DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.006
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

文章编号:1000-5404(2002)11-1267-03

论著

人DNA MTase反义基因转染诱导E-Cadherin基因启动子区域去甲基化

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 E-Cadherin基因启动子区域甲基化状态的影响。方法 采用脂质体法将已构建的包含正、反义DNA MTase基因片段的真核表达载体转染入肝癌细胞系SMMC-7721;用甲基化特异的PCR法检测E-Cadherin基因启动子区域甲基化状态的改变。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;甲基化特异的PCR法检测显示转染反义DNA MTase基因片段的SMMC-7721细胞中的E-Cadherin基因启动子区域呈现去甲基化状态。结论 人DNA MTase反义基因片段可诱导E-Cadherin基因启动子区域去甲基化;实验结果有助于进一步了解DNA MTase在肝癌发展中的作用。

关键词:DNA甲基转移酶;DNA,反义;肝癌细胞系;E-Cadherin;去甲基化
中图法分类号:R394-33;R394.2;R735.7 文献标识码:A

Demethylation in the promoter region of E-Cadherin gene induced by the transfected human antisense DNA MTase gene

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 effects of the transfection of human antisense DNA MTase gene on the methylation status in the promoter region of E-Cadherin gene in 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 with liposome DOTAP and the methylation status of E-Cadherin gene in the promoter region was detected with methylation specific PCR(MSP). Results The constructed recombinant vectors were successfully transfected into SMMC-7721 cell line with liposome DOTAP affirmed by amplifying the ectogenetic NeoR gene with PCR. Demethylation with MSP was found in the promoter region of E-Cadherin gene of the SMMC-7721 cell line tranfected with antisense DNA MTase gene fragment. Conclusion Human antisense DNA MTase gene can induce demethylation in the promoter region of E-Cadherin gene, and maybe helpful for understanding the role of DNA MTase in the development of hepatocarcinoma.

Key words: DNA Methylatransferase; antisense DNA; carcinoma; hepatocelluar; cell line; E-Cadherin; demethylation

在肿瘤细胞中,DNA甲基化存在明显紊乱。其中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尤为明显。同时还发现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]。为探讨肝癌细胞中高甲基化与抑癌基因的关系,为肝癌基因治疗提供更多的实验依据,我们构建了正反义DNA MTase基因片段真核表达载体[4]。将其转染入肝癌细胞SMMC-7721中,对E-Cadherin基因启动子区域甲基化状态进行了检测。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、PCR产物纯化试剂盒、DOTAP脂质体、G418为Roche公司产品;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Gibco公司产品;RPMI1640、新生小牛血清为Hyclone公司产品。亚硫酸氢钠等试剂均为国产分析纯;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的构建及测序鉴定 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和鉴定 参见文献[5]。

1.2.4 采用甲基化特异的PCR法(MSP)检测E-Cadherin基因甲基化状态 7721、7721-S、7721-AS DNA提取采用TriPure提取剂,按说明书操作。引物设计、三组DNA的亚硫酸氢盐修饰、反应条件等参考文献[5]。野生型引物:5′-ACT CCA GGC TAG AGG GTC ACC GC-3′(上游引物),5′-TCC AAG GGC CCA TGG CTG GCC GGG GAC G-3′(下游引物);甲基化引物:5′-ATT TTA GGT TGA AGG GTT ATC GC-3′(上游引物),5′-TCC AAA AAC CCA TAA CTA ACC GAA AAC G-3′(下游引物);非甲基化引物:5′-ATT TTA GGT TAG AGG GTT ATT GT-3′(上游引

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,(010)66867672
收稿日期:2002-05-21;修回日期:2002-08-20

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

物), 5′—TCC AAA AAC CCA TAA CTA ACC AAA AAC A—3′(下游引物)。产物长度 316bp。

2 结果

2.1 正、反义真核表达载体酶切鉴定和测序

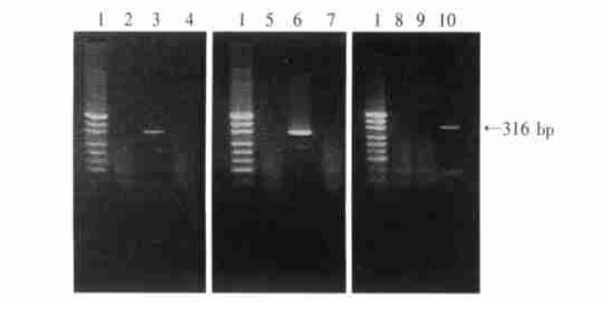
参见文献[4]。

2.2 细胞转染鉴定

参见文献[5]。

2.3 E-Cadherin 基因启动子区域甲基化状态检测

采用 MSP 检测 E-Cadherin 基因启动子区域甲基化状态, 作为空白对照和阴性对照的 7721 和 7721-S DNA 中 E-Cadherin 基因启动子区域用甲基化引物(Methglation-specific primers, M)扩增出 316 bp 产物, 而用野生型(Wild-type primers, W)和非甲基化引物(Unmethylation-specific primers, U)无扩增产物, 显示 7721 和 7721-S DNA 中 E-Cadherin 基因启动子区域呈现被甲基化状态。7721—AS DNA 中 E-Cadherin 基因启动子区域用非甲基化引物扩增出 316 bp 产物, 而用野生型和甲基化引物无扩增产物, 显示 7721—AS DNA 中 E-Cadherin 基因启动子区域去甲基化, 见图 1。



1: DNA Marker 501/498, 404, 331, 242, 190, 147, 111/110 bp; 2: 7721 W amplification; 3: 7721 M amplification 316 bp; 4: 7721 U amplification; 5: 7721-S W amplification; 6: 7721-S M amplication 316 bp; 7: 7721-S U amplification; 8: 7721-AS W amplification; 9: 7721-AS M amplification 316 bp; 10: 7721-AS U amplification 316 bp

图 1 MSP 检测 E-Cadherin 基因启动子区域甲基化状态

Fig 1 Analysis of the methylation status of E-Cadherin gene in the promoter region with MSP

3 讨论

DNA 甲基化在肿瘤形成和发展中起作用的假设已提出很多年。大量的研究也证实了这种假设。DNA 甲基化与癌关系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。由于抑癌基因的失活是肿瘤发生分子生物学机制中一个很重要的方面, 所以倍受人们重视。大量的研究报道显示, 在多种癌组织和细胞系中 E-Cadherin 基因因启动子区域高甲基化而出现表达减低或不表达[7~10]。例如, Nojima 等[8]研究了 34 例肾细胞癌标本和 5 种肾癌细胞系, 并与正常肾组织进行对比, 发现所有正常肾组织均表达 E-Cadherin 基因和蛋白, 67%的肾细胞癌组织标本不表达 E-Cadherin, 这些肾细胞癌组织 E-Cadherin 基因启动子区域呈现高甲基化。5 种肾癌细胞系均无 E-Cadherin mRNA 和蛋白表达, 其 E-Cadherin 基因启动子区域均显示高甲基化。提示 E-Cadherin 基因启动子区域高甲基化可使 E-Cadherin 基因表达减低或不表达。同时, 用 DNA MTase 抑制剂 5-脱氧杂氮胞苷处理高甲基化的细胞系, 可使 E-Cadherin 基因恢复表达。

在体外转染试验中启动子区域 DNA 甲基化能抑制多种类型基因的转录。这种方式的甲基化与基因的失活状态相关[11]。目前有 3 种可能的机制来解释 DNA 甲基化对转录的抑制: ①DNA 甲基化直接参与干扰特异转录因子与启动子上各自识别位点的结合。几种转录因子, 如 AP-2、c-Myc/Myn、CREB、E_2F、NF-κB 识别含有 CpG 残基的序列, 每一种因子的结合都可被甲基化抑制。②DNA 甲基化直接使特异的转录阻遏物与甲基化的 DNA 结合, MeCP-1 和 MeCP-2 已被确认可与基因序列中任何甲基化 CpG 残基结合。③DNA 甲基化可改变染色质结构。

E-Cadherin 是一种 120×10^3 的钙依赖性跨膜蛋白。它介导上皮细胞间的粘附, 在胚胎发育、细胞分化及细胞间信号传递中起重要作用。与肿瘤的分化状态和肿瘤转移潜能有关。其表达丧失会导致肿瘤细胞脱离癌灶, 启动转移和浸润。E-Cadherin 表达与肿瘤分级和淋巴结转移呈负相关。

如何抑制 DNA MTase 活性已成为肿瘤治疗研究的热点。5-脱氧杂氮胞苷有去甲基化作用, 但同时也有细胞毒性作用。本实验构建了反义 DNA MTase 基因片段真核表达载体。将其转染入肝癌 SMMC-7721 细胞系, 发现使 E-Cadherin 基因启动子区域去甲基化。其机制可能是转录的反义 DNA MTase 基因片段阻抑了内源性 DNA MTase 基因的表达, 使细胞的甲基化能力减弱, 近而使 E-Cadherin 基因启动子区域去甲基化。构建反义载体的方法具有表达时间长、细胞毒性小等优点, 为找到一种新的 DNA MTase 抑制剂提供了实验依据。这些结果也有助于进一步了解 DNA MTase 在肝癌发展中的作用。

参考文献:

[1] Simpson D J, Hibberts N A, McNicol A M, *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] 张 宏, 肖文华, 梁后杰, 等. 人 DNA MTase 反义基因转染对肝癌细胞 DNA MTase 基因 mRNA 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(11): 1 264—1 266.

[6] 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 U S A, 1996, 93(18): 9821—9826.

[7] Si H X, Tsao S W, Lam K Y, *et al*. E-cadherin expression is commonly

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

downregulated by CpG island hypermethylation in esophageal carcinoma cells [J]. Cancer Lett, 2001, 173(1): 71—78.
[8] Nojima D, Nakajima K, Li L C, *et al*. CpG methylation of promoter region inactivates E-cadherin gene in renal cell carcinoma[J]. Mol Carcinog, 2001, 32(1): 19—27.
[9] Corn P G, Heath E I, 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.
[10] 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.
[11] Baylin S B, Herman J G, Graff J R, *et al*. Alterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia[J]. Adv Cancer Res, 1998, 72: 141—196.

（编辑　张　宁）

文章编号：1000-5404(2002)11-1269-01

个案与短篇

上颌骨巨大软骨肉瘤 1 例

A case report of huge chondrosarcoma in maxllia

张志轩，张哉根　　（第三军医大学附属新桥医院病理科，重庆 400037）

软骨肉瘤多发生在骨盆、肋骨、肩胛骨等处，发生在颌骨的巨大软骨肉瘤罕见。我院于 2000 年收治 1 例，现报告如下。

1　临床资料

患者女，29 岁，右颜面部肿块伴疼痛及颜面部畸形 6 个月。患者于 1994 年 10 月行第四腰椎低分化软骨肉瘤切除术，1996 年复发再次手术，1998 年 4 月行颅内软骨肉瘤切除术，分别于 1998 年 8 月、1998 年 12 月、1999 年 1 月复发并治疗。检查颜面部肿块大小 12.0 cm× 10.0 cm× 8.0 cm，活动性差，质硬伴触痛，全身多处切口疤痕，双下肢截瘫。X 线片：右颧骨、额骨及右眼眶骨质破坏，显示不清。CT：右颧骨额部有一 8.2 cm× 9.3 cm 大小软组织肿块，其内有大面积斑片状钙化，右侧脑室前脚受压，脑组织稍向外膨出。病理检查：巨检：部分颌骨及肿瘤组织多块，重 370.0 g，大者体积：9.0 cm× 8.5 cm× 8.5 cm，上颌骨附带牙齿 5 枚，肿瘤组织切面灰白、灰红色，质中，有砂砾感。

镜检：肿瘤组织由肿瘤性软骨细胞及软骨基质构成，一部分呈小叶状结构，瘤细胞体积较大，核圆、卵圆形或星状，陷窝清楚，另一部分瘤细胞弥漫分布，血窦结构丰富，瘤细胞呈圆形或卵圆形，胞浆少，核大，染色深，核分裂相易见，见图 1，可见多核及瘤巨细胞，并有坏死。该病变与 1994 年腰椎肿瘤组织结构相似。病理诊断：（右）上颌骨低分化软骨肉瘤。

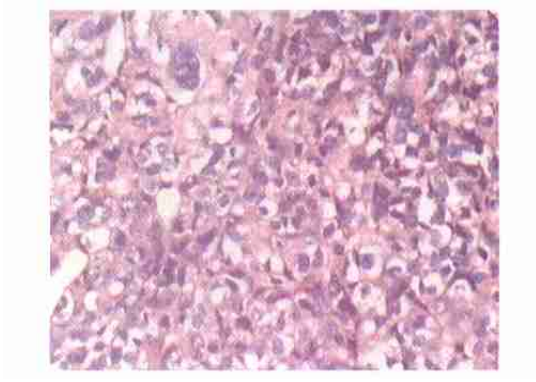


图 1　肿瘤细胞密集，异型性明显　（HE× 400）

2　讨论

软骨肉瘤按其发生可分为原发性与继发性，按部位可分为中心型、周围型及骨膜型，按组织学又分为普通型、透明细胞型、间叶型、粘液样型及去分化型。本例为多部位、反复发生的、低分化软骨肉瘤，肿瘤体积巨大，实属罕见。

软骨肉瘤的治疗，中心型以手术彻底切除为主，放、化疗效果均不理想，中心型的预后主要取决于两个因素：即组织学分级和切除边界是否充分[1]。据文献报告普通型软骨肉瘤大多生长缓慢，5 年生存率为 41%～76%，10 年生存率 35%～49%。本例普通型软骨肉瘤位于脊椎骨与颜面骨，故在手术上相对较难以彻底切除，在历经 6 年中多次复发。本例 1994 年初发于脊椎骨，1998 年出现于颅骨，2000 年又发生上颌骨软骨肉瘤是否为多原发或是肿瘤本身的转移较难判断，因为软骨肉瘤最常见的远处转移部位是肺，其次为肝、肾和脑，但还有 18%病例有骨的转移[2]。

关键词：上颌骨；软骨肉瘤
中图法分类号：R739.82　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 徐万鹏，冯传汉. 骨科肿瘤学[M]. 北京：人民军医出版社，2001. 209—219.
[2] 刘彤华，李维华. 诊断病理学[M]. 北京：人民卫生出版社，1994. 803.

（编辑　薛国文）

作者简介：张志轩（1977—），男，吉林省桦甸市人，学员。电话：（023）68755641
收稿日期：2001-10-06；修回日期：2002-03-09

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