

鼻息肉 VEGF-B 基因启动子甲基化研究*

谭海燕^{1△} 白伟良¹ 王泉维¹ 徐婷婷¹

[摘要] 目的:探讨 VEGF-B 基因启动子在鼻息肉中甲基化状态。方法:应用 MS-PCR 检测 28 例实验组鼻息肉组织和 12 例对照组正常组织 VEGF-B 基因启动子甲基化状态,并对 MS-PCR 产物进行测序。结果:VEGF-B 启动子甲基化在 28 例鼻息肉中有 9 例阳性,19 例阴性;在 12 例对照组织中 8 例阳性,4 例阴性。鼻息肉组织和对照组织中 VEGF-B 基因启动子甲基化阳性率的差异有统计学意义($\chi^2=4.096, P<0.05$)。MS-PCR 产物测序结果表明鼻息肉中存在 VEGF-B 基因启动子甲基化修饰。结论:鼻息肉中 VEGF-B 基因启动子可能存在低甲基化状态。推测鼻息肉 VEGF-B 基因甲基化调控着 VEGF-B 的表达,在鼻息肉的发生机制中占有重要地位。

[关键词] 鼻息肉; VEGF-B; 启动子; 甲基化特异性聚合酶链反应

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2017.19.005

[中图分类号] R765.25 [文献标志码] A

The exploration of VEGF-B methylation in the nasal polyp

TAN Haiyan BAI Weiliang WANG Xiaowei XU Tingting

(Department of Otolaryngology, Shengjing Hospital, the Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, 110004, China)

Corresponding author: BAI Weiliang, E-mail: bweiliangcmu@163.com

Abstract Objective: The objective of this study is to investigate the methylation status of vascular endothelial cell growth factor B (VEGF-B) gene and to identify the roles in pathogenesis, development and classification of nasal polyps. **Method:** The methylation status of VEGF-B gene of 28 nasal polyp tissues and 12 samples of inferior turbinate tissues were detected by methylationspecific-polymerase chain reaction (MS-PCR) and gene sequencing. **Result:** There was significant statistic difference between nasal polyp tissue group and control group ($\chi^2=4.096, P<0.05$). The results of gene sequencing suggest that the VEGF-B gene promoter were hypomethylation status in the nasal polyps. **Conclusion:** Methylation status of VEGF-B promoter may play an important role in the pathogenic mechanism of nasal polyps.

Key words nasal polyps; vascular endothelial growth factor B; promoter; methylation specific-polymerase chain reaction

鼻息肉是耳鼻咽喉科常见疾病,本质上是鼻黏膜的慢性持续性炎症,鼻息肉的发生与多种因素有关。近年来,学者们发现 VEGF-B 在鼻息肉中表达较高,VEGF-B 具有较强的促进血管内皮细胞分裂增生的能力,可强烈而特异地促使血管内皮细胞分裂增殖,增加血管的通透性,并且能增强毛细血管的通透性而促进血管新生^[1],因此可能在鼻息肉重塑改造过程中起重要作用,但是 VEGF-B 基因在鼻息肉中升高的表达机制并不清楚。DNA 基因甲基化是调节基因表达的一个重要机制,有报道 VEGF-B 基因甲基化可能是其在某些组织中的调控方式^[2],但是在鼻息肉中其基因甲基化状态并无报道,我们通过甲基化特异性聚合酶链反应(MS-PCR)及基因测序的方法,研究鼻息肉中 VEGF-B 基因启动子甲基化状态。

1 材料与方法

1.1 研究对象

实验组 28 例鼻息肉标本(男 15 例,女 13 例;年龄 24~70 岁,平均 46.1 岁),均来自初次行鼻息肉切除术的患者(术后病理证实),诊断标准参照 2012 年昆明 CRS 指南,排除肿瘤、免疫缺陷及其他严重全身性疾病;对照组为鼻中隔偏曲患者的正常下鼻甲黏膜组织 12 例(男 7 例,女 5 例;年龄 20~55 岁,平均 36.3 岁),均来自 2010—2012 年期间在中国医科大学附属盛京医院耳鼻咽喉科手术切除的标本,-80℃保存。

1.2 主要试剂及仪器

硫化处理试剂盒(ZYMO D5005),DNA 提取试剂盒(Takara D824),MS-PCR 试剂盒(Takara DR110),引物(Takara),2%的琼脂糖凝胶,紫外分光光度计,PCR 扩增仪,电泳仪,凝胶成像系统。

1.3 研究方法

1.3.1 DNA 提取 按照 Takara D824 步骤从组织中提取总 DNA。提取的 DNA 用紫外分光光度计测定其浓度及纯度。

* 基金项目:辽宁省科学事业公益研究基金资助(No: 2013001010);沈阳市科学计划项目资助(No: F11-264-1-07, F13-220-9-21)

¹ 中国医科大学附属盛京医院耳鼻咽喉科(沈阳,110004)

[△] 现在东港市中心医院耳鼻咽喉科(辽宁东港,118300)

通信作者:白伟良, E-mail: bweiliangcmu@163.com

1.3.2 引物设计与合成 Meth Primer 软件在线设计引物,引物由宝生物工程(大连)有限公司合成甲基化引物和非甲基化引物。甲基化上游引物:5'-ACGG-TTAGGGTAGCGGTAGTC-3',下游引物:5'-ACCGA-ACACGAACTCTACGAA-3';非甲基化上游引物:5'-AATGGTTAGGGTAGTGGTAGTTGT-3',下游引物:5'-AAAAACCAAACACAAACTCTACAAA-3'。

1.3.3 DNA 甲基化修饰 根据总 DNA 浓度不同,按照 ZYMO 硫化修饰说明书对总 DNA 进行硫化处理,其目的是将 DNA 序列中未甲基化的胞嘧啶完全转化为尿嘧啶,而甲基化的 5-甲基胞嘧啶保持不变。制备好的 DNA 放置于 -20℃ 备用。每次制备的 DNA 范围在 500 pg~2 μg,最佳量 200~500 ng。

1.3.4 MS-PCR 以去离子水为空白对照,用硫化处理后的基因组 DNA 为阳性对照。MSP 反应体系为 25 μl, TaKaRa EpiTap HS 0.125 μl, 10× EpiTap PCR Buffer 2.5 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μl, dNTP Mixture 3 μl, 硫化处理后的 DNA 2 μl, 上下引物各 1 μl, 去离子水 12.875 μl。其反应条件:95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72℃ 终延伸产物 4 min 结束。

1.3.5 电泳 PCR 反应结束后,取 5 μl 的样品加入 1 μl 6× Loading Buffer 后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪观察结果。

1.3.6 测序 将 MS-PCR 扩增产物送往北京六和 华大基因科技股份有限公司进行测序。

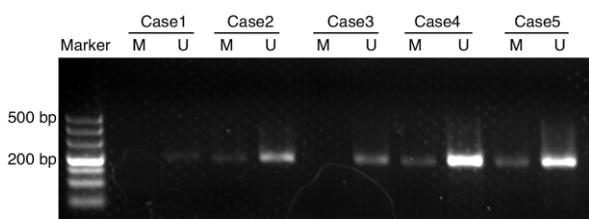
1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件分析。对鼻息肉组织及对照组织的 VEGF-B 启动子甲基化阳性分布进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 鼻息肉组织及对照组织的 VEGF-B 启动子甲基化检测结果

VEGF-B 启动子甲基化在 28 例鼻息肉中有 9 例阳性,19 例阴性;在 12 例对照组织中 8 例阳性,4 例阴性。鼻息肉组和对照组比较差异有统计学意义($\chi^2=4.096, P<0.05$),见图 1。

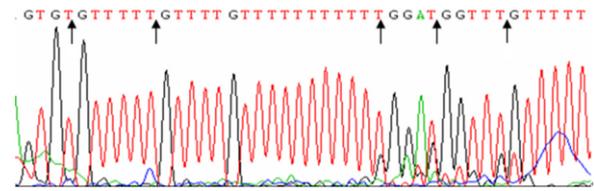


Case1 和 Case3:鼻息肉无甲基化;Case2 和 Case4:鼻息肉甲基化阳性;Case5:正常组织甲基化阳性。

图 1 VEGF-B 基因启动子甲基化状态

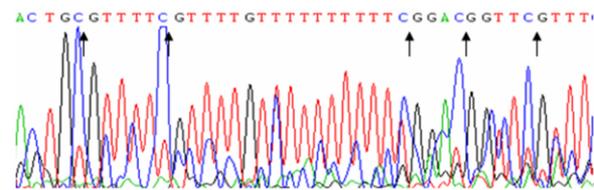
2.2 MS-PCR 产物测序

对鼻息肉及鼻腔黏膜组织的 MS-PCR 进行 DNA 测序,启动子呈非甲基化状态的组织,PCR 产物中 CpG 岛内胞嘧啶已经完全转化为尿嘧啶(图 2);启动子呈甲基化状态的组织,其 PCR 产物中 CpG 岛内胞嘧啶保持不变未转化为尿嘧啶(图 3)。



非甲基化引物扩增的 PCR 产物中 CpG 岛内胞嘧啶已经完全转化为尿嘧啶(箭头所示)。

图 2 甲基化阴性测序



甲基化引物扩增的 PCR 产物中 CpG 岛内胞嘧啶保持不变未转化为尿嘧啶。

图 3 甲基化阳性测序

3 讨论

研究发现血管内皮生长因子家族与鼻息肉形成密切相关,其家族包括:VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、胎盘生长因子和 VEGF-F 等 7 个成员以及各自的变位剪切体^[3-4]。VEGF-B 是近年被发现的 VEGF 家族的新成员,广泛存在于各种组织中,如内皮细胞、褐色脂肪、皮肤、肺、胎盘、视网膜等,位于 11 号染色体 q13^[5]。VEGF-B 以同源二聚体形式与内皮细胞表面的血管内皮生长因子受体 1 结合而发挥促进血管生成的生物学作用。通过激活 FLT-1 上调尿激酶型纤溶酶原激活物及纤溶酶原激活物抑制因子-1,提示 VEGF-B 在内皮细胞迁移和基质重构中起作用^[6]。动物实验研究表明 VEGF-B 能促进血管生成,可能与激活内皮细胞一氧化氮合成酶有关。VEGF-B 还可与 VEGF-A 形成异源二聚体,从而影响 VEGF-A 的生物学活性。鼻息肉组织特征为间质高度水肿、血管增生扩张。VEGF 又称血管通透因子,同时是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂素^[7],可引起息肉组织高度水肿,同时促进息肉组织内的血管增殖和炎性细胞聚积等。VEGF-B 作为 VEGF 成员之一,在鼻息肉中的表达及意义目

前尚无报道。前期我们通过基因芯片筛查发现鼻息肉中存在 VEGF-B 调控,并通过 Real Time PCR 认证 VEGFB mRNA 在鼻息肉中存在高表达,但其在鼻息肉中的调控机制目前尚未明确。

近年随着对表观遗传学的研究,人们认识到遗传和环境是密切相关的 2 个因素,由于人类遗传背景短期内不可能发生明显变化,表观遗传修饰在环境和遗传因素之间起到重要的调控作用。表观遗传学主要研究没有 DNA 序列变化并且可以遗传的基因表达改变,能在发育和细胞增殖过程中形成稳定的遗传信息,属于非孟德尔遗传规律的核内遗传,和 DNA 序列改变不同的是表观遗传的改变是可逆的^[8]。DNA 甲基化是表观遗传学机制的重要组成部分之一,指在 DNA 甲基转移酶作用下,以 S-腺苷甲硫氨酸作为供体,将活化的甲基基团引入 DNA 链,在基因组 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5 碳位共价结合一甲基基团,形成 5-甲基胞嘧啶,构成甲基化的 CpG 从而阻碍转录因子与启动子的结合影响基因转录^[9]。研究发现 DNA 甲基化对哮喘的辅助 T 细胞(Th1/Th2)功能失衡具有极其重要的作用。IL-4、IFN- γ 等基因甲基化在依赖于细胞因子刺激、信号传导和转录激活因子(STAT)刺激下影响着 Th2 分化,从而影响哮喘发病^[10]。鼻息肉与哮喘有着密切联系,“一个气道,一个炎症”形象地概括 2 种疾病的一致性和相关性。本实验中通过 MS-PCR 对实验组及对照组中的 VEGFB 启动子甲基化状态检测,发现对照组中甲基化阳性率高于实验组,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.096, P < 0.05$)。这证实了鼻息肉中存在着基因甲基化调控。通过基因测序进一步发现鼻息肉中 VEGF-B 基因启动子甲基化,并且呈低甲基化状态。

VEGF-B 基因甲基化修饰影响鼻息肉发病的详细机制目前还不清楚。研究发现鼻息肉患者转录激活因子 3 (STAT3) 和转录激活因子 6 (STAT6) 的表达显著高于对照组(正常下鼻甲组)^[11]。STAT 是在多种细胞因子和生长因子与相应受体结合后,激活 JAK 等酪氨酸激酶,从而被其磷酸化,然后形成二聚体,再转位至核中,与 DNA 上的靶基因结合,激活靶基因的转录^[12]。学者们研究发现 STAT3 蛋白(即 STAT3B,一种 STAT3 的突变形式,可抑制 STAT3 的活性)及 STAT3 反义寡核苷酸阻断 STAT3 的信号转导,均可下调 VEGF 的表达,同时通过染色质免疫沉淀检测,发现 P-STAT3 蛋白在体内结合于 VEGF 的启动子并影响其活性,阻断 STAT3 的信号转导可下调 VEGF 的表达,使鼻息肉的生长减慢。STAT6 是 Th2 分化的特异性转录因子,可促进 Th2 细胞增殖和产生 IL-4、IL-13 等 Th2 细胞因子,使 Th1/Th2 比例失衡,调节 Th2 优势应答,从

而导致局部 Th2 细胞因子高表达,促进 B 细胞分化和 IgE 的类型转换,以及 EOS 聚集等炎症反应^[13]。维持基因位点的表观遗传修饰依赖于细胞因子刺激、信号传导和转录激活因子刺激。在有关哮喘表观遗传学研究发现 STAT 可促进某些基因位点组蛋白乙酰化和 DNA 甲基化^[14]。转录激活因子在鼻息肉发病机制中起着重要的作用,尤其发现 STAT3 与鼻息肉中 VEGF 表达有着密切的关系,推测在鼻息肉中 STAT 可促进 VEGF-B 基因位点组蛋白乙酰化和启动子甲基化,从而调控 VEGFB 的表达,影响鼻息肉的发病。

本实验还发现同一患者中鼻息肉组织基因启动子呈无甲基化状态,而在正常黏膜中呈低甲基化状态。前期我们已通过基因芯片筛查及 Real Time PCR 认证发现 VEGF-B mRNA 在鼻息肉中存在高表达,对照正常黏膜中低表达。由此推测基因启动子甲基化从转录水平影响到 mRNA 的转录效率。但由于样本量小,本实验中可能存在着偶然性,我们将进一步完善大样本 Real Time PCR 验证鼻息肉中是否有 VEGF-B mRNA 高表达;应用 Western blotting 实验观察鼻息肉中 VEGF-B 蛋白表达情况;从而进一步研究鼻息肉中 VEGF-B 基因启动子甲基化状态,其 mRNA 和蛋白表达情况,为深入研究鼻息肉的病理机制提供了新的机制及理论基础。本研究仅仅提供了 VEGF-B 及启动子甲基化修饰参与了鼻息肉发病的客观依据,但有关其参与的具体机制以及与其他基因和细胞因子的关系有待进一步探索。

参考文献

- [1] BOBIC S, HOX V, CALLEBAUT I, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 1 expression in nasal polyp tissue[J]. *Allergy*, 2014, 69: 237-245.
- [2] CURTIN J A, SIMPSON A, BELGRAVE D, et al. Methylation of IL-2 promoter at birth alters the risk of asthma exacerbations during childhood [J]. *Clin Exp Allergy*, 2013, 43: 304-311.
- [3] CHO J S, KANG J H, HAN I H, et al. Activation of TLR4 induces VEGF expression via Akt pathway in nasal polyps[J]. *Clin Exp Allergy*, 2013, 43: 1038-1047.
- [4] DIVEKAR R D, SAMANT S, RANK M A, et al. Immunological profiling in chronic rhinosinusitis with nasal polyps reveals distinct VEGF and GM-CSF signatures during symptomatic exacerbations [J]. *Clin Exp Allergy*, 2015, 45: 767-778.
- [5] DEVAUX Y, VAUSORT M, AZUAJE F, et al. Low levels of vascular endothelial growth factor B predict left ventricular remodeling after acute myocardial infarction[J]. *J Card Fail*, 2012, 18: 330-337.

(下转第 1491 页)

- to traffic-related air pollution and allergic rhinitis in pre-school children[J]. *Respir Med*,2016,121:67-73.
- [27] 张福定,何勇,邵薇娜.宁波市青少年变应性鼻炎患病情况及相关因素调查[J].*实用预防医学*,2015,22(2):189-190.
- [28] 李佩娥,徐胜辉,廖卫华.外来学生变应性鼻炎的流行病学调查[J].*川北医学院学报*,2014,29(2):195-198.
- [29] HU Y, LIU W, HUANG C, et al. Home dampness, childhood asthma, hay fever, and airway symptoms in Shanghai, China: associations, dose-response relationships, and lifestyle's influences[J]. *Indoor Air*,2014,24:450-463.
- [30] 张莉君,郭常义,许慧慧,等.社区儿童哮喘及过敏性疾病的环境影响因素分析[J].*环境与健康杂志*,2014,31(8):702-706.
- [31] 路婵,邓启红,欧翠云,等.大气污染对儿童鼻炎发病率的影响[J].*科学通报*,2013,58(25):2577-2583.
- [32] 阎萍,周晶,任霞斌,等.上海市徐汇区中小学生对变应性鼻炎的患病率及危险因素调查[J].*中国基层医药*,2013,20(3):343-346.
- [33] DONG G H, QIAN Z M, WANG J, et al. Residential characteristics and household risk factors and respiratory diseases in Chinese women: the Seven Northeast Cities (SNEC) Study[J]. *Sci Total Environ*,2013;389-394.
- [34] BOUSQUET J, KHALTAEV N, CRUZ A A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen)[J]. *Allergy*,2008,63 Suppl 86:8-160.
- [35] BROZEK J L, BOUSQUET J, BAENA-CAGNANI C E, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision[J]. *J Allergy Clin Immunol*,2010,126:466-476.
- [36] FUHLBRIGGE A L, ADAMS R J. The effect of treatment of allergic rhinitis on asthma morbidity, including emergency department visits[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*,2003,3:29-32.
- [37] SAXON A, DIAZ-SANCHEZ D. Air pollution and allergy: you are what you breathe[J]. *Nat Immunol*,2005,6:223-226.

(收稿日期:2017-07-16)

(上接第 1484 页)

- [6] CHOI M R, YOO N J, LEE S H, et al. Frameshift mutation of an angiogenesis factor VEGFB and its mutational heterogeneity in colorectal cancers [J]. *Pathol Oncol Res*,2015,21:853-855.
- [7] FRUTH K, ZHU C, SCHRAMEK E, et al. Vascular endothelial growth factor expression in nasal polyps of aspirin-intolerant patients[J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*,2012,138:286-293.
- [8] SEIBERLING K A, CHURCH C A, HERRING J L. Epigenetics of chronic rhinosinusitis and the role of the eosinophil[J]. *Int Forum Allergy Rhinol*,2012,2:80-84.
- [9] ACEVEDO N, REINIUS L E, GRECO D, et al. Risk of childhood asthma is associated with CpG-site polymorphisms, regional DNA methylation and mRNA levels at the GSDMB/ORMDL3 locus[J]. *Hum Mol Genet*,2015,24:875-890.
- [10] BRAND S, KESPER D A, TEICH R, et al. DNA methylation of TH1/TH2 cytokine genes affects sensitization and progress of experimental asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*,2012,129:1602-1610. e6.
- [11] CAO Q, ZHANG T, ZHANG J, et al. Correlation analysis of STAT3 and VEGF expression and eosinophil infiltration in nasal polyps[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*,2015,272:1955-1960.
- [12] LINKE R, PRIES R, KÖNNECKE M, et al. Increased activation and differentiated localization of native and phosphorylated STAT 3 in nasal polyps[J]. *Int Arch Allergy Immunol*,2013,162:290-298.
- [13] ALBASANZ-PUIG A, MURRAY J, NAMEKATA M, et al. Opposing roles of STAT-1 and STAT-3 in regulating vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2012,428:179-184.
- [14] MICHEL S, BUSATO F, GENUNEIT J, et al. Farm exposure and time trends in early childhood may influence DNA methylation in genes related to asthma and allergy[J]. *Allergy*,2013,68:355-364.

(收稿日期:2017-06-30)