DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.002
第25卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 4
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)04-0283-04

论著

NDGA诱导人胶质瘤细胞株分化过程中基因组甲基化及甲基转移酶的变化及意义

卢佳友,卞修武,赵 雯,徐承平,蒋雪峰 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 了解去甲二氢愈创木酸(Nordihydroguaiaretic acid, NDGA)处理前后两种人胶质瘤细胞系CHG-5、SHG-44甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)活性、DNMT mRNA表达和基因组甲基化程度的改变。方法 以NDGA处理人恶性胶质瘤细胞系CHG-5及SHG-44,观察两种细胞增殖和分化状态;采用同位素微量示踪法测定甲基转移酶活性和基因组DNA甲基化程度;应用RT-PCR法测定DNMT mRNA表达水平。结果 NDGA处理后两种细胞增殖速度明显减缓,分化水平升高;DNMT活性显著降低、基因组甲基化程度明显升高;而DNMT mRNA改变不明显。结论 NDGA能抑制甲基转移酶的活性,升高基因组甲基化水平,这些作用可能与其诱导恶性胶质细胞瘤分化的机制有关。

关键词:胶质细胞瘤;去甲二氢愈创木酸;甲基化;甲基转移酶;PCR
中图法分类号:R394.2;R730.264;R977.3 文献标识码:A

Changes of DNA methylation during differentiation of human glioma cells induced by NDGA

LU Jia-you, BIAN Xiu-wu, ZHAO Wen, XU Cheng-ping, JIANG Xue-feng (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of NDGA in changing the activity, expression of the DNA methyltransferase (DNMT) and the patterns of genome DNA methylation in two glioma lines. Methods After two malignant glioma lines CHG-5 and SHG-44 were treated by various concentrations of NDGA, their differentiation states, the patterns of genome methylation, activity of NDMT were detected by ^{3}H-labeled tracing microassay technique and RT-PCR was used to measure the expression of NDMT mRNA. Results NDGA could reduce the activity of DNMT and increase the DNA methylation degree which was dose- and time-dependent, but could not change the expression of DNMT mRNA. Conclusion The effect of NDGA on the inhibition of DNMT activity, increase of the DNA methylation degree may be one of the most important mechanisms of NDGA inducing differentiation effect.

Key words: glioma; nordihydroguaiaretic acid; induced differentiation; methylation; DNA-methyltransferase; reverse transcription PCR

DNA异常甲基化作用干扰基因转录水平,与很多肿瘤的发生发展密切相关[1~3]。我们以往采用甲基化敏感性PCR对SHG-44细胞进行研究时发现,NDGA处理后细胞的GFAP基因甲基化水平显著降低,具体机制尚不明了。本实验通过对NDGA处理前后,SHG-44、CHG-5基因组甲基化水平、甲基转移酶活性及DNMT mRNA表达水平的检测,了解基因组甲基化水平、甲基转移酶活性及DNMT mRNA水平与人恶性胶质瘤分化状态的关系,并进一步探讨NDGA诱导胶质瘤细胞分化的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞来源、培养及处理

两种人恶性胶质瘤细胞系SHG-44引自苏州医学院,CHG-5由本所自行建系,均采用含10%小牛血清的RPMI1640(Hyclone公司)培养液常规培养。细胞用0.25%胰酶消化后,按5×10^{4}转至培养瓶和6孔培养板中。常规设置对照组与实验组。实验组于接种12 h后改为含50、100、150 μmol/L NDGA(Sigma公司,完全培养基稀释)的培养基继续培养12、24、48 h。对照组采用常规处理,不加药物处理。人脐静脉内皮细胞株ECV304(ECACC, Salisbury, Wiltshine, UK)作为甲基转移酶活性及基因组甲基化检测的参照细胞。

1.2 NDGA诱导胶质瘤细胞分化效应观察

常规HE染色,显微镜下观察。同时于处理12、24、48 h后取出6孔板中细胞爬片,75%酒精固定15 min,SABC法检测

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970268)
作者简介:卢佳友(1974-),男,湖北省建始县人,硕士,医师,主要从事肿瘤诱导分化方面的研究。电话:(023)68752247
通信作者:卞修武,E-mail:bianxiuwu@263.net
收稿日期:2002-06-03;修回日期:2002-08-19

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

GFAP 蛋白表达。

1.3 基因组甲基化程度检测

检测方法依据文献[4]略加改动。基本原理是：DNMT 能将过量的^{3}H 标记的S-甲基酰苷蛋氨酸(^{3}H-SAM)中的甲基最大限度地掺入原先未甲基化的碱基中。通过检测待测 DNA 中^{3}H 标记的甲基化的量即可间接推测出原先 DNA 甲基化水平情况。结果以样本每分计数值和参照组每分计数值之比作为反应中掺入的^{3}H-SAM 量的相对值。以 ECV304 为参照细胞。重复实验3次。

1.4 DNMT 活性检测

处理及重复实验同 1.3。采用试剂及检测方法参考文献[5]略加改动。基本原理同甲基化程度检测。实验采用已知过量的碱基(poly[d(I-C)d(I-C)])及^{3}H-SAM，检测等量待测样品(裂解蛋白)中 DNMT 将^{3}H 标记的甲基掺入 poly[d(I-C)d(I-C)]的能力来评价其活性。仍以实验组样本检测值与参照组检测值之比作为 DNMT 的相对活性。

1.5 DNMT mRNA 表达水平检测

样本用 100 μmol/L NDGA 处理 12、24、48 h 后进行检测。DNMT 的上游引物 P1：5′-ATCGGATGAGTCCATCA-3′；下游引物 P2：5′- TTCTTCTGCAGGAAGC G-3′。扩增长度为 100 bp。内参照采用小鼠β-actin，上游引物：5′-TTGTCACCACCTGGGACGATATGG-3′，下游引物：5′-CATAGGTCTTCTCCAGGGAG-3′，扩增长度：500 bp。由上海基康公司合成。

1.5.1 总 RNA 提取 采用 Tripure 试剂盒(Boehringer Mannheim 公司，德国)，按说明书进行。

1.5.2 RT-PCR 反转录体系总体积为 2.9 μl，包括：0.5 μg 总 RNA，0.1 μl PCR 下游引物 P2，0.4 μl 5× cDNA buffer，0.2 μl 100 mmol/L DTT，0.2 μl 10 mmol/L dNTP，1 μl AMV 反转录酶，0.6 μl DEPC 水。混匀后 70℃预变性 10 min，42℃反转录 1 h，72℃ 10 min；冰浴 15 min。PCR 反应体系总体积为 50 μl，包括：0.5 μl 10× PCR buffer，0.5 μl 25 mmol/L $MgCl_2$，2.5 μl 10 mmol/L dNTP，1 μl 20 μmol/L 上、下游引物，0.1 μl 5 U/μl AMV，0.1 μl 5 U/μl *Taq* 酶，0.1 μl 2 U/μl RNasin，补加 DEPC 水。PCR 反应条件：预变性：94℃ 2 min，循环：94℃ 50 s，52℃ 50 s，72℃ 60 s。循环数：35 个循环。延长：72℃ 10 min。取扩增产物 5 ml 于 2.0% 琼脂糖电泳 30 min。Bio Rad 凝胶扫描仪上进行扫描。

1.6 统计学方法

所有计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用统计软件 SPSS 10.0 进行两样本均值间显著性检验；采用非配对资料 t 检验。

2 结果

2.1 NDGA 诱导胶质瘤细胞分化效应观察

处理后两种胶质瘤细胞增殖速度减慢，梭形细胞增多，突起变得细长，核/浆减小，见图1。两种细胞 GFAP 阳性细胞比例逐渐升高，面积增大及强度增加，见图2。

2.2 甲基化状态测定

随着处理浓度增大及作用时间的增加，两种细胞基因组甲基化水平呈现不同程度的增加，见表1、2。

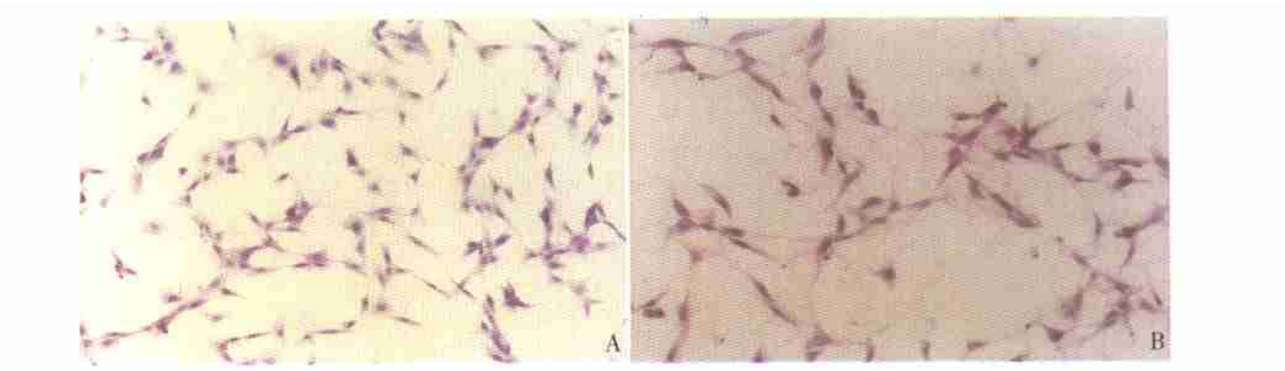


图1 100 μmol/L NDGA 处理 48 h 后 CHG-5(A)、SHG-44(B)细胞胞质丰富，突起变长 (A：HE× 40；B：HE× 100)

Fig 1 The cytoplasm of CHG-5(A) and SHG-44(B) enriched and processes extended after being treated by NDGA (A：HE×40；B：HE× 100)

表1 NDGA 对 CHG-5 细胞基因组甲基化程度的影响

Tab 1 Effect of NDGA on the DNA methylation degree of CHG-5 cells

Phrase time (h)	Control	Group		
		50 μmol/L	100 μmol/L	150 μmol/L
12	5.193 3±0.781 3	4.350 0±0.434 0	3.873 3±0.560 9	2.926 7±0.349 9 **※※
24	4.647 0±0.427 4	5.113 3±0.720 6	3.280 0±0.511 1 *※	2.724 3±0.398 5 **※※
48	4.433 3±0.691 7	3.086 7±0.416 3 *△△	2.353 3±0.389 3 **△※	1.599 5±0.521 3 **△△※※

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* Control；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* 12 h；※：$P<0.05$，※※：$P<0.01$ *vs* 50 μmol/L

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

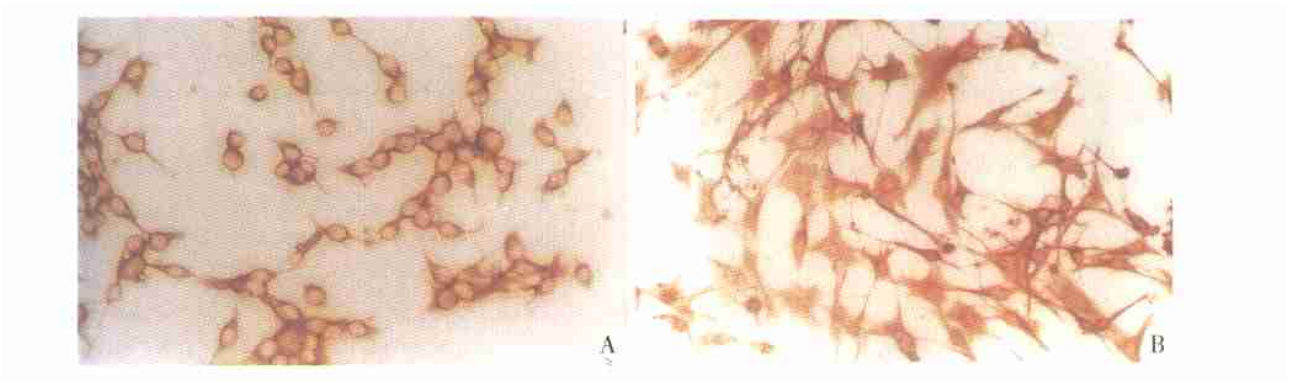


图 2　100 μmol NDGA 处理 48 h 后 CHG-5(A)、SHG-44 细胞(B)GFAP 强阳性表达　(SABC× 100)

Fig 2　The positive expression of GFAP in cytoplasm of CHG-5(A) and SHG-44(B) after being treated by NDGA　(SABC× 100)

表 2　SHG-44 细胞基因组甲基化程度检测结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of NDGA on the DNA methylation degree of SHG-44 cells($\bar{x}\pm s$)

Phrase time (h)	Control	Group		
		50 μmol/L	100 μmol/L	150 μmol/L
12	5.273 3±1.217 91	4.726 0±0.817 8	3.473 3±0.693 2 *※	2.996 8±0.621 3 **※※
24	5.626 7±1.170 3	4.170 0±0.797 0	2.763 3±0.655 0 **※	2.398 8±0.512 5 **※※
48	5.046 7±1.194 2	3.356 7±0.718 2 *△	2.106 7±0.674 3 **※△△	1.520 0±0.382 2 **△△※※

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* Control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* 12 h; ※: $P<0.05$, ※※: $P<0.01$ *vs* 50 μmol/L

2.3　NDGA 处理后甲基转移酶活性变化

随着处理浓度增大及作用时间的增加, 两种胶质瘤细胞株的基因组甲基转移酶活性逐渐下降, 见表 3、4。

2.4　DNMT mRNA 表达水平的变化

经 100 μmol/L NDGA 处理 12、24、48 h 后药物处理后, 两株胶质瘤细胞 DNMT mRNA 均无明显改变, 见图 3。

表 3　CHG-5 细胞 DNMT 活性检测结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effect of NDGA on the DNMT activity of CHG-5 cells($\bar{x}\pm s$)

Phrase time (h)	Control	Group		
		50 μmol/L	100 μmol/L	150 μmol/L
12	2.273 00±0.513 00	1.943 67±0.454 67	1.880 33±0.380 64	1.760 00±0.418 76
24	2.172 11±0.479 81	1.218 00±0.397 11 **△	1.055 67±0.341 96 **△△	0.927 00±0.330 48 **△△
48	2.265 3±0.436 89	1.165 67±0.378 44 **△	0.789 00±0.326 05 **△△	0.838 00±0.240 44 **△△

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* Control; △: $P<0.05$,　△△: $P<0.01$ *vs* 12 h; ※: $P<0.05$, ※※: $P<0.01$ *vs* 50 μmol/L

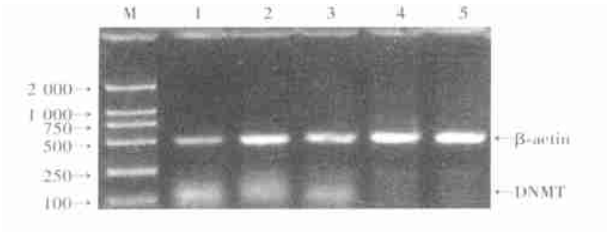
表 4　SHG-44 细胞 DNMT 活性检测结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effect of NDGA on the DNMT activity of SHG-44 cells($\bar{x}\pm s$)

Phrase time (h)	Control	Group		
		50 μmol/L	100 μmol/L	150 μmol/L
12	3.236 67±0.625 97	2.996 67±0.698 65	2.644 33±0.581 80	2.218 33±0.521 73
24	3.285 62±0.542 13	2.236 33±0.579 54 **	1.925 33±0.491 97 **	1.316 33±0.375 66 **△△※※
48	3.384 44±0.435 69	1.603 00±0.409 67 **△△	1.025 33±0.312 41 **△△※	1.125 98±0.213 87 **△△※

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* Control; △: $P<0.05$,　△△: $P<0.01$ *vs* 12 h; ※: $P<0.05$, ※※: $P<0.01$ *vs* 50 μmol/L

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



M: Marker; 1: EVC304; 2: Untreated, CHG-5; 3: Treated, CHG-5; 4: Untreated, SHG-44; 5: Treated, SHG-44

图3 RT-PCR测NDGA处理前后两种胶质瘤细胞系DNMT mRNA的表达

Fig 3 Detection of the expression of DNMT mRNA before and after treatment with NDGA by RT-PCR

3 讨论

基因的异常甲基化与许多肿瘤的发生发展之间存在密切联系。对于人恶性胶质瘤与DNA甲基化异常的关系鲜有报道。本实验所采用的两种人胶质瘤细胞系CHG-5及SHG-44属于不同的病理学分级,既往我们实验中发现NDGA对SHG-44细胞具有诱导分化效应。本实验发现,NDGA处理之后CHG-5同样表现出明显的分化效应。同时还发现,NDGA诱导两种胶质瘤细胞分化效应与基因组甲基化水平显著相关,提示DNA异常低甲基化可能是该肿瘤发生的重要原因之一。

DNA甲基化模式的形成和维持主要取决于细胞内去甲基化机制和甲基转移酶的催化调节。后者活性增高是肿瘤的重要生物学特性之一。目前对其活性的变化在肿瘤发生发展中作用认识还非常有限,包括:①催化甲基发生转移,通过甲基化对转录及染色体结构的改变抑制抑癌基因的表达;②通过甲基转移活性以外的功能对细胞生长进行调控,如它可竞争性结合复制叉中的PCNA,阻止其它蛋白如P21的结合,后者受生长抑制信号地诱导,能与PCNA CDKs形转录抑制子[6];③DNMT也能直接或间接与组蛋白脱乙酰酶Ⅰ、Ⅱ作用,参与细胞有丝分裂过程[7,8];④近年来,有人发现DNMT在G_0期表达量极少,但S期却特异性高表达,故认为DNMT可能结合于一些抑癌基因或管家基因上的结合转录调控元件的位点,由于这些基因是S期DNA合成及复制所必需的,因此其表达"沉寂","允许"DNA复制和细胞周期的进行[9]。

本实验中,NDGA处理后DNMT活性降低与胶质瘤细胞分化呈现一致性,但DNMT活性与基因组甲基化程度变化并不一致。提示可能由于DNMT选择性作用于某些与细胞分化相关的特定基因(如GFAP基因),而影响细胞分化;NDGA通过抑制DNMT活性,并进而抑制特定基因甲基化,促进其表达最终达到诱导胶质瘤细胞分化效应;NDGA提高基因组甲基化水平可能主要是通过抑制细胞内去甲基化机制途径。详细机制尚待进一步研究。

我们还发现,NDGA处理后瘤细胞DNMT活性和DNMT mRNA表达变化并不一致。提示NDGA对瘤细胞DNA甲基化调控元件的影响可能主要发生在DNMT的翻译后水平。

基因甲基化是肿瘤促进阶段的一个早期事件,去除甲基化可引起初始细胞克隆发生退化。由于DNA甲基化作为一种表基因机制不引起基因的改变,故干预基因甲基化越来越成为预防及抗癌研究的一个热点。目前国内外甲基化治疗的方案主要有3种:胞嘧啶类似物和它的脱氧类似物;靶向其对3′-,5′-端的反义抑制物及蛋白抗体[10,11]。但目前所采用的这些药物大多具有不同程度的毒副作用。NDGA是花生四烯酸代谢中脂氧化酶的一种特异强烈抑制剂,我们既往实验证明NDGA对人恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞及其移植瘤具有诱导分化的作用。

本实验结果显示:NDGA能通过改变DNMT的活性或/和其它机制影响胶质瘤细胞基因的甲基化模式,从而诱导瘤细胞的分化。提示NDGA有可能成为一种治疗基因甲基化异常方面的新药。

参考文献:

[1] Perrais M, Pigny P, Buisine M P, *et al*. Aberrant expression of human mucin gene MUC5B in gastric carcinoma and cancer cells. Identification and regulation of a distal promoter[J]. J Biol Chem, 2001, 276(18): 15386—15396.

[2] Toyooka K O, Toyooka S, Virmani A K, *et al*. Loss of expression and aberrant methylation of the CDH13 (H-cadherin) gene in breast and lung carcinomas[J]. Cancer Res, 2001, 61(11): 4556—4560.

[3] Mares J, Kriz V, Weinhausel A, *et al*. Methylation changes in promoter and enhancer regions of the WT1 gene in Wilms' tumours[J]. Cancer Lett, 2001, 166(2): 165—171.

[4] 房静远, 沈兰兰, 萧树东 等. 肝癌和胃癌DNA甲基化与病理的关系[J]. 肿瘤防治研究, 1997, 14(2): 19—32.

[5] 白志勇, 徐国宾, 武淑兰. 同位素示踪微量法测定白血病细胞DNA-甲基转移酶活性[J]. 北京医科大学学报, 2000, 32(1): 76—78.

[6] Araujo F D, Croteau S, Slack A D, *et al*. The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus[J]. J Biol Chem, 2001, 276(10): 6930—6936.

[7] Rountree M R, Bachman K E, Baylin S B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci[J]. Nat Genet, 2000, 25(3): 269—277.

[8] Tatematsu K I, Yamazaki T, Ishikawa F. MBD2-MBD3 complex binds to hemi-methylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase[J]. Genes Cells, 2000, 5(8): 677—688.

[9] Milutinovic S, Knox J D, Szyf M. DNA methyltransferase inhibition Induces the transcription of the tumor suppressor p21(WAF1/CIP1/sdi1)[J]. J Biol Chem, 2000, 275(9): 6353—6359.

[10] Antoun G, Baylin S B, Ali Osman F. DNA methyltransferase levels and altered CpG methylation in the total genome and in the GSTP1 gene in human glioma cells transfected with sense and antisense DNA methyltransferase cDNA[J]. J Cell Biochem, 2000, 77(3): 372—381.

[11] Ndo T, Nishimura M, Oka Y. Decitabine (5-Aza-2′-deoxycytidine) decreased DNA methylation and expression of MDR-1 gene in K562/ADM cells[J]. Leukemia, 2000, 14(11): 1915—1920.

(编辑 陈聪连)

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