DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.007
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

文章编号:1000-5404(2000)11-1033-03

论著

5-脱氧杂氮胞苷诱导肝癌细胞株p16基因高表达

刘丽华[1],肖文华[1],刘为纹[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]肿瘤科;[2]消化内科;重庆 400038)

提 要:目的 研究5-脱氧杂氮胞苷对肝癌细胞株p16基因表达的影响及其机制。方法 肝癌细胞株SMMC-7221、$HePG_2$用5-脱氧杂氮胞苷处理,处理前后采用RT-PCR和免疫组织化学染色法观察和分析其mRNA和蛋白表达变化。结果 经5-脱氧杂氮胞苷处理的肝癌细胞株mRNA和蛋白表达均明显增强。结论 5-脱氧杂氮胞苷可使p16基因在转录水平和翻译水平表达增高,其机制可能是通过去甲基化使p16基因表达恢复。

关键词:肝癌细胞株;p16基因;甲基化;5-脱氧杂氮胞苷
中图法分类号:R394.2;R735.702 文献标识码:A

Over-expression of p16 gene induced by 5-Aza-cdR in hepatocellular carcinoma cell lines

LIU Li-hua, XIAO Wen-hua, LIU Wei-wen (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of 5-Aza-cdR on p16 expression in hepatocellular carcinoma cell lines. Methods The expressions of p16 mRNA and protein in hepatocellular carcinoma cell SMMC-7721 and $HePG_2$ before and after the treatment of 5-Aza-cdR were analyzed with reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical methods. Results The expressions of p16 mRNA and protein after 5-Aza-cdR treatment were increased distinctively. Conclusion 5-Aza-cdR can elevate the transcription and translation levels of p16 gene probably by its demethylation restoring p16 expression.

Key words: hepatocellular carcinoma cell line; p16 gene; methylation; 5-Aza-2'-deoxycytidine

肝细胞癌是人类肿瘤中最常见的恶性肿瘤之一,尽管其发生的确切机制尚不明确,但与其相关的一系列基因改变正逐渐被人们所认识[1],其中,细胞周期调控基因p16抑癌基因与肝癌的发生发展密切相关[2]。p16基因失活的一重要原因是其启动子区域异常甲基化[2,3],目前在人类许多肿瘤中都存在p16基因高甲基化而致表达缺失或下降[3,4]。但是,到目前为止,就p16基因甲基化与肝细胞癌相关性的报道甚少,且存在分歧。本实验用甲基转移酶抑制剂5-脱氧杂氮胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-cdR)处理肝癌细胞株,对比分析处理前后其mRNA、蛋白的表达变化,以初步了解肝癌细胞株中p16基因甲基化情况。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人肝癌细胞株SMMC-7721、$HePG_2$来源于本院消化内科实验室,培养于含10%小牛血清,100 U/ml青霉素,100 U/ml链霉素的RPMI-1640培养液中,培养条件为37 ℃,饱和湿度,5%CO_2。

1.2 5-脱氧杂氮胞苷处理

两细胞株按3×10^5个/瓶接种,24 h后,用5×10^{-7}mol/L的5-脱氧杂氮胞苷(Sigma公司)处理,24 h后弃去药液,换新鲜培养液,继续培养9 d,然后用Tripure提取液(Bochringer Mannheim公司)提取RNA。未用药物处理的细胞做为对照。

1.3 RT-PCR

RT-PCR采用一步一管法(Acces RT-PCR system, Promega公司)。p16引物用于扩增位于外显子2基因片段,引物(上海生物工程公司合成,PAG纯化)为P1:5'-AGCCTTCGGCTGACTGGCTGG-3',P2:5'-CTGCCCATCATCATGACCTGGA-3';扩增片段长度为428 bp。反应体系为:总体积25 μl,dNTP 0.2 mmol/L,上下游引物各1 mmol/L,$MgSO_4$ 1 mmol/L,AMV逆转录酶0.1 U/ml,Tf1DNA聚合酶0.1 U/ml,10×反应缓冲液2.5 μl,RNA模板100 ng,扩增条件为94 ℃,2 min→

作者简介:刘丽华(1968—),女,甘肃省兰州市人,硕士研究生,主治医师,主要从事消化系肿瘤方面的研究,现在兰州军区总医院消化内科,兰州 730050。电话:(0911)75243

收稿日期:2000-02-10;修回日期:2000-07-18

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

94 ℃, 30 s; 60 ℃, 45 s; 68 ℃, 90 s; 40 cycles→68 ℃, 7 min。取3μl扩增产物行2%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并拍照。

1.4 免疫组织化学染色

药理处理前后的肝癌细胞SMMC-7721、$HePG_2$按1×10^6个/孔接种于6孔培养板,接种前孔底置10 mm×10 mm盖玻片,24 h后细胞爬行,伸延,捞出玻片,4%多聚甲醛室温下固定30 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,每次3 min,3%过氧化氢甲醇液室温下10 min,以阻断内源性氧化物酶,正常羊血清1∶10稀释后封闭30 min,加p16小鼠抗人多克隆抗体(中山公司)(即用型),37 ℃孵育1 h;1∶100生物素化羊抗小鼠IgG血清及1∶100 SABC试剂(中山公司)均孵育1 h,DAB显色10 min。设有阴性、阳性对照。光镜下观察p16表达的变化,同时进行图像分析。采用德国Leica MD20真彩色图像分析仪进行细胞染色强度的半定量分析。每张随机取5个视野,共分析124个细胞,求平均积分光密度(IOD),以$\bar{x}\pm s$表示。

1.5 统计学处理

采用t检验。

2 结果

2.1 5-脱氧杂氮胞苷对p16 mRNA表达的影响

SMMC-7721和$HePG_2$细胞经5-脱氧杂氮胞苷处理后p16 mRNA表达增多,见图1。

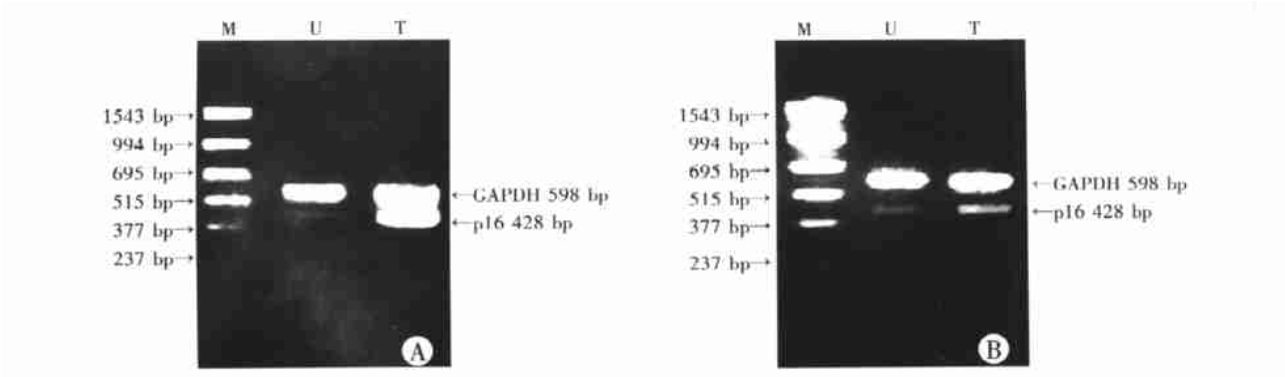


图1 5-脱氧杂氮胞苷处理前后 **SMMC-7721**和 **$HePG_2$**细胞 **p16 mRNA**表达变化

Fig 1 Alteration of p16 mRNA expression in SMMC-7721 and $HePG_2$ cell line after treatment with 5-Azc-cdR

M: PCR Marker; U: Untreated; T: Treated; A: SMMC-7721; B: $HePG_2$

2.2 5-脱氧杂氮胞苷对P16蛋白表达的影响

经药物处理的细胞,胞核显示明显的黄褐色染色,而未经药物处理的细胞则呈阴性或淡染,见图2。图像分析半定量结果为:SMMC-7721和$HePG_2$两株肝癌细胞经5-Azc-cdR处理后,其IOD值分别为582.34±46.23和495.89±52.12,与未处理组(172.3±35.19,212.81±62.56)比较差异显著($P<0.05$)。

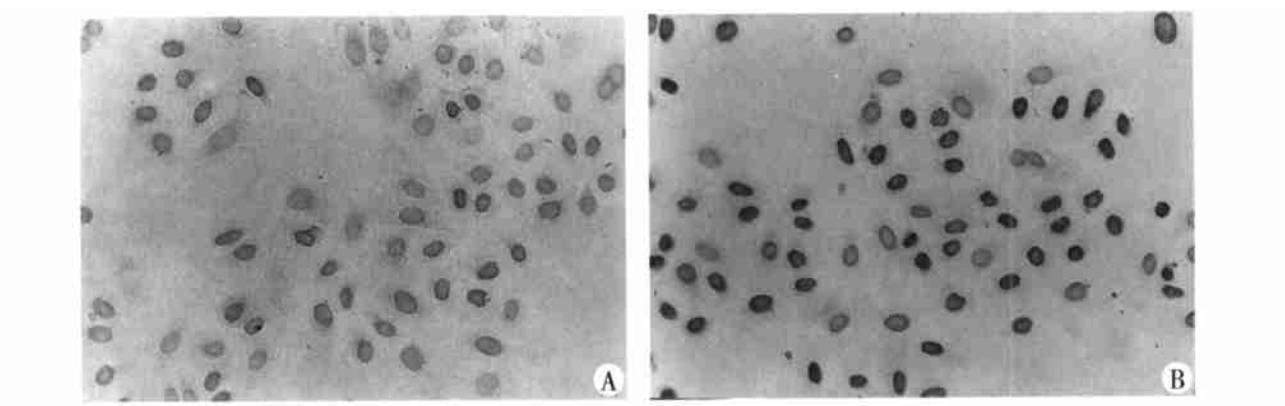


图2 5-脱氧杂氮胞苷处理前、后 **$HePG_2$ p16**蛋白表达 (SABC× 200)

Fig 2 Expression of p16 protein in $HePG_2$ cell line after treated with 5-Azc-cdR (SABC× 200)

A: Untreated; B: Treated

3 讨论

肝细胞癌是世界范围内常见的恶性肿瘤之一,其发生过程与多种抑癌基因异常有关[1]。p16基因异常改变作为恶性肿瘤的一种发病机制受到愈来愈多的研究者重视,目前研究发现5′-CpG区甲基化所引起的

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

p16 基因失活是人类肿瘤中最频繁发生的基因改变。国内外对 p16 基因在肝癌中的表达及基因改变研究甚少。Sun 等[6] 发现原发性肝细胞癌和肝癌细胞系中普遍存在甲基转移酶明显增高, 但未对其相关基因的甲基化状态进行分析。Wong 等[7] 研究发现原发性肝细胞癌中 p16 基因呈高甲基化。Hui 等[8] 在研究中发现 6 个肝癌细胞系中只有一个 p16 mRNA 未表达, 在排除了突变与杂合缺后, 推测与甲基化异常相关, 而其余 5 个细胞系有不同程度的 p16 mRNA 表达。Heish 等[9] 研究进一步证实基因转录抑制与基因启动子区域 CpG 甲基化的密度相关, 低密度的 CpG 岛甲基化只能使 67%到 90%的转录被抑制, 只有 CpG 岛呈高度的甲基化修饰时, 才表现为基因转录的完全抑制。然而, 这种抑制作用是可逆的, 已有大量实验研究证明甲基转移酶抑制剂 5-脱氧杂氮胞苷通过 DNA 去甲基化机制可以恢复多种抑癌基因的表达。

本实验中 SMMC-7721、$HePG_2$ 两肝癌细胞系中都存在 p16 mRNA 和蛋白微弱表达, 但是经甲基转移酶抑制剂 5-脱氧杂氮胞处理后, p16 mRNA 和蛋白表达水平均明显增强, 说明 5-Azc-cdR 可明显诱导 p16 基因高表达。由于 5-Azc-cdR 的特殊作用机制-DNA 去甲基化作用, 本研究提示: SMMC-7721 和 $HePG_2$ 肝癌细胞株可能存在 p16 基因 CpG 岛部分甲基化, 经 5-Azc-cdR 处理后, p16 基因进一步去甲基化, 其转录和蛋白表达也明显增强。p16 基因编码的 P16 蛋白属于细胞周期依赖性激酶的抑制蛋白, 调节 G_1/S 期细胞的转化, 因此, 我们认为 p16 的复活可能会引起这两株肝癌细胞的生长行为发生改变; 5-Azc-cdR 有可能在未来肝癌的治疗中发挥较大的作用。

参考文献:

[1] 肖文华, 刘为纹, 吕有勇, 等. 肝细胞癌多种抑制癌基因失活机制的研究[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(2): 324—327.

[2] Chaubert P, Gayer R, Zimmermann A, *et al*. Germ-line mutation of the $p16^{INK4}$(MTSI) gene occur in a subset of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 1997, 25(3): 1 376—1 381.

[3] Liew C T, Li H M, Lo K W, *et al*. High frequency of $p16^{INK4}$ gene alteration in hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 1999, 18(2): 789—795.

[4] Costello J F, Berger M S, Huang H T, *et al*. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation[J]. Cancer Res, 1996, 56(4): 2 405—2 410.

[5] Herman J G, Merlo A, Mao L, *et al*. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrent DNA methylation in all common human cancers[J]. Cancer Res, 1995, 55(1): 4 525—4 530.

[6] Sun L, Yae A M H, Sakamoto K M, *et al*. Increased DNA methyltransferase expression is associated with an early stage of human hepatocarcinogenesis[J]. Jpn J Cancer Res, 1997, 88(3): 1 165—1 170.

[7] Wong I H, Lo Y M, Zhang J, *et al*. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients[J]. Cancer Res, 1999, 59(1): 71—73.

[8] Hui A M, Sakamoto M, Kanai Y, *et al*. Inactivation of p16 INK4 in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 1996, 24(2): 575—579.

[9] Heish C L. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density[J]. Mol Cell Biol, 1994, 14(7): 5 487—5 494.

[10] Bachman K E, Herman J G, Corn P G, *et al*. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggests a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers[J]. Cancer Res, 1999, 59(2): 798—802.

(编辑　王　红)

(上接 1032 页)

确定为 α_1-ACT 杂合缺失; 哮喘组 α_1-ACT 杂合缺失频率为 4.4%, 比健康儿童对照组(0)及成人对照组(0.5%)明显增高($P<0.05$)。哮喘组 α_1-ACT 杂合缺失的基因频率为 0.022, 成人对照组 α_1-ACT 杂合缺失的基因频率为 0.003, 哮喘组较成人对照组增高($P<0.05$)。

α_1-ACT 表型分析: 在蛋白水平存在遗传多态性。

基因分析: 未发现 Bonn-1 和 Bochum-1 变异体。

临床资料分析: α_1-ACT 杂合缺失患者哮喘初发年龄早, 哮喘住院次数多; RAST 阳性率显著增高。

3　讨论

以上结果提示 α_1-ACT 杂合缺失增加了儿童患哮喘的危险性, 并在一定程度上影响儿童哮喘的严重性, 血浆 α_1-ACT 检测可望为儿童哮喘临床治疗提供一项有价值指标。α_1-ACT 遗传多态性的发现提示 α_1-ACT 有希望成为新的遗传标记。虽然 Bonn-1 和 Bochum-1 变异体与所研究的 90 例汉族儿童哮喘发病无关, 但由测定血浆含量确定的 α_1-ACT 杂合缺失与该基因分析的不平行现象提示可能存在本筛查范围外的基因突变, 这为进一步研究 α_1-ACT 与疾病的相互关系拓宽了视野。

关键词: 儿童哮喘; α_1-抗糜蛋白酶; 遗传
中图法分类号: R562.250.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Lindmark B, Svenonius E, Eriksson S. Heterozygous α1-antichymotrypsin and PiZ α1-antitrypsin deficiency, Prevalence and clinical spectrum in asthmatic children[J]. Allergy, 1990, 45(3): 197—203.

[2] 尹晓娟, 李为明. α_1-抗糜蛋白酶的研究进展[J]. 四川医学, 1999, 20(3): 281—283.

[3] 全国儿科哮喘协作组. 儿童哮喘诊断标准和治疗常规[J]. 中华儿科杂志, 1993, 31(3): 222—224.

(编辑　陈聪连)

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