

5-氮杂-2'-脱氧胞苷对胃癌细胞中 HLA-C 表达的影响

吴守伟,付倩琦,汤必奎,黄银久,赵 莉

[摘要] 目的:研究 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)对胃癌细胞中人白细胞抗原 C(HLA-C)表达的影响及其与 DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)的关系。方法:用终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-Aza-CdR 处理培养胃癌细胞(实验组),以未处理细胞作为对照;HLA-C 和 DNMT1 基因的转录表达使用半定量 RT-PCR 检测;HLA-C 的甲基化状态使用甲基化特异性 PCR(MSP)检测。结果:5-Aza-CdR 处理降低了 BGC823 细胞中 DNMT1 基因在转录水平的表达;HLA-C CpG 岛的甲基化水平降低;HLA-C mRNA 表达量明显上调,对电泳条带的半定量分析显示实验组和对照组之间的差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论:5-Aza-CdR 通过抑制 DNMT1 的表达,改变胃癌细胞中 HLA-C 基因的异常甲基化状态,进而上调 HLA-C 的表达。

[关键词] 胃肿瘤;5-氮杂-2'-脱氧胞苷;DNA 甲基转移酶;人白细胞抗原 C

[中国图书资料分类号] R 735.2 **[文献标识码]** A

Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on human leukocyte antigen C expression in gastric cancer cells

WU Shou-wei, FU Qian-qi, TANG Bi-kui, HUANG Yin-jiu, ZHAO Li

(Department of Bioscience, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on human leukocyte antigen C (HLA-C) expression and the relationship with DNA methyltransferase 1 (DNMT1) in gastric cancer cells. **Methods:** The gastric cancer cells BGC823 cultured in medium containing 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR (final concentration) were as experiment group. The untreated gastric cancer cell were as control group. The transcripts of HLA-C and DNMT1 genes were detected by semi-quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR). The methylation level of HLA-C was analyzed by methylation-specific PCR (MSP). **Results:** The expression of DNMT1 mRNA in BGC823 cells treated with 5-Aza-CdR were obvious less than in untreated cells. The DNA hypermethylation in CpG island of HLA-C gene was reversed and led to up-regulation of HLA-C transcripts. There was the statistical significance between the control and experiment group in the expression of HLA-C mRNA analyzed by Gel-Pro Analyzer ($P < 0.01$). **Conclusions:** 5-Aza-CdR treatment can lead to DNA demethylation of HLA-C through inhibiting the expression of DNMT1, and then up-regulating the expression of HLA-C mRNA.

[Key words] gastric neoplasms; 5-Aza-2'-deoxycytidine; DNA methyltransferase; human leukocyte antigen C

人白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA-C) I 类分子在人类多种肿瘤中广泛存在失表达或低表达现象,体现了肿瘤细胞针对 HLA 分子具有向 T

细胞递呈免疫原性多肽这一作用而选择的一种逃避机制。肿瘤细胞中 HLA I 类分子低表达的机制有多种:HLA I 类分子完全失表达、等位基因选择性失表达、多位点低表达和等位基因选择性低表达^[1]。除了遗传基因的改变,为数不多的研究^[2-3]发现一些肿瘤中 HLA 基因也存在表遗传的改变。本研究旨在明确胃癌 BGC823 细胞中 HLA-C 基因的甲基化状况,并观察去甲基化试剂处理对细胞生长及 HLA-C 表达的影响。

[收稿日期] 2010-03-12

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2006kj124c)

[作者单位] 蚌埠医学院 生物科学系,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 吴守伟(1966-),男,硕士,讲师。

[通讯作者] 赵 莉,研究生导师,教授。E-mail: genetics2008@163.com

[7] Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, et al. BAA1C expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics; a Cancer and Leukemia Group B Study[J]. Blood, 2003, 102(5): 1613-1618.

[8] Langer C, Radmacher MD, Ruppert AS, et al. High BAA1C expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia; a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study[J]. Blood, 2008, 111(11): 5371-5379.

[9] 李红艺,魏旭东,吕晓东,等.实时荧光定量 PCR 检测 BAA1C 基因在正常核型急性髓系白血病中的表达[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(12): 1706-1709.

[10] 钟明华,龚明,马亮,等.实时定量逆转录 PCR 检测急性髓系白血病患者骨髓细胞 BAA1C 基因表达[J]. 中日友好医院学报, 2009, 23(3): 153-159.

[11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

1 材料与方方法

1.1 材料 胃癌细胞株 BGC823 购于中国科学院细胞生物化学研究所;5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)和 β -肌动蛋白(β -actin)(Sigma), dNTP 和 $MgCl_2$ (Promega), Taq DNA 聚合酶(TaKaRa), Trizol (Invitrogen), RNase 抑制剂(TaKaRa), M-MLV 逆转录酶(Promega)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及 5-Aza-CdR 处理 胃癌 BGC823 细胞复苏和培养,取汇合率 80% 左右的细胞,胰酶消化,按照每瓶 3×10^5 细胞分 3 瓶,培养 24 h 使其贴壁,更换含 5-Aza-CdR 终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 培养液。每 24 h 换液 1 次,药物浓度不变,共换 4 次,即药液处理达 96 h。之后更换含血清、不含 5-Aza-CdR 的培养液,继续孵育 48 h,恢复对数期生长后收获细胞(实验组)。对照组细胞使用不含 5-Aza-CdR 的培养液培养。处理过程中传代依常规方法进行。

1.2.2 RT-PCR 检测 DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)及 HLA-C 的表达 用 Trizol 法提取培养细胞总 RNA,DU70 紫外分光光度计检测 RNA 浓度及纯度。纯化后的总 RNA 经 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA 第 1 链,对目的基因 HLA-C 和内参基因 β -actin 同时扩增。所用 HLA-C 的 RT-PCR 引物序列为, F:5'-CGC CGC GAG TCC RAG AGG-3', R:5'-GTG TCC GCS CGG TCC AG-3', 扩增片段大小 301 bp。 β -actin, F:5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3', R:5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3', 扩增片段长度 240 bp。50 μl 体系其中包括 150 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 10~25 pmol 上、下游引物, 5 U Taq DNA 聚合酶和 5 μl DNA 模板。95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后进入循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 28 个循环,在剩余 17 个循环时加入 β -actin 引物,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。对 DNMT1 扩增所用引物序列为, F:5'-CCG AGT TGG TGA TGG TGT GTA C-3', R:5'-AGG TTG ATG TCT GCG TGG TAG C-3', 扩增片段长度 324 bp; 采用 25 μl 反应体系。PCR 参数参照前述,取 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 28 个循环。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后由 EB 染色。以 Gel-Pro Analyzer 3.2 软件分析条带强度灰度比,HLA-C 和 DNMT1 的强度与该样本的内对照 β -actin 的强度比值作为此样本 HLA-C 和 DNMT1 表达的相对强度。以未经 5-Aza-CdR 处理 BGC823 细胞为对照。

1.2.3 甲基化特异性 PCR(MSP)检测 HLA-C 基因启动子区甲基化状态 DNA 的亚硫酸氢盐修饰和

纯化采用常规方法。HLA-C 甲基化引物, F:5'-TTG GGT GTC GGG TTT TAG AG-3', R:5'-ACT CCC CGA ATC CTA CGC-3', 扩增片段长度 256 bp; 非甲基化引物, F:5'-TTG GGT GTT GGG TTT TAG AG-3', R:5'-AAC TCC CCA AAT CCT ACA C-3', 预扩增片段长度 256 bp。采用 25 μl MSP 反应体系,反应时间和温度:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后加入 Taq 酶 0.5 μl (热启动), 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 甲基化引物在 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。5 μl PCR 反应产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外观察仪观察,凝胶成像处理系统扫描。

1.3 统计学方法 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 5-Aza-CdR 处理 BGC823 细胞的生长及形态 5-Aza-CdR 处理可以改变 BGC823 细胞的生长速度和形态。肿瘤细胞呈上皮型贴壁生长,呈多角形,形态不规则,轮廓清楚,细胞间结构紧密,细胞生长旺盛(见图 1);经 5-Aza-CdR 处理后的细胞皱缩,多角形形态趋于规则,密度降低,细胞间接触变松,部分细胞体积缩小,折光性及贴壁能力减弱,增殖减慢(见图 2)。

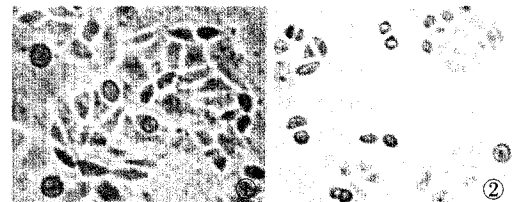


图 1 5-Aza-CdR 处理 BGC823 细胞的形态及生长状况

图 2 未经 5-Aza-CdR 处理 BGC823 细胞的形态及生长状况

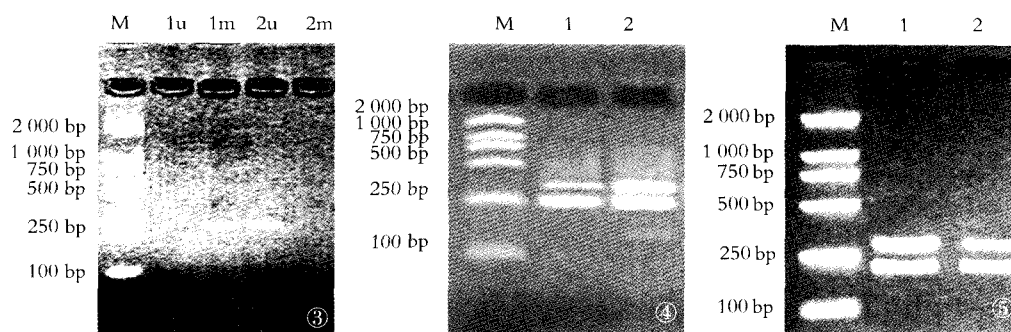
2.2 5-Aza-CdR 处理 BGC823 细胞中 HLA-C 的甲基化状态 甲基化特异性 PCR 显示 5-Aza-CdR 对胃癌细胞 HLA-C 甲基化状态的影响(见图 3)。对照组 BGC823 细胞使用甲基化引物可扩增出明显的 256 bp HLA-C 条带,非甲基化引物未扩增出相应的条带,表明其处于甲基化状态;实验组使用甲基化引物扩增不出 256 bp 条带,相反使用非甲基化引物扩增的条带则非常明显,显示 BGC823 细胞中 HLA-C 基因的甲基化状态发生了改变。

2.3 5-Aza-CdR 处理 BGC823 细胞对 HLA-C mRNA 表达的影响 以 β -actin 为内参分析 HLA-C mRNA 的表达,5-Aza-CdR 处理可在一定程度上上调其表达(301 bp)水平(见图 4)。Gel-Pro Analyzer 半定量分析显示,HLA-C mRNA 在正常培养 BGC823 细胞和 5-Aza-CdR 处理 BGC823 细胞中的相对表达强度分别为 0.33 ± 0.04 和 0.52 ± 0.08 ($t = 3.68, P <$

0.05)。

2.4 5-Aza-CdR 处理 BGC823 细胞中 DNMT1 mRNA 的表达 以 β -actin 为内参分析 DNMT1 mRNA 的表达水平,可见 5-Aza-CdR 处理明显降低 DNMT1 mRNA (324 bp) 的表达(见图 5)。Gel-Pro

Analyzer 3.2 软件对琼脂糖凝胶电泳图的半定量分析显示, DNMT1 mRNA 在正常培养 BGC823 细胞和 5-Aza-CdR 处理 BGC823 细胞中的相对表达强度分别为 0.63 ± 0.03 和 0.17 ± 0.02 ($t = 22.10, P < 0.01$)。



M: DNA marker (DL2000); 1: 对照组; 2: 实验组; u: 非甲基化扩增; m: 甲基化扩增
图 3 5-Aza-CdR 处理 BGC823 细胞中 HLA-C 基因启动子甲基化状态 图 4 5-Aza-CdR 处理 BGC823 细胞中 HLA-C mRNA 的表达 图 5 实验组和对照组中 DNMT1 mRNA 的表达

3 讨论

HLA I 类分子在内源性抗原被递呈给 CTL 细胞供其杀伤途径中发挥至关重要的作用,因此肿瘤抗原递呈也依赖于 HLA I 类分子的正常表达。但是在肾癌、前列腺癌、胃癌、结肠癌和睾丸癌等癌中人们发现 HLA I 类分子存在低表达或失表达^[4],这种异常表达可发生在基因水平、转录水平或转录后水平,并与肿瘤的浸润和转移相关联。

遗传学和表遗传学改变均可引起原癌基因活化和抑癌基因失活。基因启动子区域 CpG 岛的甲基化将导致该基因沉默,这在肿瘤基因表达的调控中非常普遍,但这是否与 HLA-I 类分子的表达受抑有关尚不清楚。有实验观察到 HLA 位点表现出高甲基化,这种高甲基化不仅与 HLA-I 分子表达下调相一致,且具有位点特异性。本研究利用 MSP 技术对 BGC823 细胞中 HLA-C 位点启动子区域甲基化状态进行了分析,结果显示该位点存在 CpG 岛甲基化,并且这种甲基化可被去甲基化药物 5-Aza-CdR 处理所逆转。目前已知参与 DNA 甲基化的酶有 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b。DNMT1 主要是维持基因组中 DNA 的甲基化状态, DNMT3a 和 DNMT3b 主要参与未甲基化 DNA 重新甲基化^[5]。RT-PCR 的结果显示,5-Aza-CdR 处理 BGC823 细胞后,对甲基化起主要作用的 DNMT1 表达显著被抑制,表明上述过程可能是借助 5-Aza-CdR 抑制 DNMTs 活性而实现。

5-Aza-CdR 作为一种去甲基化试剂,可以改变 DNA 中胞嘧啶的甲基化状态^[6]。5-Aza-CdR 处理一

个食管癌细胞系可以使其 HLA-B 基因去甲基化并重新表达,表明 DNA 甲基化导致了该细胞系中 mRNA 的失活。在人类黑素瘤中 DNA 去甲基化试剂 5-Aza-CdR 可以显著增强 HLA I 类抗原的表达^[7]。为验证 MSP 的结果,本研究也利用 5-Aza-CdR 处理 BGC823 细胞抑制 DNMTs 活性,观察其对 HLA-C mRNA 表达的影响,结果显示处理细胞的 HLA-C mRNA 表达较未处理细胞强,与前人^[2]研究一致。但未处理细胞中 HLA-C mRNA 也并非失表达, DNA 甲基化在这其中的调控机制尚不清楚。

并不是所有实验都支持甲基化导致 HLA 基因失活的假设。使黑素瘤 DNA 低甲基化从而其激活 HLA I 类抗原表达上调的分子机制并不具有 HLA-I 位点特异性^[8]。I 类分子基因的一个基础水平的甲基化可能是维持基因转录活性所必需的。对神经母细胞瘤的研究^[8]发现,一个可修正 HLA 基因甲基化的 MEMO-1 位点的丢失会导致 HLA-I 部分位点的低甲基化,并使这些基因的表达水平降低,暗示过低或过高的甲基化水平都会导致 HLA-I 基因表达的抑制,这似乎可解释用 5-Aza-CdR 处理 MSR3-mel 细胞后,HLA-I 类分子所恢复到的表达水平并非希望的那么高。从另一角度看,HLA 位点的高甲基化和基因表达受抑也可能体现肿瘤细胞在其发展过程中为对抗 CTL 的抗肿瘤反应而采取的一种便利途径。

细胞表面 HLA I 类抗原复合物的表达受许多因素的控制,包括相关基因的正常转录、翻译,复合体各组分正常组装、运送,加工分子正常行使其功能等,任何一个环节异常都可造成该复合物表达的异

安迪粉针剂诱导慢性粒细胞白血病 K562 细胞凋亡的细胞学研究

李 妍¹, 李 锋², 王四旺³, 许 晖¹

[摘要] **目的:**探讨安迪注射剂(Andi injection, Adi)对慢性粒细胞白血病 K562 细胞株凋亡的影响。**方法:**流式细胞仪技术检测细胞凋亡变化;使用荧光显微镜和透射电镜观察细胞形态学改变;评价 Adi 对 K562 细胞株凋亡的影响。**结果:**流式细胞仪检测结果显示 10、20 μg/ml Adi 处理组 K562 细胞的凋亡率分别为 50% 和 39%, 明显高于对照组的 10% ($P < 0.05$); 荧光显微镜和电镜下可见 K562 细胞呈典型凋亡样改变。**结论:**Adi 能明显抑制 K562 细胞增殖, 促进细胞凋亡。

[关键词] 白血病; 安迪注射剂; K562 细胞; 细胞凋亡

[中国图书资料分类法分类号] R 733 **[文献标识码]** A

Study on the apoptosis of erythroleukemia K562 cells induced by Andi injection

LI Yan¹, LI Feng², WANG Si-wang³, XU Hui¹

(1. Department of Food and Biology Technology, Bengbu College, Bengbu Anhui 233030;

2. Department of Hematology, Nanjing Military Region Nanjing General Hospital, Nanjing Jiangsu 210002;

3. Institute of Material Medical, Pharmacy Department, Fourth Military Medical University, Xi'an Shanxi 710032, China)

[Abstract] **Objective:** To study the apoptosis of K562 cells induced by Andi injection (Adi). **Methods:** Flow cytometer was used to detect the apoptosis of K562 cells after the action of Adi, and the morphological changes were observed by fluorescence microscopy and electron microscopy. The effects of Adi on the proliferation and apoptosis of K562 cells were evaluated. **Results:** The apoptosis rates were 50% and 39% in the cells that had been treated with 10 and 20 μg/ml Adi, respectively, which was significantly higher than the 10% in the control group ($P < 0.05$); Abnormal morphological changes of K562 cells were observed in Adi group by fluorescence microscopy and electron microscopy. **Conclusions:** Adi can obviously inhibit the proliferation of anti-leukemic cells and induce the apoptosis of K562 cells.

[Key words] erythroleukemia; Andi injection; K562 cell; apoptosis

[收稿日期] 2010-01-22

[作者单位] 1. 蚌埠学院 食品与生物工程系, 安徽 蚌埠 233030; 2. 南京军区总医院 血液科, 江苏 南京 210002; 3. 第四军医大学 药理学系药物研究所, 陕西 西安 710032

[作者简介] 李 妍(1982-), 女, 硕士, 助教。

蟾酥为常用中药之一, 性味甘辛、温、有毒。一些基础和临床实验结果表明, 蟾酥具有解毒、消肿、醒神、开窍、强心和止痛等作用。蟾酥化学成分含有蟾毒灵(bufoalin, BL), BL 为中药蟾酥中的活性成分。文献报道^[1-3], BL 对白血病细胞具有诱导分化的作

常。加之肿瘤细胞具有异质性^[9], 虽已证实 DNA 甲基化是调控基因转录的重要机制之一, 但对 HLA I 类基因异常表达的调控途径可能是多样化的。

[参 考 文 献]

[1] 谢维. HLA 表达与肿瘤的生物治疗[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2002, 9(1): 1-5.

[2] Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, et al. Expression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment[J]. Int J Cancer, 2001, 94(2): 243-251.

[3] Sers C, Kuner R, Falk CS, et al. Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells[J]. Int J Cancer, 2009, 125(7): 1626-1639.

[4] Seliger B, Cabrera T, Garrido F, et al. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells[J]. Cancer Biology, 2002, 12(1): 3-13.

[5] 樊红, 许军, 等. DNMT1 siRNA 稳定表达载体的构建及其沉默效率的评价[J]. 中华医学遗传学杂志, 2005, 22(2): 142-145.

[6] 缪珑昇, 相加庆, 张亚伟, 等. 食管鳞癌中 hMLH1、E-cadherin、p16INK4a 基因启动子甲基化及其意义[J]. 中国癌症杂志, 2009, 19(5): 340-346.

[7] Mora-García Mde L, Duenas-González A, Hernández-Montes J, et al. Up-regulation of HLA class-I antigen expression and antigen-specific CTL response in cervical cancer cells by the demethylating agent hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid[J]. J Transl Med, 2006, 4: 55.

[8] Gasparollo A, Coral S, Ciullo M, et al. Unbalanced expression of HLA-A and -B antigens: a specific feature of cutaneous melanoma and other non-hemopoietic malignancies reverted by IFN-γ[J]. Int J Cancer, 2001, 91(4): 500-507.

[9] Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, et al. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease[J]. J Hum Genet, 2009, 54(1): 15-39.