

[文章编号] 1000-2200(2009)02-0106-04

· 基础医学 ·

人源肝癌细胞系中甲胎蛋白基因表达及甲基化的研究

王 玮¹, 陈立军¹, 初殿伟², 呼文亮³

[摘要] 目的:了解不同人源肝癌细胞系甲胎蛋白(AFP)基因表达及不同区域甲基化状态,探讨肝癌发生的表达遗传学调控机制。**方法:**采用亚硫酸氢盐-基因组测序(bisulfite-assisted genomic sequencing, BAGS)技术,检测人源 HepG2、SMMC-7721 肝癌细胞系和人成纤维细胞中 AFP 基因启动子区及 CpG 岛区的甲基化水平,RT-PCR 检测基因的表达,并分析相关性。**结果:**HepG2 细胞高表达 AFP, SMMC-7721 细胞低表达 AFP, 成纤维细胞不表达 AFP;在启动子区, HepG2 细胞的非甲基化修饰位点发生率较高,尤其是第一个和第二个 CG 位点, SMMC-7721 细胞的甲基化程度较之高,而成纤维细胞甲基化程度整体很高;在 CpG 岛区,成纤维细胞的非甲基化修饰位点发生率较高,主要是第 6 个和第 7 个 CG 位点, SMMC-7721、HepG2 细胞的甲基化程度较之高。**结论:**AFP 基因启动子甲基化程度与基因表达水平存在负相关, AFP 基因 CpG 岛甲基化程度与基因是否表达有关, AFP 基因启动子低甲基化可能是 AFP 高表达的分子机制。

[关键词] 肝肿瘤; 甲胎蛋白类; 基因表达调节; DNA 甲基化; CpG 岛; HepG2 细胞; SMMC-7721 细胞

[中国图书资料分类法分类号] R 735.7 **[文献标识码]** A

Methylation and expression of α -fetoprotein gene in human hepatocellular carcinoma cell line

WANG Wei¹, CHEN Li-jun¹, CHU Dian-wei², HU Wen-liang³

(1. Department of Biochemistry, 3. Department of Education, Medical College of the Chinese People's Forced Police, Tianjin 300162;

2. Tianjin General Hospital of Forced Police, Tianjin 300162, China)

[Abstract] Objective: To study the mechanism of development in hepatocellular carcinoma by analyzing the methylation patterns of α -fetoproteins(AFP) gene and its expression in human hepatocellular carcinoma cell line. **Methods:** To analyze the relationship of AFP gene methylation and its expression, the methylation status of the promoter and CpG island of AFP gene was investigated by means of bisulfite-assisted genomic sequencing in HepG2, SMMC-7721 and fibroblasts. AFP gene expression was detected by RT-PCR. **Results:** AFP gene was found expressed in HepG2 cell line higher, which in SMMC-7721 was high, and in fibroblasts was the lowest. In the promoter area of AFP gene, the methylation level was low in HepG2 cell line, which in SMMC-7721 was high, and in fibroblasts was the highest, especially at the first and the second CG sites. But in the CpG island of AFP gene, the methylation level was high in HepG2 and SMMC-7721 cell line, which in fibroblasts was low, especially at the sixth and the seventh CG sites. **Conclusions:** The methylation patterns of AFP gene may associated with the level of AFP gene expression, AFP gene silencing is associated with the promoter methylation.

[Key words] liver neoplasms; α -fetoproteins; gene expression regulation; DNA methylation; CpG island; HepG2 cell line; SMMC-7721 cell line

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)恶性程度高,病情发展迅速,病死率高,早期诊断困难^[1]。甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)长期以来一直作为胎儿缺陷、肝癌及胚胎相关癌的一个重要血清分子标志物^[2]。肝细胞癌变后重新分泌 AFP,原因可能是由于某些致病因素引起 AFP 基因的表达开放、基因转录增加或翻译修饰水平的提高。但 AFP 表达调控机制至今尚未完全清楚。大量实验证明,

DNA 甲基化能够在转录水平抑制基因的表达^[3],肿瘤细胞中某些异常表达的基因常表现为总体低甲基化和某些特定区域高甲基化^[4]。本文旨在研究人源肝癌细胞中 AFP 基因表达与基因不同区域甲基化位点之间的关系,探讨 AFP 表达的遗传调控机制。

1 材料与方法

1.1 试剂 高糖、低糖 DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶均购自 Gibco 公司; Trizol 购自 Invitrogen 公司; AMV 逆转录酶、Wizard DNA Purification System 购自 Promega 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒购自 Takara 公司; 胎牛血清(FCS)购自血液研究所; DNA 提取试剂盒、Marker 购自天为时代公司; 引物由上海生工合成; 人源 HepG2 细胞株购自中国医学科学院, 人源 SMMC-7721 细胞株

[收稿日期] 2008-04-03

[基金项目] 天津市科技厅应用基础研究计划资助项目(05YFJMJC08100); 武警医学院青年基金资助项目(WYQ2007-4)

[作者单位] 武警医学院 1. 生物化学教研室, 3. 训练部, 天津 300162; 2. 武警天津总队医院, 天津 300162

[作者简介] 王 玮(1982-), 女, 硕士研究生。

[通讯作者] 陈立军, 研究生导师, 副教授。

为本室保存,人源成纤维细胞由陈虹博士惠赠。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 细胞、SMMC-7721 细胞、成纤维细胞每升均以 1×10^9 个起始浓度分别接种培养于含 10% 胎牛血清、 10^5 u/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的高糖 DMEM、低糖 DMEM、PRMI 1640 培养液中,培养条件为 37 °C、5% CO₂、饱和湿度。待培养至对数生长期,开始后续实验。

1.2.2 DNA 提取 当细胞密度为每升 5×10^9 个时收集,按 DNA 提取试剂盒说明书要求,提取细胞基因组 DNA,溶于 200 μ l TE 缓冲液中。核酸定量仪测 OD 值并定量。

1.2.3 DNA 修饰 取 DNA 25 μ l, EcoR I 酶切后,每 50 μ l 加入 3 mol/L NaOH 5.5 μ l, 37 °C 水浴 15 ~ 20 min; 加入新鲜配制的 0.02 mol/L 氢醌 12.6 μ l 和 4.8 mol/L 亚硫酸氢钠 (pH 5.0) 320 μ l, PCR 仪上进行下面循环: 55 °C 15 min, 95 °C 30 s, 共 20 个循环; 用 Wizard DNA Purification System 试剂盒纯化 DNA, 按说明书操作; 每 100 μ l DNA 样品中加 3 mol/L NaOH 11 μ l, 37 °C 孵育 15 min, 加 1 μ g 鲑精 DNA 作载体, 加 47.6 μ l 10 mol/L 乙酸铵中和, 再加 480 μ l 无水乙醇, -20 °C 过夜沉淀后离心收集, 70% 乙醇清洗, 空气中干燥后加 20 μ l TE 缓冲液溶解。

1.2.4 DNA 修饰前后效果检测 为保证 DNA 修饰处理之前样品存在所需检测的区域, Primer Premier 5 设计引物, PCR 扩增不同模板, 包括细胞基因组 DNA、酶切后 DNA 及修饰后 DNA。原始启动子区域上游引物 PP1: 5'-GAT AAA GAT AAA GCC CAG AG-3', 下游引物 PP2: 5'-GAC TAC ACC AGG ACT AAC AAC-3', 扩增产物 269 bp; 循环条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 34 个循环, 72 °C 10 min。原始 CpG 岛区上游引物 CP1: 5'-GCT TGT AAT CCC AGC ACT TTG-3', 下游引物 CP2: 5'-GGG TTC ACG CCA TTC TCC-3', 扩增产物 188 bp; 循环条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 5 min。扩增产物行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 BSP (bisulfite sequencing PCR) [5] 分别选取 AFP 基因启动子及 CpG 岛区域, 在线 MethPrimer 软件 (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) 设计 BSP 启动子区域上游引物 BP1: 5'-GTT AAG TGA TAG GGT AAA AAT TTA AAT TAG-3', 下游引物 BP2: 5'-AAC CAC CAA TTC ATC AAA ATA TC-3', 扩增片段 248 bp; CpG 岛区域上游引物

BCP1: 5'-GTA AAG GTT TAT TGA ATA TTT AGG ATG TTG-3', 下游引物 BCP2: 5'-TTT CAC CAT ATT AAC CAA AAT AAT CTC-3'。以亚硫酸氢盐修饰后的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 采用热启动法, 97 °C, 7 min 后加入 Tag 酶。循环条件: 94 °C 预变性 3 min 后; 94 °C 30 s, 60 ~ 55 °C (每循环降 0.5 °C) 30 s, 72 °C 30 s, 10 个循环; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s, 5 个循环; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 30 s, 5 个循环; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s, 10 个循环; 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 30 s, 15 个循环; 72 °C 延伸 5 min。扩增产物行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 4 °C 保存备用。

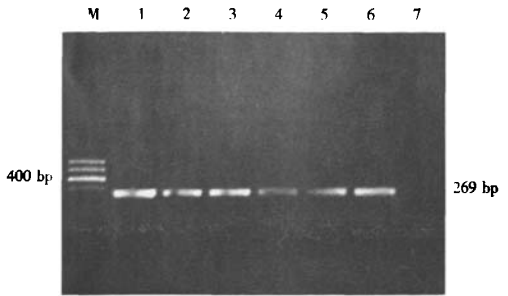
1.2.6 PCR 产物测序 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒纯化, 按说明书操作, 送 Takara 公司测序 (每种细胞随机抽取 5 个 PCR 产物), 测序结果对比 GenBank 上原始序列使用, DNAssist 2.0 软件分析。

1.2.7 RT-PCR 检测 AFP 基因表达 Trizol 分别提取 3 种细胞 RNA, 在 AMV 逆转录酶作用下于 43 °C 合成 cDNA。AFP 基因 cDNA 扩增所用上游引物 mAFP1: 5'-CAA AAA GCC CAC TCC AGC ATC-3'; 下游引物 mAFP2: 5'-CAG ACA ATC CAG CAC ATC TCC TC-3', 扩增片段 451 bp; 以 β -actin 作为内参照, 上游引物 β -actin1: 5'-GCA CCA CAC CTT CTA CAA TG-3'; 下游引物 β -actin2: 5'-GTG GTG AAG CTG TAG C-3', 扩增片段 350 bp。循环条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 50 °C 45 s, 72 °C 45 s, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 Bio-Rad 公司 PDQuest 7.0 凝胶图像软件分析结果。

2 结果

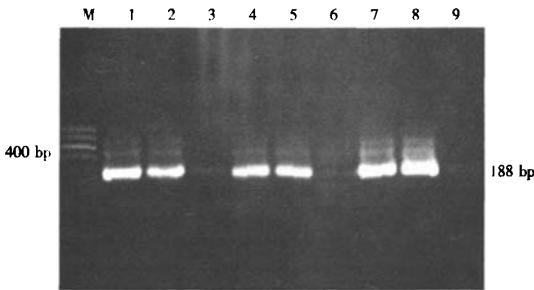
2.1 DNA 修饰前后效果检测 以 3 种细胞基因组 DNA、酶切后 DNA 为模板, 使用 AFP 基因启动子区及 CpG 岛区引物扩增, 均能得到目的条带, 269 bp 处及 188 bp 处各有一清晰的特异性条带 (见图 1、2), 片段长度符合预期长度, 测序后对比与所查原始序列一致, 证明可以用于后续的 BSP 检测; 而以修饰后 DNA 为模板未见有特异性条带, 说明 DNA 被修饰后改变了原有序列, 原始序列中不携带甲基基团的胞嘧啶发生了转变。

2.2 BSP 检测结果 以 3 种细胞修饰后 DNA 为模板, 分别以 AFP 基因启动子区及 CpG 岛区 BSP 引物进行扩增, 均能获得目的条带, 248 bp 处及 139 bp 处各有一清晰的特异性条带 (见图 3), 片段长度符合预期长度。启动子区存在 4 个 CG 位点, CpG 岛



M:100~600 bp DNA Marker;1,3,5: 基因组 DNA;2,4,6: 酶切后 DNA;7: 修饰后 DNA;1,2:HepG2 细胞;3,4:SMMC-7721 细胞;5,6: 成纤维细胞

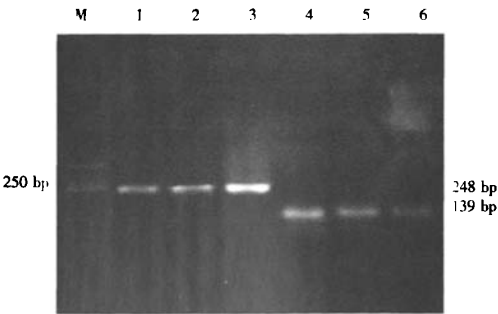
图1 AFP 基因启动子区原始引物扩增产物



M:100~600 bp DNA Marker;1,4,7: 基因组 DNA;2,5,8: 酶切后 DNA;3,6,9: 修饰后 DNA;1~3:HepG2 细胞;4~6:SMMC-7721 细胞;7~9: 成纤维细胞

图2 AFP 基因 CpG 岛区原始引物扩增产物

区存在 13 个 CG 位点。使用 DNAssist 2.0 软件分别和原始序列对比分析结果可见除了甲基化的胞嘧啶 (C) 外,所有的 C 均被转化为胸腺嘧啶 (T),而 CG 位点中被甲基化的 C 未被转化。在启动子区, HepG2 的非甲基化修饰位点发生率较高,尤其是第一个和第二个 CG 位点, SMMC-7721 的甲基化程度较高,而成纤维细胞甲基化程度整体很高;而在 CpG 岛区,成纤维细胞的非甲基化修饰位点发生率较高,主要是第 6 个和第 7 个 CG 位点, SMMC-7721、HepG2 的甲基化程度较高。

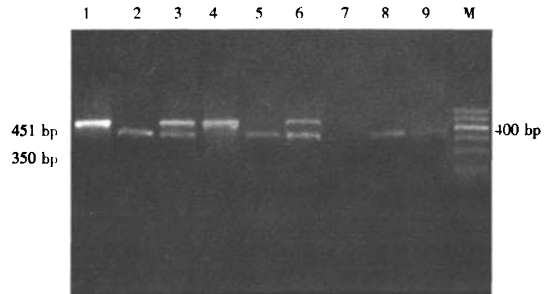


M:50~400 bp DNA Marker;1~3: 启动子区;4~6: CpG 岛区;1,4:HepG2 细胞;2,5: 成纤维细胞;3,6:SMMC-7721 细胞

图3 AFP 基因启动子区、CpG 岛区 BSP 引物扩增产物

2.3 AFP 在 HepG2、SMMC-7721 及人成纤维细胞中的表达 HepG2 细胞 451 bp 处及 350 bp 处各有

一清晰的特异性条带;SMMC-7721 细胞 451 bp 处有一模糊的特异性条带,350 bp 处有一清晰的特异性条带;而对照人成纤维细胞只在 350 bp 处有一清晰的特异性条带(见图 4)。人肝癌细胞 HepG2 和 SMMC-7721 都检测到 AFP 的表达,HepG2 高表达 AFP 基因,SMMC-7721 表达水平较低,而人成纤维细胞未检测到 AFP 的表达。以 β -actin 作为内参照,软件分析显示, HepG2 中 AFP 表达量约是 SMMC-7721 的 10 倍,用人成纤维细胞作对照获得阴性结果,表明实验结果可信,具有特异性。



M:100~600 bp Marker;1~3:HepG2 细胞;4~6:SMMC-7721 细胞;7~9: 成纤维细胞;1,4,7:mAFP 引物;2,5,8: β -actin 引物;3,6,9:mAFP 和 β -actin 引物

图4 HepG2、SMMC-7721 及人成纤维细胞 AFP mRNA 表达

3 讨论

在大量的基因中观察到胞嘧啶甲基化与转录负相关^[6],尤其是许多抑癌基因启动子区的 CpG 岛甲基化后造成的相应基因转录障碍。Park 等^[3]采用甲基化特异性 PCR (MSP) 和亚硫酸氢盐测序分析证实,由于多种基因 CpG 岛甲基化,导致整联蛋白 $\alpha 4$ 基因沉默的发生率在胃癌细胞株占 88.8%,在 46 种原发性肿瘤中高达 84.7%,使用甲基化酶抑制剂处理后,基因可恢复活性^[7]。目前有三种可能机制来解释 DNA 甲基化对转录的抑制:(1) DNA 轴的大沟是许多蛋白因子与 DNA 结合的部位,当 C 被甲基化后,5mC 则突出至大沟中,从而干扰了转录因子与 DNA 的结合,已知的此类转录因子有 Ap-2、E2F、CREB 及 NF- κ b 等。(2) 序列特异性甲基化连接蛋白 (sequence specific methylated DNA binding protein, MDBP) 与启动子区甲基化 CpG 岛结合,组织转录因子与启动子区靶序列的结合,从而影响基因的转录^[8]。(3) 通过甲基化结合蛋白 (methylated CpG binding protein, MeCPs) 改变染色质结构,抑制基因表达。在启动子区低甲基化与转录活性正相关(非启动子区甲基化例外),基因本身的甲基化与基因表达也有弱的负相关,基因 CpG 岛的甲基化可干扰一些转录因子与基因调控区的结合抑制转录,还

可能直接抑制 RNA 聚合酶活性而抑制基因的表达。

大多数恶性肿瘤中都有 DNA 甲基化模式异常^[9],肿瘤中的 DNA 甲基化多表现为总体甲基化水平降低和某些特定区域发生的高甲基化。低甲基化是大多数肿瘤基因组的特征,常发生在高度和中度重复序列。许多癌基因低甲基化状态使该基因的表达增强亦是促使肿瘤发生的一种机制。如母体内曾暴露于无机砷的成年雄鼠,其肝中雌激素受体(ER- α)基因和 Cyclin D1 基因发生低甲基化,导致 ER- α 基因过表达,表明其可能与肝细胞癌的发生有关^[10]。

AFP 的检测作为目前使用最广泛最理想的 HCC 早期诊断、治疗及预后评价指标。某些基因由于受甲基化修饰而不表达,在特定的生理或病理条件下发生去甲基化重新表达。受其调控的目的基因能在 AFP 阳性的肝癌细胞中特异性表达,而在 AFP 阴性的肝癌细胞及非肝癌细胞中则不表达或低表达^[11,12]。Fang 等^[13]证明,AFP 基因中的 6 个 CCGG (*Hpa* II 切酶)位点的低甲基化与其表达呈正相关,其后的相关研究多采用甲基化特异性酶切后 Southern 杂交法、MSP 法,假阳性率高,检测位点少,不能反映真实的甲基化模式。而以 NaHSO₃ 为基础的 BAGS 法最为准确,能确定基因单个位点的甲基化情况。我们选取表达存在差异 3 种细胞的 AFP 基因启动子区和 CpG 岛区域作为具体 BGS 的检测位点。本实验证明在启动子区域,HepG2 的非甲基化修饰位点发生率较高,尤其是第一个和第二个 CG 位点,SMMC-7721 的甲基化程度较之高,成纤维细胞甲基化程度整体很高;在 CpG 岛区,成纤维细胞的非甲基化修饰位点发生率较高,主要是第 6 个和第 7 个 CG 位点,SMMC-7721、HepG2 的甲基化程度较之高。AFP 基因启动子区甲基化程度与基因表达水平存在负相关,AFP 基因 CpG 岛区甲基化程度与基因是否表达有关,AFP 基因启动子低甲基化可能是 AFP 高表达的分子机制,而在非启动子区,CpG 岛的甲基化可能通过干扰一些转录因子与基因调控区的结合直接抑制转录。

因此,不同的 DNA 序列其甲基化状态代表的意义也可能不同,但对于同一个基因其甲基化调节的机制应该是稳定的,多数学者认为 AFP 基因启动子

的甲基化与其基因表达抑制是相一致的,并且 DNA 甲基化是一可逆过程,故通过恢复未发生突变或丢失而仅仅被抑制的生长调控基因的表达恢复细胞正常生长调控功能,有可能达到治疗癌症的目的。

[参 考 文 献]

- [1] Qiu GH, Salto-Tellez M, Ross JA, et al. The tumor suppressor gene DLEC1 is frequently silenced by DNA methylation in hepatocellular carcinoma and induces G1 arrest in cell cycle[J]. *J Hepatol*, 2008, 48(3):433-441.
- [2] Johnson PJ. The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Liver Dis*, 2001, 5(1):145-159.
- [3] Park J, Song SH, Kim TY, et al. Aberrant methylation of integrin alpha4 gene in human gastric cancer cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23(19):3474-3480.
- [4] Patra SK. Ras regulation of DNA-methylation and cancer[J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(6):1193-1201.
- [5] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(5):1827-1831.
- [6] Liu J, Benbrahim-Tallaa L, Qian X, et al. Further studies on aberrant gene expression associated with arsenic-induced malignant transformation in rat liver TRL1215 cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 216(3):407-415.
- [7] Leone G, Voso MT, Teofili L, et al. Inhibitors of DNA methylation in the treatment of hematological malignancies and MDS[J]. *Clin Immunol*, 2003, 109(1):89-102.
- [8] Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2000, 183(2):145-154.
- [9] Hermes M, Geisler H, Osswald H, et al. Alterations in S-adenosylhomocysteine metabolism decrease O6-methylguanine DNA methyltransferase gene expression without affecting promoter methylation[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(11):2100-2111.
- [10] Waalkes MP, Liu J, Chen H, et al. Estrogen signaling in livers of male mice with hepatocellular carcinoma induced by exposure to arsenic in utero[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(6):466-474.
- [11] Mizejewski CJ. alpha-fetoprotein as a biologic response modified relevance to domain and subdomain structure[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1997, 215(4):333-362.
- [12] Zhang C, Li Z, Cheng Y, et al. CpG island methylator phenotype association with elevated serum alpha-fetoprotein level in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(3):944-952.
- [13] Fang JY, Xiao SD. Alteration of DNA methylation in gastrointestinal carcinogenesis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 16(9):960-968.