维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2008)05-0578-03

烟草悬凝物诱导永生化人支气管上皮细胞恶性转化过程中 p16 基因甲基化改变的研究

张 诚[1],吴庆琛[1],李 强[1],朱茂祥[2],杨陟华[2],潘秀颉[2],谢俊豪[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016;2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所,北京 100850)

【摘 要】目的:探讨永生化人支气管上皮细胞(HPV-18 immortalized human bronchial epithelial cells,BEP-2D)恶性转化过程中 p16 基因甲基化改变。方法:选取正常 BEP-2D 细胞及经过烟草悬凝物处理后的 15 周(week-15,W-15)、25 周(W-25)、38 周(W-38)和 43 周(W-43)的 BEP-2D 细胞作为研究对象,采用巢式 MSP(Nested—methylation-specific PCR,Nested-MSP)检测各细胞株中 p16 基因的甲基化改变情况。结果:正常 BEP-2D 细胞 p16 基因未发生甲基化,而烟草悬凝物处理后的 15 周、25 周、38 周和 43 周的 BEP-2D 细胞 p16 基因发生甲基化。结论:p16 基因甲基化改变可能发生在肺癌形成的早期,检测 p16 基因甲基化可以作为肺癌早期辅助诊断的生物标记物之一。

【关键词】烟草悬凝物;p16;甲基化;巢式 PCR

【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-25

Study on p16 methylation status of BEP-2D cells during its malignant transformation by cigarette smoke condensate(CSC)

ZHANG Cheng,et al

(*Department of Cardiothoracic Surgery,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To study p16 methylation of BEP-2D cells during its malignant transformation. *Methods*:Normal BEP-2D cells and BEP-2D cells treated by cigarette smoke condensate(CSC) for 15 weeks(W-15),25 weeks(W-25),38 weeks(W-38) and 43 weeks(W-43)respectively were chosen to study the p16 methylation status by Nested methylation specific PCR (Nested-MSP). *Results*:The p16 methylation was found in W-15、W-25、W-38 and W-43 BEP-2D cells,but not in the normal BEP-2D cell. *Conclusion*:The p16 methylation may be considered as a kind of biology—marker of the early diagnosis of lung cancer because the p16 methylation occurs in the earlier period of lung cancer.

【Key words】 Cigarette Smoke Condensate;p16;Methylation;Nested-MSP

在肺癌发生发展过程中,癌相关基因的遗传变异,包括 DNA 序列的重组、碱基置换、缺失和插入等在由正常细胞向癌细胞的转变过程中起着重要作用;但由非遗传变异所引起的癌基因和抑癌基因表达异常也同样起着重要作用。P16 基因是一种重要的细胞周期负调控基因,抑制细胞增值,被认为是重要的抑癌基因,在大多数肿瘤中失活,其失活机制有突变、缺失和甲基化 3 种。肺癌已经成为人类癌症死亡的主要原因之一,研究肺癌中 p16 基因甲基化的发生状态具有很大的临床意义。本研究采用 Nested-MSP 检测 p16 基因甲基化的情况,并探讨 p16 基因甲基化与肺癌发生发展的关系。

作者介绍:张 诚(1974-),男,硕士,

研究方向:肺癌病因学和分子生物学。

通讯作者:吴庆琛,男,教授,E-mail:Wuqc6@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 试剂仪器与细胞培养

LHC-8 无血清培养 invotrigion 公司产品,小牛血清为杭州四季青公司产品,胰蛋白酶及 EDTA-Na2 为 Gibco 公司产品,DNA 提取试剂盒为 BioFlux 公司,EZ DNA 甲基化试剂盒—Gold 为 ZYMO 公司,100bp 梯度 DNA 分子量标准参照物为 TIANGEN 公司,p16 引物由北京赛百盛公司合成,低熔点琼脂糖粉为 Simga 公司产品,重庆市某品牌香烟(CSC 提取具体方法是将经过吸烟机抽吸点燃香烟,每支烟每分钟吸抽吸 1 次,共抽吸 4 次,先经过 95%乙醇吸收,再经过 LHC-8 培养液吸收,最后用 LHC-8 培养液稀释所需浓度。乙醇的最终浓度是最大不超过 0.1%,经研究测定该浓度不影响培养

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞的正常生理生化功能)。电泳仪为 Bio-Rad,美国,图像分析仪为北航 CM 2000B 型生物医学图像分析系统,紫外透射反射仪为上海 WFH-210B,PCR 仪为 Themohybaid,高速低温离心机为 SIGMA1-15k,微量加样器:(10μl、200μl、1 000μl)。细胞系以 LHC-8 无血清培养液培养,以 95%相对湿度、5%CO_2、37℃培养箱内孵育;细胞每 3d 换液,每周传代 1 次。

1.2 细胞株

人支气管上皮细胞系 BEP-2D 由军事医学科学院放射与辐射医学研究所朱茂祥教授从 Harris 实验室引进并馈赠,此株细胞由 Harris 实验室用人乳头状瘤病毒 HPV-18 感染人支气管上皮细胞系 BEP-2D,在体外连续传代 100 次以上未发生衰老和死亡,且不具有锚着独立生长能力,接种裸鼠饲养 12 个月以上未观察到成瘤[1],表明该永生化的细胞株具有较好的遗传稳定性。人支气管上皮细胞系 BEP-2D 细胞经烟草悬凝物染毒恶性转化过程如下:根据 MTT 试验、克隆形成率实验确定转化试验所用的 CSC 浓度 1μl/ml, 将对数生长的 BEP-2D 细胞接种于 2 个 50ml 培养瓶,每瓶接种 3×10^5 个,加入 4ml 的 LHC-8 培养液培养,至细胞 80%处于融合状态后 1 瓶进行染毒处理,另一瓶作为平行对照;染毒 24h 后弃除含 CSC 培养液,用 D-Hank's 液洗 3 次,换以新鲜的 LHC-8 培养液继续培养,每次染毒 24h,3d 换 1 次液,6~7d 传代 1 次,染毒至细胞恶性转化。染毒传代至 15 周时血清抗性实验阴性,至 25 周时血清抗性实验显示其促增殖能力显著增强,表明具有转化的趋势,至 38 周时接种于裸鼠背部后生长成瘤,经病理证实为中分化鳞状上皮细胞癌(见图 1~3)。

本实验选取正常 BEP-2D 细胞、染毒 15 周(W15)、染毒 25 周(W25)、染毒 38 周(W38)和染毒 43 周(W43)细胞作为 Nested-MSP 研究对象。

1.3 细胞基因组 DNA 的提取 按照试剂盒说明书所述方法提取 DNA

1.4 P16 基因异常甲基化检测

1.4.1 亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA 按照 EZ DNA 甲基化试剂盒—Gold 所述方法处理 DNA。

1.4.2 p16 基因引物 引物设计参考文献[2],序列见表 1。

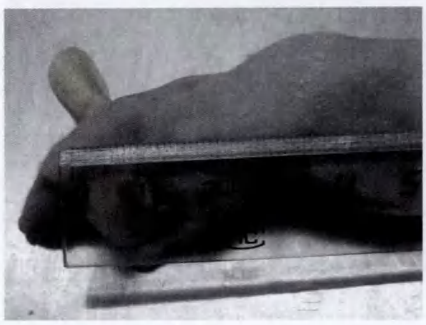


图 1 正常 BEP-2D 细胞接种裸鼠照片

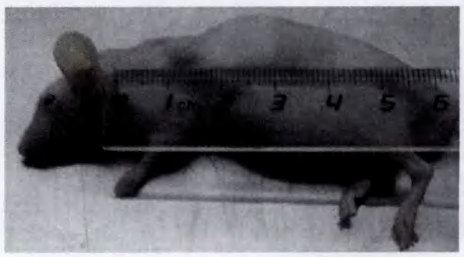


图 2 转化 W38 细胞接种裸鼠成瘤照片

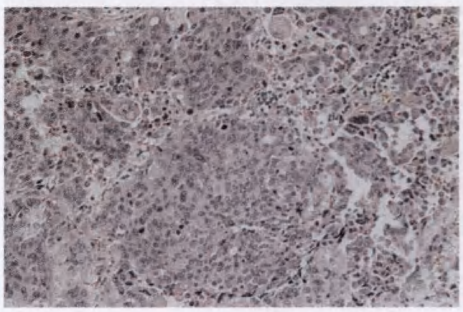


图 3 裸鼠肿瘤组织学图片(HE×40)

1.4.3 巢式 MSP 以亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA 为模板。(1)第 1 轮 PCR 扩增,PCR 反应体系 25μl:含 2μl DNA 模板,10×Ex Taq Buffer,Taq 酶 0.25μl,$Mgcl_2$ 2.5μl,dNTP 4μl,引物 5μl,ddH_2O 6.25μl;反应条件:94℃5min;94℃

表 1 巢式 MSP 扩增 p16 基因的引物序列

引物	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
p16-F	GAAGAAAGAGGAGGGGTTGG	280
p16-F	CTACAAACCCTCTACCCACC	
p16-M	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	150
p16-M	GACCCCGAACCGCGACCGTAA	
p16-U	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	151
p16-U	CAACCCCAAACCACAACCATAA	

注:p16-FO 和 FD.上、下游外侧引物;p16-MO 和 MD.上、下游甲基化特异性内侧引物;p16-UO 和 UD.上、下游非甲基化特异性内侧引物

维普资讯 http://www.cqvip.com

30s,55℃30s,72℃25s,共 40 个循环;72℃,5min。(2)第二轮 PCR 扩增,将第一轮 PCR 反应产物适当稀释(50 倍),取 2μl 进行第二轮 PCR 反应,退火温度增加到 60℃反应时间减少为 25s,其他条件与第一轮反应相同。反应完成后,将取 6μl PCR 反应产物,用 1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳,Goldview 染色。凝胶成像分析仪拍照分析。

2 结 果

由图 4 见,正常 BEP-2D 细胞未发生 p16 基因甲基化,而烟草悬凝物处理后的 15 周、25 周、38 周和 43 周的 BEP-2D 细胞均已发生了 p16 基因甲基化。

3 讨 论

DNA 甲基化[3]是哺乳动物最普通的一种复制后调节方式,是由甲基转移酶介导,将胞嘧啶变为 5'-甲基胞嘧啶的一种反应。研究表明,60%的人类基因启动子区存在 CpG 岛,其位于基因的 5'端启动子区,这些 CpG 岛的甲基化可引起染色质结构、DNA 构型、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白因子相互作用方式的改变,从而控制基因表达。当 DNA 处于高甲基化状态时,基因表达受抑制;当 DNA 处于低甲基化状态时,基因表达可顺利进行。目前,大量研究表明基因的异常甲基化是人类肿瘤发生中最常见的分子生物学事件之一。因此,基因甲基化成为很多学者探讨肿瘤发生机制的关注热点。

p16 抑癌基因是人们发现的第 1 个直接作用细胞周期抑制细胞分裂的抑癌基因,因与许多肿瘤发生发展密切相关,故又称为多肿瘤抑制基因,是细胞增殖周期的调节和抑制者。它位于人染色体 9p21 区,全长 8.5kb,由 3 个外显子和 2 个内含子组成,它们共同编码 148 个氨基酸组成的 15.8ku 的 p16 蛋白[4,5]。p16 基因的失活可表现为纯合缺失、基因突变和启动子区域 5'-CpG 岛的甲基化[6]等多种形式。90%的甲基化发生在 CpG 序列。大量研究证实,p16 基因甲基化在很多肿瘤中发生,如胃癌、结肠癌和乳腺癌。

从本实验结果来看,BEP-2D 细胞受烟草悬凝物作用至 15 周时就已发生 p16 基因的甲基化,而此时血性抗性实验结果与正常 BEP-2D 细胞相比无明显变化,说明此时细胞还没有发生恶性转化。随着染毒时间延长,至 25 周时血性抗性实验结果示染毒 BEP-2D 细胞具有显著促增殖能力,细胞具有恶性转化趋势;至 38 周时,细胞发生恶性转化,裸鼠成瘤试验阳性,而此时细胞仍保持 p16 基因的甲基化改变,并且在染毒 43 周时细胞还保持这种状态。其结果说明,p16 基因甲基化的改变可能发生在肺癌形成的早期阶段,并且这种改变可以遗传给子代细胞。Palmisano 等[7]用 MSP 法对 21 例鳞癌研究发现,10 例确诊为鳞癌,其中 8 例肺癌组织和痰液均有 p16 基因甲基化,2 例无改变;另 11 例在临床诊断肺癌前 5～35 个月随访过程中,患者的痰脱落细胞中就可检测出 p16 基因异常甲基化;100%的肺鳞癌患者痰液可在临床诊断前 3 年内检测出 p16 基因的甲基化。Belinsky 等[8]研究发现,在肺鳞癌的发生发展中,从细胞的过度增生、鳞状化生到原位癌的不同阶段抑癌基因 p16 甲基化的发生率分别达 17%、14%和 50%,p16 基因甲基化在肿瘤组织和癌前病灶均有发生,因此认为 p16 基因甲基化在人的肺癌发生中是一个早期事件,检测 p16 基因甲基化对肺癌早期诊断有较大意义。

综上所述,肿瘤基因的启动区异常甲基化是肿瘤发生过程中的一个早期、频繁事件,与肿瘤的发生、发展及预后关系密切。肿瘤基因的启动区甲基化状态是一个高度敏感的肿瘤分子标记物[8]。p16 基因甲基化改变可能发生在肺癌形成的早期阶段,并在肺癌形成后持续存在。由此提示,p16 基因异常甲基化可能成为肺癌早期辅助诊断的生物标记物之一。

参 考 文 献

[1] Willey JC, Broussoud A, Sleemi A, et al. Immortalization of normal human bronchial epithelial cells by human papillomaviruses 16 or 18[J]. Cancer Res, 1991; 51(19): 5370-5377.

[2] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation—specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93(18): 9821-9826.

[3] Larid PW, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics[J]. Annu Res Genet; 1996; 30(12): 441-444.

[4] Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhausl, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types[J]. Science, 1994; 264(5157): 436-440.

[5] Serrano M, Hannon G, Beach D.A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4[J]. Nature, 1993; 366(6456): 704-707.

(下转第 591 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

一系列细胞因子如：血管内皮生长因子、色素细胞衍生因子等大量分泌，促使新生血管大量生成，导致 ROP[1]。对 0～7d 的小鼠玻璃体动脉消退和视网膜血管形成的研究表明，7d 的小鼠视网膜血管发育最接近早产儿视网膜血管的特点[2]将这种小鼠置于高氧环境中会出现视网膜血管增生等类似与 ROP 的表现，我们选择 7d 龄 wistar 新生鼠研究 ROP，是因为这种鼠具备的特性适合制备氧诱导的血管增生性视网膜病模型[3]。建立早产儿视网膜病变动物模型的关键是箱内的氧浓度是否稳定。预实验中我们发现氧浓度过低对新生血管的形成不利，而氧浓度过高 >80%则会使小鼠及哺乳母鼠的死亡率明显上升。同时箱内温度、湿度的控制也是影响小鼠存活的重要因素。本实验采用由市售整理箱改制成高氧箱，箱底铺钠石灰颗粒可保持干燥，使用透明胶密闭便于观察和换母鼠和饲料等物，且密闭性高。通过控制室内的温度和湿度间接控制箱内温度.

3.2 视网膜新生血管指标的量化

由于正常的视网膜血管不会突破内界膜，故突破内界膜进入玻璃体腔的血管应视为新生血管[4]，计数突破内界膜的内皮细胞核来反映视网膜血管的增殖具有科学性[2]。HE 染色可很好的显示视网膜结构和突破内界膜的血管内皮细胞核，使计数工作简便易行。为和玻璃体动脉内皮细胞核区别，我们仅计数与内界膜有联系的血管内皮细胞细胞核。视网膜铺片能直接反映视网膜血管的形态和分布，更加直观。视网膜 VEGF 免疫组化的检测能半定量反映在高浓度氧环境中引起视网膜相对缺氧从而引起一系列细胞因子如：血管内皮生长因子大量分泌，促使新生血管大量生成。最后导致 ROP。

此模型的建立简便经济，易于实施，结果稳定，可重复性强。是研究早产儿视网膜病新生血管发生机制及相关治疗的合适模型。

参 考 文 献

[1] Smith LE. Pathogenesis of retinopathy of prematurity[J]. Semin Neonatol,2003;8(6):469-473.

[2] Smith LEH,Wesolowski E,McLellan A,et al.Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,1994;35(1):101-106.

[3] Ventresca MR,Gonder JR,Tanswell AK. Oxygen-induced proliferative retinopathy in the newborn rat[J]. Can J Oph thalmol,1990;25(2):186-189.

[4] 张惠蓉，主编.视网膜临床和基础研究[M]. 太原：山西科学技术出版社，1995.323-325.

（责任编辑：谭乐勤）

（上接第 577 页）

and TNF-α[J]. Diabetologia,2007;50(10):2221-2223.

[12] Vitkova M,Klimcakova E,Kovacikova M,et al. Plasma levels and adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of retinol-binding protein 4 are reduced during calorie restriction in obese subjects but are not related to diet-induced changes in insulin sensitivity[J]. J Clin Endocrinol Metab,2007;92(6):2330-2335.

[13] Lafontan M,Moro C,Sengenes C,et al. An unsuspected metabolic role for atrial natriuretic peptides:the control of lipolysis, lipid mobilization, and systemic nonesterified fatty acids levels in humans[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2005;25(10):2032-2042.

[14] Moro C,Klimcakova E,Lolmede K,et al. Atrial natriuretic peptide inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue[J]. Diabetologia,2007;50(5):1038-1047.

（责任编辑：关蕴良）

（上接第 580 页）

[6] 龚振明，傅继梁.p16INK4a 基因及调控[J].生物化学与生物物理进展，2002;29:193-196.

[7] Palmisano WA,Divine KK,Saccomanno G,et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum[J]. Cancer Res,2000;60(21):5954-5958.

[8] Belinsky SA,Nikula KJ,Palmisano WA,et al. Aberrant met hylation of p16(IN K4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998;95(20):11891-11896.

（责任编辑：谭乐勤）