DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.020
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2212 2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)24-2212-04

脂质体包裹DNMT1反义寡核苷酸诱导白血病细胞株孕酮受体去甲基化的实验研究

张晓兵,刘泽军 (第三军医大学附属西南医院检验科,重庆 400038)

提 要:目的 研究脂质体包裹DNA甲基转移酶(DNMT1)反义寡核苷酸转染对白血病细胞株孕酮受体(Progesterone Receptor,PR)启动子甲基化及表达的影响,探讨甲基化基因治疗的新途径。方法 人工合成的DNMT1反义寡核苷酸MG88用脂质体包裹后转染白血病细胞株,用RT-PCR检测DNMT1、PRB mRNA表达的变化以及用MSP分析PRA、PRB甲基化状态的改变。结果 用MG88转染白血病细胞株后,DNMT1 mRNA显著下降;PRA、PRB启动子出现脱甲基化,PRB mRNA表达显著上升。结论 DNMT1反义寡核苷酸MG88可以诱导白血病细胞PR脱甲基化,使PRB mRNA表达升高,为DNA甲基化基因治疗的实验性研究提供了可能。

关键词:DNMT1;反义寡核苷酸;白血病;孕酮受体;甲基化;脂质体
中图法分类号:R394.3;R73-354;R733.7 文献标识码:A

Demethylation of progesterone receptor in leukemia cell line induced by DNMT1 antisense oligonucleotide wrapped in liposome

ZHANG Xiao-bing, LIU Ze-jun (Department of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of the transfection of DNMT1 antisense oligonucleotide wrapped in liposome on the promotor methylation and expression of progesterone receptor in leukemia cell lines so as to find a new pathway of methylation for gene therapy. Methods Artificially synthesized DNMT1 antisense oligonucleotide MG88 wrapped in liposome was transfected into the leukemia cell line. Changes of DNMT1 &PRB mRNA were detected by RT-PCR, and the changes of the methylation status of PRA &PRB were analyzed by MSP. Results After transfection of leukemia cell line with MG88, DNMT1 mRNA decreased significantly. PRA &PRB promotors were demethylated, and the expressions of PRB mRNA increased significantly. Conclusion MG88 can induce the demethylation of PR promoters in leukemia cell line, resulting in the increase of PRB mRNA expression. So MG88 can be used in the experimental study of DNA methylation for gene therapy.

Key words: DNMT1; antisense oligonucleotide; leukemia; progesterone receptor; methylation; liposomes

基因调控可在不同水平下发生:DNA折叠、DNA转录成RNA、RNA翻译成蛋白以及翻译后发生的加工过程。DNA甲基化为精确调控的方法之一,是复制后的一种调节方式,是由DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase,DNMT)介导,将胞嘧啶变为5-甲基胞嘧啶的一种反应。DNMT有多种,但与CpG岛甲基化表型(CpG island methylator phenotype,CIMP)显著相关的是DNMT1[1],而且DNMT1对维持肿瘤细胞相关基因CpG岛异常甲基化是很必要的[2]。我们实验已证明,在白血病中孕酮受体(Progesterone receptor,PR)启动子A、B HL-60、K562、Jurket,研究反义寡核苷酸诱导白血病细胞株PR启动子的去甲基CpG岛都处于高甲基化状态,为此利用脂质体包裹DNMT1 mRNA反义寡核苷酸MG88转染白血病细胞株化效应。

1 材料与方法

1.1 材料

白血病细胞株HL-60、K562、Jurket来源于上海细胞生物研究所。在含10%小牛血清新鲜RMPI1640培养液(Gibco公司)中,37 ℃,5%CO_2的环境培养。

1.2 反义寡核苷酸的合成

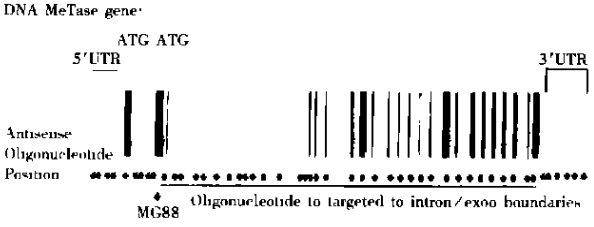
根据DNMT1杂交结合的位点不同,设计了反义寡核苷酸MG88,作用在DNMT15′-非翻译区(5′-untranslated region,5′-UTR),其序列为5′-AAGCATGAGCACCGTTCTCC-3′,其中该序列

作者简介:张晓兵(1973—),男,四川省宣汉县人,医师,主要从事DNA甲基化方面的研究。电话:(023)68753687

收稿日期:2003-04-04;修回日期:2003-07-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

前4个碱基和后4个碱基均作2′-甲基硫代磷酸化修饰。另外, 设计了无关对照反义寡核苷酸(MG208): 5′-AACGATCAGGACCCTTGTCC-3′, 与 MG88 相比有6个碱基不相同, 经基因库检索不与已有的已知编码序列互补。MG208 前4个碱基和后4个碱基也作2′-甲基硫代磷酸化修饰, 它不具有抑制 DNMT1 mRNA 表达的作用, 作阴性对照。以上寡核苷酸由上海生工技术公司合成。



Oligonucleotide was designed to hybridize to the 5′-untranslated region, intron/exon boundaries, and to regions flanking two ATG sequences in the 5′ of the DNA MeTase gene. The position of the most active antisense oligonucleotide (MG88) are shown

图1　DNA甲基转移酶基因结构及 MG88 作用位点

Fig 1　Schematic of DNA methyltransferase gene structure and position of 20-mer phosphorothioate antisense oligonucleotides (filled circles).

1.3　脂质体与反义寡核苷酸的制备

阳离子脂质体 DOSPER Liposomal Transfection Reagent 购自 Roche 公司。546 μl HBS 加到1 *D* 值的 MG88 和 MG208 中形成 1.0 μmol/L 的 DNA, 然后再用 HBS 将其稀释成 40、80、140 nmol/L; 用 HBS 稀释 10.0 μl DOSPER 至终体积为 1 000.0 μl 形成 10 μg/ml 的 DOSPER。取 40、80、140 nmol/L DNA 各 300 μl 分别与 10 μg/ml 的 DOSPER 300 μl 轻轻地混合, 在室温放置 15 min, 使其混合均匀。

1.4　细胞的处理

用新鲜 RMPI1640(10% 小牛血清) 37 ℃, 5% CO_2 培养1 d, 离心去上清液, 加1 ml 细胞培养液, 再加 200 μl 20、40、70 nmol/L 的 DOSPER/DNA 混合液, 轻敲培养瓶, 使混合物分散均匀, 37 ℃ 培养6 h, 离心去上清液, 培养24 h 后收集细胞, 如此培养8 d。每转染1次, 将细胞一分为二, 其中一半继续转染, 另一半收集, 标明转染时间。

1.5　细胞 DNA 和 RNA 的提取

所收集的细胞用 Tripure Isolation Reagent(Roche)提取 DNA 和 RNA。详细情况参见说明书。

1.6　PR 甲基化的检测

采用重亚硫酸盐法处理细胞 DNA(Intergen, USA)[3], 以处理过的 DNA 作模板, 作 PCR。扩增引物及条件见表1(引物均由上海生工公司合成)。

PCR 产物在2%琼脂糖凝胶上电泳。

1.7　RT-PCR

提取的 RNA 用紫外分光光度计定量后, 用 RT-PCR 试剂盒半定量(TaKaRa 公司)测定 PRB、DNMT1 mRNA 的表达。扩增引物及条件见表2(引物均由上海生工公司合成)。

表1　MSP 检测 PRA、PRB 甲基化引物

Tab 1　Summary of the primer sets and annealing for PRA and PRB

Primer	Sequence	Denature	Annealing	Extension	Cycle
PRA-Uf	5′-ATGGGTTATTTTTTTTTG-3′	94 ℃, 30 s	55 ℃, 45 s	72 ℃, 60 s	40
PRA-Ur	5′-TAAAATATACACCCTCCACA-3′				
PRA-Mf	5′-ACGGGTTATTTTTTTTTCG-3′	94 ℃, 30 s	55 ℃, 45 s	72 ℃, 60 s	40
PRA-Mr	5′-TAAAATATACGCCCTCCACG-3′				
PRB-Uf	5′-TGATTGTTGTTTGTAGTATG-3′	94 ℃, 30 s	55 ℃, 45 s	72 ℃, 60 s	40
PRB-Ur	5′-CAACAATTTAATAACACACA-3′				
PRB-Mf	5′-TGATTGTCGTTCGTAGTACG-3′	94 ℃, 30 s	55 ℃, 45 s	72 ℃, 60 s	40
PRB-Mr	5′-CGACAATTTAATAACACGCG-3′				

表2　RT-PCR 检测 PRB, DNMT1 和 β actin mRNA 引物

Tab 2　Summary of the primer sets for PRB and DNMT1 mRNA

Primer	Sequence	Annealing
RT-PCR PRB-f	5′-ACTGAGCTGAAGGCAAAGGGT-3′	62 ℃
RT-PCR PRB-r	5′-GTCCTGTCCCTGGCAGGGC-3′	
RT-PCR DNMT1-f	5′-GTGGCAGTGGACGGAGCAAG-3′	62 ℃
RT-PCR DNMT1-r	5′-AACCAGTGGGCGTGAAACAT-3′	
β actin-f	5′-AAGGCCAACCGCGAGAAGAT-3′	62 ℃
β actin-r	5′-TCGGTGAGGATCTTCATGAG-3′	

PCR 产物在2%琼脂糖凝胶上电泳。将电泳凝胶置于凝胶图像分析系统, 照相后, 采用 Gel-Pro3.1(Media Cybemeties Inc, USA)凝胶图像分析软件分析处理。PCR 产物量以积分吸光度(Integrated optical density, IOD)表示扩增产物量, 计算各 mRNA 与 β actin 的比值, 即为该 mRNA 的相对表达量。

1.8　统计学处理

实验数据采用 SPSS8.0 软件进行处理, 利用 Scheffe 检验进行单因素多重比较, 利用 Spearman 进行相关性分析。

2　结果

2.1　40 nmol/L 的 MG88、MG208 转染白血病细胞株后 DNMT1 mRNA 表达的比较

MG88 转染白血病细胞株后, 转染各时段与转染前相比较, DNMT1 mRNA 表达存在非常显著性差异($P<0.01$), 而 MG208 转染各时段与转染前相比较, DNMT1 mRNA 表达没有显著性差异($P>0.05$), 见表3。

表3　MG88 和 MG208 转染后 DNMT1 mRNA 表达的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Comparison of DNMT1 mRNA expression between MG88 and MG208 transfection($\bar{x}\pm s$)

	Before transfection	Time after transfection			
		2d	4d	6d	8d
MG88	0.894±0.011	0.365±0.008*	0.215±0.009*	0.218±0.011 8*	0.124±0.008*
MG208	0.908±0.022	0.873±0.009	0.902±0.012	0.901±0.013	0.886±0.018

*: $P<0.01$ *vs* Before transfection

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 MG88浓度与DNMT1 mRNA的表达的关系

为了确定MG88转染白血病细胞株的最适浓度，分析了0、20、40、70 nmol/L MG88转染后DNMT1 mRNA表达，结果分别为(0.912±0.011)、(0.375±0.012)、(0.206±0.010)和(0.179±0.004)，从中可见，随着MG88浓度的增加，DNMT1 mRNA表达逐渐降低，20、40、70 nmol/L与0 nmol/L之间显著差异($P<0.01$)，而40 nmol/L与70 nmol/L之间差异无显著性($P>0.05$)。确定MG88转染的最适浓度为40 nmol/L。

2.3 40 nmol/L的MG88转染白血病细胞株后，DNMT1、PRB mRNA变化的关系

MG88转染细胞株后，DNMT1 mRNA与PRB mRNA表达之间是否存在一定的关系，为此检测了两者的表达，见表4。

表4 MG88转染后DNMT1与PRB mRNA表达之间的关系($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Relation of DNMT1 with PRB mRNA after transfection with MG88($\bar{x}\pm s$)

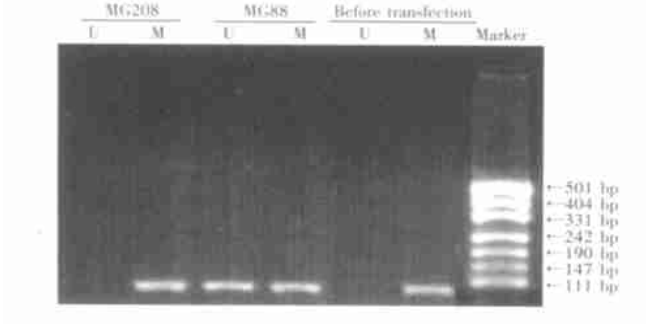
	Before transfection	Time after trasfection			
		2 d	4 d	6 d	8 d
DNMT1 mRNA	0.894±0.011	0.365±0.008*	0.215±0.009*	0.218±0.018*	0.124±0.008*
PRB mRNA	0.027±0.011	0.094±0.008*	0.342±0.005*	0.504±0.010*	0.625±0.006*

*: $P<0.01$ *vs* Before transfection

利用Scheffe检验进行单因素多重比较，DNMT1与PRB mRNA表达在转染的各时段与转染前相比较，存在显著性差异($P<0.01$)。利用Spearman分析两者的关系发现，DNMT1与PRB显著负相关($r=-0.900$，$P=0.037$)。

2.4 MSP结果

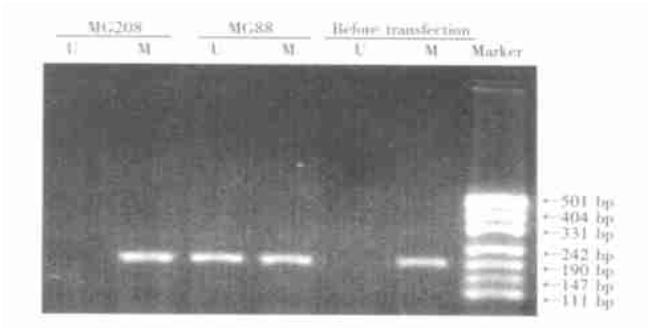
利用MSP检测MG88、MG208转染白血病细胞株后孕酮受体双启动子的甲基化状态，结果从转染的第2天开始，都出现PRA、PRB脱甲基化现象，见图2、3。转染前，PRA、PRB只有M出现阳性扩增带，而用MG88处理后M、U都出现阳性扩增带。而MG208转染后只有M出现阳性扩增带。



U: Unmethylation; M: Methylation

图2 MG88、MG208转染白血病细胞株前后PRA甲基化状态

Fig 2 Methylation status of PRA before and after transfection of leukemia cell line with MG88 and MG208



U: Unmethylation; M: Methylation

图3 MG88、MG208转染白血病细胞株前后PRB甲基化状态

Fig 3 Methylation status of PRB before and after transfection of leukemia cell line with MG88 and MG208

3 讨论

随着分子生物学技术的发展和对DNA甲基化这一后生性调节机制的研究不断深入，逐渐认识到DNMT1活性的高低是影响DNA甲基化模式的重要因素，其活性部分被抑制可以导致甲基化模式的改变。这样，DNMT1可以作为治疗疾病的靶点。抗DNMT1疗法比化学治疗途径有潜在的优势，它是针对某一种潜在的癌状态的调节物而不是作用于一种非特异的增生功能。由于DNMT1抑制剂如5-杂氮-2′-脱氧胞苷(5-Aza-2′-deoxycytidine，5-Aza CdR)容易对DNA产生损害的副作用[4]，反义技术的出现使人们能够设计针对DNMT1 mRNA序列的特异的反义寡核苷酸。

由于硫代磷酸化修饰的反义寡核苷酸在体内产生非特异性作用，而本实验所采取2′-甲基硫代磷酸化修饰这一混合骨架寡核苷酸修饰法(Mixed backbone oligonucleotides MBO)，不但降低极性和非特异性蛋白结合能力，而且增强寡核苷酸和它在杂交时的稳定性[5,6]。针对DNMT1 mRNA反义寡核苷酸MG88经过这样修饰后转染白血病细胞株，检测PR甲基化状态和mRNA表达的变化，探索因高甲基化所致基因表达失活的采取基因治疗可行性。

在本实验中，与MG88转染前相比，转染后白血病细胞株，DNMT1 mRNA表达随MG88浓度和作用时间而显著性下降($P<0.01$)，PR双启动子都出现脱甲基化，PRB mRNA恢复表达，且PRB mRNA升高与DNMT1 mRNA降低显著负相关(Spearman，$r=-0.900$，$P=0.037$)，而无关对照的寡核苷酸MG208却没有这一变化。

目前在肿瘤和基因紊乱性遗传病中，DNA甲基化是其中中心环节，治疗的可能性也很明确，因为突变过程是经常发生的，而甲基化过程是可逆转的[7]。肿瘤

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞 DNA 甲基化导致基因表达"沉寂", 这与肿瘤细胞 DNMT1 mRNA 高表达有关, 因为它对维持肿瘤细胞相关基因 CpG 岛异常甲基化是很必要的[2]。如果降低 DNMT1 mRNA 表达对改变 DNA 高甲基化状态和恢复基因表达成为可能。3 株白血病细胞株中 PR 双启动子处于高甲基化状态, 而且表达都失活, 影响 PR 对白血病细胞的生长的调节, 这与白血病的形成可能有关; 利用反义寡核苷酸 MG88 转染白血病细胞株后, DNMT1 表达降低, 而且 PR 双启动子出现脱甲基化, 并且 PRB mRNA 恢复表达, 且与 DNMT1 表达显著负相关。DNA 甲基化的维持就是 DNMT1 的维持甲基化功能的结果, 因为 DNMT1 有维持甲基化和从头甲基化的作用。文献[2] 报道, MG88 转染肿瘤细胞后, DNMT1 维持甲基化酶活力显著性降低, 这也就导致了 MG88 脱甲基化功能。虽然 MG88 转染的第 2 天开始到第 8 天, PRA、PRB 启动子一直出现部分甲基化, 这可能与转染不完全有关, 但这仍可说明 MG88 可阻滞 DNMT1 mRNA 的表达, 具有脱甲基化的能力, 同时也证明了甲基化所导致的肿瘤有关基因"沉寂"可能由 DNA 甲基转移酶调节的观点。本实验说明反义核酸技术对研究 DNA 甲基化与肿瘤形成机制以及对肿瘤的基因治疗有一定的理论意义和潜在的应用价值。

参考文献:

[1] Kanai Y, Ushijima S, Kondo Y, *et al*. DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers[J]. Int J Cancer, 2001, 91(2): 205—212.

[2] Robert M-F, Morin S, Beaulieu N, *et al*. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells[J]. Nat Genet, 2003, 33(1): 61—65.

[3] Herman J G, Graff J R, 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.

[4] Melki J R, Vincent P C, Clark S J. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia[J]. Cancer Res, 1999, 59(15): 3730—3740.

[5] Toulme J J. New candidates for true antisense[J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(1): 17—18.

[6] Moshe S. Utilization of antisense oligonucleotides to study the role of 5-cytosine DNA methyltransferase in cellular transformation and oncogenesis[J]. Methods, 2002, 27(2): 184—191.

[7] Adrian B. DNA mehtylation patterns and epigenetic memory[J]. Genes Dev, 2002, 16(1): 6—21.

(编辑　薛国文)

(上接 2211 页)

鞘管后, 观察局部有无渗血、肿胀; 按压局部皮肤有无波动感等以了解有无皮下出血。为预防血肿发生, 术后嘱病人必须卧床 24 h 以上; 穿刺部位用绷带(以穿刺点为中心)行"8"字固定加压包扎, 并以沙袋压迫穿刺点 6~8 h。一般病人绷带加压包扎 24 h 后可拆除。本组 1 例患者由于身体较肥胖, 且术中穿刺不顺利, 按时拆除绷带后, 出现穿刺处针眼往外渗血, 经重新压迫股动脉穿刺点上方 20~30 min, 更换敷料加压包扎后出血停止。其余患者经用止血剂、抗生素、限制活动、抬高患肢等综合处理, 1 周后血肿与淤血逐渐吸收、消退。

3.2　低血压、心动过缓

由于手术中支架释放刺激了颈动脉压力感受器, 反射性有血压下降的危险[2]。本组 5 例病人均在安全返回病房后出现血压下降至 13/7 kPa, 持续 1~4 d, 同时伴心率缓慢平均 53 次/min, 经持续补液及予阿托品、多巴胺、阿拉明滴注后得到纠正。患者在术后应立即心电监护 24 h, 密切监测心率和血压, 先以每 30 min 测 1 次, 4 h 后再调为每小时测 1 次, 血压稳定后根据医嘱调为 2~4 h 测 1 次, 观察 24 h 后停止。做到及早发现, 及早纠正。

3.3　高灌注综合征

介入治疗使病变血管开通后, 有的会导致脑过度灌注而造成病人不良反应。本组 1 例病人术后 1 d 出现剧烈头痛、恶心, 经及时按医嘱给降血压、降颅内压药物处理后, 症状消失。护理: 及时发现病情, 排除脑出血等原因引起的头痛; 密切观察意识、瞳孔的变化, 每 30 min 巡视 1 次; 应用 20%甘露醇 125~250 ml 静脉滴注, 以降低颅内压; 辅以维生素 C、维生素 E 及激素治疗观察应用效果。应用止痛剂, 必要时静脉输注血管解痉剂尼莫通, 使脑血管逐渐适应新的血液动力学变化。

3.4　血尿

本组 1 例支架植入术后患者当晚即出现浓茶色尿, 尿量 200 ml/24 h。某些造影剂的高渗性或化学毒性、抗凝剂的作用等可造成血尿, 尤其是高危病人(如伴糖尿病、高血压、肾脏疾病等)[3]。本组病人术后常规用肝素 500~700 U/h, 持续 24 h, 可能与血尿发生有关。护理: 术前除病情必需, 一般不宜大剂量使用甘露醇等脱水剂, 以减轻肾脏负担; 术后早期嘱病人多饮水和适量补液以促进造影剂的排出; 定时观察尿量、颜色, 并记录每小时变化, 作常规尿液检查; 禁止用有肾毒性的抗生素; 尿少或血尿者应及时检测凝血 3 项、血肌酐、尿素氮, 视情况及时调整肝素使用剂量。

关键词: 颈动脉狭窄; 颈动脉支架; 手术后并发症; 护理
中图法分类号: R473.74　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 李铁林, 刘亚杰, 刘振华. 重视缺血性脑血管病的外科与介入治疗[J]. 中华神经医学杂志, 2003, 2(1): 6—7.

[2] 李慎茂, 董宗俊, 武　剑, 等. 血管内支架在治疗颈内动脉高度狭窄疾病中的应用[J]. 中华放射学杂志, 2000, 34(12): 817.

[3] 凌　峰. 介入神经放射学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 74—76.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net