DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.005
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
1264 2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1264-03

人DNA MTase反义基因转染对肝癌细胞DNA MTase基因mRNA表达的影响

张 宏[1],肖文华[2],梁后杰[1],房殿春[3],杨仕明[3],罗元辉[3] (1第三军医大学附属西南医院肿瘤血液科,重庆 400038;2解放军第304医院肿瘤科,北京 100037;3第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察人DNA MTase反义基因转染对肝癌细胞系SMMC-7721内源性DNA MTase基因mRNA表达的影响。方法 将构建的包含正、反义DNA MTase基因片段的真核表达载体用脂质体法将其转染入肝癌细胞系SMMC-7721;采用RT-PCR法观察DNA MTase基因mRNA表达变化。结果 PCR法扩增外源性NeoR基因证实用脂质体法成功将重组载体转染入细胞;RT-PCR法检测DNA MTase基因mRNA表达,显示转染反义DNA MTase基因片段的SMMC-7721细胞中DNA MTase基因mRNA表达下调。结论 人DNA MTase反义基因转染是一种有效、可靠的抑制肝癌细胞系SMMC-7721 DNA MTase基因表达的方法。它为更多了解DNA MTase在肝癌发生、发展中的作用提供了帮助。

关键词:DNA甲基转移酶;真核表达载体;DNA,反义;肝癌细胞系;mRNA
中图法分类号:R394.2;R735.7 文献标识码:A

Effect of transfection of human antisense DNA MTase gene on expression of DNA MTase gene mRNA in SMMC-7721 cells line

ZHANG Hong, XIAO Wen-hua, LIANG Hou-jie, FANG Dian-chun, YANG Shi-ming, LUO Yuan-hui (Department of Oncology and Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of the transfection of human antisense DNA MTase gene on the expression of ectogenetic DNA MTase gene mRNA of the human hepatocarcinoma cell line SMMC-7721. **Methods** The constructed sense and antisense DNA MTase gene eukaryotic expression vectors were transfected into the hepatocarcinoma cell line SMMC-7721 by liposome DOTAP. The changes of the expression of DNA MTase gene mRNA were observed by RT-PCR. **Results** The constructed recombinant vectors were successfully transfected into SMMC-7721 cell line with liposome DOTAP and affirmed by amplifying the ectogenetic NeoR gene with PCR. Decrease of the DNA MTase gene mRNA was found in the SMMC-7721 cell line tranfected with antisense DNA MTase gene fragment after being detected with RT-PCR. **Conclusion** Transfection of human antisense DNA MTase gene was a valid way to inhibit the expression of DNA MTase gene of the SMMC-7721 cell line may be helpful for the derstanding the role of DNA MTase in the hepatocarcinoma.

Key words: DNA methyltransferase; eukaryotic expression vector; antisense DNA; carcinoma; hepatocelluar; cell line; mRNA

大量的研究表明,在多种肿瘤组织或细胞系中都存在DNA(5-胞嘧啶)甲基转移酶[DNA(Cytosine-5)-Methylatransferase, DNA MTase]表达增高和局部区域CpG岛特异性的高甲基化。一些抑癌基因或相关基因5′端调控序列CpG岛被高甲基化而失活[1~3]。使用DNA MTase抑制剂5-脱氧杂氮胞苷处理高甲基化的肿瘤细胞系可以使失活的抑癌基因恢复表达。本实验利用反义技术,以构建的DNA MTase反义基因真核表达载体[4]转染肝癌细胞系SMMC-7721,发现DNA MTase基因mRNA表达下调。报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系SMMC-7721、大肠杆菌菌株JM109由第三军医大学西南医院全军消化专科中心保存;TriPure提取剂、DOTAP脂质体、G418为Roche公司产品;反转录PCR试剂盒、PCR试剂盒、真核表达质粒载体pCI-neo为Promega公司产品;低熔点琼脂糖为Gibro公司产品;RPMI1640、新生小牛血清为Hyclone公司产品。PCR引物设计及电子酶切分析使用DNAStar公司的Lasergen程序组,引物由上海生工公司合成(PAGE纯化)。

1.2 方法

1.2.1 DNA MTase基因片段真核表达载体构建及测序鉴定 参见文献[4]。

1.2.2 细胞培养 SMMC-7721细胞在含10%小牛血清的1640培养基中,于37℃,5%CO_2,饱和湿度下培养。

1.2.3 正、反义重组质粒的转染(脂质体法) 在六孔板中分别接种7721、7721-S、7721-AS,细胞数为10^5/孔。待细胞生长至对数期,于转染前1 d换培养液。脂质体转染复合物的制备:5.2 μg重组质粒DNA溶于20 mmol/L Hepes(pH 7.4)中,终体积50 μl;30 μl脂质体溶于20 mmol/L Hepes(pH 7.4)中,终体积100 μl。将二者混匀,置室温下15 min。将转染复合物加入培养细胞中,混匀,培养6 h。加G418(400 μg/ml)筛选。每2~3 d换一次培养液,同时加G418,直到克隆形成。将单个细胞克隆株进行转移与扩增。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870344)
作者简介:张 宏(1967-),男,河南省新乡市人,硕士,主治医师,主要从事肝癌发病机制方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754128
通信作者:肖文华,电话:(010)66867672
收稿日期:2002-05-21;修回日期:2002-08-29

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

将转染正义表达载体(pCI-S)的 SMMC-7721 克隆细胞命名为 7721-S, 转染反义表达载体(pCI-AS)的 SMMC-7721 克隆细胞命名为 7721-AS, 未转染的 SMMC-7721 细胞命名为 7721。

1.2.4　重组载体转染细胞的鉴定　　采用 PCR 法扩增外源性 NeoR 基因。引物: 5′-CAA GAT GGA ATT GCA CGC AGG-3′(上游引物), 5′-CCC GCT CAG AAA GAA CTC GTC-3′(下游引物), 产物长度 790 bp。反应体系: ddH_2O 35.5 μl, 10× 反应缓冲液 5 μl, dNTP(10 mmol/L) 1 μl, 上游引物(0.1 μg/μl)2 μl, 下游引物(0.1 μg/μl)2 μl, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μl, Taq 酶(5 U/μl)0.5μl, 模板 DNA(0.1μg/μl)2 μl, 总体积 50 μl。反应条件 95 ℃, 2 min; 95℃, 50s。60 ℃, 1 min。72℃, 1 min。35 个循环; 72℃, 10 min。取 PCR 产物 5 μl 行 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 用 1× TAE 作为电泳缓冲液, 紫外灯下观察并拍照。

1.2.5　采用 RT-PCR 法检测内源性 DNA MTase 基因 mRNA　用 TriPure 提取剂提取总 RNA, 按说明操作。引物: GAPDH 基因外参照 5′- CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3′(上游引物), 5′-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC AC-3′(下游引物), 产物长度 598 bp; DNA MTase 基因 5′-ATG CCC GTA GCC CTG GAA ACA AAG-3′(上游引物), 5′-CCC CGG CAG CCA GAA AAC ACA TC-3′(下游引物), 产物长度 145 bp; 反应体系: ddH_2O 30 μl, AMV/Tfl5× 反应缓冲 10 μl, dNTP(10 mmol/L) 1 μl, 上游引物(0.1 μg/μl) 1 μl, 下游引物(0.1 μg/μl) 1 μl, 25 mmol/L $MgSO_4$ 2 μl, AMV 反转录酶(5 U/μl) 1 μl, TflDNA 多聚酶(5 U/μl) 1 μl, RNA 模板(0.1μg/μl)2μl, RNase 抑制剂(10 U/μl) 1 μl, 总体积 50 μl。反应条件 48 ℃, 45 min; 94℃, 2 min; 94 ℃, 30 s。56.4℃, 40 s。68 ℃, 60 s。35 个循环; 68 ℃, 7 min。产物 10 μl 行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 用 1× TAE 作为电泳缓冲液, 紫外灯下观察并拍照。

1.3　统计学分析

采用 *t* 检验。

2　结果

2.1　正、反义真核表达载体酶切鉴定和测序

参见文献[4]。

2.2　细胞转染鉴定

在 G418 筛选下, 转染后第 2 天 3 种细胞开始逐渐死亡, 第 2 周开始形成克隆集落。7721-AS 的培养板中形成的克隆少且小, 见图 1, 7721-S 培养板中形成的克隆多而大, 集落周围有散在细胞, 见图 2, 7721 一周内全部死亡, 见表 1。用特异引物扩增外源性 NeoR 基因, 7721-S 和 7721-AS 均出现 790bp 特异扩增条带, 而 7721 未出现条带, 表明 pCI-S 和 pCI-AS 均转染入细胞内, 见图 3。

表 1　各组转染细胞 G418 抗性细胞克隆形成数

Tab 1　Number of G418 resistant cell clones formed after transfection

Cell type	No. of cells	No. of transfection times			Rate of clone formation($\bar{x}\pm s$)
		1	2	3	
7721	10^5	0	0	0	0±0
7721-S	10^5	27	29	25	27±2**
7721-AS	10^5	14	17	19	17±3*△

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* group 7721; △: $P<0.05$ *vs* group 7721-S

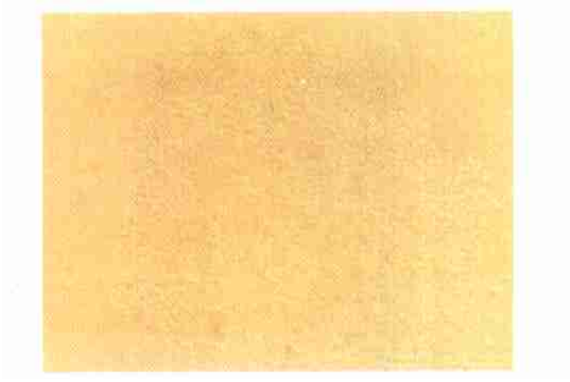


图 1　pCI-S 转染 SMMC-7721 细胞经 G418 筛选后形成的克隆　(倒置显微镜× 20)

Fig 1　7721-S clones screened by G418　(Inverted microscope× 20)

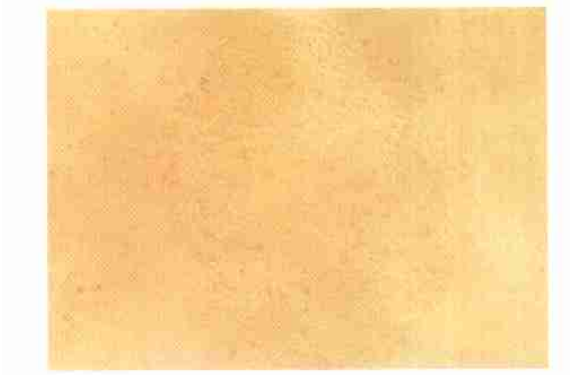
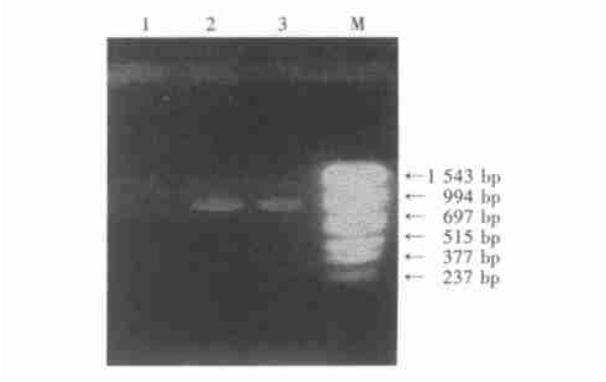


图 2　pCI-AS 转染 SMMC-7721 细胞经 G418 筛选后形成的克隆　(倒置显微镜× 20)

Fig 2　7721-AS clones screened by G418　(Inverted microscope× 20)



1: 7721 no PCR product; 2: 7721-S NeoR gene 790 bp; 3: 7721-AS NeoR gene 790 bp; M: PCR Marker

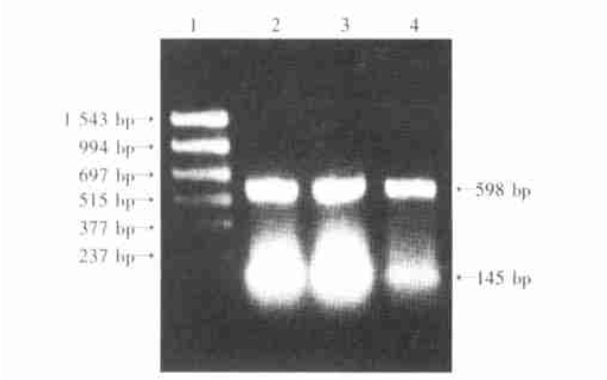
图 3　重组载体转染的鉴定

Fig 3　Identification of the recombinant vectors

2.3　DNA MTase 反义基因对内源性 DNA MTase 基因 mRNA 表达量的影响

以 GAPDH 为外参照, 采用 RT-PCR 方法扩增内源性 DNA MTase 基因, 7721-S 细胞扩增条带亮度较 7721 细胞无明显变化, 7721-AS 细胞较 7721 细胞亮度减低, 表明内源性 DNA MTase 基因 mRNA 表达量较 7721 细胞减少, 见图 4。

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



1: PCR Marker; 2: 7721; 3: 7721-S; 4: 7721-AS

图 4 pCI-AS 对内源性 DNA MTase 基因 mRNA 表达量的影响

Fig 4 Effect of pCI-AS on the expression of endogenous DNA MTase gene mRNA

3 讨论

研究证实 DNA 甲基化异常与癌形成和发展有关，其中一个重要方面是肿瘤抑制基因启动子区域因高甲基化而失活。大量的研究报道显示在多种癌组织和细胞系中 E-Cadherin 等抑癌基因因启动子区域高甲基化而表达减低或不表达[5~8]。所以如何阻抑肿瘤细胞中 DNA MTase 高表达成为人们研究的热点。

本研究采用反义技术[9,10]，将构建的 DNA MTase 正、反义基因片段真核表达载体用脂质体法转染肝癌细胞系 SMMC-7721，以正义表达载体作为阴性对照，观察内源性 DNA MTase 基因 mRNA 表达的变化。在 G418 的筛选下，7721-S、7721-AS 均形成细胞集落，表明转染成功。7721-AS 形成的细胞集落数量较 7721-S 少，提示 DNA MTase 反义基因可抑制转染克隆形成率。采用 RT-PCR 法检测内源性 DNA MTase 基因 mRNA，7721-AS 扩增条带亮度减低，说明表达减低。结果提示 DNA MTase 反义基因可抑制内源性 DNA MTase 基因 mRNA 表达。DNA MTase 基因 mRNA 表达减低可使 DNA MTase 表达下调，细胞甲基化能力减低，从而使肿瘤细胞中抑癌基因启动子区域去甲基化，抑癌基因的功能活性得到恢复，以此可达到抑制或逆转肝癌细胞恶性表的目的。目前国内外应用较多的 DNA MTase 抑制剂是 5-脱氧杂氮胞苷。它是一种核苷类似物，通过非竞争机制结合到 DNA MTase 与细胞 DNA 的结合位点上，使细胞在进一步复制时免受高甲基化的修饰，从而恢复多种基因的表达和活性。但 5-脱氧杂氮胞苷被认为是一种分化诱导剂，用来治疗白血病、镰刀型贫血病等，所以，其药理作用是多种的、复杂的，用它来研究 DNA 甲基化不严谨。反义技术是根据碱基互补原则，互补 DNA 或 RNA 可与基因组相应单链 mRNA 或双链 DNA 结合，形成部分双链分子或三链核酸，从而定向封闭靶基因，阻断相应基因的表达。本研究选择构建反义表达载体有能大量制备、表达时间长、特异性高的优点。研究结果对进一步认识 DNA MTase 在肝癌发生、发展中的作用和肝癌治疗提供了实验前提和依据。

参考文献：

[1] Simpson DJ, Hibberts NA, McNicol AM, *et al*. Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island [J]. Cancer Res, 2000, 60(5): 1 211—1 216.

[2] Fujimoto J, Yasui W, Tahara H, *et al*. DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis[J]. Cancer Lett, 2000, 149(1): 125—134.

[3] Lubomierski N, Kersting M, Bert T, *et al*. Tumor suppressor genes in the 9p21 gene cluster are selective targets of inactivation in neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors[J]. Cancer Res, 2001, 61(15): 5 905—5 910.

[4] 张 宏，肖文华，梁后杰. 正反义人 DNA(5-胞嘧啶)甲基转移酶基因片段真核表载体的构建[J]. 癌症，2001，20(11)：1 325—1 326.

[5] Si HX, Tsao SW, Lam KY, *et al*. E-cadherin expression is commonly downregulated by CpG island hypermethylation in esophageal carcinoma cells [J]. Cancer Lett, 2001, 173(1): 71—78.

[6] Nojima D, Nakajima K, Li LC, *et al*. CpG methylation of promoter region inactivates E-cadherin gene in renal cell carcinoma[J]. Mol Carcinog, 2001, 32(1): 19—27.

[7] Corn PG, Heath EI, Heitmiller R, *et al*. Frequent hypermethylation of the 5′ CpG island of E-cadherin in esophageal adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(9): 2 765—2 769.

[8] Nakayama S, Sasaki A, Mese H, *et al*. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas[J]. Int J Cancer, 2001, 93(5): 667—673.

[9] Pawlak W, Zolnierek J, Sarosiek T, *et al*. Antisense therapy in cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2000, 26(5): 333—350.

[10] Raizada MK, Francis SC, Wang H, *et al*. Targeting of the renin-angiotensin system by antisense gene therapy: a possible strategy for the long-term control of hypertension[J]. J Hypertens, 2000, 18(4): 353—362.

（编辑 张 宁）

（上接 1261 页）

一段形成。随着胚胎的发育，左颈总动脉和左锁骨下动脉之间的一段主动脉逐渐缩短，从而右锁骨下动脉的起点也随之移到主动脉弓上的左锁骨下动脉下方，成为主动脉弓上的第四个分支，经过食管的后方，越过中线到达右侧。有此变异的人早期可出现因气管和食管受压而产生的吞咽困难，刺激性干咳或声音嘶哑等症状。变异动脉由于受压可引起近端狭窄、闭塞缺血，可引发锁骨下动脉窃血症[2]。因该变异较为少见，在临床颈、胸、上肢等相关疾患的诊治中应予以高度重视，术前应做详尽的照影检查。手术分离时应特别注意迷走的右锁骨下动脉起始部和食管后部，因为该部术中剖露较为困难且动脉管壁较薄，易于损伤动脉而导致大出血。此外，在甲状腺手术中还应注意由于右喉下神经的位置较高，结扎甲状腺下动脉时应避免损伤。

关键词：锁骨下动脉；变异

中图法分类号：R322.121 文献标识码：B

参考文献：

[1] 边艳珠，廖 瑞，袁桂琴. 食管后锁骨下动脉 1 例[J]. 河北医科大学学报，1996，17(1)：20.

[2] 汪曾炜，刘维永，张宝仁. 手术学全集-心血管外科卷[M]. 北京：人民军医出版社，1995. 257.

（编辑 薛国文）

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