

葡萄胎中MBD2表达及其相关基因甲基化芯片研究

郭良蕊 何俊琳 陈雪梅 刘学庆 王应雄 丁裕斌*

(重庆医科大学公共卫生学院生殖生物学实验室, 重庆 400016)

摘要 用Real-time RT-PCR、Western blot 和免疫组织化学方法分别检测了去甲基化酶MBD2(methyl-CpG-binding domain 2, MBD2)在完全型葡萄胎(complete hydatidiform mole, CHM)和正常早期妊娠绒毛中的表达, 用甲基化DNA免疫沉淀MeDIP(methylated DNA immunoprecipitation)-甲基化芯片分析完全型葡萄胎和正常早期妊娠绒毛中相关基因的甲基化情况, 用生物信息学分析筛选了差异甲基化基因并进行功能分类。MBD2的mRNA在完全型葡萄胎中的表达明显高于正常早期妊娠绒毛($P=0.0083$), Western blot($P=0.0005$)和免疫组织化学($P=0.0091$)检测到MBD2蛋白表达与Real-time RT-PCR结果一致。结果显示MBD2在完全型葡萄胎中的表达显著高于正常早期妊娠绒毛组织($P<0.01$), 与正常早期妊娠绒毛组织相比较, 完全型葡萄胎组织中相对有89个基因发生了去甲基化, 其中85个基因可被映射到基因组图谱中, MBD2在完全型葡萄胎中的高表达及部分基因的去甲基化可能在完全型葡萄胎的发生中扮演了重要的角色。

关键词 完全型葡萄胎; 去甲基化酶; MBD2; 甲基化DNA免疫沉淀

葡萄胎是一种常见的妊娠滋养层细胞疾病, 以滋养层细胞异常增生、绒毛间质水肿及缺乏间质血管为主要特征。目前对葡萄胎发生的原因尚未完全清楚。滋养细胞来源于胚胎的胚外层细胞, 早期胎盘的滋养细胞具有许多类似恶性肿瘤的特性, 表现为迅速增生并侵蚀子宫内层, 但是胎盘形成后滋养细胞即停止侵入, 而变成肿瘤的滋养细胞却不断浸润, 并发生转移, 其滋养层细胞增生与肿瘤性增生在生物学行为上一致^[1]。在肿瘤发生的研究中, 表观遗传学研究表明, DNA甲基化异常在肿瘤发生、发展过程中发挥重要作用, 被称为“肿瘤发生的第三条途径”^[2]。DNA甲基化异常的肿瘤细胞与正常细胞相比, DNA甲基化状态和方式存在很大差异。在肿瘤细胞基因组范围内, 某些基因去甲基化和胞嘧啶水平降低, 可导致原癌基因活化、形成突变热点、转座子的异常表达、基因组不稳定等^[3,4]。DNA去甲基化酶(DNA demethylase)MBD2是甲基化CpG结合蛋白2, 有研究表明MBD2特异性结合基因甲基化的启动子, 吸引组氨酸去乙酰化酶和染色质重构蛋白, 从而抑制转录, 导致基因沉默, 提示MBD2在肿瘤发生中发挥重要作用。亦有研究表明MBD2的异常表达与人类肿瘤的形成有关^[5]。在一些癌症中发现MBD2的表达并不一致, MBD2在葡萄胎中的表达

及其在葡萄胎中的作用如何, 以及与MBD2相关基因的甲基化行为, 目前国内尚无相关报道。本研究旨在通过检测MBD2在完全型葡萄胎中的表达以及与其相关基因的去甲基化情况, 探讨其在完全型葡萄胎发生中的作用, 为该疾病的诊断、治疗及预后提供潜在理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选择妊娠6~8周人工流产术后的正常早期妊娠绒毛组织18例(重庆医科大学附属第一医院妇产科), 患者年龄21~30岁, 平均 25.2 ± 1.1 岁, 标本收集均征得病人知情同意且符合以下条件: 无遗传病史、无产道异常、无免疫系统异常, 自愿终止妊娠者。葡萄胎标本7例(重庆医科大学附属第一医院妇产科), 均为第一次清宫术后葡萄胎组织标本, 且经病理确诊。所有标本经磷酸盐缓冲液冲洗后, 一部分直接放入

收稿日期: 2010-09-18 接受日期: 2010-12-20

国家自然科学基金(No.30700898)、教育部博士点基金(No.20070631007)、重庆市科委自然科学基金(CSTC, No.2007BB5286)、出生缺陷与生殖健康重庆市重点实验室课题(No.0801)和重庆医科大学校级课题(No.XBYB2008063)资助项目。

*通讯作者。Tel: 13220293739, E-mail: dingyb@gmail.com

液氮保存, 另一部分用4%的多聚甲醛固定。

1.2 Real-time RT-PCR检测MBD2 mRNA的表达

将冻存的组织用液氮研磨后, 按照TRIzol reagent (Invitrogen)试剂盒说明书提取RNA, 紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 比值, 判断RNA纯度及浓度, 取5 μ l RNA用1.5%琼脂糖凝胶电泳, 紫外光下检测其完整性。取500 ng的RNA按照PrimeScript RT reagent Kit说明书逆转录合成cDNA(TaKaRa Code: DRR037A), 所有试剂加样过程均在冰上进行。体系如下: 500 ng RNA, 2 μ l 5 \times PrimeScript Buffer, 0.5 μ l PrimeScript RT Enzyme Mix I, 0.5 μ l Oligo dT Primer (25 pmol), 0.5 μ l Random 6 mers (50 pmol), RNase Free dH₂O补充到10 μ l。逆转录反应程序为: 37 $^{\circ}$ C 15 min (逆转录反应), 85 $^{\circ}$ C 5 s (逆转录酶失活反应)。合成好的cDNA储存于-80 $^{\circ}$ C冰箱中备用。MBD2 (序列号: NM_003927)及GAPDH的引物序列见表1。引物由上海生工生物技术有限公司合成。使用荧光定量PCR仪(BiO-Rad iQ-5)采用两步法进行Real-Time PCR, 反应体系为25 μ l, 包括12.5 μ l 2 \times SYBR Premix Ex Tag, 正向及反向引物各0.5 μ l (10 μ mol/L), 100 ng cDNA, 加水补充到25 μ l, PCR反应如下: 94 $^{\circ}$ C变性4 min, 循环: 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 62 $^{\circ}$ C退火45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 扩增40个循环。每次循环后于72 $^{\circ}$ C收集荧光信号, 将反应产物从55 $^{\circ}$ C缓慢而均匀地上升到95 $^{\circ}$ C, 温度每升高0.5 $^{\circ}$ C读一次荧光值。由仪器自动绘制溶解曲线。以GAPDH作内参对目的基因表达量进行归一化处理, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 数据分析。定量结果采用实验重复3次, *t*检验进行统计学分析。

1.3 Western blot检测MBD2的表达

将冻存的组织用液氮研磨后, 称取200 mg的组织, 加入500 μ l蛋白裂解液(碧云天公司)及5 μ l蛋白酶抑制PMSF(100 mmol/L), 冰浴下震荡裂解20 min, 4 $^{\circ}$ C下12 000 r/min离心15 min, 取1~2 μ l裂解上清液用BCA试剂盒测定样品蛋白含量。取等量蛋白提取

样品(约50 μ g)按4: 1溶于5 \times loading buffer样品上样缓冲液中, 混匀, 沸水煮沸10 min, 8% SDS-PAGE凝胶电泳, 恒流250 mA电泳1.5 h, 将分离的蛋白电转移至PVDF(0.22 μ m)膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 然后与MBD2一抗(1: 200 Santa Cruz, CA)及 β -actin抗体4 $^{\circ}$ C孵育12 h, PBST洗涤三次, 每次5 min, 加入5%脱脂奶粉稀释的二抗室温孵育1 h, 用PBST漂洗三次, 每次5 min, 化学发光ECL法显影检测条带。蛋白质条带用Quantity One软件进行灰度相对定量分析, 并以 β -actin作为内参照。

1.4 免疫组织化学检测MBD2的表达

将多聚甲醛固定的组织经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后, 切片厚度为4 μ m, 进行免疫组化染色, 主要步骤: 石蜡切片常规脱蜡, 流动自来水冲洗5 min, 蒸馏水冲洗后入PBS浸洗3 min, 微波炉抗原热修复处理15 min, 3%的双氧水室温孵育10 min后PBS浸洗三次, 每次3 min。滴加一抗(1: 100) 4 $^{\circ}$ C过夜, 阴性对照滴加PBS, 然后按照山羊超敏二步法免疫组化检测试剂盒(中杉金桥公司)说明进行, 滴加试剂1, 37 $^{\circ}$ C孵育20 min, PBS冲洗, 2 min \times 3次。滴加试剂2, 37 $^{\circ}$ C孵育20 min, PBS冲洗, 2 min \times 3次。应用DAB溶液显色, 苏木精复染细胞核, 脱水树脂封片。用MIAS医学图像分析管理系统定每张切片阳性表达的灰度值。在40 \times 10的高倍镜视野下, 每张切片选择具有代表性的5个阳性视野, 选取空白区定标, 测定每个视野的灰度值, 最后求平均值。

1.5 甲基化DNA免疫沉淀——甲基化芯片

将组织从液氮中取出后, 称取等量的组织, 主要步骤如下: 按照Dneasy血液和组织试剂盒(QIAGEN公司)提取总DNA, 然后超声打断基因组DNA, 将甲基化的DNA免疫共沉淀, 用BiomagTM磁珠法(Bangs公司)分离甲基化DNA片段抗体复合物, 洗脱后, 用苯酚、氯仿提取DNA免疫沉淀物。然后制备文库, 经扩增、纯化、标记后, 与准备好的杂交样品及混合液

表1 引物序列

Table 1 Sequence of primers used in the experiment

基因	引物序列	产物大小	退火温度
Target genes	Primer sequence	Size(bp)	Annealing temp
Mbd2-F	5'-AAC CCT GCT GTT TGG CTT AAC-3'	101 bp	62 $^{\circ}$ C
Mbd2-R	5'-CGT ACT TGC TGT ACT CGC TCT TC-3'		
GAPDH-F	5'-CTC TCT GCT CCT CCT GTT CGA CAG-3'	230 bp	54 $^{\circ}$ C
GAPDH-R	5'-GTG GAA TCA TAT TGG AAC ATG T-3'		

杂交,经洗涤后,采集图像并分析数据(Gene Pix 6.0)。

1.6 统计学分析

所有数据均使用SPSS10.0统计软件, *t*检验进行分析。

2 结果

2.1 完全型葡萄胎和正常早期妊娠绒毛组织中 *MBD2* mRNA的表达

在完全型葡萄胎组织中,与对照组正常早期妊娠绒毛组织相比, *MBD2*的mRNA的表达升高,且有统计学意义($P=0.0083$, $P<0.01$, 图1)。

2.2 完全型葡萄胎和正常早期妊娠绒毛组织中 *MBD2*蛋白的表达

在完全型葡萄胎组织中,与对照组正常早期妊娠绒毛组织相比, *MBD2*蛋白的表达明显升高,与该蛋白的mRNA表达水平一致,且有统计学意义($P=0.0005$, $P<0.01$, 图2)。

2.3 完全型葡萄胎和正常早期妊娠绒毛组织中 *MBD2*的表达

免疫组织化学显示*MBD2*在完全型葡萄胎和正常早期妊娠绒毛组织中的表达情况(图3)。与正常早期妊娠绒毛组织相比*MBD2*在完全型葡萄胎中表达

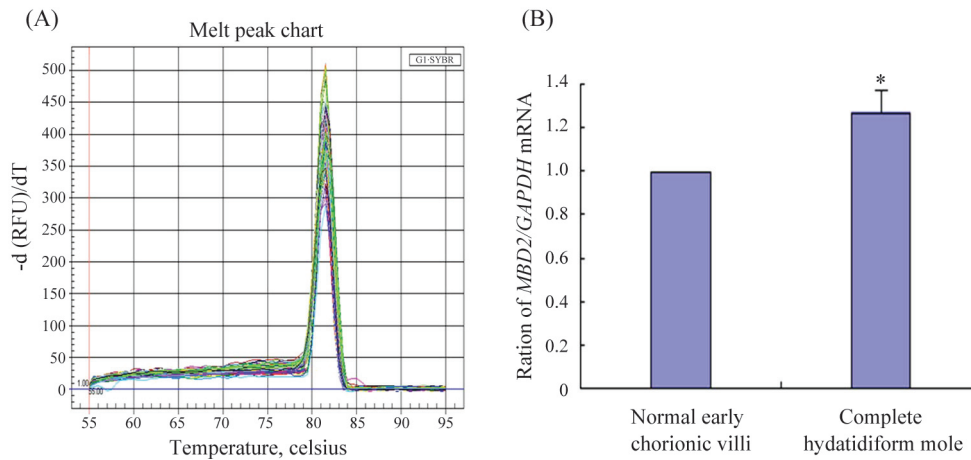


图1 Real-time RT-PCR检测*MBD2* mRNA在CHM和正常早期妊娠绒毛组织的表达

A: 溶解曲线; B: 与正常绒毛组织相比, CHM中*MBD2* mRNA的表达显著升高。

Fig.1 Expression of *MBD2* in CHM and normal early chorionic villi detected by Real-time RT-PCR

A: melting peak chart; B: the mRNA level of *MBD2* in CHM were significantly higher than that in normal early chorionic villi, $*P<0.01$.

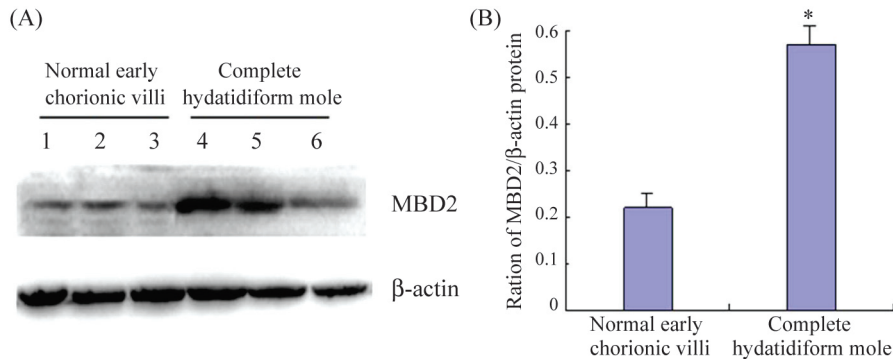


图2 Western blot检测*MBD2*在CHM和正常早期妊娠绒毛中的表达

A: *MBD2*蛋白水平在CHM和正常早期妊娠绒毛中的检测结果; B: 与正常绒毛组织相比, CHM中*MBD2*蛋白水平表达显著升高, $*P<0.01$ 。

Fig.2 Expression of *MBD2* in CHM and normal early chorionic villi detected by Western blot

A: the lever of *MBD2* protein in both CHM and normal early chorionic villi were detected by Western blot. β -actin served as loading control.

B: quantitation of protein level of *MBD2* in CHM and normal early chorionic villi, $*P<0.01$.

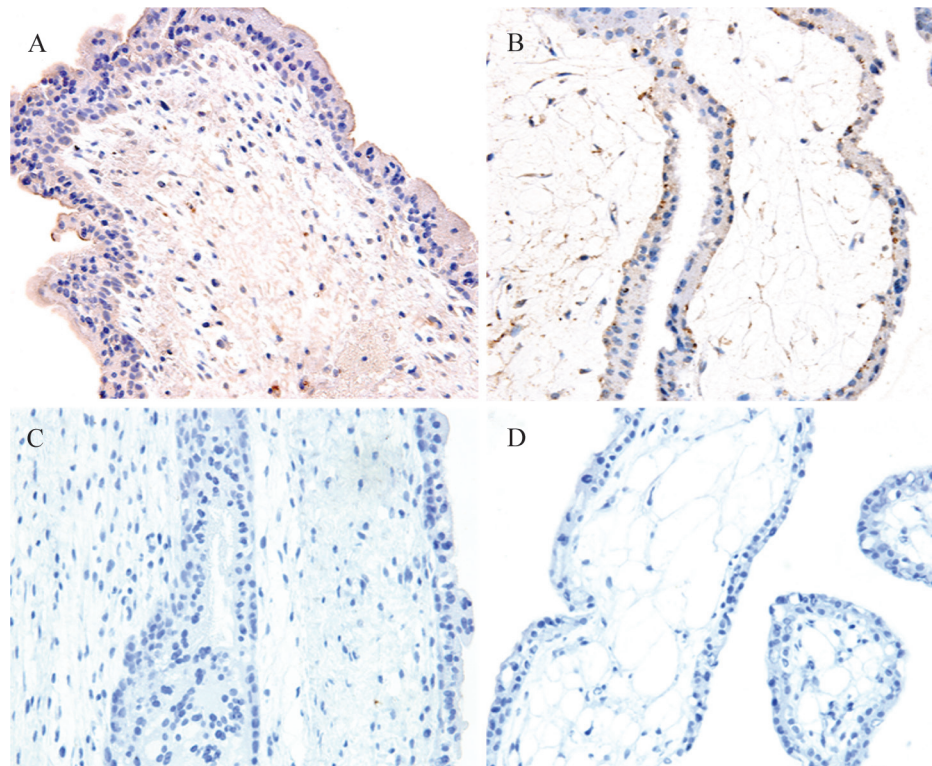


图3 免疫组织化学检测MBD2在CHM和正常早期妊娠绒毛中的表达($\times 40$)

A: MBD2主要表达在完全型葡萄胎组织中滋养层细胞的胞浆; B: MBD2主要表达在正常早期妊娠绒毛组织中部分滋养层细胞的胞浆; C, D: 完全型葡萄胎组织和正常早期妊娠绒毛组织的阴性对照。

Fig.3 Expression of MBD2 in CHM and normal early chorionic villi detected by immunohistochemistry ($\times 40$)

A: MBD2 was mainly expressed in trophoblastic cells cytoplasm in CHM; B: MBD2 was mainly expressed in the part of the cytoplasm of trophoblastic cells in normal early chorionic villi; C, D: negative control for CHM and normal early chorionic villi, respectively.

表2 完全型葡萄胎发生去甲基化基因的功能分类

Table 2 Functional grouping of genes demethylated in CHM

功能分类	百分数	基因	P值
Functional classification	Count (%)	Genes	P Value
Methylation	5(5.88)	<i>KHDRBS1, RAB3B, RHOD, RUNX1, NCL</i>	0.02
Acetylation	19(22.35)	<i>KHDRBS1, SHROOM2, GMDS, ZNF346, PTMA, NCL, RPS7, MTHFD2, MTHFS, FNTA, NDRG3, GSTK1, BAG2, LSM12, ZYX, RUNX1, CHAF1B, LRPPRC, STAG1</i>	0.03
Nad	4(4.71)	<i>GAPDHS, MTHFD2, AOX1, ALDH3B2</i>	0.05
Cell cycle	6(7.06)	<i>KHDRBS1, LZTS2, CDK2AP1, DMCI, CHAF1B, STAG1</i>	0.05

显著升高($P=0.0091, P<0.01$)。

2.4 甲基化DNA免疫沉淀——甲基化芯片结果

实验结果显示完全型葡萄胎和正常早期妊娠绒毛组织中基因的甲基化模式有显著改变。与正常早期妊娠绒毛组织相比较,完全型葡萄胎组织中相对有89个基因发生了去甲基化,85个基因可被映射到基因组图谱中,其中能够进行功能分类的基因中19个与乙酰化相关,5个与甲基化密切相关,6个与细

胞周期相关,4个与醇脱氢酶类相关。表2中,这些基因的去甲基化可能与MBD2的高表达有关。

3 讨论

葡萄胎在胚胎发生过程中,由于胎盘绒毛滋养层细胞过度增殖而形成的一种病理变化,易发生恶变而形成侵蚀性葡萄胎或绒癌。葡萄胎的发生,目前有遗传、营养不良、病毒感染、卵巢功能失调

及免疫机制失调等学说,特定基因的表达异常亦可能是葡萄胎发生的重要因素^[7],但目前并没有完全阐明哪些基因的表达异常与葡萄胎的发生相关,这些基因受到何种因素的影响而致其表达异常皆不清楚。目前的研究表明,基因启动子的甲基化异常是影响葡萄胎中基因表达的重要因素之一。Xue等^[8]研究表明*P16*、*HIC-1*、*E-cadherin*在葡萄胎中存在甲基化,发生频率在13%~40%之间,而且*P16*超甲基化本身或者与*E-cadherin*甲基化联合,与葡萄胎的持续性发生密切相关^[8,9]。朱长焜等^[10]研究发现错配修复基因*hMLH1*和*hMSH2*启动子甲基化可能与葡萄胎的发生有关;*PTEN*基因启动子甲基化亦与葡萄胎的发生有关,但是与葡萄胎的恶性转化无关^[11]。*KvDMR1*、*SGCE/PEG10*基因的甲基化状态在葡萄胎中发生改变,*SOX2*在葡萄胎中处于超甲基化状态,且与其mRNA的低表达相关^[12-14]。

*MBD2*位于18q21的保守区域^[15],有6个外显子和一个长约50 Kb的无编码的外显子,它可与启动子区域甲基化的DNA结合招募组氨酸去乙酰化酶,导致染色质重塑,从而会抑制转录,抑制基因表达^[16],另一方面*MBD2*有去甲基化酶的功能^[17],即除了具有抑制转录外,还可能有激活基因的作用。*MBD2*的表达异常与肿瘤密切相关,如在乳腺癌中*MBD2*的表达异常分两种情况^[18],一种是*MBD2*表达非常高,与肿瘤的大小相关,另一种是*MBD2*表达较低。在乳腺癌细胞中发现高表达的*MBD2*可抑制*GSTP1*的转录,而在肠癌和胃癌的组织中发现*MBD2* mRNA表达降低^[19]。在正常人前列腺组织中,有*MBD2*的表达并具有去甲基化酶的作用,但在前列腺癌组织中却没有发现*MBD2*的表达^[20]。这些*MBD2*在不同肿瘤中表达的不同,说明*MBD2*在抑制转录和去甲基化作用中的不同作用方式。因此,在癌症中*MBD2*的异常表达说明,*MBD2*是介导DNA甲基化异常的主要因子。我们的研究显示,与正常绒毛相比较,*MBD2*的mRNA、蛋白以及组织水平表达上调水平呈显著差异,说明*MBD2*的表达异常亦可能与CHM的发生相关。同时由于*MBD2*的超表达,可能会导致一些癌基因的去甲基化,参与完全型葡萄胎的发生。

多种癌症的发生都与特定基因的低甲基化相关,如化学致癌剂诱发的大鼠肝癌结节中*raf*、*cMyc*、*cfos*、*chras*和*ckras*基因的低甲基化与肿瘤形

成有关^[21]。多数人类肿瘤细胞中*cMyc*基因的第三外显子呈低甲基化状态,而在正常细胞中是完全甲基化的状态^[22]。Ray等^[23]研究发现在细胞群体中,那些低甲基化的细胞具有形成肿瘤的生长优势,DNA低甲基化可能促进这些细胞克隆扩大。DNA低甲基化可能是导致肿瘤形成的祖细胞克隆扩大的关键因素之一。我们的甲基化芯片结果显示,与正常早期妊娠绒毛组织相比较,CHM与正常早期妊娠绒毛组织相比较有89个基因发生了去甲基化,即甲基化水平降低。从功能分类来看,这些基因主要与甲基化、乙酰化以及细胞周期等相关。由于完全型葡萄胎中同时存在*MBD2*去甲基化酶的表达升高,因此,我们认为部分基因的甲基化水平降低可能与*MBD2*的高表达有关,这亦可能与完全型葡萄胎的发生有关,但这些低甲基化基因在完全型葡萄胎中的行为,以及异常甲基化在完全型葡萄胎发生中的作用,需要扩大样本进一步验证。

参考文献(References)

- Li HW, Tsao SW, Cheung AN. Current understandings of the molecular geneses of gestational trophoblastic diseases. *Placenta* 2002; 23(1): 20-31.
- Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA demethylation and cancer: therapeutic implications. *Cancer Lett* 2004; 211(2): 133-43.
- Ducasse M, Brown MA. Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer* 2006; 5: 60.
- Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005; 14(1): R47-58.
- Patra SK, Patra A, Zhao H, Carroll P, Dahiya R. Methyl-CpG-DNA binding proteins in human prostate cancer: expression of CXXC sequence containing MBD1 and repression of MBD2 and MeCP2. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302(4): 759-66.
- Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, Oravez S, Mishriki Y, Finkel G, et al. Ras p21 expression in the progression of breast cancer. *Hum Pathol* 1987; 18(12): 1268-75.
- Kato HD, Terao Y, Ogawa M, Matsuda T, Arima T, Kato K, et al. Growth-associated gene expression profiles by microarray analysis of trophoblast of molar pregnancies and normal villi. *Int J Gynecol Pathol* 2002; 21(3): 255-60.
- Xue WC, Chan KY, Feng HC, Chiu PM, Ngan HY, Tsao SW, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in hydatidiform mole and choriocarcinoma. *J Mol Diagn* 2004; 6(4): 326-34.
- Xue WC, Feng HC, Tsao SW, Chan KY, Ngan HY, Chiu PM, et al. Methylation status and expression of E-cadherin and cadherin-11 in gestational trophoblastic diseases. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13(6): 879-88.
- 朱长焜, 叶大风, 谢 幸, 程晓东, 陈怀增, 吕卫国. 错配修复

- 基因启动子甲基化和蛋白表达在葡萄胎的发生及恶变中的作用。中国医学科学院学报 2003; 25(4): 422-6.
- 11 Chen H, Ye D, Xie X, Lu W, Zhu C, Chen X. PTEN promoter methylation and protein expression in normal early placentas and hydatidiform moles. *J Soc Gynecol Investig* 2005; 12(3): 214-7.
- 12 Bourque D, Peñaherrera M, Yuen R, Van Allen M, McFadden D, Robinson W. The utility of quantitative methylation assays at imprinted genes for the diagnosis of fetal and placental disorders. *Clin Genet* 2011; 79(2): 169-75.
- 13 Li AS, Siu MK, Zhang H, Wong ES, Chan KY, Ngan HY, *et al.* Hypermethylation of SOX2 gene in hydatidiform mole and choriocarcinoma. *Reprod Sci* 2008; 15(7): 735-44.
- 14 Hayward BE, De Vos M, Talati N, Abdollahi MR, Taylor GR, Meyer E, *et al.* Genetic and epigenetic analysis of recurrent hydatidiform mole. *Hum Mutat* 2009; 30(5): E629-39.
- 15 Hendrich B, Abbott C, McQueen H, Chamber D, Cross S, Bird A. Genomic structure and chromosomal mapping of the murine and human *Mbd1*, *Mbd2*, *Mbd3*, and *Mbd4* genes. *Mamm Genome* 1999; 10(9): 906-12.
- 16 Snape A. MBDs mediate methylation, deacetylation and transcriptional repression. *Trends Genet* 2000; 16(1): 20.
- 17 Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodeling and histone deacetylation. *Nature Genet* 1999; 23(1): 62-6.
- 18 Billard LM, Magdinier F, Lenoir GM, Frappart L, Dante R. MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland. *Oncogene* 2002; 21(17): 2704-12.
- 19 许琳, 罗兵, 王青, 徐翻飞, 黄维青, 梁华. 胃癌MAGE-1基因启动子B'区去甲基化状态的研究. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2003; 10(1): 39-41.
- 20 Zhu Y, Spitz MR, Zhang H, Grossman HB, Frazier ML, Wu X. Methyl-CpG-binding domain 2: a protective role in bladder carcinoma. *Cancer* 2004; 100(9): 1853-8.
- 21 Rao PM, Antony A, Rajalakshmi S, Sarma DS. Studies on hypomethylation of liver DNA during early stages of chemical carcinogenesis in rat liver. *Carcinogenesis* 1989; 10(5): 933-7.
- 22 Sharrard RM, Royds JA, Rogers S, Shorthouse AJ. Patterns of methylation of the *c-myc* gene in human colorectal cancer progression. *Br J Cancer* 1992; 65(5): 667-72.
- 23 Ray JS, Haebison ML, McClain RM, Goodman JI. Alterations in the methylation status and expression of the rafonco gene in phenobarbital induced and spontaneous B6C3F1 mouse liver tumors. *Mol Carcinog* 1994; 9(3): 155-66.

The Expression of MBD2 and Related Gene Methylation Microarray in Hydatidiform Mole

Liang-Rui Guo, Jun-Lin He, Xue-Mei Chen, Xue-Qing Liu, Ying-Xiong Wang, Yu-Bin Ding*

(Laboratory of Reproductive Biology, School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The expression of MBD2 (methyl-CpG-binding domain2) in complete hydatidiform mole (CHM) and normal early chorionic villi were examined by Real-time RT-PCR, Western blot and immunohistochemistry. Differential methylation pattern of genes in CHM and normal early chorionic villi were examined by MeDIP-chip (methylated DNA immunoprecipitation-chip), analysed and functional charactered by bioinformatics. The results showed mRNA expression ($P=0.0083$) of MBD2 was significantly higher in CHM than that in normal chorionic villi ($P<0.01$). The protein level was coincident with mRNA level when examined by Western blot ($P=0.0005$, $P<0.01$) and immunohistochemistry ($P=0.0091$, $P<0.01$). MeDIP-chip results showed 89 genes in CHM were demethylated, of which 85 genes can be mapped to genome. Our results suggested that over-expression of MBD2 and related gene demethylation may play vital roles in the genesis of CHM.

Key words CHM; demethylase; MBD2; MeDIP

Received: September 18, 2010 Accepted: December 20, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30700898), the Ministry of Education Doctoral Foundation (No.20070631007), Natural Science Foundation of Chongqing Science and Technology Commission (CSTC, No.2007BB5286), Birth Defects and Reproductive Health Subject in Chongqing Key Laboratory (No.0801) and Chongqing Medical University School Subject (No.XBYB2008063)

*Corresponding author. Tel: 13220293739, E-mail: dingyb@gmail.com