DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.002
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

文章编号:1000-5404(2001)03-0251-03

论著

去甲二氢愈创木酸对恶性胶质瘤细胞基因组甲基化水平的影响及其意义

姚 莉,卞修武,张树辉,陈自强 (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 探讨去甲二氢愈创木酸(NDGA)诱导人恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞分化过程中基因组甲基化状态改变及其意义。方法 合成甲基化敏感性AP-PCR引物,用AP-PCR方法检测SHG-44细胞基因组甲基化状态,观察NDGA诱导该细胞分化过程中甲基化水平的变化。结果 对照组基因组DNA经*Msp*Ⅰ酶解后AP-PCR扩增片段比*Hpa*Ⅱ酶解后的扩增片段小,几乎未见存留大片段,至少有3个片段与*Hpa*Ⅱ酶解片段不同。同一时相点*Hpa*Ⅱ酶解后扩增产物相比,NDGA处理后基因组DNA *Msp*Ⅰ酶解后的扩增产物量较少、条带较多,且随时相点延长产物量逐渐增加,条带增多。结论 NDGA诱导人恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞分化过程中基因组甲基化状态增高,推测基因组甲基化状态可能是NDGA诱导胶质瘤细胞分化的作用靶点之一。

关键词:去甲二氢愈创木酸;胶质瘤;基因甲基化;甲基化敏感性AP-PCR
中图法分类号:R730.264;R977.3 文献标识码:A

Effects of nordihydroguaiaretic acid on genomic methylation pattern of malignant glioma cells and its significance

YAO Li, BIAN Xiu-wu, ZHANG Shu-hui, CHEN Zi-qiang (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the genomic methylation pattern of a malignant glioma cell line in the process of differentiation induced by nordihydroguaiaretic acid (NDGA). **Methods** Methylation-sensitive arbitrarily primed PCR was used to study the genomic methylation changes. **Results** Fragments of genomic DNA of PCR products in control groups digested with *Msp*Ⅰ were smaller than those with *Hpa*Ⅱ. No large fragment could be identified and at least three fragments of different sizes were demonstrated in the control group. In NDGA treatment group, comparing *Msp*Ⅰ digestion with *Hpa*Ⅱ digestion, the amount of PCR products was smaller with more DNA bands. The amount of PCR products in NDGA treatment group was increased with more DNA bands compared with that in the control groups. **Conclusion** The genomic methylation level in SHG-44 cells was increased by NDGA in the differentiation process of SHG-44 cells. It suggests that genomic methylation pattern may be one of the targets for glioma cell differentiation induced by NDGA.

Key words: nordihydroguaiaretic acid; glioma; genomic methylation; methylation-sensitive arbitrarily primed PCR

细胞基因组及特定基因甲基化状态的异常与肿瘤发生有密切关系。由于DNA甲基化状态可被逆转,因此针对基因甲基化的靶向治疗成为肿瘤研究的又一热点[1]。去甲二氢愈创木酸(Nordihydroguaiaretic acid, NDGA)是从常青灌木 *Larrea divaricata* 和 *Guaiacum officinale* 中提取的一种天然成份,我室既往研究表明,NDGA在诱导胶质瘤细胞分化时胶质纤维酸性蛋白(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)基因表达增高[2],其机制是否与影响胶质瘤细胞基因组甲基化状态有关尚未见报道。因此,本实验采用甲基化敏感性随机引物多聚酶链式反应(Arbitrarily primed polymerase chain reaction, AP-PCR)方法,对NDGA诱导人恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞分化过程中基因组甲基化状态进行研究,旨在探讨NDGA诱导恶性胶质瘤细胞分化的分子机制,为NDGA的临床应用提供实验依据。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970268)
作者简介:姚 莉(1971—),女,山西省垣曲县人,硕士,讲师,主要从事肿瘤诱导分化方面的研究,发表论文6篇,现在北京军医学院病理学教研室,北京 100071。电话:(010)66947710
通信作者:卞修武(E-mail:bianxiuwu@263.net)
收稿日期:2000-10-18;修回日期:2001-01-09

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 肿瘤细胞 人脑恶性胶质瘤细胞系SHG—44细胞引自苏州医学院附属二院脑肿瘤研究室。

1.1.2 试剂 NDGA的来源和溶液配制参照文献[2]。*Hpa*Ⅱ限制性内切酶为Boehringer Mannheim公司产品,*Msp*Ⅰ限制性内切酶为华美生物工程公司产品,Taq聚合酶为加拿大Sangon公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人脑恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞按常规方法培养,细胞用RPMI 1640完全培养基,置37 ℃、5% CO_2 孵箱(相对湿度为95%)中培养。用于实验的细胞分为对照组、NDGA处理组(终浓度为100 μmol/L)分设为12、24、48 h 3个时相点。收集每组、每个时相点的培养细胞,提取基因组DNA并分以下3个组进行酶解和PCR扩增。用于甲基化敏感性AP-PCR扩增的基因组DNA分3组:①未行酶解组;②*Hpa*Ⅱ酶解组;③*Msp*Ⅰ酶解组。

1.2.2 甲基化敏感性AP-PCR扩增 每组、每个时相点的培养细胞用0.25%胰蛋白酶消化将约含5×10^7的细胞悬液移入10 ml离心管,按常规方法加入DNA裂解缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 100 mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 20 μg/ml RNase,

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

100 μg/ml 蛋白酶 K)消化,饱和酚∶氯仿∶异戊醇(25∶24∶1)抽提基因组 DNA,紫外分光光度计定量后-20 ℃冻存备用。

甲基化敏感性 AP-PCR 引物序列为 5'-AAC CCT CAC CCT AAC CCC GG-3'[3],引物由上海基康生物技术有限公司合成。25 μl 反应体系含 10× Buffer 2.5 μl,2.5 mmol/L Mg^{2+},100 μmol/L dNTP,Taq 聚合酶 1 U,基因组 DNA 200 ng。扩增条件:低严谨条件下,94 ℃变性 30 s,40 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 90 s,共 5 个循环;严谨条件下,94 ℃变性 15 s,55 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 60 s,共 30 个循环;最后一个循环后 72 ℃延伸 5 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖(含 0.5 μg EB)电泳,100 V 电压 1.5 h,紫外灯下观察、照像。

1.2.3 结果判定 根据扩增谱带的位置和荧光强度,比较瘤细胞基因组 DNA 经不同酶酶解后甲基化敏感性 AP-PCR 甲基化状态。NDGA 处理组与对照组相比,条带增加、荧光强度增强为甲基化水平增高,反之为甲基化水平降低。

2 结果

NDGA 处理后各时相点 SHG-44 细胞的基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳显示各时相点基因组 DNA 主要集中在加样孔附近。各组基因组 DNA 经 *Msp* Ⅰ 或 *Hpa* Ⅱ 酶解后琼脂糖凝胶电泳显示各组样品均出一条平坦而宽度相当的条带。各组 SHG-44 细胞基因组 DNA 经 *Msp* Ⅰ、*Hpa* Ⅱ 酶解后 AP-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图 1、2。

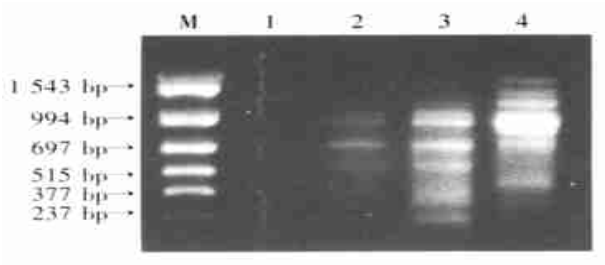


图 1 各组 SHG-44 细胞基因组 DNA 经 *Msp* Ⅰ 酶解后 AP-PCR 扩增结果

Fig 1 Results of amplication with AP-PCR after *Msp* Ⅰ digestion of genomic DNA in SHG-44 cells

M: Marker; 1: Control; 2: 12 h after NDGA treatment; 3: 24 h after NDGA treatment; 4: 48 h after NDGA treatment

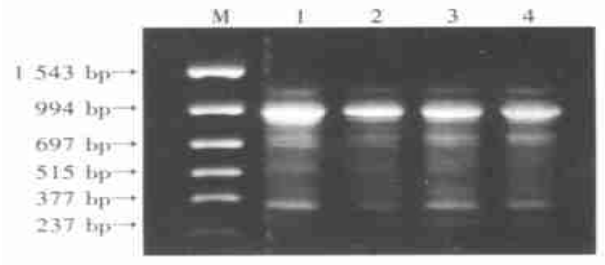


图 2 各组 SHG-44 细胞基因组 DNA 经 *Hpa* Ⅱ 酶解后 AP-PCR 扩增结果

Fig 2 Results of amplication with AP-PCR after *Hap* Ⅱ digestion of genomic DNA in SHG-44 cells

M: Marker; 1: Control; 2: 12 h after NDGA treatment; 3: 24 h after NDGA treatment; 4: 48 h after NDGA treatment

Msp Ⅰ 酶解 AP-PCR 扩增产物,在 12 h 与对照组相比产物量明显增加,条带增加,约 994 bp 处、697 bp 处可见清晰条带;在 24 h 产物量明显高于 12 h;在 48 h 扩增产量明显高于 24 h,在 994 bp 处及其上方可见 4 条清晰条带。说明 NDGA 处理后可使 SHG-44 细胞基因组 DNA 的甲基化水平提高。*Hpa* Ⅱ 酶解基因组 DNA 甲基化敏感性 AP-PCR 扩增产物在各组各时相点间无显著差异。

经 *Msp* Ⅰ 酶解后 AP-PCR 扩增片段与 *Hpa* Ⅱ 酶解后的扩增片段相比:对照组 *Msp* Ⅰ 酶解产物较小,几乎未见存留大片段,至少有 3 个片段与 *Hpa* Ⅱ 酶解 AP-PCR 扩增片段不同。NDGA 处理后 *Msp* Ⅰ 酶解 AP-PCR 扩增产物与 *Hpa* Ⅱ 酶解后的产物相比,在 12 h 扩增产物量明显减少、条带增多,在 697 bp 处可见一清晰条带;在 24 h AP-PCR 扩增产物量明显减少、条带增多,在约 697 bp 处、697~515 bp 间可见清晰条带;NDGA 处理后 48 h AP-PCR 扩增产物增加、条带增多,在约 1 543 bp 处及其上方、515~377 bp 可见清晰条带。

3 讨论

DNA 甲基化是指 DNA 在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNA-MTase)的催化下,以 S-腺苷酸-L-甲硫氨酸(SAM)为甲基供体,将甲基转移到特定碱基上的过程。其主要形式为 5-甲基胞嘧啶(5 ^{m}C)。真核细胞中 5 ^{m}C 主要出现在 5'-CpG-3' 序列。DNA 甲基化在胚胎发育、X 染色体失活、基因组印迹和细胞衰老等过程中起重要作用。在基因组功能上,DNA 甲基化在基因表达的调控、基因结构的稳定、重复结构及插入结构的封闭等方面有重要作用,从而对细胞的生物学特性产生重要影响,但确切机制尚未阐明[4]。

许多研究显示,肿瘤细胞或组织中存在普遍低甲基化现象。Soares 等[5]研究发现乳腺癌基因组低甲基化与肿瘤的分期、大小、组织学分级、转移和预后显著相关。还有一些研究发现胃癌、膀胱癌和肝癌等也存在基因组 DNA 普遍低甲基化[6~8]。目前认为,肿瘤发生中基因组低甲基化的机制可能与去甲基化酶的作用有关。Cervoni 等[8]研究发现,哺乳动物细胞内确实存在一种去甲基化酶,它不破坏 DNA 就能将 DNA 链上的甲基脱去。比较研究发现,去甲基化的启动序列是特异的,一旦去甲基化酶被启动(激活),它将沿着 DNA 链以 250 bp 的高速度顺式作用于 CpG 岛,导致基因组去甲基化。普遍低甲基化中常有卫星 DNA 低甲基化,引起染色质结构和数量的异常,由于连接在着丝粒周异染色质的一些蛋白对其靶序列甲基化状态的异常非常敏感,导致染色质结构不稳,引起细胞恶性转化[9]。

有关恶性胶质瘤细胞基因组 DNA 甲基化状态的研究尚少,作为来源于中国人恶性胶质瘤的细胞系 SHG-44 基因组甲基化状态的研究尚未见报道。本研究发现,对照组 SHG-44 细胞基因组 DNA 经 *Msp* Ⅰ 酶解后 AP-PCR 扩增片段比 *Hpa* Ⅱ 酶解后 AP-PCR 扩增

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

片段更小，几乎未见存留大片段，至少有 3 个片段与 *Hpa* Ⅱ 酶解 *AP-PCR* 扩增片段不同。与同一时相点 *Hpa* Ⅱ酶解后 AP-PCR 扩增产物相比，NDGA 处理后细胞基因组 DNA *Msp* Ⅰ 酶解后的扩增产物量较少、条带较多。处理组各时相点 *Msp* Ⅰ 酶解 AP-PCR 扩增产物与对照组相比随时相点延长产物量逐渐增加，条带增多。表明NDGA 诱导胶质瘤细胞的分化过程中，胶质瘤细胞基因组 DNA 甲基化水平随着 NDGA 作用时间的延长而逐渐增高，此时细胞出现分化表型，进一步证实人恶性胶质瘤细胞系SHG-44细胞基因组 DNA 甲基化水平与肿瘤细胞的分化程度相关，而 NDGA 对恶性胶质瘤细胞基因组 DNA 甲基化具有促进作用。

甲基化敏感性AP-PCR 法是 Gonzalgo 等[3] 建立的检测基因组 DNA 甲基化状态的方法，其基本原理是：*Hpa* Ⅱ、*Msp* Ⅰ 均为甲基化敏感性限制性内切酶，它们都能识别 CCGG 序列，但有一定差异。而 MLG2 引物（单引物）的3' 末端与 *Hpa* Ⅱ 和 *Msp* Ⅰ 识别序列互补。若 *Msp* Ⅰ 酶解的 DNA 片段经 PCR 扩增无扩增产物出现，则说明酶解片段中包含一个或更多的 CCGG 位点，因为 *Msp* Ⅰ 可以切割它所识别的 CCGG 位点，从而阻止 DNA 扩增。该方法将限制性内切酶酶解和 AP-PCR 联合应用可检测发生在基因组 DNA 中多个 CCGG 位点的甲基化改变。本实验证实它是一种测定基因组甲基化改变的简易、快捷的方法，它勿需事先明确与甲基化改变相关的基因序列，所需待测基因量少。另外，此技术也可应用于不同细胞株间或肿瘤组织与正常组织间甲基化水平的比较性研究。

参考文献：

[1] Bovenzi V, Le N L, Cote S, *et al*. DNA methylation of retinoic acid receptor beta in breast cancer and possible therapeutic role of 5-aza-2′-deoxycytidine[J]. Anticancer Drugs, 1999, 10(5): 471—476.
[2] 卞修武，史景泉，辛 榕，等. 去甲二氢愈创木酸对人恶性胶质瘤细胞系 SHG-44 生长和分化的影响[J]. 中华病理学杂志，1997, 26(5): 285—288.
[3] Gonzalgo M L, Liang G, Spruck C H, *et al*. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR[J]. Cancer Res, 1997, 57(4): 594—599.
[4] Robertson K D, Jones P A. DNA methylation: past, present and future directions[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(3): 461—467.
[5] Soares J, Pinto A E, Cunha C V, *et al*. Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression[J]. Cancer, 1999, 85(1): 112—118.
[6] Cravo M, Pinto R, Fidalgo P, *et al*. Global DNA hypomethylation occurs in the early stages of intestinal type gastric carcinoma[J]. Gut, 1996, 39(3): 434—438.
[7] Schulz W A. DNA methylation in urological malignancies (Review)[J]. Int J Oncol, 1998, 13(1): 151—167.
[8] Cervoni N, Bhattacharya S, Szyf M. DNA demethylase is a processive enzyme[J]. J Biol Chem, 1999, 274(13): 8 363—8 366.
[9] Qu G, Dubeau L, Narayan A, *et al*. Satellite DNA hypomethylation *vs*. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential[J]. Mutat Res, 1999, 423(1-2): 91—101.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2001)03-0253-01

经验与短篇

右前外侧开胸心脏不停跳体外循环手术的配合

The cooperation of cardiac operation through right anterio-lateral thoracic incision on beating heart

刘冬梅，周 莉 （第三军医大学附属新桥医院手术室，重庆 400037）

随着心脏外科技术的日臻成熟和美容的要求，我院采用右胸前外侧小切口实施心内直视手术 27 例，现报道手术配合如下。

1 临床资料及术前准备

一般资料：1998 年 3 月至 5 月，我院采用该方法治疗 27 例患者，男 16 例，女 11 例，年龄 1.8～42 岁（平均 11.9 岁），27 例中先天性心脏病房间隔缺损 4 例，部分型房室管畸形 1 例，膜部室间隔缺损 9 例，嵴内型缺损 3 例，干下型室缺 4 例，双腔右心室 1 例，风湿性心脏病二尖瓣狭窄伴关闭不全 2 例，其中 1 例有左房血栓，主动脉瓣狭窄伴关闭不全 3 例。

术前准备：①器械及药品准备。常规心内直视手术器械和药品。②其它：根据需要备好缝线，合适的气囊尿管、一次性流筒、微量输液泵、避光空针，鲁米那套线器及合适的体位垫等。

手术方法及配合：全麻插管后，行股静脉穿刺置管，建立中心静脉监测系统，以便术中中心静脉监测及输液输血。同时行桡动脉穿刺，以便术中监测桡动脉压及术前术后血气检测。导尿，放置体温传感器于鼻咽部和肛门内。病人左侧 45°卧位后，常规消毒铺巾，皮肤切口自胸骨缘，沿肋间方向后缘至腋前线。女性病人切口绕过乳房下缘，儿童为 8～10 cm，成人为 10～12 cm。第 4 肋间入胸，将肺向后牵引，撑开肋 骨。沿膈神经前 2 cm 切开心包，上达主动脉-心包返折处，下至膈肌，丝线悬吊心包，肝素化后即行主动脉插管，上腔插管，转流后，插左房引流管，上下腔套带。降温至 34 ℃左右勒紧上下腔静脉套带。除主动脉置换术者，不阻断主动脉，在浅低温、心脏不停跳下行心内直视手术。直接缝闭房缺 3 例，自体心包修补房缺 1 例。二尖瓣成形并用自体心包补片原发孔房缺1例。经右心房切

作者简介：刘冬梅(1970—)，女，重庆市永川人，护师。电话：(023)65207513
收稿日期：2000-11-25；修回日期：2001-02-05

（下转 256 页）

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