

5-Aza-CdR对肝癌细胞DAPK基因甲基化的影响

毛良勤¹, 刘颖春¹, 谢海¹, 仇小强², 余红平¹, 李孟英³ (1. 广西医科大学公共卫生学院流行病学教研室, 南宁, 530021; 2. 桂林医学院, 南宁, 530021; 3. 解放军第303医院, 南宁, 530021)

摘要: 目的 探讨去甲基化药物5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)对人肝癌细胞株SMMC-7721中死亡相关蛋白激酶(DAPK)基因启动子CpG岛甲基化的影响。方法 不同浓度(0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 、50.0 $\mu\text{mol/L}$) 5-Aza-CdR处理人肝癌细胞株SMMC-7721 72小时后, 用焦磷酸测序法检测处理前后DAPK基因启动子CpG岛甲基化水平。以未经处理的人肝癌细胞株SMMC-7721作为对照组。结果 未经5-Aza-CdR处理的肝癌细胞SMMC-7721细胞株DAPK基因启动子高度甲基化, 平均水平为76.71%。经3种不同浓度药物处理72小时后, 各组间甲基化平均水平分别为78.29%、77.57%和66.00%, 各组间甲基化水平差异均有统计学意义($F = 39.71$, $P < 0.01$)。其中, 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组细胞甲基化水平最低, 与其他各组差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 SMMC-7721细胞株DAPK基因启动子区呈高度甲基化状态; 5-Aza-CdR能够逆转人肝癌细胞SMMC-7721 DAPK基因启动子区域的甲基化状态。
关键词: 肝肿瘤; 蛋白激酶类; DNA甲基化; 焦磷酸测序; 脱氧胞苷

Effect of 5-Aza-CdR on methylation and expression of DAPK gene in hepatocellular carcinoma cell line
MAO Liang-qin¹, LIU Ying-chun¹, XIE Hai¹, QIU Xiao-qiang², YU Hong-ping¹, LI Meng-ying³ (1. Department of Epidemiology and Statistics, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guilin Medical College, Guilin 541004, China; 3. The 303 Hospital of PLA, Nanning 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on the level of promoter methylation in human hepatoma cell line SMMC-7721 cells. **Methods** Human hepatoma cell line SMMC-7721 cells were treated with different concentrations (0.5 $\mu\text{mol/L}$, 5.0 $\mu\text{mol/L}$, 50.0 $\mu\text{mol/L}$) of 5-Aza-CdR for 72 hours, with the untreated human hepatoma cell line SMMC-7721 cells as control group. The application of pyrosequencing was used to detect the average level of promoter methylation. **Results** DAPK gene promoter was highly methylated in human hepatoma cell line SMMC-7721 cells, with the average methylation level as 76.71%. When the cells were treated with different concentrations (0.5 $\mu\text{mol/L}$, 5.0 $\mu\text{mol/L}$, 50.0 $\mu\text{mol/L}$) of 5-Aza-CdR for 72 hours, the average methylation level of DAPK gene for each treatment group was 78.29%, 77.57% and 66.00%, respectively, and statistically significant difference was found among different treatment groups ($F = 39.71$, $P < 0.01$). The average methylation level of DAPK gene in the 50.0 $\mu\text{mol/L}$ treatment group was lowest, compared with other groups ($P < 0.01$). **Conclusions** 5-Aza-CdR can reverse the status of DAPK gene promoter methylation and induce the mRNA expression of DAPK in SMMC-7721 cells.

Key words: Liver neoplasms; Protein kinases; DNA methylation; Pyrosequencing; Deoxycytidine

肝癌是威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 尽管早期肝癌治疗有了很大的进步, 但其5年生存率并

无明显提高^[1]。肝癌的发生发展与抑癌基因的异常改变密切相关, 而近年来的研究表明, 基因启动子CPG岛甲基化是抑癌基因表达下调甚至失活

的一个重要机制。死亡相关蛋白激酶基因（death-associated protein kinase, DAPK）位于人染色体9P34.1, 是新近发现的一种抑癌基因, 可促进肿瘤细胞的分化并抑制肿瘤的转移, 参与细胞凋亡^[2]。5-氮杂-2'-脱氧胞苷（5-Aza-2'-deoxy-cytidine, 5-Aza-CdR）是一种甲基化转移酶抑制剂, 其可以通过逆转抑癌基因甲基化状态诱导基因重新表达, 从而恢复抑癌基因抑癌作用^[3]。本研究通过检测人肝癌细胞株SMMC-7721DAPK基因在5-Aza-CdR干预前后甲基化状态, 为探索肝癌的发生发展机制及治疗方法提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂和仪器 人肝癌细胞株SMMC-7721来源于广西医科大学中心实验室; 5-Aza-CdR（编号: A3656-5mg）购自美国Sigma公司; RPMI1640培养基购自美国Gibco公司; 小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 5-Aza-CdR和溶剂二甲基亚砷 DMSO购自美国Sigma公司; 焦磷酸测序及测序前PCR引物均由上海生工生物工程有限公司合成; AxyPrep 基因组DNA小量制备试剂盒购自北京益奥柏科贸有限公司; DNA重亚硫酸盐处理试剂盒EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit、焦磷酸测序分析中优化的模板DNA的PCR扩增试剂盒PyroMark PCR Kit和焦磷酸测序试剂盒PyroMark Gold Q96 SQA Reagents均购自德国Qiagen公司。12孔、96孔无菌培养板购自广州洁特生物过滤制品有限公司。主要仪器有: 超净工作台、电子天平、低速离心机、0.22微米微型过滤器、梯度PCR仪、电泳仪、移液器、4℃、-20℃及-80℃冰箱、凝胶成像分析仪Alphamager 2200、二氧化碳恒温培养箱、荧光倒置显微镜、台式高速低温离心机、600型三用水浴箱、恒温烤箱、NanoDrop超微量高精度紫外/可见分光光度计、PyroMark




Q96 MD焦磷酸测序仪。


1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物处理 配制含10%小牛血清、100 U/ml青霉素及100 U/ml链霉素的RPMI 1640培养液。用PBS溶解药物5-Aza-CdR, 配制含5-Aza-CdR浓度分别0.5 μmol/L、5.0 μmol/L、50.0 μmol/L的3种RPMI 1640培养液, 将分别培养于该3种含不同浓度药物5-Aza-CdR的RPMI 1640培养液的肝癌SMMC-7721细胞作为实验组。将同期置于不含5-Aza-CdR的RPMI 1640培养液并在5% CO₂、37℃饱和温度和湿度条件下培养的SMMC-7721细胞作为对照组。

1.2.2 焦磷酸测序法检测5-Aza-CdR处理前后肝癌SMMC-7721细胞株DAPK基因启动子区甲基化水平 取对照组和药物处理72小时后的各组细胞, 用AxyPrep 基因组DNA小量制备试剂盒提取肝癌细胞基因组DNA, 紫外分光光度仪检测DNA浓度及纯度。每份标本取0.4 μg DNA, 采用德国Qiagen公司的试剂盒EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit进行重亚硫酸盐处理。采用PyroMark Assay design 2.0针对DAPK基因启动子CpG岛设计PCR引物和测序引物, 设计结果见表1。依照德国Qiagen公司的焦磷酸测序前PCR试剂盒PyroMark PCR Kit说明书进行PCR扩增。反应体系均为: mix 12.5 μl, 去离子水6 μl, 上游引物2 μl, 下游引物2 μl, Coral Load Concentrate 2.5 μl, 共25 μl。反应条件95℃预变性15分钟; 94℃变性30秒, 56℃退火30秒, 72℃延伸30秒, 循环45次后, 72℃延伸10分钟, 4℃暂时保存。取5 μl PCR扩增产物, 2%琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统摄像并分析观察结果。依照焦磷酸测序试剂盒PyroMark Gold Q96 SQA Reagents说明书, 在焦磷酸测序仪PyroMark Q96 MD上运用CpG甲基化分析软件PyroMark CpG

表 1 DAPK启动子甲基化焦磷酸测序引物设计结果

引物	ID	序列	Nt	Tm, °C	%GC
 PCR	F1	5' -GGATATGGGATTTTGTGTAGATTAGTA-3'	28	59.6	32.1
 PCR	R1	5' -ACCAAAATAATCTCCATCTCTTAAC-3'	25	58.1	32.0
 测序	S1	5' -TTTTAGTGGTTATTTTAAAAAG-3'	24	42.7	16.7

注:  表示下游引物5' -端添加生物素, 扩增产物长度200 bp, 由上海生工生物有限公司合成

Assays对PCR扩增产物进行测序。

1.3 统计学处理 实验数据采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用随机区组设计方差分析分析不同实验组细胞DAPK基因启动子甲基化水平。数据统一采用SPSS 18.0统计软件包进行统计分析, 所有统计学检验均为双侧检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

不同浓度5-Aza-CdR对肝癌SMMC-7721细胞株DAPK基因启动子区甲基化水平的影响, 成功对DNA进行重亚硫酸处理并进行PCR, 电泳结果见图1。对各组细胞DNA中的DAPK基因启动子CpG岛甲基化状态重复测序3次, 结果显示肝癌细胞DAPK基因启动子区7个相邻的CpG位点高度甲基化, 见图2。经3种不同浓度 (0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 、50.0 $\mu\text{mol/L}$) 去甲基化药物5-Aza-CdR处理72小时后, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组和5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组甲基化频率无明显变化, 而50.0 $\mu\text{mol/L}$ 组甲基化频率明显低于对照组, 见图3、4、5。经随机区组设计方差分析得出组间差异有统计学意义 ($F = 39.71$, $P < 0.01$)。经两两比较发现, 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 组DAPK基因启动子CpG岛甲基化频率与其他组均有差异且差异有统计学意义 (P 均=0.000)。0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组及对照组中, 任意两组间DAPK基因启动子CpG岛甲基化频率差异均无统计学意义, $P > 0.05$, 见图6及表2。

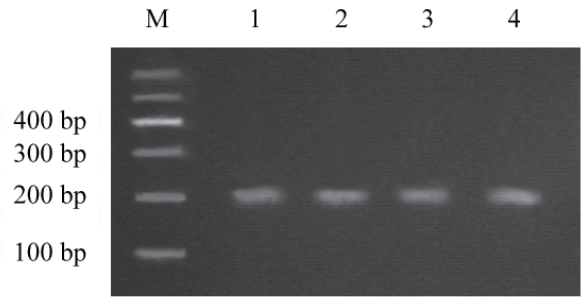


图 1 基因组DNA重亚硫酸盐转化后扩增电泳图

注: M为100 bp Marker; 1为对照组; 2为0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3为5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; 4为50.0 $\mu\text{mol/L}$ 组

表 2 不同浓度5-Aza-CdR处理组及对照组DAPK基因启动子甲基化频率

分组	甲基化频率 ($\bar{x} \pm s$, %)
0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	78.29 \pm 6.9
5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	77.57 \pm 6.4
50.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	66.00 \pm 6.0 ^a
对照组	76.71 \pm 7.7

注: 经随机区组设计方差分析, 组间 $F = 39.71$, $P = 0.000$, ^a与其他组两两比较 $P < 0.05$

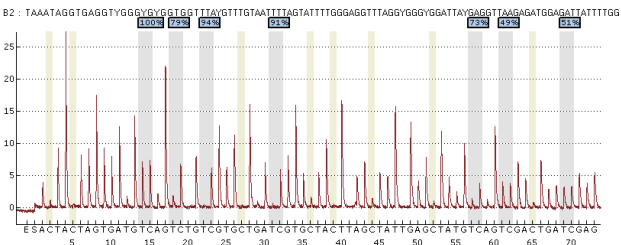


图 2 对照组DAPK基因启动子甲基化频率

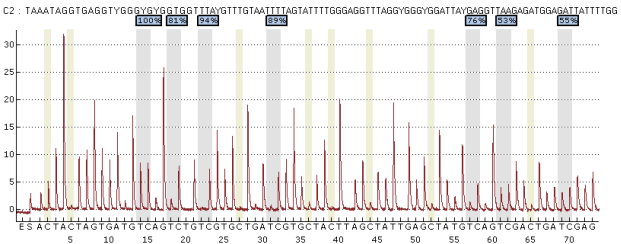


图 3 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组5-Aza-CdR处理组DAPK基因启动子甲基化频率

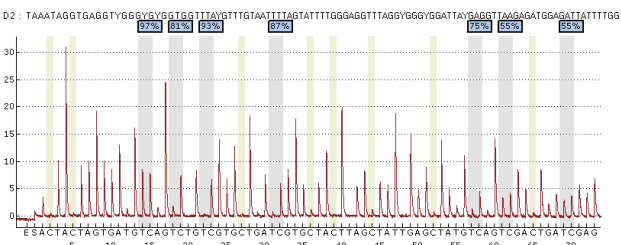


图 4 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组5-Aza-CdR处理组DAPK基因启动子甲基化频率

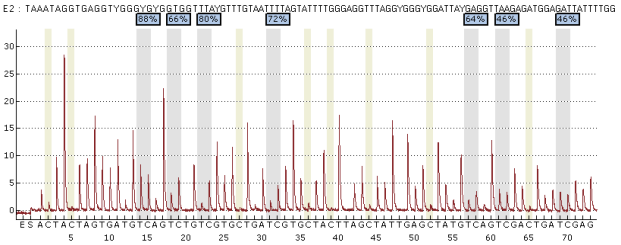


图 5 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 组5-Aza-CdR处理组DAPK基因启动子甲基化频率

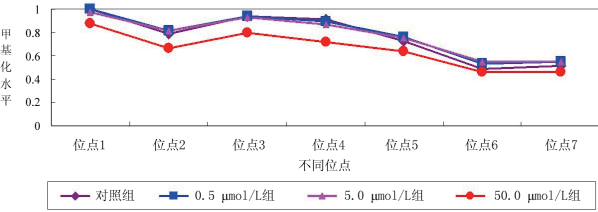


图 6 不同浓度5-Aza-CdR处理组及对照组DAPK基因启动子组基因甲基化频率

3 讨论

DNA甲基化是以S-腺苷-L-甲硫氨酸为甲基供体,在DNA甲基化转移酶的作用下,将甲基转移到胞嘧啶的5位碳原子上生成5-甲基胞嘧啶的过程,其特征是不改变遗传密码和DNA序列且具有可逆性,在基因转录过程中扮有重要角色^[4]。基因启动子区的CpG岛一般在正常状态下为非甲基化,当其发生甲基化时,常导致基因转录沉寂,使肿瘤相关基因如抑癌基因、DNA修复基因等丧失功能^[5]。越来越多的证据显示,DNA甲基化是一个早期的分子事件,其可能加速肿瘤的进展^[6]。因DNA甲基化而导致失活的基因对甲基化抑制剂非常敏感,易重新活化。目前研究较多的甲基化抑制剂为胞苷类似物5-Aza-CdR,其作用机制是与DNA甲基转移酶共价结合,通过降低DNA甲基转移酶的生物活性,逆转抑癌基因启动子的甲基化状态,使不同的抑癌基因得以开放,进而有效地抑制肿瘤的发展^[7]。

DAPK是钙调蛋白调节的丝氨酸/苏氨酸激酶,是肿瘤细胞凋亡的正性调节因子,与肿瘤的发生、发展和转移密切相关^[8]。已有研究^[9-18]报道在胃癌、膀胱癌、宫颈癌、口腔鳞状细胞癌、乳腺癌、前列腺癌、食管癌、肝癌等各种恶性肿瘤均发现DAPK基因CPG岛存在不同程度的异常甲基化,其中5-Aza-CdR可使人胃癌、膀胱癌、宫颈癌等细胞株细胞甲基化的DAPK基因去除甲基化修饰,重新表达或表达上调,同时细胞增殖受到抑制。笔者在前期研究中发现,肝癌SMMC-7721细胞中DAPK基因mRNA表达水平很弱,5-Aza-CdR可诱导该细胞DAPK mRNA表达^[19],且5-Aza-CdR对肝癌SMMC-7721细胞的增殖存在明显抑制作用。本研究结果显示,肝癌细胞SMMC-7721经5-Aza-CdR处理前,DAPK基因启动子区CPG的7个位点均有不同程度甲基化。经药物处理后,DAPK基因的启动子区域高甲基化状态得到逆转。结合笔者前期研究的结果^[19],提示DAPK基因mRNA表达下调可能由于DAPK基因的启动子区域高甲基化所致,DAPK基因mRNA的表达上调可能是5-Aza-

CdR抑制肝癌细胞SMMC-7721增殖的重要原因。

5-Aza-CdR可在一定程度上逆转SMMC-7721细胞DAPK基因启动子的甲基化状态,使DAPK基因被重新激活,其转录活性得到恢复,从而发挥抑制肝癌细胞增殖和促进肝癌细胞凋亡的作用。

综上所述,肝癌细胞DAPK基因mRNA表达失活与该基因的启动子区域高甲基化有关。5-Aza-CdR可以通过逆转肝癌细胞SMMC-7721 DAPK基因启动子区域高甲基化状态来恢复其mRNA表达,从而恢复肿瘤抑制功能。针对DNA甲基转移酶活性和DNA甲基化模式改变探索肿瘤防治策略已成为一种新的思路^[1]。本研究为肝癌的发生发展机制和临床治疗提供了一种新的理论依据,该领域值得进一步研究。

参考文献

- [1] 王勇,狄镇海. 肝癌DNA甲基化的研究进展[J]. 医学综述,2011,17:3404-3406.
- [2] Bialik S, Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond[J]. Annu Rev Biochem,2006,75:189-210.
- [3] Laird PW, Jaenisch R. DNA methylation and cancer[J]. Human Molecular Genetics. 1994,3:1487-1495.
- [4] Patra SK, Patra A, Rizzi F, et al. Demethylation of (Cytosine-5-C-methyl) DNA and regulation of transcription in the epigenetic pathways of cancer development[J]. Cancer Metastasis Rev,2008,27:315-334.
- [5] 张丽丽,吴建新. DNA甲基化-肿瘤产生的一种表观遗传学机制[J]. 遗传,2006,28:880-885.
- [6] 何丽霞,季文樾,杨静. 喉癌组织中CHFR基因mRNA表达水平及启动子区甲基化的研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2010,24:673-677.
- [7] 位玲霞,张师前. 5-氮-2-脱氧胞苷对人卵巢癌细胞RUNX3基因启动子区甲基化状态的影响[J]. 中华临床医师杂志,2009,3:362-369.
- [8] Raveh T, Kimchi A. DAP kinase-a proapoptotic gene that functions as a tumor suppressor[J]. Exp Cell Res,2001,264:185-192.
- [9] 王贺玲,张健,李岩,等. 5-Aza-CdR对胃癌细胞系BGC823生长及DAPK1基因甲基化的影响[J]. 山东医药,2007,47:27-29.
- [10] 徐宁儒,刘春晓,郑少波. 5-杂氮脱氧胞苷逆转膀胱癌T24细胞死亡相关蛋白激酶的转录表达[J]. 南方医科大学学报,2009,29:1882-1886.
- [11] 党艳丽,马晓旗,毕红梅. 5-氮胞苷对宫颈癌细胞系DAPK1异常甲基化的影响[J]. 西安交通大学学报,2005,26:48-51.
- [12] 李春艳,高文信,周延民. 口腔鳞状细胞癌组织中死亡相关蛋白激酶的甲基化及其蛋白的表达[J]. 吉林大学学报,2009,35:341-344.
- [13] 唐纪全,王川,傅芳萌,等. DAPK1基因启动子甲基化与

- 乳腺癌临床病理特征的关系[J]. 国际病理科学与临床杂志,2010,30:277-281.
- [14] 何晶晶,毛易捷,许刚,等. 前列腺癌组织中GSTP1和DAPK基因异常甲基化检测及临床意义[J]. 实用医学杂志,2009,25:1362-1364.
- [15] Brabender J, Arbab D, Huan X, et al. Death-associated protein kinase (DAPK) promoter methylation and response to neoadjuvant radiochem- otherapy in esophageal cancer[J]. Ann Surg Oncol,2009,16:1378-1383.
- [16] 钱波,朱立新,耿小平,等. 原发性肝癌 MGMT、DAPK、THBS1 和 RIZ1 基因甲基化研究[J]. 中华普通外科杂志,2005,20:291-294.
- [17] 申健,张越,肖伟凡,等. 5-Aza-CdR对膀胱癌细胞生长及hsa-miR-203表达的影响[J]. 中国细胞生物学学报,2011,33:766-771.
- [18] 于月成,吴维光. 5-脱氧杂氮胞苷调控p16基因表达对人宫颈癌HeLa细胞增殖及调亡的影响[J]. 西北国防医学杂志,2012,33:110-113.
- [19] 谢海,仇小强,余红平,等. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对人肝癌细胞株SMMC-7721增殖及DAPK mRNA表达的影响[J]. 广西医科大学学报,2012,29:13-16.

收稿日期: 2012-11-02

• 消息 •

医学论文写作中的注意事项

论文的写作前言主要概述研究的背景、目的、研究思路、理论依据等。有些研究还说明该研究开始的具体时间。前言必须开门见山、简要、清楚、切忌套话、空话、牵涉面过宽、详述历史过程或复习文献过多等。不要涉及本研究中的数据或结论。不要与摘要雷同。未经检索,前言中不可写“国内外未曾报道”等字样,也不可自我评价达到“XX水平”或“填补XX空白”等。前言通常不需要标题。论著文稿的前言一般不超过250字;比较短的论文可以只用小段文字起前言作用。

方法主要介绍对象(人或实验动物,包括对照组)的选择及其基本情况,以及研究所采用的方法及观察指标。常用标题有“材料与方法”、“对象与方法”、“资料与方法”等。

临床研究需交代病例和对照者的来源、选择标准及研究对象的年龄、性别和其他重要特征等,并应注明参与研究者是否知情同意。临床随机对照组研究应交代干预方法的设计(随机方法)和所采用的盲法。实验研究需注明动物的名称、种系、等级、数量、来源、性别、年龄、体重、饲养条件和健康状况等。

个人创造的方法应详细说明“方法”的细节,以备他人重复。改进的方法详述改进之处,并以引用文献的方式给出原方法出处。原封不动使用他人方法,应以引用文献的方式给出方法的出处,无需展开描述。

药品、试剂应使用化学名,并注明剂量、单位、纯度、批号、生产单位和生产时间。仪器、设备应注明名称、型号、规格、生产单位、精密度或误差范围。无须描述其工作原理。

统计学处理项应说明统计分析方法及其选择依据。

结果的叙述应客观真实、简洁明了、重点突出、层次分明、合乎逻辑,不应与讨论内容混淆。若文稿设有图表,则正文不需重述其全数据,只需摘述其主要发现或数据。若使用文字描述,内容冗长繁锁不易读懂,则应改用图或表来表达数据,以收到一目了然的效果。应认真核对正文和图表的数据,达到准确、统一。统计学分析应交代统计方法、统计值,仅有P值不能体现重要的定量信息。

讨论应着重讨论研究中的新发现及从中得出的结论,包括发现的意义及其限度,以及对进一步研究的启示。若不能导出结论,也可以进行必要的讨论,提示建议、设想、改进的意见或待解决的问题。应将研究结果与其他有关的研究相联系,并将本研究的结论与目的相关联。不必重述已在前言和结果部分详述过的数据或资料。不要过多罗列文献。避免做不成熟的主观推断。讨论中一般不应设置图或表。

本刊编辑部