

肝癌细胞p15基因CpG岛甲基化研究

王松¹, 许诚¹, 舒丹¹, 何清¹, 叶涛生¹, 李丽雄¹, 周陶友², 陈守春³ (1. 深圳市东湖医院, 深圳 518020; 2. 四川大学华西医院, 成都 610041; 3. 成都地奥制药集团, 成都 610041)

摘要: 目的 通过检测肝癌细胞株HepG2的抑癌基因p15基因启动子区CpG岛的甲基化状态, 探讨其与肿瘤发生的可能相关性。方法 应用甲基化特异性PCR (MSP) 技术, 对人肝癌细胞株HepG2的p15基因启动子区域CpG岛的甲基化状态进行检测, 以人淋巴瘤细胞株Raji为阳性对照, 以正常人外周血单核细胞 (PBMC) 和肝细胞为阴性对照。结果 肝癌细胞HepG2中p15基因启动子区域CpG岛甲基化和非甲基化检测均呈阳性, 正常人外周血单核细胞和肝细胞甲基化检测阴性。结论 肝癌细胞株HepG2抑癌基因p15基因CpG岛存在高度甲基化, 可能与肝癌的发生相关。

关键词: 肝癌; DNA甲基化; p15基因

Study on p15 gene methylation status of CpG island in hepatocellular carcinomas

WANG Song¹, XU Cheng¹, SHU Dan¹, HE Qing¹, YE Tao-sheng¹, LI Li-xiong¹, Zhou Tao-you², CHEN Shou-chun³ (1. Shenzhen Donghu Hospital, Shenzhen 518020, China; 2. Huaxi Hospital affiliated to Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Diaoyao Group, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To investigate methylation status of CpG island on p15 gene promoter domain and its relationship with hepatocellular carcinoma. **Methods** Methylation status of CpG island on p15 gene promoter domain in HepG2 cells was detected by methylation specific PCR and Raji cells were taken for positive control while normal PBMC and hepatocytes as negative control. **Results** Both methylation and non-methylation status of CpG island on p15 gene promoter domain in HepG2 cells were detected, but methylation in negative controls were not detected. **Conclusions** Methylation status of CpG island on p15 gene promoter domain exist in HepG2 cells which may associate with hepatocellular carcinoma.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; DNA methylation; p15 gene

原发性肝癌为消化道常见恶性肿瘤之一, 死亡率仅次于胃癌和食管癌, 其发病机制与多种基因的异常表达有关。研究表明, 原发性肝癌中普遍存在DNA甲基化失衡现象^[1-3], 包括抑癌基因p15。正常p15基因具有细胞周期调控作用, 当其启动子区域CpG岛高度甲基化后, 经一系列复杂生理过程最终调控肿瘤相关基因的表达。为了解人肝癌细胞株的p15基因CpG岛是否发生甲基化, 本研究采用甲基化特异性聚合酶链反应 (methylation-specific PCR, MSP) 技术, 检测HepG2细胞p15基因启动子区的甲基化状态, 探讨HepG2细胞作为去甲基化抗肿瘤药物筛选模型的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料 Wizard DNA Purify System 购自美国Promega公司; Taq DNA聚合酶、DNA分子量Marker和pMD18-T载体购自TaKaRa公司; 少量组织/细胞基因组DNA快速抽提纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; DNA胶回收纯化试剂盒购自Omega公司; 引物合成和DNA测序由上海生物工程有限公司完成。

人肝癌细胞株HepG2为本研究室保存; 人Burkitt淋巴瘤Raji细胞株由上海药物研究所惠赠; 所有细胞均使用含有10%灭活小牛血清的RPMI 1640培养基, 置37℃、5% CO₂、95%相对湿度环境中培养, 每2~3天换液1次。

基金项目: 深圳市卫生科技计划 (200404159)

通讯作者: 周陶友 Email: marshelzty@sina.com

1.2 方法

1.2.1 细胞基因组 DNA 的提取 收集处于指数生长期的 HepG2 和 Raji 细胞, 正常肝组织取自非肿瘤患者肝穿刺标本, 采用小量组织/细胞基因组 DNA 快速抽提纯化试剂盒提取细胞基因组 DNA。正常人外周血单核细胞(PBMC)取自于外周静脉血, 于 2000 转/分钟离心 10 分钟分离血细胞, 然后采用小量血液基因组 DNA 快速抽提纯化试剂盒抽提 DNA。

1.2.2 亚硫酸氢盐化学修饰基因组 DNA 基本原理是利用高浓度亚硫酸氢钠将基因组 DNA 链上的胞嘧啶(C)转变成尿嘧啶(U), 若 C 被甲基化时则不能被转化。取 50 μ l 基因组 DNA (约 1 μ g), 加入 NaOH (终浓度 0.2 mol/L), 37℃ 变性 10 分钟, 后加入 10 mmol/L 氢醌 30 μ l 和 3 mmol/L 亚硫酸氢钠 (pH 5.0) 520 μ l, 混匀离心后后覆盖 200 μ l 石蜡油, 50℃ 避光孵育 16~20 小时。修饰后的 DNA 用 Wizard DNA clean-up System 纯化除去游离的亚硫酸氢钠, 再加入 NaOH (终浓度 0.3 mol/L), 37℃ 孵育 15 分钟, 经 3 mol/L 醋酸氨中和后, 以无水乙醇沉淀并回收 DNA。将 DNA 溶解于 50 μ l TE 溶液中, -80℃ 贮存备用。

1.2.3 甲基化特异性 PCR (MSP) 扩增 参照相关文献, 设计并合成 2 对引物 (表 1), 分别用于扩增 p15 基因甲基化序列 (p15-M) 和非甲基化序列 (p15-U)。采用 50 μ l PCR 反应体系, 取 50 ng 基因组 DNA 或经亚硫酸氢钠修饰的 DNA 作为模板, dNTP 终浓度 0.2 mmol/L, 引物各 0.2 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 扩增 p15 和 p16 基因片段。循环参数设置为: 94℃ 预变性 5 分钟, 94℃ 变性 30 秒, 60℃ 退火 30 秒, 72℃ 延伸 30 秒, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 分钟。取 5 μ l PCR 反应

产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳并于凝胶成像系统观察结果。

2 结果

采用 MSP 法分别以 HepG2 细胞、Raji 细胞、人 PBMC 细胞和正常成人肝细胞 DNA 为模板扩增 p15 基因甲基化及非甲基化序列。结果显示: 从肝癌细胞株 HepG2 中, 同时扩增出 p15 基因的甲基化与非甲基化条带; 而 Raji 细胞株扩增出 p15 基因甲基化条带, 而正常人外周血单核细胞和正常肝组织仅扩增出 p15 基因非甲基化条带 (图 1)。

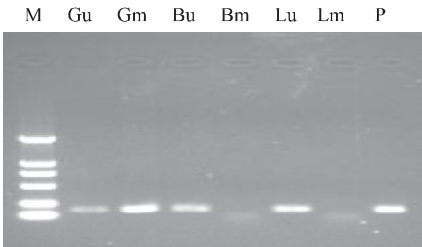


图 1 MSP法扩增产物的电泳图谱

M: DNA marker DL-2000; Gu 和 Gm 分别为 HepG2 细胞株的非甲基化和甲基化扩增; Bu 和 Bm 分别为正常人 PBMC 的非甲基化和甲基化扩增; Lu 和 Lm 分别为正常肝组织的非甲基化和甲基化扩增; P 为 Raji 细胞株的甲基化扩增

3 讨论

肝癌发生机制中, 细胞周期调控改变与某些抑癌基因编码的细胞抑制因子有关^[4]。肿瘤抑制基因 p15 属于周期蛋白激酶 CDK4 抑制因子家族成员, 定位于人染色体 9p21 区, 其编码蛋白质能够抑制细胞周期素-2 CDK4/6 复合物对 PRB 蛋白的磷酸化作用, 进而阻止细胞周期通过 G1/S 检验点, 在调节细胞增殖与凋亡、阻止有 DNA 损伤的细胞进行分裂增殖中发挥关键作用^[5]。p15 基因操纵区 CpG 岛在正常组织中是非甲基化的, 而在原发性肝癌患者则 CpG 岛异常甲基化表现出较高的频率。

表 1 MSP法扩增p15基因甲基化序列和非甲基化序列的引物

引物名称	引物序列	目的片段长度 (bp)
p15-M	5' -GCGTTCGTATTTTGCGGTT-3'	148
	5' -CGTACAATAACCGAACGACCGA-3'	
p15-U	5' -TGTGATGTGTTTGTATTTGTGGTT-3'	154
	5' -CCATACAATAACCAACAACCAA-3'	

据报道^[6], 癌组织中有 p15 基■ CpG 岛甲基化者, 其癌旁及远癌组织中 p15 基■ CpG 岛甲基化比例分别达到 80% 和 50%, 提示 p15 基■ CpG 岛异常甲基化可能是人原发性肝癌发生的早期事件。

p15 基■ CpG 岛异常甲基化与肿瘤的发生发展存在相关性, 同时也可作为抗肿瘤药物药效的参考指标。有学者^[7]在 p15 基■ 高甲基化的白血病细胞株 Raji 细胞培养体系中, 加入甲基转移酶抑制剂 5-Aza2-cdR, 当 5-Aza2-cdR 达到 $10^6 \sim 10^7$ mol/L 时, Raji 细胞株倍增时间明显延长, 细胞生长受到抑制; 应用相同细胞毒作用剂量的 Ara-C (不抑制 DNA 甲基化) 处理则无生长抑制效应。上述现象同样可作为原发性肝癌治疗药物的筛选指标, 但以人肝癌细胞株作为细胞模型比直接应用癌组织更为简便和稳定可靠。笔者通过 p15 基■ 的甲基化及非甲基化引物, 分别扩增 HepG2 细胞、Raji 细胞、人 PBMC 细胞和正常成人肝细胞 DNA。结果表明正常人外周血单核细胞和正常肝组织 p15 基■ 呈非甲基化形式, 而人肝癌细胞株 HepG2 中则同时扩增出 p15 基■ 的甲基化与非甲基化条带, 与有关原发性肝癌的 p15 基■ 检测结果相似, 提示人肝癌细胞株同样存在 p15 基■ 高度甲基化现象。

尽管抑癌基■ CpG 岛异常甲基化的分子机制尚不明确, 但针对相关基■ 异常靶点探索恶性肿瘤治疗新途径的研究已展开。以人原发性肝癌、膀胱

癌等细胞株以及裸鼠移植瘤为模型^[8], 平行研究某些药物的去甲基化作用和对肿瘤细胞生长的抑制, 有可能成为抗肿瘤药物筛选的新途径之一。

参考文献

- [1] Matsumoto H, Nagao M, Ogawa S, et al. Prognostic significance of death-associated protein-kinase expression in hepatocellular carcinomas[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23: 1333-1341.
- [2] Zhang YJ, Chen Y, Ahsan H, et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relationship to aflatoxin B1-DNA adducts and p53 mutation in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2003, 103: 440-444.
- [3] Matsukura S, Miyazaki K, Yakushiji H, et al. Combined loss of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and hMLH1 accelerates progression of hepatocellular carcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2003, 82: 194-200.
- [4] Roncalli M, Bianchi P, Bruni B, et al. Methylation framework of cell cycle gene inhibitors in cirrhosis and associated hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2002, 36: 427-432.
- [5] Herman JG, Jen J, Merlo A, et al. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B[J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 722-727.
- [6] 刘建余, 章扬, 孙芝琳, 等. 人原发性肝癌中 p16, p15 基■ CpG 岛甲基化研究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2002, 39(s): 127-132.
- [7] 周海, 陆红, 范洪涛, 等. 5-Aza2-cdR 诱导 Raji 细胞 p15 基■ 再表达及细胞生长抑制遗传性的实验研究[J]. *陕西医学杂志*, 2005, 34(1): 14-18.
- [8] Herman JG, Graff JR, 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: 9821-9826.

收稿日期: 2008-05-12

• 消息 •

北京地坛医院迁址通知

北京地坛医院已经开始搬迁工作, 搬迁新址: 北京市朝阳区京顺东路8号, 邮编100015, 即东五环外, 机场高速路与京顺高速路之间, 机场高速路的北皋出口, 紧邻■ 门路大饭店, 2008年10月1■ 后, 北京地坛医院的电话总机将改为 84322000。新北京地坛医院斥资12亿元, 占地135亩, 建筑面积75000平米, 编制床位600张, 40%单人间, 40%双人间。新的北京地坛医院具备先进的气动物流传输系统、物流机器人、达芬奇手术机器人、自动摆药机、整体化手术室、32张床的内外科ICU。北京地坛医院传染病研究所也新添置了3500万元的新设备, 成为■ 内同行业条件较好的研究平台。

编辑部地址也将改为北京市朝阳区京顺东路8号, 邮编100015, 电话: 84322058, 传真: 84322059, 具体搬迁时间为2008年9月20■。