

血管瘤血管内皮生长因子受体 KDR 基因异常甲基化的研究

杨 恩 刘 铭 彭 强

【摘要】 目的 通过建立甲基化敏感性高分辨率溶解曲线法 (MS-HRM), 检测血管瘤内皮生长因子 VEGF 受体 KDR 基因启动子区域在不同时期血管瘤、血管畸形及正常皮肤组织中的甲基化状态, 初步探讨基因甲基化在血管瘤形成、增生、退化过程中的作用。**方法** 选取不同时期血管瘤石蜡标本 48 例、血管畸形石蜡标本 15 例、正常包皮皮肤组织标本 8 例, 分别提取 DNA, 经亚硫酸氢盐甲基化修饰、纯化、回收 DNA, 然后用甲基化敏感性高分辨率溶解曲线法 (MS-HRM), 定量检测不同标本中血管瘤内皮生长因子受体 KDR 甲基化水平。**结果** 48 例血管瘤标本共检出 32 例不同程度 KDR 基因启动子区域甲基化 (66.67%), 其中 24 例增殖期血管瘤标本中检出 21 例 (87.50%) 不同程度甲基化, 24 例消退期血管瘤标本中检出 11 例 (45.83%) 不同程度甲基化, 增殖期血管瘤与消退期血管瘤标本中 KDR 的甲基化程度比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 9.375, P < 0.05$); 15 例血管畸形标本中仅检出甲基化程度为 0 ~ 25% 者 2 例 (13.33%), 8 例正常包皮皮肤组织中检测到 1 例甲基化 0 ~ 5% (12.50%)。与血管瘤相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, Fisher' 确切概率法)。**结论** 血管瘤中血管内皮生长因子受体 KDR 基因启动子序列 CpG 岛存在异常甲基化, 血管瘤内皮生长因子受体 KDR 基因异常甲基化可能与血管瘤增生、退化等有关。

【关键词】 血管瘤; 受体, 血管内皮生长因子; 基因

The Abnormal Methylation of Vascular Endothelial Cell Growth Factor Receptor-2 (KDR) Gene in Infancy Hemangioma. YANG En, LIU Ming, PENG Qiang. Department of Pediatric Surgery, Sichuan Province Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 445000, China.

【Abstract】 Objective To investigate the methylation status of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR, KDR) gene in hemangioma, vascular malformation and normal skin tissues by establishing methylation sensitivity high resolution dissolve curve method (MS-HRM). The role of genetic methylation in proliferating and regressing hemangiomas also will be discussed. **Methods** 48 different period hemangioma samples, 15 vascular abnormality samples, and 8 normal skin tissue samples were tested respectively. The DNA of samples were extracted, modified with sulphite methylation. Then, the DNA of samples was purified and recycled and prepared for test. The methylation levels of KDR in all samples were tested by the methylation sensitivity high resolution dissolve curve method (MS-HRM). **Results** KDR gene methylation were detected positively in 32 hemangioma specimens (66.67%), including 21 proliferate hemangiomas samples (87.50%) and 11 involuting hemangiomas (45.83%). There was significant difference between proliferate hemangiomas and involuting hemangiomas in KDR methylation ($X^2 = 9.375, P < 0.05$). The methylation positive rate of vascular malformation samples was 13.33% (ranged from 0% to 25%). The methylation positive rate of normal wrapping skin tissues was 12.50% (ranged from 0% to 5%). The methylation positive rate in hemangioma was significant higher than that in vascular malformation or normal wrapping skin tissue ($P < 0.05$). **Conclusions** Abnormal methylation of KDR expressed in hemangioma which may be associated with hemangioma formation, hyperplasia and degradation.

【Key words】 Hemangioma; Beceptors, Vascular Endothelial Growth Factor; Genes

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2012.04.010

作者单位: 四川省泸州医学院附属医院小儿外科 (四川省泸州市, 445000), E-mail: 151519667@qq.com, 通讯作者: 刘铭, E-mail: liuming6603@163.com

血管瘤 (hemangiomas, HA) 是婴幼儿常见的血管良性肿瘤^[1]。其发病机制目前仍不十分清楚。众多研究显示, VEGF 及其受体 KDR 在增殖期血管

瘤中高表达,在消退期血管瘤、血管畸形及含血管的正常皮肤中低表达,说明 VEGF 及其受体 KDR 的改变与血管瘤的血管增生有着密切关系。近年来研究发现,肿瘤的发生与 DNA 异常甲基化紧密相关,已成为肿瘤发生机制的研究热点之一。血管瘤的发生发展是细胞、细胞因子、基因、信号传导途径等多种因素发生改变的结果,我们有理由怀疑血管瘤组织中某些基因可能发生了甲基化变异,使得某些促血管生成功能相关基因的部分功能失活,最终导致正常血管生成障碍,形成血管瘤。因此,从 DNA 异常甲基化的角度研究血管瘤对进一步探明其增生与退化机制可能具有重要意义。本研究首次采用甲基化敏感性高分辨率溶解曲线法 (Methylation sensitive high resolution melting curve analysis, MS-HRM) 来检测 48 例不同时期血管瘤及 15 例血管畸形和 8 例正常包皮皮肤组织 DNA 中 VEGF 受体 KDR 基因启动子区域 CpG 岛的甲基化状态,通过对目前研究较多的 VEGF 及其受体 KDR 这条血管生成途径的甲基化状况的检测,进行血管瘤组织中基因异常甲基化的初步研究,探讨血管瘤增生与消退的可能机制。

材料与方法

一、研究对象

选取本院 2006 ~ 2010 年手术切除的血管瘤等石蜡标本 48 例,其中男 20 例,女 28 例,手术年龄 2 个月至 10 岁,按 Mulliken 等^[2]标准进行复检及免疫组化测定细胞增殖核抗原 (Antigen identified by monoclonal antibody, Ki-67) 的结果分类^[3],其中增殖期血管瘤 24 例,消退期血管瘤 24 例,最小年龄 2 个月,最大 10 岁。另取血管畸形石蜡标本 15 例,男性 6 例,女性 9 例,年龄最小 2 岁,最大 13 岁。血管瘤主要分为毛细血管瘤、海绵状血管瘤、混合型血管瘤及蔓状血管瘤,主要选取毛细血管瘤、海绵状血管瘤及混合型血管瘤为标本,其中混合型血管瘤提取组织的部位为毛细血管和海绵状血管两种组织均有的部位。血管畸形主要为动-静脉血管畸形。这些血管瘤及血管畸形所在的部位有头皮、前额、耳背、颈部、肩部、上肢、大腿、手、足的皮肤及脑内等。正常包皮皮肤组织 8 例作对照,正常包皮皮肤标本均经过 10% 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋处理。

二、试剂及仪器

小鼠抗人单克隆抗体 Ki-67 (BIOWORLDE 公司),热启动酶 (德国 QIAGEN 公司),dNTP (10mM)

(日本 Takara 公司),荧光染料 Evagreen (Biotium 公司),全基因组甲基化 DNA (德国 QIAGEN 公司),全基因组非甲基化脐带血 DNA (自己制备),甲基化修饰试剂盒 (德国 QIAGEN 公司),石蜡 DNA 提取试剂盒 (德国 QIAGEN 公司),引物合成 (北京金唯智生物科技公司),LightCycler 480 荧光定量仪 (瑞士 Roche 公司),Nanodrop 1000 定量仪 (美国 Thermo 公司)

三、DNA 提取

分别按石蜡 DNA 提取试剂盒说明书和血液 DNA 提取试剂盒说明书进行样本 DNA 和 100% 非甲基化健康孕妇脐带血 DNA 提取。用 NANO Drop1000 核酸定量仪测定 DNA 浓度,调整 DNA 浓度至 5 ng/ μ L。

四、甲基化修饰、纯化及回收

取 DNA 标本 1 μ g,按 EpiTect Bisulfite Handbook 说明书进行甲基化修饰、纯化、回收。

五、构建标准品

以 QIAGEN 公司的全基因组甲基化 DNA 作为 100% 甲基化标准品,与 100% 非甲基化健康孕妇脐带血 DNA 按比例混合,稀释制成 0%、5%、25%、50%、75%、100% 系列浓度甲基化 DNA,将标准品经过 PCR 扩增后进行 MS-HRM 溶解曲线检测,重复检测 3 次获得标准曲线。按待测标本在标准曲线上的位置确定其甲基化程度。

六、MS-HRM 检测 KDR 基因启动子区域甲基化

使用 primer premier 5.0 软件设计引物,上游引物序列: 5'-TATTAGTTTTTATTTTGTATTGAGTTTCG-3';下游引物序列 5'-AATATCCAACTACCAAACGAACTT-3'。PCR 反应体系 25 μ L,其中 PCRbuffer 2.5 μ L (含 Mg^{2+} ,终浓度在 1.5 mmol/L), $MgCl_2$ 0.5 μ L,dNTPmixture 0.5 μ L,Eva-green 饱和染料 1.0 μ L,上下游引物各 1.9 μ L,修饰后的 DNATemplate 1.0 μ L,Taq 酶 0.2 μ L,ddH₂O 15.5 μ L。PCR 和 HRM 反应条件:95 $^{\circ}C$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}C$ 变性 10 s,60 $^{\circ}C$ 退火 30 s,72 $^{\circ}C$ 延伸 10 s,50 个循环后。HRM 反应条件:95 $^{\circ}C$ 1 min,40 $^{\circ}C$ 1 min 预处理后,65 $^{\circ}C$ 1 s,溶解温度 76 $^{\circ}C$ ~ 95 $^{\circ}C$,每升高 0.1 $^{\circ}C$ 采集 1 次数据,每秒检测荧光 40 次。运行 LightCycler 480 gene scanning 程序,得到分型图谱,判断样本曲线与标准曲线的位置,得到样本甲基化程度数据。

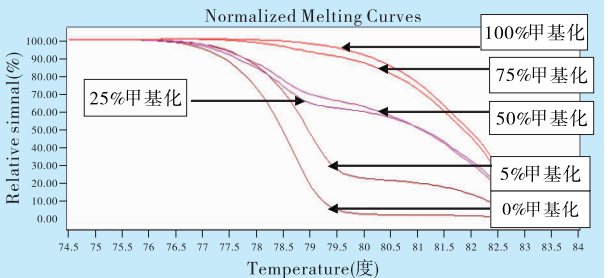
七、统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。不同组织间 KDR 甲基化率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher's 确切概率法分析, $P < 0.05$ 为差异有显著统计学意义。

结 果

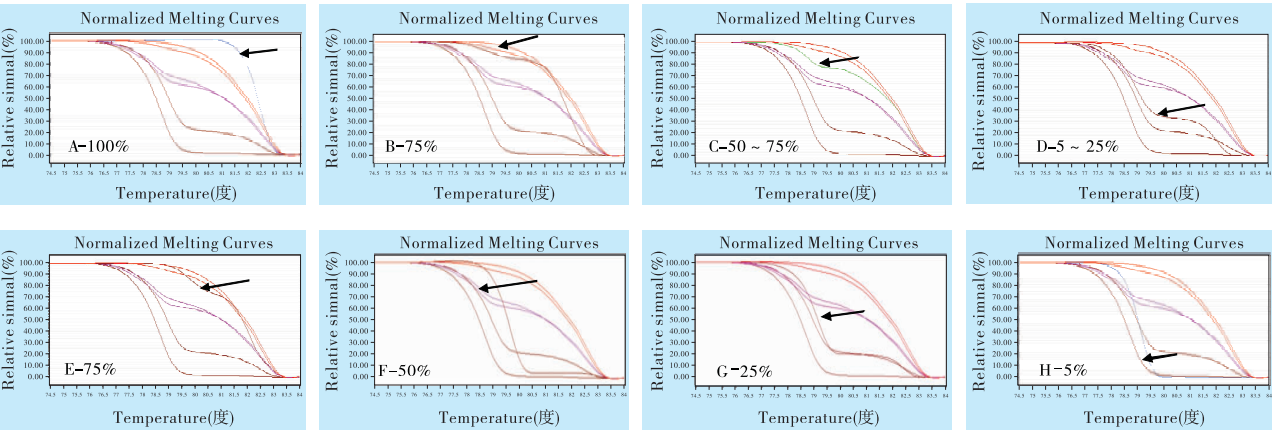
一、MS-HRM 标准曲线及重复性结果

0.5%、25%、50%、75% 和 100% 系列浓度甲基化标准品 DNA, 经过 PCR 扩增后进行 MS-HRM 溶解曲线检测, 并经过 3 次重复检测获得标准曲线(图 1)。在溶解曲线图中, 曲线从左往右依次分开排列, 能精确地划分标本甲基化程度。待测样本在系列浓度标准曲线中的相应位置与其甲基化程度的



注: 横轴temperature为溶解温度Tm值, 随甲基化程度的升高而升高, 纵轴relative signal为荧光强度, Normalized Melting Curves为标准曲线, 从右向左分别代表了标准品经过扩增后经MS-HRM检测后的不同甲基化程度。

图1 MS-HRM法标准曲线图



注: A、B、C、D为增殖期血管瘤标本中KDR基因不同程度甲基化, E、F、G、H为消退期血管瘤标本中KDR基因不同程度甲基化。

图2 不同标本中KDR基因不同程度甲基化

表 1 KDR 在不同时期血管瘤、血管畸形和正常皮肤中甲基化情况

检测组织	KDR 甲基化情况					χ^2 值	P 值
	例数	甲基化	非甲基化	甲基化率 (%)			
增殖期血管瘤	24	21	3	85.70	—	—	
消退期血管瘤	24	11	13	45.83	9.375	0.002 *	
血管畸形	15	2	13	13.33	20.986	0.000 *	
正常皮肤组织	8	1	7	12.50	15.709	0.000 *	

注: * 为各组分别与增殖期血管瘤相比所得 P 值, $P < 0.05$ 。

高低相对应, 因此能根据待测样本在标准曲线中的位置推测其甲基化程度。3 次检测结果显示其曲线基本重叠一致。

二、MS-HRM 检测不同组织中 KDR 基因甲基化程度结果

经过 MS-HRM 检测, 48 例血管瘤标本共检出 32 例不同程度 KDR 基因甲基化(66.67%), 其中 24 例增殖期血管瘤标本中检出 21 例(21/24, 87.50%)不同程度甲基化(图 2), 1 例甲基化程度为 0~5%, 11 例甲基化为 25%~50%, 5 例甲基化为 75%, 4 例甲基化为 100%; 24 例消退期血管瘤标本中检出 11 例(11/24, 45.83%)不同程度甲基化(图 2), 其中 1 例甲基化程度为 75%, 8 例甲基化为 25%~50%, 2 例甲基化为 0~5%, 增殖期血管瘤与消退期血管瘤标本中 KDR 的甲基化程度比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 9.375, P < 0.05$); 15 例血管畸形标本中仅检出甲基化程度为 0~25% 2 例(2/15, 13.33%), 8 例正常包皮皮肤组织中检测到 1 例甲基化 0~5% (1/8, 12.50%)。与血管瘤相比, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$, Fisher' 确切概率法); 消退期血管瘤与血管畸形中 KDR 的甲基化程度比较, 差异有统计学意义($P = 0.045$, Fisher' 确切概率法), 见表 1。

讨 论

DNA 甲基化是最早发现的基因表观遗传修饰方式之一,可通过不改变基因序列而引起基因表达失活,是肿瘤形成过程中基因沉默的重要机制之一^[4]。DNA 发生异常甲基化会对相关基因产生很大影响:①DNA 高甲基化可能导致基因功能部分或全部失活;②DNA 低甲基化可能引起基因组不稳定;③影响染色体结构的组蛋白修饰;④DNA 去甲基化可能诱导基因的重新活化和表达。

KDR (Kinase insert domain-containing receptor, 含激酶插入区功能区受体)是从人的内皮细胞 cDNA 文库分离得到的 Flk-1 (fetal liver kinase-1, 胎肝激酶-1)基因的同源物,是 VEGF 发挥促血管生成作用的主要功能性受体,具有明显趋化性和促分裂活性。如果 Flk-1/KDR 基因表达缺陷,可干扰内皮细胞分化,阻止新生血管的形成。研究发现^[5],纯合子动物编码 Flk-1/KDR 基因突变会减少已有的血管内皮细胞以出芽方式生成血管及其功能,而不影响间质原位细胞分化为成血管细胞和血细胞生成,这提示 KDR 是血管形成的主要调控因子。

本实验中,作者采用甲基化敏感性高分辨率溶解曲线 (MS-HRM) 法对血管瘤、血管畸形、正常包皮皮肤组织中 VEGF 受体 KDR 基因启动子区域异常甲基化状态进行检测,结果 48 例不同时期血管瘤标本中,共检出 32 例甲基化 (66.67%);15 例血管畸形中,检出 2 例甲基化 (13.33%);8 例正常皮肤组织中检测到 1 例甲基化 (12.50%),差异具有统计学意义,表明血管瘤组织中 KDR 基因存在着异常高甲基化;24 例增殖期血管瘤标本中检出 21 例发生甲基化,24 例消退期血管瘤标本中检出 11 例甲基化,二者差异显著,表明血管瘤增生与自然消退与 KDR 基因发生的异常甲基化及去甲基化有关,血管瘤的增生伴随着 KDR 基因启动子区域高甲基化,而血管瘤的消退伴随着 KDR 基因启动子区域去甲基化的发生。值得关注的是在消退期血管瘤中不同标本甲基化程度存在一些差别,其中 1 例甲基化程度为 75%,8 例甲基化程度为 50%,2 例甲基化程度为 5%~25%,作者考虑可能与不同标本处于消退期的

不同阶段有关系。DNA 甲基化是一个可以逆转的表观遗传现象,而去甲基化受到复杂的调控是一个缓慢而复杂的过程,因此,在不同阶段的个体中去甲基化程度就可能有很大差异,当然这仅仅是推测。通过检测基因的甲基化程度是否可以判断血管瘤的分期尚需进一步大样本的研究。另外,本实验发现血管瘤增生期 KDR 基因启动子序列 CpG 岛甲基化率明显高于血管瘤消退期,血管瘤的消退伴随着 KDR 基因启动子区域去甲基化的发生,而既往众多的研究均发现 VEGF 及其受体 KDR 在增殖期血管瘤中表达明显升高,消退期表达显著减少^[6-8],这表明血管瘤中 KDR 基因的异常高甲基化并没有导致 KDR 基因的转录和蛋白表达的降低,因此,血管瘤 DNA 甲基化后对基因及蛋白表达的影响及机制还有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 张莉,林晓曦,王伟. 血管瘤和血管畸形的鉴别诊断[J]. 中华整形外科杂志. 2003,19(2):138-141.
- 2 Mulliken JB, Zetter BR, Folkman J. In vitro characteristics of endothelium from hemangiomas and vascular malformations [J]. Surgery, 1982, 92(2):348-335.
- 3 王彪,庄福连,王美水,等. Ki-67 抗原在血管瘤和血管畸形组织中的表达[J]. 中华医学美容美容杂志, 2006, 12(2):98-100.
- 4 Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome [J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(1):R50-59.
- 5 Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3 [J]. Circulation, 1996, 93(8):1493-1495.
- 6 Tanst, elickovicm, Ruger B M, et al. Cellular and extracellular markers of hemangioma [J]. Plast Reconstr surg, 2000, 106(3):529-538.
- 7 Li Chen, Zhao Yi Fang, Zhang Wen Feng, et al. Vascular endothelial growth factor, endothelial cell proliferation and angiogenesis in human hemangioma [J]. Chin J Dent Res, 2004, 7(1):32-36.
- 8 梁杰,黄其佳. 血管瘤中血管内皮生长因子及其受体 KDR 的表达和血管生成的研究[J]. 中国临床新医学, 2009, 2(11):1131-134.