文章编号:1000-5404(2005)21-2103-04

论著

p53凋亡刺激蛋白基因5′端非编码区CpG岛高甲基化与其mRNA表达的改变

张 云[1],辛海明[1],刘泽军[1],卢 欣[2],钟 山[2],顾寿智[3],张晓兵[1],杨 新[1] ([1]第三军医大学西南医院国际合作实验室,重庆 400038;[2] Ludwig Institute for Cancer Research, Imperial College School of Medicine, UK;[3] Seirei Christopher University, Hamamatsu, Japan)

提 要:目的 了解ASPP1和ASPP2基因5′端非编码区CpG岛在野生型p53肿瘤细胞中的甲基化状况及其与mRNA异常表达的关系。**方法** 用RT-PCR方法测定mRNA表达,甲基化特异的PCR方法测定DNA甲基化。**结果** 肿瘤细胞中ASPP1和ASPP2 mRNA表达减少,同时ASPP基因的5′端非编码区出现异常高甲基化。**结论** ASPP基因的异常高甲基化可能是引起ASPP mRNA表达降低的影响因素之一。

关键词:p53凋亡刺激蛋白;DNA甲基化;MSP;RT-PCR
中图法分类号:Q51;Q754;Q786 **文献标识码**:A

Relationship between the hypermethylation of the ASPP gene 5′-untranslated region and the abnormal mRNA expression

ZHANG Yun[1], XIN Hai-ming[1], LIU Ze-jun[1], LU Xin[2], ZHONG Shan[2], GU Shou-zhi[3], ZHANG Xiao-bing[1], YANG Xin[1] ([1]Laboratory of International Cooperation, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China, [2]Ludwig Institute for Cancer Research, Imperial College School of Medicine, UK, [3]Seirei Christopher University, Hamamatsu, Japan)

Abstract: Objective To understand the possible cause of abnormal expression of ASPP1 and ASPP2 in the tumor cell lines retaining wide-type p53. **Methods** The mRNA expression of ASPP1 and ASPP2 in 3 tumor cell lines (HepG2, MCF-7, A549, fibroblast as normal control) retaining wide-type p53 was measured using RT-PCR. The CpG island methylation status of ASPP1 gene and ASPP2 gene in the 5′-untranslated region was also investigated by methylation-specific PCR. **Results** The mRNA expression of ASPP1 and ASPP2 was lower than that of control and CpG island of 3 kinds of tumor cells was hypermethylated. **Conclusion** ASPP CpG island aberrant methylation could be one of the molecular and genetic alterations in wild-type p53 tumors.

Key words: apoptosis-stimulating protein of p53; DNA methylation; methylation-specific PCR; RT-PCR

p53是人体中的主要抑癌基因之一,同时也是变异频率最高的基因之一[1]。迄今为止已在大约50%的人类肿瘤中发现了p53基因的变异[2,3]。其余50%的肿瘤中p53为野生型。变异p53肿瘤可以用基因变异导致p53失活来解释肿瘤产生的原因,但野生型p53肿瘤却不能用同样的原因来解释。为什么这些野生型p53没有起到抑癌基因的作用而放任肿瘤的形成,这个问题多年来一直没有找到合理的解释。

最近,一个新的蛋白家族,p53凋亡刺激蛋白(apoptosis stimulating protein of p53, ASPP)被英国科学家发现[4,5],这个发现对上面提到的难题给出了一种新的解释,同时也对阐明野生型p53肿瘤产生的机制提出了一个新的理论。新发现的ASPP家族由3个成员组成:ASPP1、ASPP2和iASPP(ASPP的抑制形式)。ASPP1和ASPP2是p53蛋白的潜在活化子(activator),能特异性的激活p53的促进细胞凋亡的能力。而iASPP正好相反,是p53蛋白的抑制子(inhibitor)。p53蛋白的凋亡能力能被ASPP1和ASPP2激活,也能被iASPP抑制[6-8]。

我们前期工作发现了ASPP1和ASPP2低表达和iASPP高表达共存的现象[9]。为了进一步了解ASPP家族在野生型p53肿瘤中异常表达的原因,本研究从

基金项目:国际自然科学基金"两个基地"资助项目(30313268);日本Seirei Christopher大学日中合作项目(20030050)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30313268) and the Foundation for Sino-Japanese Cooperation by Seirei Christopher University (20030050)

作者简介:张 云(1976-),男,云南省曲靖市人,硕士,医师,主要从事DNA甲基化方面的研究。电话:(023)68754691
通讯作者:刘泽军,电话:(023)65424208

收稿日期:2005-11-24;**修回日期**:2005-02-23

DAN 甲基化的角度进行探讨,以揭示 ASPP1 和 ASPP2 mRNA 在野生型 p53 肿瘤细胞中异常表达的可能原因。由于 ASPP 基因 5′端非编码区存在着极为丰富的 CpG 二核苷酸,极易受到甲基化的修饰,所以首先对这一区域进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

3 种野生型 p53 肿瘤细胞株为肝癌 HEPG-2, 乳腺癌 MCF-7 和肺癌 A549,正常对照采用成纤维细胞。所有细胞用高糖 DMEM 培养夜(10% 的小牛血清)培养。

1.2 DNA 和 RNA 制备

采用 TriPure Isolation Reagent (Roche, USA)提取细胞总 RNA 和 DNA。

1.3 RNA 表达水平测定

RT-PCR Kits (TakaRa, Japan) 被用来合成 cDNA。逆转录反应体系 20 μl ,RNA 5 μg,反转录条件为: 30 ℃预热 10 min,48 ℃逆转录反应 45 min,反应完成后,99 ℃孵育 5 min 灭活转录酶。对 ASPP 基因靶区域进行 PCR 扩增时,取逆转录产物 5 μl。同时扩增 β-actin 基因片断作为阳性对照。ASPP1 和ASPP2的 PCR 引物采用 Primier 5.0 软件设计,引物的核苷酸序列和 PCR 反应条件总结于表 1。PCR 反应结束后,取扩增产物 8 μl,与 1 μl 的溴酚蓝混合后,在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳 45 min(100 V),然后在紫外灯下观察结果。将电泳凝胶置于凝胶图像分析系统,照相后,采用 Gel-Pro 3.1(Media Cyberneties Inc,USA)凝胶图像分析软件分析处理。测定扩增产物量,PCR 产物量以积分光密度表示,计算各 mRNA 与 β-actin 的比值(相对表达量)。

表 1 ASPP1 和 ASPP2 引物的核苷酸序列和 PCR 反应条件

Tab 1 The sequence of primers sets and PCR conditions for ASPP1 and ASPP2

Primers	Sequence	Pre-PCR incubation	Denature	Annealing	Extension	Cycles	Final incubation
RT-PCR:							
ASPP1-f	5′-GCAGCACACAGCGCCTTAAATAAG-3′	95 ℃, 3 min	94 ℃, 30 s	56 ℃, 30 s	72 ℃, 45 s	30	72 ℃, 8 min
ASPP1-r	5′-TCCATTGTCCACATCGGCCAAGGT-3′						
ASPP2-f	5′-TATCTAATCCTTACCGAAACC-3′	95 ℃, 3 min	94 ℃, 30 s	55 ℃, 30 s	72 ℃, 45 s	30	72 ℃, 8 min
ASPP2-r	5’-CCCTCAGGCTCATAATCAA-3′						
Methylation:							
ASPP1-Uf	5′-TTTTGTATTTTGTTGTAGTTGTTGTT-3′	94 ℃, 5 min	94 ℃, 30 s	51 ℃, 30 s	72 ℃, 30 s	40	72 ℃, 8 min
ASPP1-Ur	5′-CACAAAAAAAATCCACAACACCC-3′						
ASPP1-Mf	5′-CGTATTTCGTCGTAGTTGTCGTT3′	94 ℃, 5 min	94 ℃, 30 s	51 ℃, 30 s	72 ℃, 30 s	40	72 ℃, 8 min
ASPP1-Mr	5′-CGAAAAAAATCCGCGACGCCC-3′						
ASPP2-Uf	5′-GGTGTTTTAGTTTGTGTGGAGG-3′	94 ℃, 5 min	94 ℃, 30 s	51 ℃, 30 s	72 ℃, 30 s	40	72 ℃, 8 min
ASPP2-Ur	5′-CAAACTAAAATACCCCAAAAAATCA-3′						
ASPP2-Mf	5′-GTGTTTTAGTTCGCGCGGAGG-3′	94 ℃, 5 min	94 ℃, 30 s	50.5 ℃, 30 s	72 ℃, 30 s	40	72 ℃, 8 min
ASPP2-Mr	5′-ACCGAACTAAAATACCCCGAAAA-3						

1.4 亚硫酸氢钠处理

使用 CpGenome DNA 修饰试剂(Intergen, Purchase, USA)处理 DNA。1 μl 的 DNA 在碱性条件下用亚硫酸氢钠处理 18 h。修饰过的 DNA 溶于 30 μl TE(10 mmol/L Tris,0.1 mmol/L EDTA, pH 7.5)中,立即置于 -20℃保存备用。

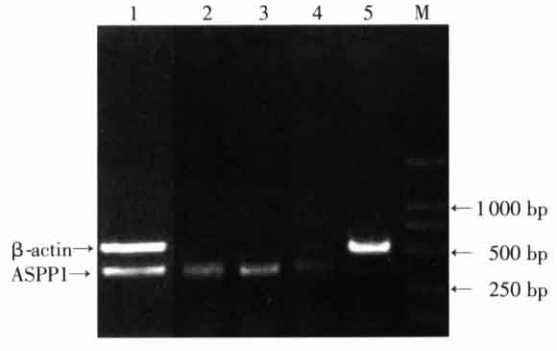
1.5 甲基化特异的 PCR 分析[10]

采用 MethPrimer 软件设计甲基化分析引物[11],ASPP 特异的引物被设计位于 ASPP 的 5′端非编码区,ASPP 基因的非甲基化序列被 ASPP-Uf 和 ASPP-Ur 引物对扩增,ASPP 基因的甲基化序列被 ASPP-Mf 和 ASPP-Mr 引物对扩增(表 1)。50 μl 反应混合物含有 2.0 mmol/L 的 $MgCl_2$, 0.2 mmol/L 的 4 种 dNTPs,1.0 mmol/L 的寡核苷酸引物和 5 U 的 *Taq* 酶。PCR 反应条件见表 1。反应结束后,取 9 μl 的 PCR 产物,与 1.5 μl 的溴酚蓝混合,然后在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳(100 V),紫外灯下观察结果,照相。

2 结果

2.1 野生型 p53 肿瘤细胞中 ASPP1 和 ASPP2 的 mRNA 表达

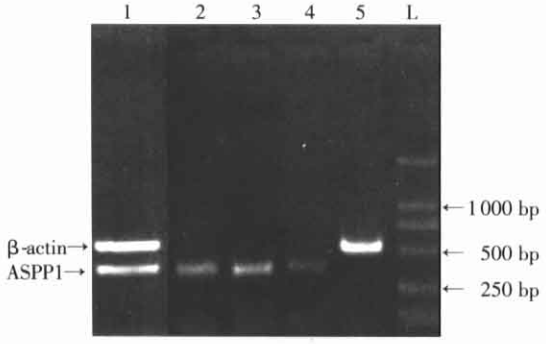
图 1 为 ASPP1 的 PCR 产物凝胶电泳图和 mRNA 相对表达,图 2 为 ASPP2 的 PCR 产物凝胶电泳图和 mRNA 相对表达。3 种肿瘤细胞中的 ASPP1 和 ASPP2 的表达均低于作为对照的成纤维细胞。



1: HepG2; 2: MCF-7; 3: A549; 4: Fibroblast; M: Ladder marker

图 1 肿瘤细胞中 ASPP1 的 mRNA 表达

Fig 1 The mRNA expression of ASPP1 in 3 tumor cell lines and normal control



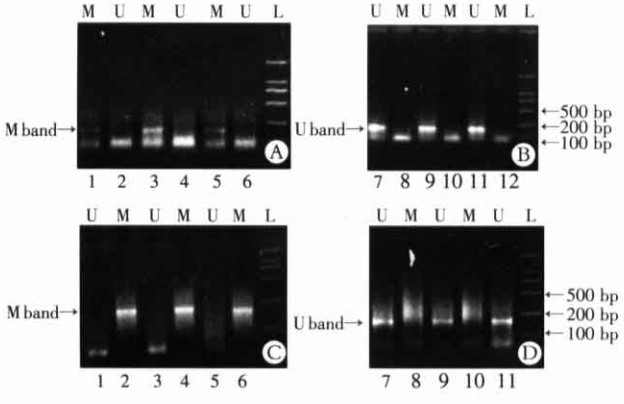
1：Fibroblast；2：HepG2；3：MCF-7；4：A549；5：β-actin；M：DNA marker

图 2　肿瘤细胞中 ASPP2 的 mRNA 表达

Fig 2　The mRNA expression of ASPP2 in tumor cell lines and normal control

2.2　野生型 p53 肿瘤细胞中 ASPP1 和 ASPP2 基因 5′端非编码区的甲基化状态

图 3 为 ASPP 基因甲基化特异的 PCR 分析结果。A、B 为 ASPP1的电泳图，C、D 为 ASPP2 的电泳图。从结果看，肿瘤细胞中的 ASPP1 和 ASPP2 均出现甲基化带，而作为对照的成纤维细胞中的 ASPP1 和 ASPP2 只出现了非甲基化带。



A、B：ASPP1；C、D：ASPP2；1，2：HepG2；3、4：MCF-7；5、6：A549；7－12：fibroblast cells；M band：methylation band；U band：unmethylation band；M：methylation primer sets amplified products；U：unmethylation primer sets amplified products；L：DNA marker

图 3　肿瘤细胞中 ASPP1 和 ASPP2 的甲基化分析

Fig 3　Methylation status of ASPP1 and ASPP2 in cancer cell lines and normal fibroblast cell

3　讨论

最近，ASPP1 和 ASPP2 被鉴定为 p53 的活化子[4]。它们能激活 p53 的凋亡功能，这个作用是通过结合于 p53 的结合结构域，形成 ASPP-p53 复合物，ASPP 的微小改变就可引起 p53 与凋亡基因的 DNA 结合的能力发生改变，从而影响 p53 诱导凋亡的能力。因此，ASPP 蛋白可能是特异性的激活 p53 诱导凋亡的分子。

人类肿瘤按照 p53 抑癌功能丧失的原因可以分为两类：一类是 p53 基因变异导致 p53 结构的变化，从而丧失了诱导细胞凋亡的能力，这类肿瘤的研究已有大量文献报道；另一类是 p53 基因没有发生变异，即正常序列结构的 p53 基因，这一类肿瘤被称为野生型 p53 肿瘤，这类肿瘤中 p53 丧失其抑癌功能的原因还不十分清楚。本研究表明在野生型 p53 肿瘤中 ASPP1 和 ASPP2 的 mRNA 表达是降低的，这个结果，再加上 Samuels 等[4] 在乳腺癌研究中得到的相同结果，提示 ASPP 表达的下降可能是野生型 p53 肿瘤中的一个分子特征。

引起野生型 p53 肿瘤中 ASPP 表达下调的两个最可能的原因是基因变异和表观遗传改变。但是，到目前为止，还没有发现 ASPP 基因发生变异的报道[12]。ASPP 基因是否发生变异还有待进一步研究，但是我们的研究发现最主要的表观遗传信号-DNA 甲基化的改变可能发生在野生型 p53 肿瘤细胞的 ASPP 中。实验结果显示 ASPP1 和 ASPP2 基因的 5′端非编码区出现了甲基化带，而对照的成纤维细胞中只出现了非甲基化带。这些结果提示 CpG 岛甲基化状态的改变可能是引起野生型 p53 肿瘤中 ASPP 基因表达下调的重要因素之一。

DNA 甲基化是人类的一种重要的后生性调控方式[13]，甲基化状态的改变在肿瘤发生学中具有重要的意义。启动子区域正常非甲基化的 CpG 岛转变为异常的高甲基化的 CpG 二核苷酸常常发生在一些抑癌基因中[14]。本研究表明高甲基化也发生在抑癌基因 ASPP 的 5′端非编码区。这个发现提示野生性 p53 肿瘤细胞中 ASPP 基因 mRNA 的下调可能与基因的异常甲基化有关。因此，ASPP 异常甲基化可能是野生性 p53 肿瘤的一种分子遗传改变。鉴定 ASPP 新基因的启动子区域，进而对其进行甲基化分析将是我们下一步研究的重点，它将对了解 ASPP 基因调控机制提供更有用的数据。

参考文献：

[1] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, *et al*. p53 mutations in human cancers[J]. Science, 1991, 253 (5015): 49－53.

[2] Slee E A, O'Connor D J, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide[J]? Oncogene, 2004, 23 (16): 2809－2818.

[3] Vousden K H, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(8): 594－604.

[4] Samuels Lev Y, O'Connor D J, Bergamaschi D, *et al*. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53[J]. Mol Cell, 2001, 8 (4): 781－794.

[5] Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil N J, *et al*. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human[J]. Nat Genet, 2003, 33 (2): 162-167.
[6] Lane D. How cells choose to die[J]. Nature, 2001, 414 (6859): 25,27.
[7] Brooksbank C. ASPP bites[J]. Nat Rev Cancer, 2001, 1 (2): 92-93.
[8] Gresham D. Cheating death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4 (2): 87.
[9] Liu Z J, Zhang Y, Zhang X B, *et al*. Abnormal mRNA expression of ASPP members in leukemia cell lines[J]. Leukemia, 2004, 18 (4): 880.
[10] Liu Z J, Maekawa M. Polymerase chain reaction-based methods of DNA methylation analysis[J]. Anal Biochem, 2003, 317 (2): 259-265.
[11] 张 云, 刘泽军. DNA甲基化测定法引物的网上设计[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(7): 426.
[12] Slee E A, Lu X. The ASPP family: deciding between life and death after DNA damage[J]. Toxicol Lett, 2003,139 (2-3): 81-87.
[13] Jones P A, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics[J]. Science, 2001, 293 (5532):1068-1070.

(编辑 周 芳)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2005)21-2106-01

尿激酶溶栓治疗急性心肌梗死的临床分析

Thrombolytic therapy of urokinase on acute myocardial infarction

邵丽玮 (中国医科大学附属第四医院循环内科, 沈阳 110032)

应用尿激酶(urokinase, UK)对200例急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)患者进行静脉溶栓治疗,旨在观察其疗效,并探讨AMI后不同时间溶栓冠脉再通率与4周病死率.现报告如下.

1 资料与方法

1.1 一般资料

1998年1月至2004年10月我院收治并进行溶栓治疗的AMI患者200例.其中男121例,女79例,年龄45-80岁(平均53岁);梗死部位:广泛前壁46例,前壁32例,前间壁24例,下壁48例,下壁+前壁22例,下壁+正后壁20例,前壁+右室4例,下壁+右室4例.

溶栓指征为:①胸痛时间持续30 min以上,硝酸甘油不能缓解.②心电图:相邻2个胸导联或2个以上胸导联ST段抬高≥0.2 mV,或Ⅱ、Ⅲ、AVF导联中至少2个导联抬高≥0.1 mV.③无溶栓禁忌证.④溶栓距离发病时间12 h内.

1.2 治疗方法

溶栓前先记录12导心电图,测量血压,测定心肌酶谱,血小板计数,出血、凝血时间及凝血酶原时间,即刻嚼服阿司匹林300 mg.用国产UK(南京南大药业有限责任公司,批号113202329413)150×10⁴U加入生理盐水100 ml于30 min内静脉滴注,继之予800-1 000 U/h肝素钠静脉滴注,持续72 h后改为肠溶阿司匹林75 mg/d长期口服.吸氧,止痛,扩冠等治疗照常进行.溶栓治疗开始后密切观察胸痛症状的动态变化;2 h内每30分钟记录12导心电图1次.出现心梗症状6 h后每2小时测心肌酶谱1次至24 h.

1.3 冠脉再通的临床标准

溶栓后判断冠脉再通标准,参考中华心血管病杂志编委会溶栓疗法参考方案,即:①胸痛在溶栓后2 h内减轻70%;②抬高的ST段在溶栓后2 h内回落50%;③心肌酶峰提前出现;④出现再灌注性心律失常.具备上述条件2项或以上者判断为再通.但仅具1-4中两项者不能判断为再通.

1.4 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件进行组间χ^2检验.

2 结果

2.1 AMI后12 h内不同时间溶栓再通率,见表1

表1 溶栓距发病不同时间血管再通情况比较

发病至溶栓时间(h)	例数	再通例数	再通率(%)
≤2	10	10	100.0
2-4	28	25	89.3
4-6	34	29	85.3
6-8	45	33	73.3
8-10	40	27	67.5
10-12	43	22	51.2
总计	200	146	73.0

各组间再通率比较差异有显著性,$P<0.05$

2.2 血管再通组与未通组4周病死率,见表2

表2 血管再通组与未通组4周病死率

组别	例数	病死数	病死率(%)
未通组	54	6	11.1
再通组	146	10	6.8*

*: $P<0.05$,与未通组比较

(下转2114页)

作者简介:邵丽玮(1968-),女,辽宁省沈阳市人,主治医师,主要从事心血管内科及急诊临床诊治方面的研究.电话:(024)24123796

收稿日期:2004-12-17;修回日期:2005-02-25