

· 论 著 ·

HDAC3 基因在 β -地中海贫血中甲基化状态及其意义研究*高 天¹, 梁志清^{1△}, 聂艳丽², 张 亮², 朱虹琳², 吴伟静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 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, 进一步探讨早期诊断 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(MSP)和 DNA 荧光定量 PCR 验证芯片结果。结果 两组芯片结果显示, 差异基因共 209 条 (ratio ≥ 2.0 or ≤ 0.50); 其中上调基因共 113 条, 下调基因共 96 条。验证结果显示, DNA 甲基化相关基因组蛋白甲基转移酶 3(HDAC3)与正常血样比较呈高甲基化状态。结论 高通量的 DNA 甲基化基因芯片技术能够筛选出大量的地中海贫血差异表达基因, DNA 甲基化相关基因 HDAC3 在地中海贫血中呈高甲基化。预示着利用 DNA 甲基化芯片分析地中海贫血中甲基化特异相关分子的规律和特点为临床上早期诊断地中海贫血开拓了新的思路和方法。

关键词: β -地中海贫血; DNA 甲基化; HDAC3; 寡核苷酸芯片; MSP

中图分类号: R556.61; R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)23-2957-03

Study on hypermethylation of gene HDAC3 in β -thalassemia*GAO Tian¹, LIANG Zhi-qing^{1△}, NIE Yan-li², et al.

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 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, to study the new method further for early diagnosis of β -thalassemia. **Methods** Two cases of children cord blood with β -thalassemia and two cases of normal cord blood were detected by containing human DNA methylation 30,178 oligonucleotide probe chips, and verifying the chip results by the methods of methylation-specific PCR (MSP) and DNA Realtime PCR. **Results** A total of 209 genetic differences (ratio ≥ 2.0 or ≤ 0.50) were showed by two groups of chips, of them 113 genes were up-regulated and 96 genes were down-regulated. The results showed that DNA the methylation-related gene HDAC3 was hypermethylation compared with the normal blood. **Conclusion** A large number of differentially expressed genes were screened out by the technology of High-throughput DNA methylation of the gene chip in thalassemia, the DNA methylation-related gene of HDAC3 was hypermethylation in thalassemia. It is prognosticated that a new idea and method are opened up for prenatal diagnosis in thalassemia by the method of DNA methylation-related microarray.

Key words: β -thalassemia; DNA methylation; HDAC3; oligo nucleotide microarray; MSP

地中海贫血是由于血红蛋白的珠蛋白肽链(α 、 β 、 γ)的合成抑制、失衡,引起无效造血和溶血性贫血。 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。目前,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地淘汰地中海贫血患儿以控制这类疾病的传播。组蛋白的修饰作用是表观遗传学的一个重要领域,深入探讨遗传调控和表观遗传调控相互作用的网络与不同生物学表型之间的关系,不仅对基因表达、调控、遗传等生理功能有更深入的理解,而且多种组蛋白修饰酶(HDACs)已经成为相关疾病治疗的靶目标^[1-2]。本研究拟通过 DNA 甲基化芯片筛选甲基化差异基因,并应用甲基化特异 PCR(MSP)进一步验证与 DNA 甲基化相关的组蛋白甲基转移酶 3(HDAC3)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 选择本院 2008 年 6~10 月采集的已明确诊

断的 β -地中海贫血患儿的外周血。对照正常血样取自健康体检儿童外周血。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;100mL 1×TBE Buffer 中加入 0.8g 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 μ L EB(原液)混匀,倒入制胶器中(15cm×15cm),室温静置 30min 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 24h,或者 -20℃储存 2 个月。

1.4 DNA 甲基化芯片探针制备

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30901619)。△ 通信作者,电话:(023)68754409。

表 1 基因功能群分布表

Name	RefSeq	ratio	pathway
CBLC	NM_012116	3.304 649	RNA 聚合酶 II 启动子激活、RNA 聚合酶 II 转录因子激活
MDFI	NM_005586	4.451 47	细胞增殖、细胞生长因子激活
HDAC3	NM_014333	3.477 9	细胞周期、染色质修复、染色质结构维持、负向调控细胞凋亡
PLAT	NM_000016	2.1873 65	血凝系统、血小板淀粉质前体途径、凝血因子抑制剂
PCNA	NM_182649	2.502 604	细胞凋亡、信号转导
MPO	NM_000250	3.483 99	血液淋巴系统、负向调控细胞凋亡
DGUOK	NM_001972	6.273 269	嘌呤代谢、激酶激活
ETS1	NM_005238	2.790 432	细胞增殖调控
MRE11A	NM_003836	2.788 509	DNA 损伤激活应答、DNA 修复
ANXA1	NM_005139	4.249 828	血液淋巴系统、负向调控细胞凋亡

1.4.1 试剂和材料 20×SSC 的配制:在 800mL 水中溶解 175.3g NaCl 和 88.2g 柠檬酸钠,加入数滴 HCl 溶液调节 pH 至 7.0,加水定容至 1L,分装后高压灭菌;10%SDS 的配制:在 900mL 水中溶解 100g 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%(m/V)Ficoll 400,1%聚乙烯吡咯烷酮(PVP),1%(m/V)牛血清清蛋白组分 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;T4 DNA 连接反应;菌落 PCR 反应;四酶混合酶切(AciI、HinP1I、HpyCH4IV、HpaII),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 4.5h,4℃ hold on,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 80μl 的杂交液(终浓度:3×SSC,0.2%SDS,5×Denhardt's,25%甲酰胺),95℃变性 3min,冰浴 3min。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 4min,然后在 0.2×SSC 中洗 4min。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。

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^[4]。在本研究中以地中海贫血样本/正常血液样本比值大于或等于 2.0 和小于或等于 0.50 分别作为显著性上调或显著性下调的筛选标准,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。

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:80mL 1×TBE Buffer 中加入 1.2g 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 2μL EB(原液)混匀,倒入制胶器中(15cm×15cm),室温静置 30min 左右即可使用。反应过程:酶激活 95℃,12min;扩增反应,第一轮反应

为变性(95℃,45s)、退火(52~62℃,45s 每降一度一个循环)、延伸(72℃,45s)、10 个循环,第二轮反应变性(95℃,45s)、退火(56℃,45s)、延伸(72℃,45s)、35 个循环,最后 4℃,hold on。

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^[5],差异基因共 209 条(ratio ≥1.5 or ≤0.67);其中上调基因共 113 条,下调基因共 96 条(见彩插 II 图 13);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(见彩插 II 图 14)。

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 10 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 CFBF、MDFI、HDAC3、PLAT、PCNA、MPO、DGUOK、ETS1、MRE11A 和 ANXA1。这些差异位点相关 pathway 分别为(1)RNA 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;(7)DNA 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。本研究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。

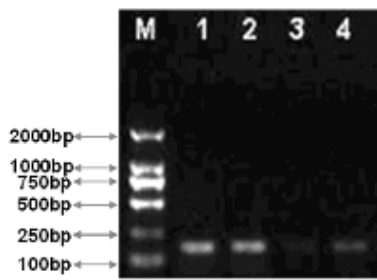
2.3 甲基化特异 PCR(MSP)验证结果 将芯片所得的目的基因进行 MSP 验证。结果显示,基因 HDAC3 在地中海贫血中是高度甲基化的,而在正常外周血中甲基化程度较低(见图 1)。

2.4 DNA 实时定量 PCR(Real-time, RT-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 1 例 β-地中海贫血学进行比较,HDAC3 基因 DNA RT-PCR 验证结果显示,与正常外周血比较,该基因在地中海贫血中甲基化程度较高,且差异有统计学意义(ratio>2.0)(表 2、图 2)。

表 2 HDAC3 基因地中海贫血与正常血样 DNA RT-PCR 结果

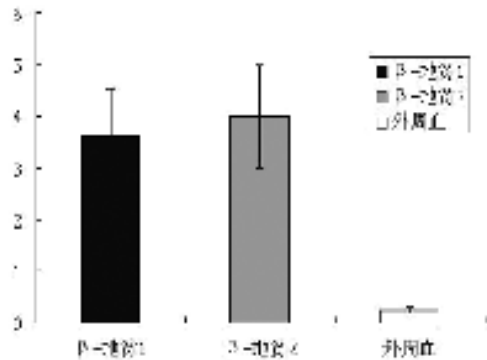
样本/内参	Ct 值	ΔCt	归一化前 ratio	比率(ratio)
actin-地贫 1	20.66	—	6.96	—
actin-地贫 2	20.42	-0.16	32.00	—
actin-外周血	20.28	0.06	—	—
HDAC3-地贫 1	21.79	—	0.88	7.89
HDAC3-地贫 2	19.68	-2.11	1.04	30.70
HDAC3-外周血	24.86	3.07	—	—

—:表示无数据。



M: Marker, DL2000; 1, 2 为地中海贫血; 3, 4 为正常外周血。

图 1 MSP 验证



纵坐标为归一化前 ratio 值。

图 2 实时定量 PCR 鉴定

3 讨 论

目前,在应用于这种高度异质性遗传病的各种分子诊断学方法中,快速简便的基因芯片技术引人注目。但是,常规的基因和蛋白质组学诊断方法已不能满足临床需要,因为对于反复妊娠发病或轻型地中海贫血患者而言,传统的分子诊断学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。有关地中海贫血在表观遗传学甲基化修饰的研究虽有报道,但既不系统又未起到指导临床诊断作用,目前仍然只能通过遗传筛查及产前诊断选择性的淘汰地中海贫血患儿以控制这类疾病的传播。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遗传疾病的分子诊断和治疗的手段之一。以分子杂交为基础的微阵列技术已应用于 DNA 甲基化检测中,这种方法是基于杂交的寡核苷酸微阵列^[6],是一种在基因组中寻找新位点的方法。目前为止,通过微阵列芯片技术检测单基因遗传病地中海贫血尚未见有报道。受此启发,作者开始尝试通过微阵列分析法去寻找基因组中的新位点,拟达到可以指导临床上对地中海贫血的早期诊断。

表观遗传学即在 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]。组蛋白甲基化修饰参与异染色质形成、基因印记、X 染色体失活和转录调控等多种主要生理功能,组蛋白的修饰作用是表观遗传学研究的一个重要领域。组蛋白甲基化的异常与肿瘤发生等多种人类疾病相关,可以特异性地激活或者抑制基因的转录活性。研究发现,组蛋白甲基转移酶的作用对象不仅仅限于组蛋白,某些非组蛋白也可以被组蛋白甲基转移酶甲基化,这将为探明细胞内部基因转录、信号转导、甚至个体的发育和分化机制提供更广阔的空间^[8]。有文献报道,在任何时候,细胞内都

有处于活化状态的基因和失活状态的基因。在发育过程的不同时期发生不同类型的基因转录^[9]。

本课题通过 DMH 芯片及其 MAS 系统的 Pathway 功能分类共发现 10 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 CFBF、MDF1、HDAC3、PLAT、PCNA、MPO、DQUOK、ETS1、MRE11A 和 ANXA1。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 HDAC3 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,β-地中海贫血是由于 β-珠蛋白生成受到抑制,造成肽链之间不平衡所引起的一组遗传性贫血^[10]。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(locus control region, LCR)序列^[11-12]。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。在胚胎发育的不同时期,ε 基因 5 上游的相关基因表观遗传学修饰有序地关闭及开启^[13],这个过程 LCR 介导了人 β-珠蛋白基因染色质区段的转录调控。文献报道,HDAC3 的甲基化修饰对 LCR 序列起转录调控作用,它的甲基化及去甲基化状态可以直接导致 LCR 序列的转录状况^[14]。因此,根据本实验结果推测 HDAC3 基因启动子区发生甲基化后导致其转录下调,从而引起 β-珠蛋白生成障碍。因此,对于组蛋白 HDAC3 的甲基化修饰的深入研究,可以为 β-地中海贫血提供临床上新的诊断靶标,提高地中海贫血的早期诊断率和筛查准确率,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] Klose RJ, Zhang Y. Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(4): 307.
- [2] Sawado T, Halow J, Im H, et al. H3 K79 dimethylation marks developmental activation of the beta-globin gene but is reduced upon LCR-mediated high-level transcription[J]. *Blood*, 2008, 112(2): 406.
- [3] Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(12): 2532.
- [4] Yu J, Zhang L, Chen AL, et al. Identification of the gene transcription and apoptosis mediated by TGF-β-Smad2/3-Smad4 signaling[J]. *J Cell Physiol*, 2008, 215(2): 422.
- [5] Tang YY, Chen YW, Ni B. 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.
- [6] 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.
- [7] Weber M, Davies JJ, Wittig D, et al. (下转第 2962 页)

性弱的菌株。

PCR 自 1985 年问世以来便不断被应用到各种病原微生物,尤其是常规难以培养的微生物检测中。该技术于 1990 年被首次用于 Hi 的鉴定,此方法快速、敏感、特异,为 Hi 的检测提供了广阔的前景。本实验选用 16S rRNA 基因及 p6 基因作为 Hi 快速鉴定的靶基因,结果表明 p6 和 16S rRNA 对 Hi 的检测均具有较高的特异性,但前者的检出率高于后者,这可能与 16S rRNA 的多样性有关。有文献报道 16S rRNA 基因是细菌的“分子化石”,在细菌及其他微生物的进化过程中高度保守,但保守性是相对的,不同细菌的科、属、种间都有不同程度的差异^[9],有研究者基于 16S rRNA 基因的多样性而对 Hi 进行分子流行病学调查及其基因分型^[10],本研究结果证实了 Hi 的 16S rRNA 存在多样性的可能。实验结果显示外膜蛋白 p6 的编码基因的 PCR 检出率为 100%,有文献报道所有的 Hi 均存在外膜蛋白 p6 的编码基因,本实验结果与文献报道一致^[11]。

综上所述,本实验结果提示 p6 基因是对 Hi 快速检测和鉴定的更特异靶基因之一,可用于临床对小儿 Hi 感染疾病的快速诊断和流行病学研究。基于前述的研究结果,可将该 PCR 方法应用于临床标本中 Hi 的直接检测,以此尝试将分子生物学技术应用于苛氧菌的快速鉴定。

参考文献:

- [1] 盛朝凯,刘岚,余道澄,等.住院呼吸道感染患儿嗜血杆菌检出率及耐药性调查[J].重庆医学,2003,32(4):431.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pediatric bacterial meningitis surveillance-African region,2002-2008[J].MMWR Morb Mortal Wkly Rep,2009,58(18):493.
- [3] 郭军,崔振泽,黄燕,等.小儿急性呼吸道感染细菌分布及耐药状况[J].中国当代儿科杂志,2008,10(5):579.
- [4] Marcon MJ,Hamoudi AC,Cannon HJ. Comparative laboratory evaluation of three antigen detection methods for diagnosis of Haemophilus influenzae type b disease[J]. J Clin Microbiol,1984,19(3):333.
- [5] Malouin F,Bryan LE,Shewciw P,et al. DNA probe technology for rapid detection of Haemophilus influenzae in clinical specimens[J]. J Clin Microbiol,1988,26(10):2132.
- [6] Van Ketel RJ,De Wever B, Van Alphen L. Detection of Haemophilus influenzae in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification[J]. J Med Microbiol,1990,33(4):271.
- [7] Bäckman A,Lantz P,Rådström P,et al. Evaluation of an extended diagnostic PCR assay for detection and verification of the common causes of bacterial meningitis in CSF and other biological samples[J]. Mol Cell Probes,1999,13:49.
- [8] Stralin K,Bäckman A,Holmberg H,et al. Design of a multiplex PCR for Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae to be used on sputum samples[J]. APMIS,2005,113(2):99.
- [9] Olsen GJ,Larsen N,Woese CR. The ribosomal RNA database project[J]. Nucleic Acids Res,1991,19(Suppl.):2017.
- [10] Sacchi CT,Alber D,Dull P,et al. High level of sequence diversity in the 16S rRNA genes of Haemophilus influenzae isolates is useful for molecular subtyping[J]. J Clin Microbiol,2005,43(8):3734.
- [11] Nelson MB,Apicella MA,Murphy TF,et al. Cloning and sequencing of Haemophilus influenzae outer membrane protein p6[J]. Infect Immun,1988,56(1):128.

(收稿日期:2009-07-12 修回日期:2009-08-15)

(上接第 2959 页)

Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells [J]. Nature Genet, 2006, 34(20):136.

- [8] Qian C,Wang X,Manzur K,et al. Structural insights of the specificity and catalysis of a viral histone H3 lysine 27 methyltransferase[J]. J Mol Biol,2006,359(1):86.
- [9] Ginder GD,Gnanapragasam NM,Mian OY. The role of the epigenetic signal,DNA methylation,in gene regulation during erythroid development, Curr [J]. Top Dev Biol, 2008,82(7):85.
- [10] 胡华,李彩霞,孙古亚,等.多重引物延伸的方法检测β-地中海贫血[J].重庆医学,2007,36(21):2193.
- [11] Stefania Bottardi, Angélique Aumont, Frank Grosveld, et

al. Developmental stage-specific epigenetic control of human β -globin gene expression is potentiated in hematopoietic progenitor cells prior to their transcriptional activation[J]. Blood,2003,102(12):3989.

- [12] Stefania Bottardi, Julie Ross, Natacha Pierre-Charles, et al. Lineage-specific activators affect β -globin locus chromatin in multipotent hematopoietic progenitors [J]. Blood,2006,25(7):3586.
- [13] Martin C,Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation[J]. Nat Rev,2005,6(11):838.
- [14] Hayashi K,Yoshida K,Matsui Y. A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase[J]. Nature,2005,438(17):374.

(收稿日期:2009-10-15 修回日期:2009-10-23)