基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.012

5-氮杂-2'-脱氧胞苷对涎腺腺样囊性癌中PTEN基因表达的影响

张华昌[1]，向学熔[1]，范小平[2]，杨明聪[1]，吴　静[1]
（重庆医科大学附属口腔医院：1. 牙周黏膜科；2. 正畸科，重庆　400015）

【摘　要】目的：研究 5-氮杂-2'-脱氧胞苷（5-aza-2'-deoxycytidine，5-Aza-dc）对涎腺腺样囊性癌（Adenoid cystic carcinoma，ACC）细胞中抑癌基因第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因（Phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten，PTEN）的影响及可能的机制。方法：利用 RT-PCR 检测 ACC 细胞经甲基转移酶抑制剂 5-Aza-dc 作用后，PTEN 基因 mRNA 的表达水平；Western blot 检测 5-Aza-dc 干预对 PTEN 蛋白表达的影响。结果：在一定时间内，经 5-Aza-dc 作用后，ACC 细胞中 PTEN基因 mRNA 及蛋白表达水平逐渐增加，且差异有统计学意义（$P<0.05$），PTEN mRNA 表达水平改变与 PTEN 蛋白的表达基本一致。结论：ACC 细胞系中 PTEN 的低表达可能与 PTEN 基因启动子区甲基化状态有关。

【关键词】涎腺腺样囊性癌；5-氮杂-2'-脱氧胞苷；第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因
【中国图书分类法分类号】R782　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2010-10-18

Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on the expression of PTEN in adenoid cystic carcinoma cells

ZHANG Hua-chang[1], XIANG Xue-rong[1], FAN Xiao-ping[2], YANG Ming-cong[1], WU Jing[1]
(1. Department of Periodontics & Oral Membrane; 2. Department of Orthodontics; the Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To detect the effects and mechanism of 5-aza-2'-deoxycytidine on the expression of PTEN in adenoid cystic carcinoma. *Methods*: The expression of mRNA and protein of PTEN were analyzed by RT-PCR and western blot after treatment with methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dc). *Results*: After the treatment with methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine(5-Aza-dc), the levels of mRNA and protein of PTEN in adenoid cystic carcinoma cells were increased dramatically ($P<0.05$), and the levels of PTEN mRNA and protein changes were consistent. *Conclusion*: The hypermethylation of CpG island in promoter of PTEN is probably responsible for low PTEN expression in adenoid cystic carcinoma cells.

【Key words】adenoid cystic carcinoma; 5-aza-2'-deoxycytidine; phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten

涎腺腺样囊性癌（Adenoid cystic carcinoma，ACC）是最常见的涎腺恶性肿瘤之一。ACC 最常见于腭部、腮腺及颌下腺，其生物学特性为生长较缓慢，但侵袭性强，常沿神经、骨髓腔、血管生长，造成感觉异常和早期血液转移，但易复发和颈淋巴结转移率低，且单纯放疗对其疗效不佳。ACC 对患者生活质量影响较大，已越来越引起临床重视。

第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白（Phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten，PTEN）基因是第一个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因，定位于10q23.3，其与多种肿瘤的发生、发展关系密切[1]。PTEN 基因通过磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸（Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate，PIP3）、丝裂原激酶（Mitogen activated protein kinase，MAPK）、局部粘附激酶（Focal adhesion kinase，FAK）等途径调节细胞生长周期，抑制细胞的转移、粘附能力，促进肿瘤细胞的凋亡，从而达到抑制肿瘤的发生、发展的目的[2-4]。在研究中发现，PTEN 表达水平的降低或沉默可能与 PTEN 基因的杂合子丢失、无义突变、某种形式的内部剪切异常、错义突变、启动子甲基化等方面有关，而在大多数肿瘤的研究中发现，PTEN 基因启动子区甲基化水平的改变可能是 PTEN 基因表达水平改变的主要原因[5,6]。而已有的研究表明，PTEN 基因的表达与 ACC 的发生、发展有关，PTEN 基因在涎腺肿瘤组织中的表达较相应的正常组织降低，甚至失表达[1]。本研究应用甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷（5-aza-2'-deoxycytidine，5-Aza-dc）干预，观察 PTEN 基因 mRNA 及蛋

作者介绍：张华昌（1982-），男，硕士，研究方向：牙周病学。
通信作者：范小平，男，主任医师，Email：zhc0483@sina.com。
基金项目：重庆市卫生局医学科研资助项目（编号：2009-2-140）。

白表达水平的改变，进一步研究 PTEN 转录抑制在 ACC 的发生发展中可能的机制，寻求治疗 ACC 的新疗法。

1 对象与方法

1.1 研究对象

人 ACC 细胞株（ACC-2）购自四川大学华西医学部细胞生物学实验室。

1.2 主要试剂

RPMI1640 培养基（HyClone 公司）、胎牛血清（HyCLone 公司）、5-氮杂-2'-脱氧胞苷（sigma 公司）、RNAisoTMPlus、PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒、TaKaRa Taq™（大连宝生物工程有限公司，TARAKA）、兔抗人 PTEN 抗体（北京博奥森生物技术有限公司）、抗人 β-actin（Abcam 公司）、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG（北京中杉公司）、化学发光显色剂（江苏碧云天生物技术研究所）。引物（由上海英骏生物技术有限公司合成），其他试剂为国产分析纯。

1.3 细胞培养

ACC-2 于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基（含 100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素）中，置于 5 %CO_2、37℃恒温恒湿培养，胰酶消化传代，每 1~2 d 更换培养基。

1.4 RT-PCR 检测 5-Aza-dc 作用对 PTEN 基因 mRNA 的表达水平的影响

将 ACC-2 细胞接种于 6 孔板，培养 24 h 后，分别用 10 μmol/L 5-Aza-dc 处理 24、48、72 h 后收集细胞，用 TAKARA RNAisoTMPlus 提取总 RNA，行 RT-PCR。其引物序列如下：RIGHT PRIMER：5'-ACCAGGACCAGAGGAAACCT-3' LEFT PRIMER：5'-GCTAGCCTCTGGATTTGACG-3'，β-actin（内参）：RIGHT PRIMER：5'-AGGAGCACCCCGTGCTGCTGA-3'，LEFT PRIMER：5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC-3'。

RT-PCR 采用两步法：①逆转录反应：按 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒操作，4 μg 的 RNA 模板，5×PrimeScript（r）Buffer 4 μl，dNTP Mixture（10 mmol each）1 μl，Oligo dT Primer（2.5 μmol）1 μl，Random 6 mers（20 μmol）1 μl，RNase Freed H_2O 至 20 μl 混均后 37℃ 15 min，85℃ 15 s 条件下进行逆转录合成 cDNA。②PCR 反应：反应体积 25 μl：cDNA 2 μl，TAKARA Taq 酶（5 U/μl）0.125 μl，10 × PCR buffer（Mg^{2+}free） 2.5 μl，$MgCl_2$（25 mmol）1.5 μl，dNTP Mixture（各 2.5 mmol）2 μl，上下游引物（10 μmol/L）各 1 μl，去离子水补至 25 μl。β-actin 作为内参。PCR 反应条件：95℃变性 5 min；94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 30 s，35 个循环；72℃ 15 min。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳，用 Bio-Rad 凝胶图像成像仪观察结果。

1.5 Western blot 检测 5-Aza-dc 作用对 PTEN 蛋白表达水平的影响

将 ACC-2 细胞接种于 6 孔板，培养 24 h 后，分别用 10 μmol/L 5-Aza-dc 处理 24、48、72 h 后收集细胞，用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白，BCA 法测蛋白浓度。10%SDS-PAGE，上样量50 μg，湿转250 mA，80 min，聚偏二氟乙烯膜（Polyvinylidene fluoride，PVDF 膜）用 5%脱脂奶 37℃封闭 1 h，再用兔抗人 PTEN（1:200）4℃孵育过夜，PBST 洗膜，二抗（1:5 000）室温孵育 1 h，PBST 洗膜。β-actin 作为内参。暗室内 X 线平片感光成像并进行图像分析。

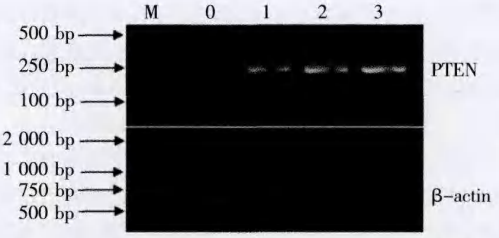
1.6 统计学分析

采用 SPSS11.5 for Windows 统计软件进行分析，数据以均数±标准差表示，均数间比较用 t 检验，以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 5-Aza-dc 作用对 PTEN 基因 mRNA 表达水平的影响

ACC-2 细胞经 10 μmol/L 5-Aza-dc 分别处理 24、48、72 h 后提取细胞总 RNA 进行 RT-PCR。结果显示，经 5-Aza-dc 分别处理 24、48、72 h 后，PTEN mRNA 表达水平较未经处理的对照组显著增加（图 1）。



M. DNA 标准；0. 未处理的 ACC-2 细胞；1. 5-Aza-dc 处理 ACC-2 细胞 24 h；2. 5-Aza-dc 处理 ACC-2 细胞 48 h；3. 5-Aza-dc 处理 ACC-2 细胞 72 h

图 1 5-Aza-dc 作用对 PTEN 基因 mRNA 表达水平的影响

2.2 5-Aza-dc 作用对 PTEN 蛋白表达水平的影响

ACC-2 细胞经 10 μmol/L 5-Aza-dc 分别处理 24、48、72 h 后提取细胞总蛋白，经 Western blot 检测显示，经 5-Aza-dc 分别处理 24、48、72 h 后，PTEN 蛋白的表达水平较未经处理的对照组显著增加，且其表达水平的改变与 PTEN mRNA 表达水平的改变基本一致（图 2）。



0. 未处理的 ACC-2 细胞；1. 5-Aza-dc 处理 ACC-2 细胞 24 h；2. 5-Aza-dc 处理 ACC-2 细胞 48 h；3. 5-Aza-dc 处理 ACC-2 细胞 72 h

图 2 5-Aza-dc 作用对 PTEN 基因蛋白表达水平的影响

3 讨 论

肿瘤的发生是一个多因素、多阶段相互作用、累积渐进的过程，是一系列内因和外因共同作用的结果，其产生的根本原因可能是基因损害造成的。PTEN 基因作为第一个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因，其自身表达水平的改变与多种肿瘤的发生、发展关系密切。研究表明，PTEN 在消化系统肿瘤、乳腺癌、神经胶质瘤、考登病等组织或细胞系中的表达较相应的正常组织或细胞明显降低，且与肿瘤的血管形成、转移相关，提示 PTEN 的转录抑制与肿瘤的发生、发展可能相关[9,10]。

DNA 甲基化是种表观遗传调控（Epigenetic regulation）方式，是哺乳类动物一种重要的基因外调控方式，其在维持正常细胞功能、遗传印记、胚胎发育及肿瘤发生中起着重要作用。肿瘤抑癌基因的启动子区甲基化的改变使原来正常的甲基化成分发生变化，导致细胞正常生长失控或突变，从而促进肿瘤的发生，因此启动子区甲基化的改变可作为肿瘤的早期诊断标准[2]。近来的研究表明，在肿瘤发生时，PTEN 常出现不同程度的 DNA 甲基化水平升高，提示 PTEN 在肿瘤中表达下调或沉默与其启动子区的超甲基化相关[3-5]。因此深入研究 PTEN 的转录抑制情况及如何逆转 PTEN 在 ACC 中的表达、抑制 ACC 的发展具有重要的理论意义和临床价值。

在肿瘤发生中 DNA 甲基化等表观遗传学的改变是可逆的，通过甲基化转移酶抑制剂作用可重新激活某些因超甲基化而表达异常的抑癌基因，有可能抑制甚至阻断肿瘤的发展、转移。为此，本实验中应用的研究 5-氮杂-2'-脱氧胞苷（5-aza-2'-deoxycytidine，5-Aza-dc）是一种能抑制甲基转移酶活性、降低启动子区甲基化水平的去甲基化药物处理ACC-2 细胞株，分别处理 24、48、72 h 后，经 RT-PCR 和 Western blot 检测，发现 PTEN mRNA 及蛋白表达水平明显上调，并随着 5-Aza-dc 处理时间的增加而逐渐增加，且 PTEN mRNA表达水平改变与 PTEN 蛋白的表达基本一致。结果提示，PTEN 基因启动子区甲基化水平的表观遗传学的改变可能与 PTEN 在 ACC-2 细胞株中的低表达相关，其在 ACC-2 细胞的转录抑制中起着重要的作用，与 ACC 的发生、发展关系可能有密切的关系。可能为进一步研究涎腺肿瘤的发生机制提供一定的理论依据，也为涎腺肿瘤的治疗提供重要的思路。

参 考 文 献

[1] 邱蔚六.口腔颌面外科学[M].第 5 版，北京：人民出版社，2003.276.

[2] Mahimainathan L，Choudhury G G.Inactivation of platelet-derived growth factor receptor by the tumor suppressor PTEN provides a novel mechanism of action of the phosphatase[J].J Biol Chem，2004，279(15)：15258-15268.

[3] Li J，Simpson L.The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the AKT/protein kinase B oncogene[J].Cancer Res，1998，58(24)：5667-5672.

[4] 葛相栓，吴正祥.抑癌基因 PTEN 在肿瘤发生发展中的作用[J].安徽医药，2007，11(11)：963-964.

[5] Parsons R，Human cancer.PTEN and the PI-3 kinase pathway[J].Semin Cell Dev Biol，2004，15(2)：171-176.

[6] Fitzpatrick D R，Wilson C B.Methylation and demethylation in the regulation of genes，cells，and responses in the immune system[J].Clin Immunol，2003，109(1)：37-45.

[7] Ho C M，Huang S H.PTEN promoter methylation and LOH of 10q22-23 locus in PTEN expression of ovarian clear cell adenocarcinomas[J].Gynecol Oncol，2009，112(2)：307-313.

[8] 祁 兵.抑癌基因 PTEN 在口腔涎腺腺样囊性癌组织中的表达[J].实用癌症杂志，2003，18(6)：597-598.

[9] 谢振宇.抑癌基因 PTEN 研究进展[J].中国肿瘤，2008，17(1)：33-37.

[10] Sansal I，Sellers W R.The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway[J].J Clin Oncol，2004，22(14)：2954-2963.

[11] 顾婷婷，张忠明，郑鹏生，等.DNA 甲基化研究方法的回顾与评价[J].医学研究通讯，2006，17(6)：555-560.

[12] Schagdarsurengin U，Gimm O，Hoang-Vu C，et al.CpG island methylation of tumor-related promoters occurs preferentially in undifferentiated carcinoma[J].Thyroid，2006，16(7)：633-642.

[13] Soria J C，Lee H Y.Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation[J].Clin Cancer Res，2002，8(5)：1178-1184.

[14] Wiencke J K，Vandenberg S.Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma[J].Neuro Oncol，2007，9(3)：271-279.

（责任编辑：张学颖）