic E, *et al*. Detecting methylation patterns of p16, MGMT, DAPK and E-cadherin genes in multiple myeloma patients[J]. Int J Lab Hematol, 2010, 32(2): 142-149.

[12] Esteller M. Epigenetics in cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 358(11): 1148-1159.

[13] Baylin S B, Herman J G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics[J]. Trends Genet, 2000, 16(4): 168-174.

[14] 王东海, 王洋, 王敏, 等. pig7基因在急性白血病细胞中的表达及其临床意义[J]. 中华血液学杂志, 2007, 28(8): 532-536.

[15] 王刚, 刘利, 陈杰, 等. 白血病细胞雄激素受体基因启动子甲基化状态的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10): 932-934.

[16] 宋君君, 李颖, 杨泽松, 等. 慢性粒细胞白血病骨髓细胞的SFRP2基因启动子高甲基化[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(24): 2583-2586.

[17] Kuo H K, Griffith J D, Kreuzer K N. 5-Azacytidine induced methyltransferase-DNA adducts block DNA replication *in vivo*[J]. Cancer Res, 2007, 67(17): 8248-8254.

[18] 陈庆美, 刘娇, 周帆, 等. 丙型肝炎病毒核心蛋白对Wnt信号抑制因子SFRPs甲基化修饰的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(20): 2116-2119.

[19] Kiziltepe T, Hideshima T, Catley L, *et al*. 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(6): 1718-1727.

[20] Fabiani E, Leone G, Giachelia M, *et al*. Analysis of genome-wide methylation and gene expression induced by 5-aza-2′-deoxycytidine identifies BCL2L10 as a frequent methylation target in acute myeloid leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2010, 51(12): 2275-2284.

(**收稿**:2011-10-28;**修回**:2011-12-19)

(编辑 王 红)