维普资讯 http://www.cqvip.co

文章编号:0253－3626(2004)06－0738－04

DNMT1 靶向 RNAi 重组体对胃癌细胞周期的影响

陈道荣[1], 王丕龙[1], 黄爱龙[2]

(1.重庆医科大学临床学院消化内科,重庆 400016;2.重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:本研究利用 RNA 干扰(RNA interfering,RNAi)技术,以 DNMT1(DNA methyltransferase 1)为靶基因,设计构建重组体,研究其对胃癌细胞周期的影响。方法:设计有小发夹结构的两条 DNA 序列,经退火成互补双链,再克隆至载体 pTZU6＋1 中构建重组体,经鉴定正确后,转染胃癌细胞 AGS,最后使用流式细胞仪分析细胞周期。结果:转染后的胃癌细胞的 S 期细胞较前有明显减少,G2－M 期细胞明显增多。结论:DNMT1 靶向 RNA 干扰重组体转染到胃癌细胞中后促使 S 期细胞进入 G2－M 期,最后衰老死亡。从而为肿瘤的治疗开辟了新途径。

【关键词】DNMT1;RNA 干扰;胃癌细胞;细胞周期

【中国图书分类法分类号】R734 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－03－30

RNA interfering on the cell cycle of gastric cancer by the recombinant plasmid affecting DNMT1 gene expression

CHEN Daorong, et al

(*Department of Gastroenterology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clone the recombinant plasmid affecting gene DNMT1 expression by RNA interfering and transfect it into AGS in order to further search its effects on the cell cycle of gastric cancer AGS. *Methods*: Two DNA sequences containing short hairpin structure was designed and synthesized. The complement form was obtained by annealing and inserted into vector pTZU6＋1. The recombinant plasmid was transfected into AGS. Finally the cell cycle was evaluated through flow cytometer. *Results*: The S cycle cells of the transfected AGS dropped dramatically. And the G2－M cycle cells increased significantly. *Conclusion*: Successful cloning and transfecting the recombinant make it possible to search new gene therapy for the tumors.

【Key words】DNMT1;RNA interfering;Gastric cancer;Cell cycle

胃癌是我国最常见的消化道肿瘤,其死亡率居各种恶性肿瘤之首[1]。随着细胞生物学与分子生物学的发展,越来越多的研究表明部分基因启动子区域的超甲基化状态严重影响了该基因的表达,尤其是一些抑癌基因的失活在肿瘤的发生中起着极其关键的作用,这已得到了国内外学者的公认[2]。而特异性 DNA 甲基转移酶就负责往 DNA 启动子区域的特定胞嘧啶残基上添加甲基。因此本实验准备通过抑制 DNA 甲基转移酶基因的表达,减少启动子区域甲基化,观察其对胃癌细胞株 AGS 的细胞周期的影响,从而为胃癌及其他类型的肿瘤寻找新的治疗途径。

作者介绍:陈道荣(1973－),女,博士生,
主要研究方向:消化系统疾病。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞株和载体

克隆用大肠杆菌 Jm109 和载体 pTZU6＋1 由重庆医科大学第二临床学院病毒性肝炎研究所保存。胃癌细胞 AGS 购自于中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。

1.2 主要试剂

1.2.1 短发夹 RNA(short hairpin RNA,shRNA)结构 DNA 序列

根据 Genbank 中报道的 DNMT1 的核苷酸序列(No NM001379),参考小干扰 RNA(short interfering RNA,siRNA)的设计策略,设计 shRNA 序列如下(正义链带有 Sal Ⅰ的酶切位点,反义链带有 Xba Ⅰ的酶切位点):

正义链:5'－TCGACCGTGAATGGACGTCTAGAAACC ACCTTTCTAGACGTCCATTCACTTTTTGA－3'

反义链:5'－CTAGTCAAAAAGTGAATGGACGTCTA

维普资讯 http://www.cqvip.com

GAAACCACCTTTCTAGACGTCCATTCACGG-3'

1.2.2 其它试剂

限制性内切酶 Sal Ⅰ、*Hind* Ⅲ、EcoR Ⅰ、Xba Ⅰ、T_4DNA 连接酶和 DMSO 均为 Promega 公司产品，购自北方同正公司；核酸分子质量标准、酚/氯仿购自上海生工公司；柱离心式质粒抽提试剂盒，以及柱离心式胶回收试剂盒均购自上海华舜公司。胎牛血清、胰酶购自于美国 Hyclone 公司。转染试剂 Lipofectamine2000 购于 Invitrogen 公司。

1.3 实验仪器和设备

核酸电泳仪(DYY-3 北京六一仪器厂)；凝胶成像仪(Gel doc 100 BIO RAD)；恒温空气浴摇床(ROSI 1000 France)；隔水式电热恒温培养箱(PIX-DHS-40×50 BS 上海跃进医疗器械厂)；台式高速冷冻离心机(Biofuge 22R Heracus)；紫外分光光度计(Du Series 600 BECKMAN)；CO_2 恒温培养箱(美国 Nuaire 公司)；倒置显微镜 CK-40 (OLYMPUS)；低速自动平衡离心机 LDZ5-2(北京医用离心机厂)；FACSC alibur 流式细胞仪(Beenon-Dickinson 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 重组体的构建和分析

在上一篇文章《DNMT1 靶向 RNA 干扰重组体的构建及序列分析》[3]中已介绍了具体的实验方法，此处不再重复。

1.4.2 细胞培养

AGS 细胞常规培养于含 10% 灭活的胎牛血清、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素的 DMEM 培养液中，培养条件为 37℃，饱和湿度 5% CO_2；每 1—2 天用 0.25% 胰酶消化传代。

1.4.3 种板

将对数生长期的胃癌细胞 AGS 消化离心后，加入适量的只含胎牛血清，而无抗生素的 DMEM 培养基计数，按 5×10^5/ml 接种于 6 孔板中。

1.4.4 实验分组

本试验共分为四组：第一组为对照组，不加任何的干预措施。第二组为脂质体对照组，仅予以脂质体；第三组为重组质粒对照组仅予以重组质粒；第四组为试验组予以重组质粒和脂质体的混合物。

1.4.5 转染

种板后 24h 左右，细胞长至培养板的 95%—100% 时进行转染。具体的转染步骤参见 Invitrogen 公司的转染操作指南。

1.4.6 作流式细胞仪检查

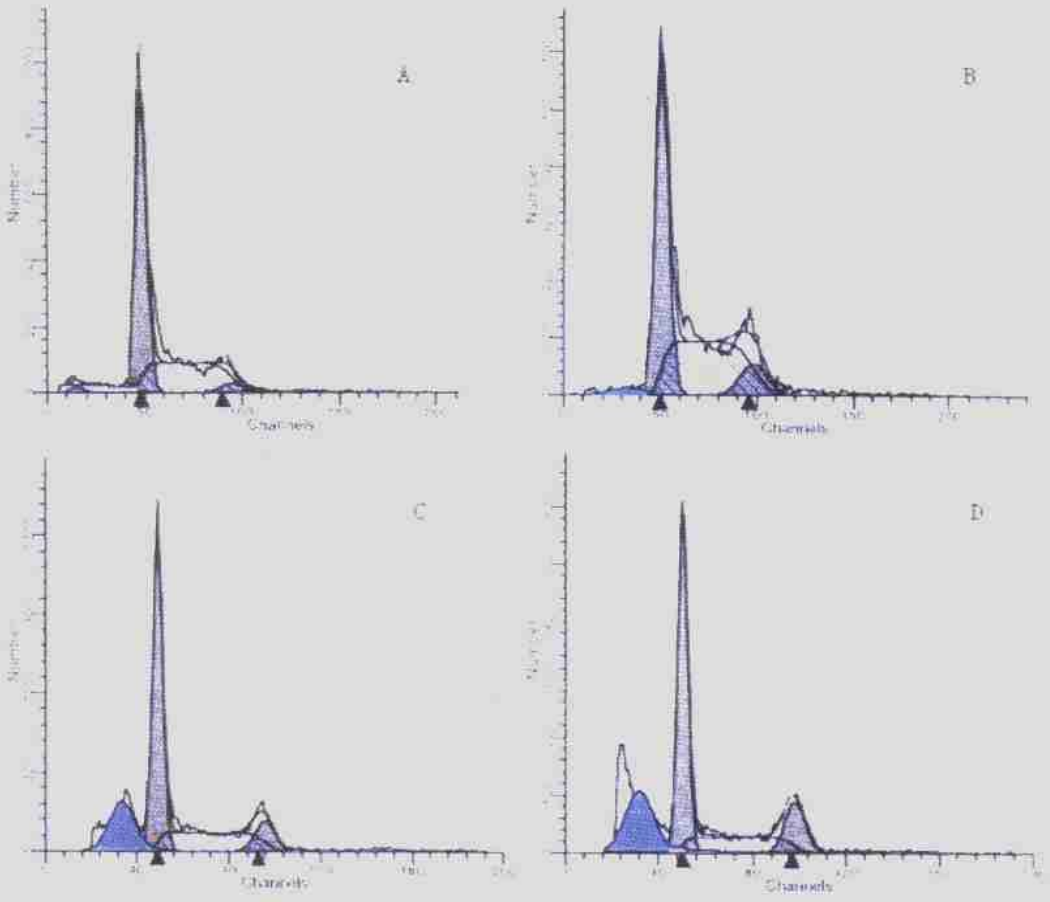


图 1 DNMT1 靶向 RNAi 重组体对胃癌 AGS 细胞周期的影响

A. 未转染重组体；B. 重组体转染后 24h；C. 重组体转染后 48h；D. 重组体转染后 72h

维普资讯 http://www.cqvip.co

将转染前、转染后 24h、48h、72h 的各组细胞用胰酶消化下来后，PBS 洗 3 次，再用 70% 乙醇重悬细胞，4℃ 保存，送流式细胞仪室检查。

1.5 统计学分析

本实验所得的数据使用 SPSS 10.0 软件中的 t 检验来观察有无统计学意义。

2 结 果

2.1 重组载体的构建和分析

见文献[3]。

2.2 重组体对细胞周期的影响

DNMT1 干扰重组体转染到胃癌细胞 AGS 后引起了细胞周期的明显变化。见图 1 和表 1(表中的百分比均为 8 例样本的平均值)。

表 1 转染前后 AGS 细胞周期的改变

	G0－G1(%)	S(%)	G2－M(%)
转染前	59.45	36.82	3.73
转染后 24 小时	50.75	37.07	12.18
转染后 48 小时	58.53	29.98	11.49
转染后 72 小时	57.93	24.06	18.01

对 G0－G1 期细胞而言，转染前和转染后 24h 之间有显著性差异($P = 0.004$)。转染后 24h 与 48h、72h 相比也有显著性差异(P 值分别为 0.027 和 0.035)。而转染前和转染后 48h、72h 无显著性差异(P 值分别为 0.479 和 0.46)。

对 S 期细胞而言，转染前与转染后 24h 无显著性差异($P = 0.787$)。其余的各项间均有显著性差异($P < 0.05$)。

对 G2－M 期细胞而言，转染前后有明显的差别(P 值分别为 0.006，0.009，0.0000)。转染后 24h 与 48h 相比无显著差异(P 值为 0.826)。转染后 24h 或 48h 与 72h 相比均有显著差异(P 值分别为 0.035，0.012)。

3 讨 论

RNA 干扰法(RNA interfering，RNAi)也称为基因沉寂疗法(Gene Silencing)，是 Andrew 和 Craig 等[4]在 1998 年研究 Caenorhabditis elegans 基因组计划时，发现并命名的新技术，其主要利用双链 RNA 诱发对宿主细胞特异性 RNA 转录的抑制，从而抑制特异目的基因的表达。随后此技术在全球得以广泛的开展和应用，特别是 Elbashir 等[5]在《Nature》上发表文章证实在哺乳动物细胞中可以应用 RNAi 技术高效阻断某个特定基因的表达，揭开了 RNAi 应用于哺乳动物细胞研究的新篇章。它与正义、反义 RNA 基因干涉相比，具有效果最强；持续时间长，甚至可持续到下一代；具有基因序列特异性等优点。因此，应用 RNAi 抑制目的基因表达将成为疾病治疗的新热点。

RNAi 技术的应用起初比较局限，主要是 siRNA 合成成本高，花费大。近年来已有许多科学家成功构建了应用 DNA 片断进行体内转录的载体。他们利用人工合成的正向和反向 19～21nt 单链 DNA，中间碱基与目的基因不互补，退火后和转录载体相连，建立含与目的基因 mRNA 互补的载体，转染宿主后，在 U6 或 T7 或 H1 等转录启动子的作用下，转录成 mRNA 而自身形成茎环结构，这样就可与宿主内的 Dice 结合，发挥抑制目的 mRNA 的翻译的作用。研究表明其抑制目的 mRNA 的表达效果与合成的 RNA 进行直接导入细胞的相似，但费用却大大降低了，因此这为 RNAi 推广和应用提供了有力的保障[6]。

细胞周期是细胞生命活动的基本过程。正常情况下，细胞在周期时相的变迁中进入增殖、分化、衰老和死亡等生理状态。如果细胞周期调控异常，细胞将进入病理状态，如细胞转化、癌变。最近研究表明 DNMT1 对 G0 期细胞无明显作用，但可以急剧促使细胞进入 S 期，同时抑制肿瘤抑制基因的转录[7]。因此 DNMT1 在肿瘤的发生中起着极其关键的作用。

本试验通过 RNAi 干扰的方法，抑制 DNMT1 在胃癌细胞中的表达，观察它对细胞周期的影响。结果表明在转染早期，G0～G1 期细胞出现一过性下降，随即很快恢复原有水平。而 S 期细胞呈持续下降的趋势，在转染后 48h 已比较明显。而 G2～M 期细胞呈持续上升趋势，在转染后 72h 最显著。该结果说明胃癌细胞 AGS 在经过靶向 DNMT1 重组干扰体作用后引起了细胞周期的改变，促使细胞由 S 期进入 G2～M 期，在进入衰老死亡，从而达到了治疗胃癌细胞 AGS 的作用。

DNMT1 靶向 RNA 干扰重组体调节胃癌细胞周期的机制目前还不太清楚，可能与 DNMT1 基因直接和/或间接地影响细胞周期调控因子的表达有关。在肿瘤细胞中，部分细胞周期凋亡调节基因启动子区域的 CpG 岛出现超甲基化现象，抑制了这些

维普资讯 http://www.cqvip.com

基因的表达,从而引起细胞周期的改变。这些基因包括:p16、p15、p21、14-3-3-α、BRCA1 和 Rb 等[8~12]。但具体的作用途径和调节方式仍有待于进一步的研究,从而为恶性肿瘤的治疗开辟新途径。

参 考 文 献

[1] 来茂德.消化道疾病.见:杨光华,武忠弼,主编.中华外科病理学(上卷)[M].北京:人民卫生出版社,2002:655.

[2] Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer[J]. Lancet Oncol,2003;4(6):351-358.

[3]陈道荣,王丕龙,黄爱龙.DNMT1 靶向 RNA 干扰重组体的构建及序列分析[J].重庆医科大学学报,2004;29(3):8-11.

[4] Fire A,Xu S,Montgomery MK,et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature,1998;391(6669):806-811.

[5] Elbashir SM,Harborth J,Lendeckel W,et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature,2001;411(6836):494-498.

[6] Sui G,Soohoo C,Affar el B,et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2002;99(8):5515-5520.

[7] Szyf M. The role of DNA methyltransferase 1 in growth control. Front[J]. Biosci,2001;6:D599-609.

[8] Bachman KE,Park BH,Rhee I,et al. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene[J]. Cancer Cell,2003;3(1):89-95.

[9] Tessema M,Langer F,Dingemann J,et al. Aberrant methylation and impaired expression of the p15 (INK4b) cell cycle regulatory gene in chronic myelomonocytic leukemia (CMML)[J]. Leukemia,2003;17(5):910-918.

[10] Zhu WG,Srinivasan K,Dai Z,et al. Methylation of adjacent CpG sites affects Spl/Sp3 binding and activity in the p21 (Cipl) promoter[J]. Mol Cell Biol,2003;23(12):4056-4065.

[11] Magdinier F,Billard LM,Wittmann G,et al. Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA 1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells[J]. FASEB J,2000;14(11):1585-1594.

[12] Kimura H,Nakamura T,Ogawa T,et al. Transcription of mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) is regulated by both E2F-Rb-HDAC-dependent and -independent pathways[J]. Nucleic Acids Res,2003;31(12):3101-3113.

(上接第 737 页)胞免疫应答,但是免疫的机制并不清楚,分泌性抗原与胞内表达抗原对于免疫应答的种类和强度是否也遵循免疫的普遍规律呢? AFP 为分泌性蛋白,本研究中所用 AFP 基因包括了信号肽序列,pSecTag$_2$B-AFP 加上了小鼠免疫球蛋白 κ 轻链 V-J2-C 区的信号肽序列,其表达的分泌性 AFP 高于其他载体。我们拟选用跟人 AFP 分泌规律相近似的小鼠为实验动物对象,研究含 AFP 基因的 DNA 疫苗能否克服免疫耐受,激发针对 AFP 的特异性体液和细胞免疫,对于 HCC 的治疗有补充作用。

参 考 文 献

[1] Vollmer CM,Eilber J,Butterfield L,et al. α-Fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res,1999;59(13):3064-3067.

[2] Hanke P,Serwe M,Dombrowski F,et al. DNA vaccination with AFP-encoding plasmid DNA prevents growth of subcutaneous ADP-expressing tumors and does not interfere with liver regeneration in mice[J]. Cancer Gene Therapy,2002;9(4):346-355.

[3] Chen CH,Wang TL,Hung CF,et al. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene[J]. Cancer Res,2000;60(4):1035-1042.

[4] 梁增伟,兰英华,李用国,等. HBsAg 真核表达质粒及其诱导的小鼠特异性免疫应答[J]. 中华肝脏病杂志,2002;10(2):106-108.

[5] 梁增伟,兰英华,任 红,等. HBsAg 与结核杆菌热休克蛋白 70 融合质粒在真核细胞中的表达[J]. 中华肝脏病杂志,2002;10(4):248-252.