论著

文章编号:1000-5404(2013)20-2168-04

人 Sox10 基因启动子区高甲基化的预测和验证

李文英[1,3],余 鸿[2],陈兴书[1],肖 岚[1] (400038 重庆,第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所[1];646000 四川,泸州医学院基础医学院组织学与胚胎学教研室[2];643020 四川,自贡市第三人民医院病理科[3])

[摘要] **目的** 运用生物信息学方法预测人 Sox10 基因启动子区甲基化情况并进行实验验证。**方法** 从 GenBank 获取人 Sox10 基因序列,利用 Methyprimer 11.0 软件、Li lab、CpG Island Searcher 预测其启动子区 CpG 岛。进一步运用甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP)和重亚硫酸盐测序(bisulfite sequencing PCR, BSP)方法检测人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛在多形性胶质母细胞瘤和瘤周组织中的甲基化情况。**结果** 经过生物信息学分析发现,人 Sox10 基因启动子区存在 2 个 CpG 岛,分别为 165 (1 241 ~ 1 405) bp 和 105 (1 478 ~ 1 582) bp。针对这两个 CpG 岛设计引物行 MSP 和 BSP 实验,研究发现,在人多形性胶质母细胞瘤和瘤周组织中 Sox10 基因启动子区 CpG 岛均出现部分甲基化,其中在多形性胶质母细胞瘤中的甲基化率为 90.5%,在瘤周组织中的甲基化率为 28.5%。**结论** 本研究证实了人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛在多形性胶质母细胞瘤中出现高甲基化,提示其表达下调可能受甲基化调节。

[关键词] 人 Sox10 基因启动子区甲基化;生物信息学分析;MSP;BSP;人多形性胶质母细胞瘤

[中图法分类号] R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Prediction and analysis on methylation of human Sox10 gene promoter

Li Wenying[1,3], Yu Hong[2], Chen Xingshu[1], Xiao Lan[1] ([1]Department of Histology and Embryology, Chongqing Institute of Neuroscience, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, [2]Department of Histology and Embryology, Luzhou Medical College, Lu zhou, Sichuan Province, 646000, [3]Department of Pathology, Zigong Third Peoples' Hospital, Zigong, Sichuan Province, 643020, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the methylation of human Sox10 gene promoter by bioinformatics and exprimental vertification. Methods Human Sox10 gene sequence was obtained from GenBank. CpG island methylation in human Sox10 gene promoter was predicted by Methyprimer software 11.0, Li lab and CpG Island Searcher. Then CpG island methylation status of Sox10 gene promoter was detected in glioblastoma multiforme and adjacent noncancerous tissues by methylation specific PCR (MSP) and bisulfite sequencing PCR (BSP). Results Two CpG islands, 165 bp (1 241 – 1 405) and 105 bp (1 478 – 1 582), were found in human Sox10 gene promoter according to bioinformatics analysis. CpG islands of human Sox10 gene promoter were partially methylated in the adjacent noncancerous tissues and glioblastoma multiforme, indicated by MSP results. BSP results showed that the percentage of methylation was 90.5% in glioblastoma multiform and 28.5% in the adjacent noncancerous tissues. Conclusion CpG islands of human Sox10 gene promoter are hypermethylated in glioblastoma multiforme. The down-regulation of human Sox10 gene might be mediated by the methylation as compared with adjacent noncancerous tissues.

[**Key words**] methylation of human Sox10 gene promoter; bioinformatics analysis; methylation specific PCR; bisulfite sequencing PCR; glioblastoma multiforme

Supported by the National Natural Science Foundation of China(31100771) and the Natural Science Foundation of Chongqing(2011jjA10029). Corresponding author: Chen Xingshu, Tel:86-23-68752229;E-mail:xingshuchen2011@163.com

基因表达不仅受遗传因素的调控,也受表观遗传因素调控。表观遗传是指通过有丝分裂或减数分裂来传递非 DNA 序列遗传信息的现象,主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰(组蛋白甲基化、乙酰化、磷酸化和泛素化)、染色质重塑和非编码调控 RNA。DNA 甲基化是最常见的表观遗传学调控途径之一,是在 DNA 甲基转移酶的作用下使鸟嘌呤和胞嘧啶的富集区(即 CpG 岛)的二核苷酸 5′端胞嘧啶转变为 5′甲基胞嘧啶(5mC)。DNA 甲基化主要发生在富含 CpG 岛的启动子区域,通过该区域的甲基化将阻碍启动子与转录因

[基金项目] 国家自然科学基金(31100771);重庆市自然科学基金(2011jjA10029)

[通信作者] 陈兴书,电话:(023)68752229;E-mail:xingshuchen2011@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130701.0925.005.html(2013-07-01)

子的结合,从而抑制基因转录[1]。

神经胶质瘤是常见的脑肿瘤之一,发病率位居颅内肿瘤第一位。多形性胶质母细胞瘤为恶性程度较高的胶质瘤之一,在其中多种基因的表达受甲基化调节[2]。Sox 家族基因为含 HMG (high mobility group) 盒的转录因子,目前已发现有 20 多个成员,主要与细胞增殖和分化相关。Sox 家族基因根据 HMG 盒的位置不同,可分为 A-H 组,Sox10 属于 E 组[3]。近年来的研究表明 Sox10 在正常脑组织和神经胶质瘤中有表达,在恶性程度高的胶质瘤中低表达,可能与胶质瘤的发生、发展有密切关系[4-5]。启动子区 DNA 高甲基化影响转录因子结合从而抑制基因转录和表达,那么 Sox10 基因在恶性程度高的胶质瘤中低表达是否由于高甲基化导致呢?

本研究运用生物信息学分析方法对人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛进行了预测,运用甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 和重亚硫酸盐测序 (bisulfite sequencing PCR, BSP) 方法检测人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛在多形性胶质母细胞瘤和瘤周组织中的甲基化情况,为进一步探索其表达调控的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

DNA 抽提试剂盒、MSP 和 BSP 试剂盒均购买自 Qiagen 公司,PCR 产物回收纯化运用 Axygen 凝胶回收试剂盒。将 PCR 回收产物连接至 pMD18-T Vector 载体,挑选克隆进行测序,交由 Invitrogen 公司进行。人多形性胶质母细胞瘤和瘤周组织来自本校新桥医院神经外科手术标本并经病理学证实鉴别诊断。

1.2 方法

1.2.1 人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛的预测 ①运用 Methyprimer 11.0 软件进行人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛的预测。②运用 CpG Island Searcher 软件进行人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛的预测 (http://www.uscnorris.com/cpgislands2/cpg.aspx)。③从 GeneBank 获取人 Sox10 基因的启动子区序列,运用 Li lab (http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi)[6] 网上预测人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛。

1.2.2 甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 法 ①用 Qiagen 公司的 DNA 抽提试剂盒抽提多形性胶质母细胞瘤和瘤周组织 DNA;②DNA 亚硫酸氢钠处理:准备 DNA 样品,总体积为 20 μL,总量大约 500 ng;在 PCR 仪上进行以下程序:98 ℃ 10 min,64 ℃ 2.5 h,4 ℃ 放置 20 h;③ PCR 检测 Sox10 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态。人 Sox10 基因 MSP 非甲基化引物:5′-TTAGGTAGCGCGTCGTCGT-3′ 和 5′-ACCAACGTCCAATCGTAACC-3′;甲基化引物:5′-TTTGTGGGTTTGGAGGAATTT-3′ 和 5′-CATCATCCACCTCACCATCCTA-3′。PCR 反应条件为 95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s,共 40 个循环;72℃ 延伸 5 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,Bio-Rad 凝胶成像仪成像。

1.2.3 重亚硫酸盐测序 (bisulfite sequencing PCR, BSP) 法 组织 DNA 提取和重亚硫酸盐处理同 MSP 方法。对 Bisulfite 处理后的 DNA 进行 PCR 扩增。人 Sox10 基因 BSP 实验 PCR 扩增引物:5′-GTTGGGTAAGGTTAAGAAGGAG-3′ 和 5′- AATACTCACCTCCAAAACTTACC-3′。PCR 反应条件为 95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。用 Axygen 凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收纯化。将 PCR 回收产物连接至 pMD18-T Vector 载体,每个样本挑选 10 个克隆进行测序。运用 Quantification tool for methylation analysis (http://quma.cdb.riken.jp/) 分析测序结果,并绘制出黑白圈点图。

2 结果

2.1 人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛的预测结果

启动子区一般位于转录起始位点上游 2 000 bp 内,运用 Methyprimer 11.0 软件进行人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛预测,结果发现人 Sox10 基因启动子区有一个长 650 (1 096 ~ 1 745) bp的 CpG 岛,见图 1。

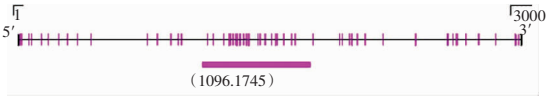


图 1 Methyprimer 11.0 软件预测人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛

运用 CpG Island Searcher 软件进行人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛的预测,结果发现存在一个 CpG 岛,长度为 501 (1 220 ~ 1 720) bp,其 GC 含量为 59.1%,见图 2。

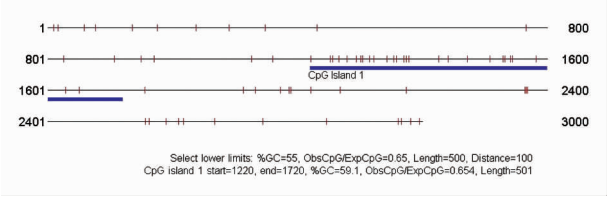


图 2 CpG Island Searcher 软件预测人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛

根据 Li lab 实验室网上预测分析显示人 Sox10 基因在转录起始位点上游 1 200 ~ 1 600 bp 区域 CG 分布密集,有 2 个 CpG 岛,分别为 165 (1 241 ~ 1 405) bp 和 105 (1 478 ~ 1 582) bp,见图 3。

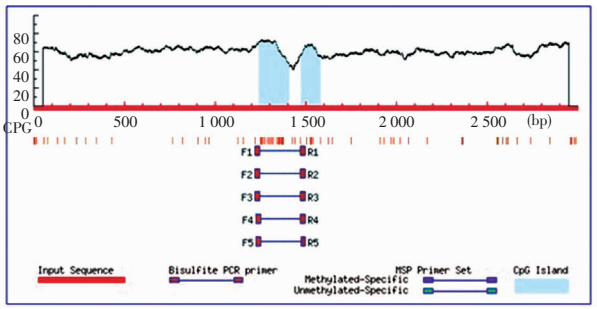
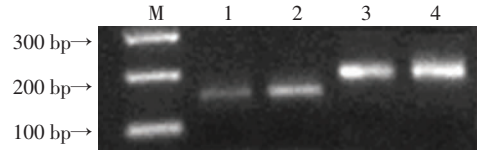


图 3 Li lab 实验室网上预测人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛

2.2 MSP 法检测人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛在多形性胶质母细胞瘤组织中的甲基化情况

根据对人 Sox10 基因启动子区 CpG 岛的预测结果,针对

Sox10基因转录起始位点上游1 200～1 600 bp区域设计MSP实验引物,MSP法PCR扩增甲基化产物长度为157 bp,非甲基化产物长度为192 bp。通过电泳结果可以看出人Sox10基因启动子区在多形性胶质母细胞瘤组织和瘤周组织均发生部分甲基化,见图4。

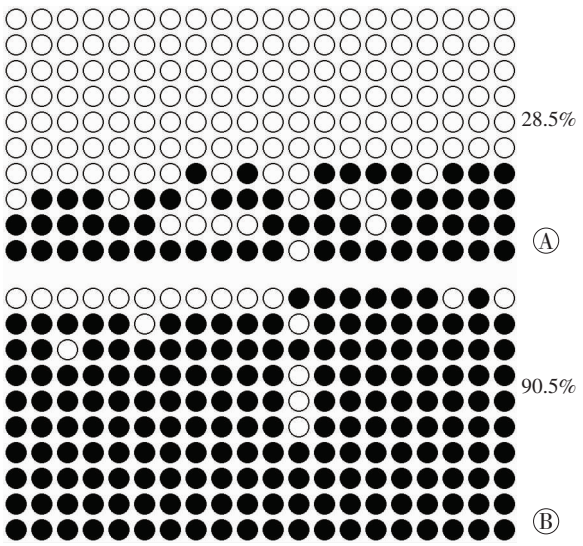


M:标准;1,2:甲基化引物;3,4:非甲基化引物;1,3:瘤周组织;2,4:多形性胶质瘤组织

图4 MSP法检测人Sox10基因启动子区CpG岛的甲基化情况

2.3 BSP法检测人Sox10基因启动子区CpG岛在多形性胶质母细胞瘤和瘤周组织中的甲基化情况

根据对人Sox10基因启动子区CpG岛的预测结果,即转录起始位点上游1 200～1 600 bp区域设计BSP实验引物,BSP法结果显示PCR扩增产物长度为288 bp,测序结果显示人Sox10基因启动子区CpG岛在瘤周组织中甲基化率为28.5%;在多形性胶质母细胞瘤组织中为90.5%,将测序结果绘制成黑白圈点图,见图5。



A:瘤周组织;B:多形性胶质母细胞瘤组织 ●:示发生甲基化的CG位点;○:示未发生甲基化的CG位点

图5 BSP法显示人Sox10基因启动子区CpG岛甲基化率

3 讨论

启动子是RNA聚合酶特异性识别和结合的部位,是参与特定基因转录及其调控的DNA序列。启动子包含核心启动子区域和调控区域。启动子在基因的转录调控中起着非常重要的作用。核心启动子区域产生基础水平的转录,调控区域能够对不同的环境条件作出应答,对基因的表达水平做出相应的调节。不仅控制着基因的转录起始,而且还决定基因的表达强度。基因启动子区的甲基化可以影响转录激活因子及其识别序列的结合,直接抑制基因的表达。研究发现,神经胶质瘤中常出现基因动子区不同程度的DNA甲基化模式改变,这种改变可作为其早期分子诊断指标[7-11]。本研究运用MethPrimer、Li lab、CpG Island Searcher软件对人Sox10基因启动子区CpG岛进行预测,3种方式预测结果基本一致,进一步运用MSP和BSP方法验证其甲基化改变,说明运用生物信息学软件预测Sox10基因启动子区CpG岛是可靠的,可为实验研究提供直接指导。

根据病理特征胶质瘤分为WHOⅠ～Ⅳ级,级别越高,恶性程度越高。胶质瘤主要包括星形细胞肿瘤、少突胶质细胞肿瘤、室管膜肿瘤和髓母细胞瘤等。多形性胶质母细胞瘤为恶性程度较高的胶质瘤之一。文献[1]报道,在多形性胶质母细胞瘤中多种基因的表达受甲基化的调节。Sox10参与神经干细胞的分化和迁移,在周围神经系统的发育中也有重要作用[12]。章卓等[13]报道Sox10影响感觉神经元和自主神经的分化。近年的研究发现Sox10为少突胶质细胞发育分化相关转录因子,协同转录因子Olig1/2促进少突胶质细胞终末分化。研究发现人Sox10基因启动子区高甲基化与精神分裂症患者脑组织中少突胶质细胞功能障碍有密切关系[14]。另外,Sox10基因突变与原发性和转移性黑色素瘤相关[15]。Sox10是少突胶质细胞发育分化相关转录因子,文献[4]报道,Sox10在恶性程度高的神经胶质瘤中表达较在正常组中低。在本实验中,MSP结果显示人Sox10基因启动子区CpG岛在多形性胶质瘤组织和瘤周组织中均发生部分甲基化。进一步通过BSP实验显示人Sox10启动子区CpG岛在多形性胶质瘤组织中发生高甲基化,在瘤周组织中甲基化则较低。启动子区的高甲基化将阻碍启动子与转录因子的结合,从而抑制基因转录,因此人Sox10基因在多形性胶质瘤组织中低表达有可能是由于其高甲基化导致。但Sox10基因高甲基化怎样抑制基因的转录呢?DNA甲基化抑制基因转录表达的机制主要有:第一,甲基化的CpG岛被甲基结合蛋白(MBD)识别,甲基结合蛋白可通过招募组蛋白去乙酰化酶(HDAC)和组蛋白甲基转移酶(HMT)改变染色质空间构象,使染色质的结构紧密,转录结合位点更加隐蔽,因而间接影响基因的表达;第二,基因启动子区的甲基化可以影响转录激活因子及其识别序列的结合,直接影响抑制基因的表达[10-11]。Sox10基因在多形性胶质瘤中高甲基化抑制基因转录的机制有待进一步探索。

随着人类的基因组序列信息的日益丰富及其各种分析程序的不断完善,生物信息学已越来越广泛地应用于基因表达的调控研究[16]。本研究结果显示多种方法对人Sox10基因启动子区CpG岛甲基化情况进

行生物信息学分析更准确,为研究工作提供直接的指导。相信随着分子生物学研究的不断深入,生物信息学将成为实验研究和临床疾病诊断的有力工具。本研究的实验结果提示人Sox10基因在多形性胶质母细胞瘤中的低表达可能受甲基化调节,为进一步探索其机制奠定了基础。

参考文献:

[1] Feng J, Fan G. The role of DNA methylation in the central nervous system and neuropsychiatric disorders[J]. Int Rev Neurobiol, 2009, 89: 67-84.
[2] Sahebjam S, McNamara M, Mason W P. Management of glioblastoma in the elderly[J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2012, 10(6): 379-386.
[3] Lefebvre V, Dumitriu B, Penzo-Mendez A, *et al*. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(12): 2195-2214.
[4] Bannykh S I, Stolt C C, Kim J, *et al*. Oligodendroglial-specific transcriptional factor SOX10 is ubiquitously expressed in human gliomas [J]. J Neurooncol, 2006, 76(2): 115-127.
[5] Ferletta M, Uhrbom L, Olofsson T, *et al*. Sox10 has a broad expression pattern in gliomas and enhances platelet-derived growth factor-B-induced gliomagenesis [J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(9): 891-897.
[6] Li L C, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs [J]. Bioinformatics, 2002, 18(11): 1427-1431.
[7] Mamrut S, Harony H, Sood R, *et al*. DNA methylation of specific CpG sites in the promoter region regulates the transcription of the mouse oxytocin receptor[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56869.
[8] Smith Z D, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development [J]. Nat Rev Genet, 2013, 14(3): 204-220.
[9] Gielen G H, Gessi M, Hammes J, *et al*. H3F3A K27M mutation in pediatric CNS tumors: a marker for diffuse high-grade astrocytomas [J]. Am J Clin Pathol, 2013, 139(3): 345-349.
[10] Madan-Babu M, Teichmann S A, Aravind L. Evolutionary dynamics of prokaryotic transcriptional regulatory networks[J]. J Mol Biol, 2006, 358(2): 614-633.
[11] Juven-Gershon T, Hsu J Y, Theisen J W, *et al*. The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription[J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(2): 253-259.
[12] Stanchina L, Van-de-Putte T, Goossens M, *et al*. Genetic interaction between Sox10 and Zfhx1b during enteric nervous system development [J]. Dev Biol, 2010, 341(2): 416-428.
[13] 章卓, 苏建明, 肖调义. Sox10在感觉神经元发育中的作用[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(10): 94-106.
[14] Iwamoto K, Bundo M, Yamada K, *et al*. DNA methylation status of Sox10 correlates with its downregulation and oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia[J]. J Neurosci, 2005, 25(22): 5376-5381.
[15] Agnarsdottir M, Sooman L, Bolander A, *et al*. Sox10 expression in superficial spreading and nodular malignant melanomas[J]. Melanoma Res, 2010, 20(6): 468-478.
[16] Giacomelli L, Nicolini C. Gene expression of human T lymphocytes cell cycle: experimental and bioinformatic analysis [J]. J Cell Biochem, 2006, 99(5): 1326-1333.

(**收稿**:2013-04-08;**修回**:2013-06-03)
(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2013)20-2171-01

经验交流

外固定支架结合负压封闭引流技术治疗胫腓骨骨折并骨筋膜室综合征54例临床分析

郑 华,王群波 (402160 重庆,重庆医科大学附属永川医院骨科)

[**关键词**] 胫腓骨骨折;骨筋膜室综合征;外固定;负压封闭引流
[**中图法分类号**] R683.42 [**文献标志码**] B

胫腓骨骨折并骨筋膜室综合征(osteofascial compartment syndrome,OCS)容易引起局部骨筋膜室内肌肉和神经急性缺血坏死[1],一旦延误,后果严重。外固定架固定技术及负压封闭引流技术(vacuum sealing drainage, VSD)已广泛应用临床[2]。我科2005年7月至2011年10月收治54例OCS患者,根据骨折AO分型、软组织Gustilo-Anderso进行分组,采取外固定结合VSD进行治疗,效果满意,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本组54例患者,年龄17~63岁,均符合胫腓骨骨折及OCS诊断标准。排除标准:①合并头胸腹脏器损伤;②OCS经药物治疗缓解者;③OCS晚期伴肌肉神经坏死者;④合并内科基础疾病者。车祸伤26例,砸伤19例,挤压伤4例,高坠伤5例;骨折按AO分型[3]:A型11例,B型16例,C型27例。软组织情况按Gustilo-Anderso分型[4]:Ⅰ型8例,Ⅱ型6例,Ⅲ型2例。54例患者采用1:1配对原则分为2组,2组患者一般情况无统计学差异(表1,$P>0.05$)。患者及家属签署知情同意书,研究获重庆医科大学附属永川医院伦理委员会批准。

表1 2组患者术前一般资料比较($n=27$)

组别	男/女(例)	年龄(岁,$\bar{x}\pm s$)	闭合/开放骨折(例)	Gustilo分型(Ⅰ/Ⅱ/Ⅲ,例)	AO分型(A/B/C型,例)	受伤至手术时间(h,$\bar{x}\pm s$)
治疗组	17/10	40.70±11.79	18/9	5/3/1	6/7/14	10.81±5.49
对照组	16/11	40.11±10.88	20/7	3/3/1	5/9/13	10.91±5.69

1.2 手术方法

小腿内外侧双切口,减压受累筋膜室,彻底清创,单边外固定架(江苏爱得)固定骨断端,部分结合有限内固定。治疗组用VSD(山东威高)封闭创面。对照组传统换药治疗。观察2组患者住院时间、换药次数、二期创面修复时间及创面感染情况。术后预防感染及深静脉血栓,针道消毒,观察VSD引流,并行细菌培养。X线片观察骨折对位情况,必要时调整外固定架。

(下转2176页)

[**通信作者**] 郑 华,电话:(023)85381662,E-mail:redantzh@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130425.0903.015.html(2013-04-25)