维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)04-0385-05

人宫颈癌发生中 FANCF 表达缺陷与其外显子甲基化的关系

李 敏[1],王泽华[2]

(1. 重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010;2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院妇产科,武汉 430022)

【摘 要】目的:研究 FANCF 基因表达缺陷在宫颈癌发生发展中的作用,分析这种差异表达与甲基化的关系,并探索去甲基化对宫颈癌细胞生长的抑制作用。方法:逆转录聚合酶链技术(RT-PCR)检测宫颈癌 SiHa 和 Hela 细胞、30 例宫颈癌组织标本、48 例宫颈上皮内瘤样病变(Cervical intraepithelial neoplasia,CIN)组织(CIN Ⅰ 12 例、CIN Ⅱ 16 例、CIN Ⅲ 20 例)中 FANCF 基因的表达。Western Blot 分析 FANCF 蛋白水平的表达。甲基化特异性的 PCR 技术(MSP)对 FANCF DNA 进行甲基化分析。以每例标本相应正常宫颈组织作为对照。采用脱甲基化试剂 5-脱氧杂氮胞苷处理 FANCF 甲基化的细胞,四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞增殖。结果:SiHa、Hela 细胞系以及 50%(15/30)宫颈癌组织中 FANCF mRNA 和蛋白表达均缺失。SiHa 伴有 FANCF DNA 甲基化,宫颈癌组织中有 9 例 FANCF DNA 高度甲基化,60%(9/15)的 FANCF 下降可能与甲基化有关。脱甲基化处理 SiHa 细胞系后,FANCF 基因重表达,细胞的增殖速度下降。结论:FANCF 基因甲基化导致其表达缺陷可能是宫颈癌发生的一种原因,脱甲基化处理在抑制宫颈癌的发生发展中有一定的作用。

【关键词】宫颈癌;FANCF;甲基化;5-脱氧杂氮胞苷

【中国图书分类法分类号】R711.74 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-17

Methylation of FANCF gene plays an important role in the development of cervical cancer

LI Min, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the disruption of FANCF gene by methylation in cervical cancer and analyze the relation between cervical cancer and the methylation of FANCF DNA so as to find a method to inhibit the development of cervical cancer. *Methods*: The level of FANCF mRNA was detected with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) before and after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR). Protein was tested by Western Blot. Methylation specific PCR (MSP) was used to check whether it was methylated in exon of FANCF. Normal cervical cancer tissues were used as controls. *Results*: The expression of FANCF mRNA in cervical cancer cell line SiHa was absent, and so was the expression of protein. The expression of FANCF mRNA and protein was decreased in Hela cell line. After treated with (5-Aza-CdR), SiHa expressed FANCF mRNA and protein, and time for SiHa cells to proliferate double was prolonged. Compared with the controls, the expression of FANCF mRNA in cervical cancer tissues decreased significantly or absolutely defaulted, and expression of FANCF protein also decreased ($P<0.05$). Nine cervical cancer specimens were found methylated in exon of FANCF and the rate was 30%. 60% decreasing expression was related to FANCF methylation. All the methylated tissues were expressed lower FANCF. *Conclusion*: Methylation of FANCF gene plays an important role in the development of cervical cancer. Discarding the methylation in FANCF gene can inhibit the development of cervical cancer.

【Key words】 Cervical cancer; FANCF; Methylation; 5-Aza-CdR

FANC-BRCA 信号通路中任何基因的表达缺陷均会损害通路的正常功能发挥。近年发现,FANCF 基因在维持通路完整性中的作用至关重要[1-3]。已经发现 FANCF 基因甲基化和急性淋巴细胞性白血病,头颈部的鳞状细胞癌有密切的关系[4],本研究拟同时从宫颈癌细胞系、CIN 组织和宫颈癌组织同时着手研究,检测 FANCF 表达状况,分析差异表达与 DNA 甲基化的关系,旨在揭示 FANCF 基因甲基化

作者介绍:李 敏(1978-),女,博士,研究方向:妇科肿瘤。

通讯作者:王泽华,男,教授,E-mail:zehuawang@163.net。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070786)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

导致基因表达变化在宫颈癌发生发展中的作用,期望通过抑制甲基化为抑制宫颈癌的发展寻找新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料及来源

人宫颈癌细胞株 Hela、SiHa 由本实验室提供。选择华中科技大学同济医学院附属协和医院 2004 年 7 月至 2005 年 3 月的手术标本,包括 30 例宫颈癌组织标本、48 例 CIN 组织(CIN Ⅰ 12 例、CIN Ⅱ 16 例、CIN Ⅲ 20 例)及其相应正常组织。FANCF 基因的引物序列由上海博亚生物技术有限公司合成,序列设计参考文献[3],其中 MSP 检测的 2 对引物序列均位于 FANCF 基因扩增启动子区域。甲基化修饰试剂来自 Chemicon 公司,去甲基化试剂 5-Aza-2'-deoxycytidine(5-Aza-CdR)为 Sigma 公司产品,细胞培养基 DMEM、RNA 提取试剂 Trizol 为美国 GIBCO 公司产品;逆转录 AMV 酶、聚合酶链反应 Hot start Taq 酶购于日本 Takara 公司,羊抗人 FANCF 蛋白抗体为美国 Santa Cruz 公司产品,辣根酶标记的马抗羊抗体来自 Pierce 公司。PCR 仪,Western Blot 仪为 Biometra 公司仪器。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基在 37℃、5%CO_2、相对湿度 90%的培养箱中培养,细胞贴壁生长。

1.2.2 FANCF mRNA 表达检测 (1)总 RNA 提取:收集细胞 5×10^6 个或取组织 50~100mg,按照 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,测定 RNA 的浓度、纯度符合要求后,进行逆转录;(2)cDNA 合成:反应体系中加入 5×逆转录缓冲液 4μl(含 Mg^{2+}),10mmol/L 三磷酸脱氧核苷混合液(dNTP)2μl,OligodT 1μl,RNA 酶抑制剂 0.5μl,提取 RNA1μg,AMV逆转录酶 2μl 以及双蒸水 5.5μl; 反应条件为 25℃10min、42℃1h、冰上冷却 2min;(3)应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 技术扩增出 FANCF mRNA 部分片段,FANCF 基因引物序列:上游为 5'-TTCGGAAGTCTTTGCTGCCT-3',下游为 5'-AGTAATAACACAGCATTGCC-3',扩增出 413bp 的片断; 以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参照,序列上游为 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCCT-3',下游 5'-GGAAGGAAG-GCTGGAAG-3',扩增出 619bp 片断。循环条件为:94℃ 4min45s,然后 94℃45s,55℃1min,72℃1min 循环 29 次,最后 72℃延伸 5min。电泳并摄像,存入计算机,应用计算机对电泳条带净密度进行分析:FANCF 相对含量=FANCF 条带密度/β-actin 条带密度。

1.2.3 FANCF 蛋白的检测 提取细胞及组织中的蛋白,采用 Western Blot 技术检测各种细胞的 FANCF 蛋白表达,方法参见文献[5]。

1.2.4 甲基化特异性 PCR(MSP) 提取各组 DNA,按照 Chemicon 公司甲基化修饰试剂盒说明书对 DNA 进行修饰,使用两对引物检测各组 FANCF 的 DNA 甲基化情况。序列分别为:甲基化引物上游 5'-TTTTTGCGTTTGTTGGAGAATCGGGTTTTC-3',下游 5'-ATACACCGCAAACCGCCGACGAACAAAACG-3'非甲基化引物上游 5'-TTTTTGTGTTTGTTGGAGAATTGGGTTTTT-3'下游 5'-ATACACCACAAACCACCAACAAACAAAACA-3'反应条件为 94℃4min45s,然后 94℃45s,65℃1min,72℃1min 循环 4 次,再 94℃45s,55℃1min,72℃1min 循环 40 次,最后 72℃延伸 5min,产物电泳摄像。

1.2.5 细胞脱甲基化处理 取 3×10^5 个细胞接种于培养瓶中,用去甲基化试剂 5-Aza-CdR 处理(终浓度为 10^{-6}mol/L)[6],24h 后更换培养基,以后每 3d 更换 1 次培养基,9d 后收获细胞,提取细胞的 DNA、RNA 和蛋白,分别用于 MSP 实验、RT-PCR 实验和 Western blot 实验。

1.2.6 检测脱甲基化试剂处理前后细胞生长速度 收集细胞并调整细胞浓度至 1×10^5 个/ml,取 96 孔板,每孔接种 100μl,37℃,5%CO_2 培养箱中过夜,脱甲基化处理组为实验组,未处理组作为对照,每个实验组及对照组设 6 孔,用台盼蓝染色计数活细胞,取均值绘制细胞生长曲线。以上实验均重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.5 软件进行方差分析和 t 检验。

2 结 果

2.1 宫颈癌细胞系和宫颈癌组织中 FANCF 表达缺失或下降明显

用 RT-PCR 扩增检测 FANCF mRNA,发现宫颈癌 Hela 细胞系中下降,而 SiHa 细胞系完全缺失,30 例宫颈癌组织中有 8 例 FANCF mRNA 缺失表达,7 例下降表达,其相应的正常对照组织中 FANCF 表达丰富,差异有显著性($P<0.05$),从 CIN 到宫颈癌,FANCF 表达呈下降趋势,其中 CIN Ⅲ、宫颈癌分别与正常组织比较,差异均有显著性($P<0.01$)(表 1,图 1)。

2.2 FANCF 蛋白的表达

FANCF 基因表达 42ku 的蛋白。Western Blot 检测 FANCF 蛋白的表达,发现与 FANCF mRNA 检测结果一致:SiHa 细胞中缺失,而 Hela 细胞下降;8 例 FANCF mRNA 表达缺失的宫颈癌组织其蛋白也未表达,7 例表达降低者也有蛋白表达明显降低现象($P<0.05$)。与正常宫颈组织、CIN Ⅰ、CIN Ⅱ 组织比较有统计学意义($P<0.05$)(图 2)。

2.3 FANCF DNA 甲基化状态

仅甲基化引物扩增出目的基因,为完全甲基化

维普资讯 http://www.cqvip.com

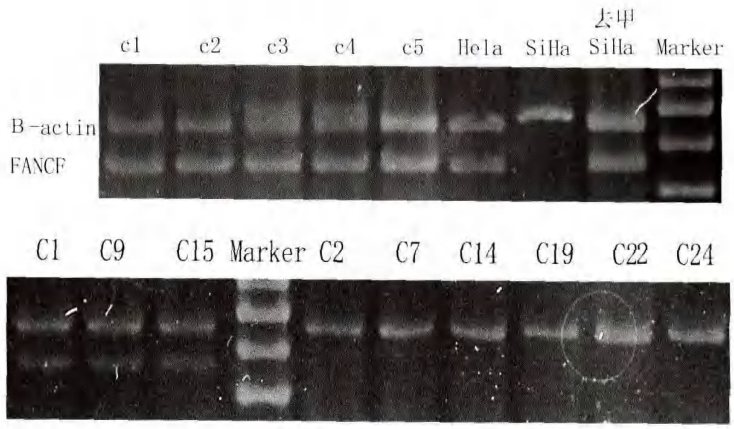
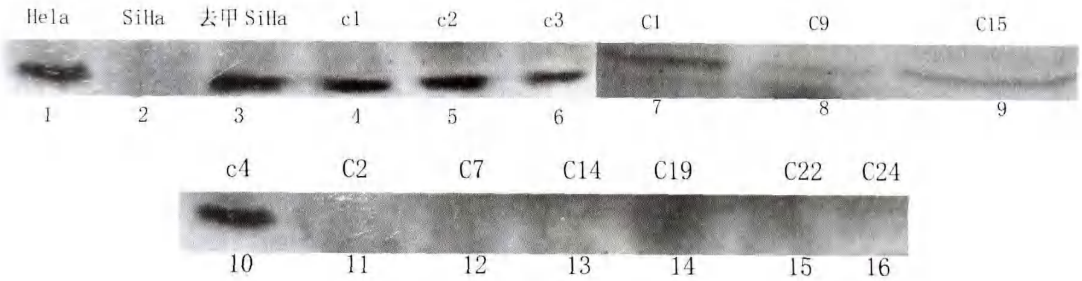


图 1 RT-PCR 检测 FANCF mRNA 表达，FANCF 扩增出 413bp 的条带，β-actin 为内参照，扩增出 619bp 的条带.可见宫颈癌组织 C1、C9、C15 中 FANCF 表达下降，C2、C7、C14、C19、C22、C24 组织中表达缺失。C:宫颈癌，c:CIN



C.宫颈癌;c.CIN

图 2 Western blot 检测 FANCF 蛋白的表达(说明同图 1)。

状态；甲基化与非甲基化引物均扩增出目的基因，为部分甲基化；仅非甲基化引物扩增出目的基因，为非甲基化。SiHa 细胞完全甲基化，Hela 细胞非甲基化，9 例宫颈癌组织出现甲基化(6 例完全甲基化，3 例部分甲基化)，甲基化率为 30%(9/30)，均伴有 FANCF mRNA 和蛋白表达缺陷(6 例完全缺失，3 例下降)。分析宫颈癌 15 例 FANCF mRNA 和蛋白表达缺陷，60%(9/15)与甲基化有关。还有 1 例 FANCF mRNA 表达缺失的宫颈癌组织，其 DNA 用两对引物均未扩增出产物，可能存在 FANCF 突变缺失。48 例 CIN 组织中仅 1 例 CIN Ⅲ 发现甲基化(表 1，图 3)。

2.4 细胞脱甲基化处理后的检测结果

SiHa 细胞经过脱甲基化处理以后，再次用于检测，发现 FANCF mRNA 和蛋白均有重新表达(图 1，图 2)，甲基化现象也消失(图 3)。进一步检测细胞的增殖曲线发现，处理前 SiHa 细胞在接种后 12h 内生长缓慢，此后细胞生长速度倍增，到第 2、3d 为增殖能力最强时期，细胞数为 4.16×10^5 个 /ml，至第 4d 细胞生长缓慢，细胞生长曲线趋于平坦，细胞数为 4.68×10^5 个 /ml。实验组用 5- 脱氧杂氮胞苷作用后，细胞生长明显受到抑制，对数生长期延迟至少 24h，第 3d 对细胞计数为 1.98×10^5 个 /ml，和对照组相比，差异有显著性($P<0.05$)(图 4)。

3 讨 论

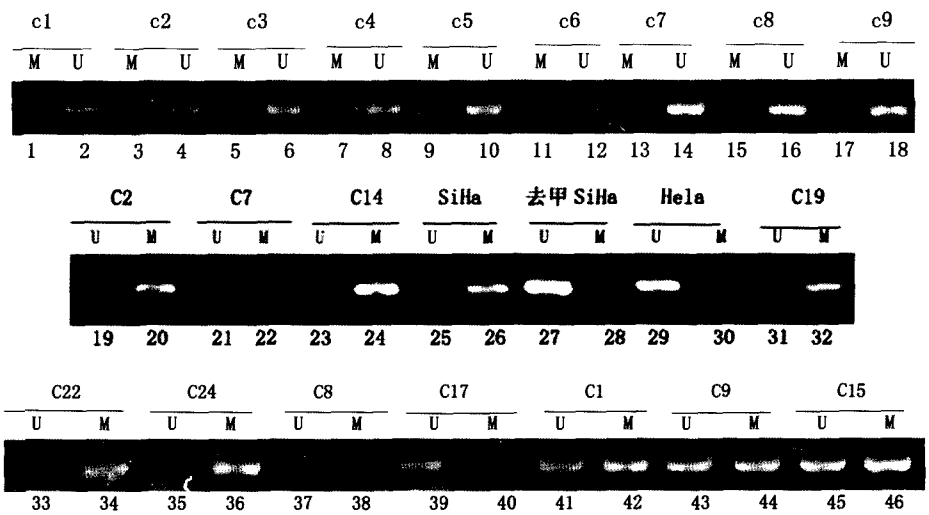
3.1 FANCF 失活在宫颈癌发生中的作用

FANCF 基因是 FANC-BRCA 转导通路中 FANC 家族重要的一员，它的发现始于对范可尼贫血的研究。范可尼贫血是一种罕见的常染色体隐性综合症，染色体极不稳定[7,8]，患者常常并发肿瘤产生[9]，分析由范可尼贫血发展而来的肿瘤患者的染色体发现，染色体的变化和一般肿瘤患者相似，那么是否导致范可尼贫血的原因也就是导致肿瘤产生的导火索成为研究的关键。范可尼贫血主要是 FANC-BRCA 信号通路缺陷导致细胞对外来的损害失去自我修复能力所致。FANCF 表达对 FANC-BR-

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 FANCF DNA 甲基化状况与基因表达的关系

分组	DNA 检测				RNA 检测			
	缺失或突变	甲基化			缺失	下降	正常	RNA 相对表达值
		无	部分	完全				
CIN Ⅰ	0	12	0	0	0	3	9	1.06 ± 0.09
CIN Ⅱ	0	16	0	0	0	6	10	0.84 ± 0.06
CIN Ⅲ	0	19	1	0	0	10	10	0.61 ± 0.08
宫颈癌组织	1	20	3	6	8	7	15	0.33 ± 0.06
宫颈癌细胞系	0	0	0	1	1	1	0	0.31 ± 0.09
正常组织	0	78	0	0	0	0	78	1.56 ± 0.07



M.甲基化；U.非甲基化；C.宫颈癌；c.CIN

图 3 MSP 检测 FANCF 基因在各组中的甲基化状况，FANCF 基因扩增出 152bp 的条带，宫颈癌组织 C1、C9、C15 中 FANCF 部分甲基化，C2、C7、C14、C19、C22、C24 组织中完全甲基化。C17 为非甲基化组织，C8 为 1 例未检测出 FANCF DNA 表达组织。

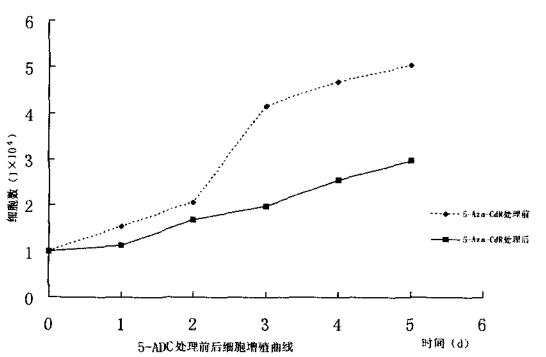


图 4 5-ADC处理前后细胞增殖曲线

CA 途径完整发挥细胞 DNA 修复功能起重要的作用。FANCF 基因的表达下降或缺失会导致 FANC-BRCA 信号转导途径缺陷，细胞 DNA 修复受损，基因发生高度复杂的染色体重排，肿瘤发生。在我们的检测结果中，从 CIN 组织到宫颈癌组织，FANCF 的表达逐步下降，CIN Ⅲ和宫颈癌组织与正常相比有显著性差异，在部分宫颈癌组织和 SiHa 细胞系中，FANCF 的表达甚至缺失，说明 FANCF 的下降在宫颈癌的发生过程中有一定的意义。可能正是由于 FANCF 的逐步下降，细胞的保护机制逐渐丧失，使细胞抵御外来损害的能力下降，细胞发生恶性转化。

3.2 甲基化导致基因表达缺失与肿瘤发生发展关系密切

一个基因表达缺失往往涉及到相关基因的表达杂合缺失，纯合缺失，突变，甲基化等。甲基化作为基因失活的第三种机制，目前得到很大的发展，因为对基因表达的研究发现，原发肿瘤中有的基因 DNA 检测尽管正常，但其表达的蛋白却经常检测不

维普资讯 http://www.cqvip.com

到,研究表明,基因启动子区域的 CpG 岛高度甲基化是多种肿瘤细胞中常见的变异[9]。CpG 岛常在表达基因的 5'区域看到,并且人类基因启动子 60%以上包含在 CpG 岛内,基因启动子区域 CpG 岛异常甲基化将导致基因永久的静止,并可通过有丝分裂传递这种后生性的变化,与 DNA 序列改变无关,所以基因 DNA 检测往往是正常的[10]。肿瘤组织中存在着基因组普遍的低甲基化和局部区域的过甲基化现象,导致这种现象的原因还不清楚。近年,DNA 甲基化与妇科肿瘤相关性的研究取得了巨大的进展,许多肿瘤相关基因启动子区域的 CpG 岛过甲基化与妇科肿瘤的形成密切相关[11]。

3.3 宫颈癌发生发展中 FANCF 基因甲基化与基因失活密切相关

FANCF 基因转录起始位点有丰富的 CpG 岛,在宫颈癌的产生过程中,FANCF 可能被甲基化而失活,在 FANCF 缺失表达的宫颈癌细胞系 SiHa 中 FANCF 完全甲基化,而使用脱甲基化处理后,FANCF 重新表达,进一步证实了 FANCF DNA 的甲基化与基因表达关系密切。脱甲基化试剂处理后 SiHa 细胞的倍增时间明显延长,说明脱甲基化处理使肿瘤细胞生长缓慢,在抑制肿瘤的发生发展中具有一定的作用,这为临床治疗晚期宫颈癌患者,延长患者的存活时间提供了一定的实验室基础。为和临床患者发病模式更加接近,研究进一步检测了 48 例 CIN 患者和 30 例宫颈癌组织中的 FANCF 基因的表达,同样发现在宫颈癌组织中也存在 FANCF 基因的甲基化现象,9 例宫颈癌组织出现甲基化,但是在 CIN 组织中,仅 1 例 CINⅢ中有部分甲基化发现。提示在从 CIN 发展到宫颈癌的过程中,FANCF 甲基化导致的基因表达缺陷有重要作用。研究中还发现,基因转录的程度也取决于甲基化的程度,甲基化不一可能导致基因表达不一,如 6 例完全甲基化组织中 FANCF mRNA 和蛋白缺失,3 例部分甲基化组织表达仅为下降;当然,由于在所检癌组织中可能有少量的正常细胞存在,这些正常细胞的 FANCF 表达可能也是原因之一。但是在宫颈癌 Hela 细胞及其他 6 例宫颈癌组织中,FANCF 表达也下降,其 DNA 却无甲基化出现;甚至 1 例宫颈癌组织中 FANCF DNA 也未检测到,表明在 FANCF 的表达调控中还有其他机制,例如缺失、突变等,也说明宫颈癌的发生是一种多因素作用的结果,甲基化并不是唯一的机制,还存在着许多不为人知的发病机制,需要更进一步研究。

参 考 文 献

[1] Medhurst AL, Huber PA, Waisfisz Q, et al. Direct interactions of the five known Fanconi anemia proteins suggest a common functional pathway[J]. Hum Mol Genet, 2001; 10(4): 423-429.

[2] de Winter JP, van Der Weel L, de Groot J, et al. The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG[J]. Hum Mol Genet, 2000; 9(18): 2665-2674.

[3] Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, et al. Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways[J]. Cell, 2002; 109(4): 459-472.

[4] Kutler DI, Aingh B, Saatagopan J, et al. A 20-year perspective on the international Fanconi Anemia Registry[J]. Blood, 2003; 101(4): 1249-1256.

[5] 萨姆布鲁克,弗里奇,曼尼阿蒂斯,主编.金冬燕译. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社, 1996.870-897.

[6] Bender CM, Pao MM, Jones PA, et al. Inhibition of DNA methylation by 5-Aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines[J]. Cancer Res, 1998; 58(1): 95-101.

[7] D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anemia/BRCA pathway [J]. Nat Rev Cancer, 2003; 3(1): 23-34.

[8] Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anemia[J]. Nat Rev Genet, 2001; 2(6): 446-457.

[9] Nephew KP, Huang TH. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression[J]. Cancer lett, 2003; 190(2): 125-133.

[10] Gonzalez-Zulueta M, bender CM, yang AS, et al. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing [J]. Cancer Res, 1995; 55(20): 4531-4535.

[11] 洪凡真,王 波.DNA 甲基化与妇科肿瘤[J].国外医学肿瘤学分册, 2004; 31(3): 229-233.

(责任编辑:谭乐勤)