

网络出版时间: 2019-5-9 10:20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190506.1438.005.html>

食管癌细胞株 Eca109 中 *cdc42* 基因 启动子区 CpG 岛甲基化调控报告基因的表达

刘玲¹, 陈艳¹, 李卉², 张法煌¹, 李依珂³, 伊丽达娜·斯提瓦尔地³, 喻亮⁴, 李惠武⁴

摘要 目的 研究细胞周期分裂蛋白 42(*cdc42*) 的启动子区 CpG 岛是否作为调节因子参与基因表达的调控。方法 选择消化道肿瘤早期相关基因 *cdc42* 为研究对象, 构建氯霉素乙酰基转移酶 3-增强子(pCAT3-Enhancer) 重组体: 内含 *cdc42* 基因启动子区第一个 CpG 岛的序列及一段不含 CpG 岛序列, 非甲基化修饰的重组体和 pCAT3-Enhancer 空载体转化至甲基化酶缺陷大肠杆菌中(ER1793), 经甲基化酶修饰后的重组体及空载体转化至可维持甲基化状态的大肠杆菌中(JM109), 阳性克隆转染至 Eca109 中, 提取蛋白, 通过薄层层析检测氯霉素乙酰基转移酶(CAT) 活性。结果 转染至细胞株后, 甲基化空载体 CAT 的活性显著低于非甲基化的; 任意 DNA-pCAT3-Enhancer 重组体甲基化及非甲基化 CAT 的活性无差异; *cdc42* 启动子区 CpG 岛-pCAT3-Enhancer 重组体, 甲基化 CAT 的活性显著低于非甲基化 CAT 的活性, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 通过食管癌细胞株 Eca109 实验 *cdc42* 启动子区 CpG 岛的甲基化修饰后, CAT 的活性降低, 非甲基化 CAT 仍保持较高活性。说明 *cdc42* 启动子区 CpG 岛甲基化程度的改变具有调节下游基因表达的作用。

关键词 Eca109 细胞株; *cdc42*; 甲基化; 报告基因

中图分类号 R 349.64

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)05-0691-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.005

表观遗传学是指在不改变基因序列的前提下对基因表达的调控, 最常见的修饰是 DNA 甲基化^[1]。其通过 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM) 将甲基添加到胞嘧啶的基因组上^[2]。甲基化状态的增减, 脱甲基化, 会使相关基因的功能改变, 导致细胞变化, 包括癌症、自体免疫反应和衰老相关的变化^[3]。在子宫内膜癌^[4]、肾透明细胞癌^[5]、胃癌^[6] 中均存在基因的启动子区甲基化改变。肿瘤

抑制基因启动子区域的甲基化引起基因表达的紊乱, 也存在于食管癌变过程^[7-8]。

细胞周期分裂蛋白 42(cell division cycle 42, *cdc42*) 是小 GTP 酶, 属 Rho 家族的成员, 可以调节细胞骨架组织和膜运输等生理过程^[9]。其启动子区 CpG 岛甲基化的变化对基因表达的调控尚未见报道。该研究应用分子克隆及薄层层析技术, 构建 *cdc42* 基因启动子区 CpG 岛 DNA 序列连接报告基因氯霉素乙酰基转移酶(*cdc42*-chloramphenicol acetyl transferase, *cdc42*-CAT) 的表达载体, 经 CpG 岛的 DNA 序列甲基化修饰, 转染食管癌细胞株 Eca109 后, 检测含 CpG 岛甲基化修饰与未甲基化修饰 DNA 片段对下游 CAT 的影响, 为确定 *cdc42* 基因启动子区 CpG 岛甲基化变化参与 *cdc42* 表达的调控提供直接证据。

1 材料与方法

1.1 引物设计及载体构建

1.1.1 引物设计 在基因数据库(GenBank) 中查询候选基因 *cdc42* 和任意一段不含 CpG 岛的 DNA 序列(Random), 应用 Primer 5.0 软件设计引物, 引物序列及熔解温度(melting temperature, T_m) 见表 1。

1.1.2 PCR 扩增 PCR 反应条件见表 2。

1.1.3 电泳及测序鉴定 2% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物 *cdc42* 及 random 序列。并将 PCR 产物 20 μ l 送上海生工测序鉴定其正确性。

1.1.4 PCR 片段与 pUCm-T 载体(pUCm-T Vector) 重组体的构建及转化 ① PCR 产物的添加: 利用添加 A 试剂盒, 加入以下试剂至 EP 管中: 10 $\times$ A tailing Buffer 5 μ l, dATP mix 1 μ l, Taq DNA 聚合酶 1 μ l, PCR 产物 30 μ l, ddH₂O 13 μ l, 置 PCR 仪 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。② 添加 A 产物的回收: 将添加 A 产物经 2% 琼脂糖电泳后, 紫外灯下割胶回收, 再经胶回收试剂盒得到纯化的 PCR 产物。③ PCR 产物与 pUCm-T 载体重组体的构建及转化: 按说明书将甲基化酶缺陷的大肠杆菌 ER1793 及可维持甲基化状态的大肠杆菌 JM109 37 $^{\circ}$ C 制备为感受态细胞。PCR 产物与

2019-02-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81460419、81060172)

作者单位: 新疆医科大学¹ 基础医学院、² 中心实验室、³ 第一临床医学院, 乌鲁木齐 830011

⁴ 广东汕头大学附属粤北人民医院, 韶关 512025

作者简介: 刘玲, 女, 副教授;

李惠武, 男, 教授, 责任作者, E-mail: liulingpine@126.com

表1 *cdc42* 及任意一段序列扩增引物序列

基因	引物序列(5'→3')	扩增产物(bp)	熔解温度(℃)
<i>cdc42</i>	F: AAGGTACCGTAATTAATAAAATCCAAAAGAGGG R: AAAGATCTTATTATTGTCTTCTCTGCTAG	853 bp	58
<i>Random</i>	F: AACTCGAGTCTCACAGCCTTCTCTTGCTCA R: AAAGATCTAAGGCAGGAGTCAGGATGGT	317 bp	68

表2 PCR 反应条件

PCR 步骤	1	2	3	4	5	6
反应条件	94 ℃	94 ℃	Tm(熔解温度)	72 ℃	72 ℃	4 ℃
<i>cdc42</i>	5 min	30 s	58 ℃ 30 s	30 s	10 min	保温
<i>Random</i>	5 min	30 s	68 ℃ 30 s	30 s	10 min	保温

pUCm-T 载体通过连接试剂盒连接,16 ℃作用12 h后,分别转化至感受态细胞。

1.1.5 阳性克隆的筛选及阳性克隆菌载体的测序鉴定 ①通过蓝白斑筛选阳性克隆菌后,经质粒提取试剂盒提取质粒。②以提取的质粒为模板,分别采用双酶切进行酶切。*cdc42*用Kpn I及Bgl II酶切(加buffer I及Kpn I酶切30 min后,再加buffer II和Bgl II酶切30 min),*Random*用Xho I及Bgl II 37 ℃酶切1 h。③酶切产物通过2%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下切胶并用胶回收试剂盒回收,电泳鉴定。PCR扩增目的片段。④并将筛选的含阳性克隆的菌液送上海生物工程服务公司测序鉴定其正确性。

1.1.6 甲基化修饰试剂盒修饰 将酶切后的PCR产物分组,一组进行甲基化修饰,一组不进行任何处理。其中SAM为活性甲基供体。将甲基化修饰体系充分混匀(上下颠倒6次)。置37 ℃孵育1 h。65 ℃加热20 min使修饰反应停止。反应终止后,在该体系中加入异丙醇1 ml沉淀甲基化修饰的PCR片段,离心,晾干,加20 μl三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-EDTA,TE)溶解DNA。甲基化酶修饰体系见表3。

表3 甲基化修饰体系

试剂	体积(μl)
去离子水	14
10 × NEBuffer2	2
稀释的SAM	2
载体(1 μg)	1
CpG 甲基转移酶(4 U/μl)	1

1.1.7 目的片段与双酶切后的p氯霉素乙酰基转移酶3-增强子(p chloramphenicol acetyl transferase 3-Enhancer, pCAT3-Enhancer)重组载体的构建 将pCAT3-Enhancer载体双酶切,经电泳后胶回收试剂盒回收。将未甲基化修饰的3个目的片段与

pCAT3-Enhancer连接,与pCAT3-Enhancer空载体分别转化至*E. coli* ER1793中(甲基化酶缺陷),将甲基化修饰的3个目的片段与pCAT3-Enhancer连接,与pCAT3-Enhancer空载体分别转化至*E. coli* JM109中(维持甲基化状态)。*E. coli* JM109经氨苄抗性及蓝白斑筛选阳性克隆,ER1793经氨苄抗性筛选,质粒提取试剂盒提取重组载体,酶切及PCR扩增鉴定,送测序鉴定其正确性。

1.2 重组载体分组与转染 将获得的重组载体分6组,在大肠埃希菌*E. coli* JM109中转化的重组体有:*cdc42*甲基化启动子区、甲基化修饰的任意片段以及pCAT3-Enhancer载体。在*E. coli* ER1793中转化的重组体有:*cdc42*启动子区、任意片段及pCAT3-Enhancer空载体。将6种载体转染至食管癌细胞株Eca109中。将食管癌细胞株Eca109 2 ml接种于6孔板中,24 h后吸去培养液,加入1.5 ml无抗培养液。加入转染试剂Opti-MEM及载体,完成后轻轻旋转混匀,37 ℃孵育6 h后,换为常规培养液,37 ℃孵育42 h。

1.3 CAT表达产物的提取及活性检测、定量

1.3.1 CAT表达产物的提取 移去培养液,用1 × PBS buffer轻洗3次,加入200 μl 1 × reporter lysis buffer,轻摇浸没细胞。室温静置15 min。用新的细胞刮刀刮擦板孔,倾斜6孔板,将细胞溶解产物转移到新的EP管中,旋转混匀10 ~ 15 s(冰浴),部分样品(用于CAT酶检测)60 ℃水浴锅放置10 min(目的是将内源性乙酰化酶失活)。13 000 r/min离心2 min,上清转移至新的EP管中。其余样品置于低温冰箱中。

1.3.2 CAT活性检测 在新的EP管中加入细胞提取物100 μl,加入CAT活性检测试剂(n-丁酰CoA 5 μl,氯霉素0.75 μl),加双蒸水至125 μl。设立阳性、阴性以及空白对照。37 ℃水浴锅放置6 h,之后置于高速离心机12 000 r/min瞬时离心。离心后加入500 μl乙酸乙酯,涡旋混匀1 min,12 000 r/min离心3 min,转移上层有机相至另一新的EP管中。开盖室温放置12 h,用以干燥样品。干燥后的样品中加入30 μl乙酸乙酯,反复吹吸悬浮样品,加样于

层析板上,薄层层析,结束后将层析板用塑料纸包裹,然后在X线片下曝光。

1.3.3 放射自显影检测 通过在层析板上出现的自显影的斑点数及位置来检测CAT催化氯霉素乙酰化的能力高低。斑点数越多及位置越靠前,代表CAT催化氯霉素乙酰化的能力越高。

1.3.4 CAT活性的定量分析 Bio-Rad Quantityone软件分析,灰度扫描后得到各乙酰化的氯霉素点的吸光度(optical density, OD)值,以吸光度为参数比较各组差异。

1.4 统计学处理 采用SPSS 15.0软件进行统计分析,数据经正态性检验呈正态分布后用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验对两组间均数进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *cdc42* 启动子区 CpG 岛及一不含 CpG 的 Random 序列 PCR 扩增结果 电泳结果显示,通过PCR扩增,得到*cdc42*启动子区CpG岛(标注1),片段大小853 bp;以及一不含CpG的Random序列(标注2),片段大小317 bp。见图1。

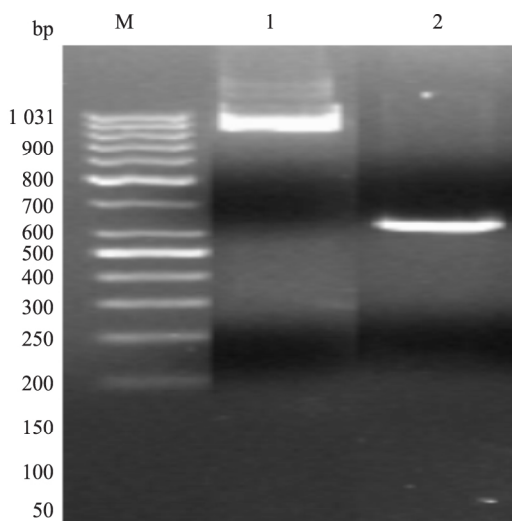


图1 *cdc42* 启动子区 CpG 岛及一不含 CpG 的 Random 序列 PCR 扩增图

M: Marker; 1 为 *cdc42* 启动子区 CpG 岛, 片段大小 853 bp; 2 为任意一段不含 CpG 的 Random 序列, 片段大小 317 bp

2.2 甲基化修饰结果 在体外将*cdc42*及Random片段CpG位点进行甲基化修饰,之后进行甲基化检测,甲基化修饰结果见表4。

2.3 对构建的重组体进行酶切 酶切电泳结果见图2。结果显示,甲基化后*cdc42*启动子区CpG岛-

pCAT3-Enhancer 重组体大小5 120 bp(标注1),甲基化后*cdc42*启动子区CpG岛-pCAT3-Enhancer 重组体酶切,大片段为载体4 273 bp,小片段为*cdc42*启动子区CpG岛847 bp(标注2),非甲基化*cdc42*启动子区CpG岛-pCAT3-Enhancer 重组体(标注3)非甲基化*cdc42*启动子区CpG岛-pCAT3-Enhancer 重组体酶切,大片段为载体4 273 bp,小片段为*cdc42*启动子区CpG岛847 bp(标注4),甲基化后Random-pCAT3-Enhancer 重组体4 548 bp(标注5),非甲基化的Random-pCAT3-Enhancer 重组体(标注6),甲基化后Random-pCAT3-Enhancer 重组体酶切,大片段为载体4 273 bp,小片段为Random311 bp(标注7),非甲基化的Random-pCAT3-Enhancer 重组体酶切,大片段为载体4 273 bp,小片段为Random311 bp(标注8)。

表4 *cdc42* 及 Random 甲基化修饰程度表

序列	CpG 位点(个)	甲基化位点	甲基化修饰率(%)
<i>cdc42</i>	18	18	100
Random	0	0	0

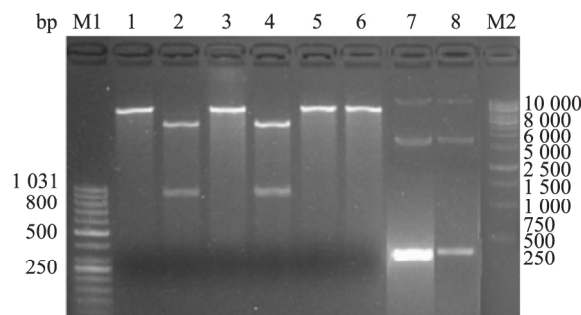


图2 重组载体及酶切电泳图

M: Marker; 1: 甲基化的*cdc42*启动子区CpG岛-pCAT3-Enhancer重组质粒; 2: 甲基化的*cdc42*启动子区CpG岛-pCAT3-Enhancer重组质粒酶切,大片段为4 273 bp的载体,小片段为853 bp的*cdc42*启动子区CpG岛; 3: 非甲基化的*cdc42*启动子区CpG岛-pCAT3-Enhancer重组质粒; 4: 非甲基化的*cdc42*启动子区CpG岛-pCAT3-Enhancer重组质粒酶切,大片段为4 273 bp的载体,小片段为853 bp的*cdc42*启动子区CpG岛; 5: 甲基化的Random-pCAT3-Enhancer重组质粒; 6: 非甲基化的Random-pCAT3-Enhancer重组质粒; 7: 甲基化的Random-pCAT3-Enhancer重组质粒酶切,大片段为4 273 bp的载体,小片段为317 bp的Random; 8: 非甲基化的Random-pCAT3-Enhancer重组质粒酶切,大片段为4 273 bp的载体,小片段为317 bp的Random

2.4 CAT表达的薄层层析结果 薄层层析结束后将层析板用塑料纸包裹,在X线片下曝光后结果2号、7号及9号样品在14碳氯霉素斑点的前面出现第2个乙酰化氯霉素斑点,2号、9号样品出现第3个二乙酰化氯霉素斑点。斑点的数目与CAT活性

成正比。见图 3。

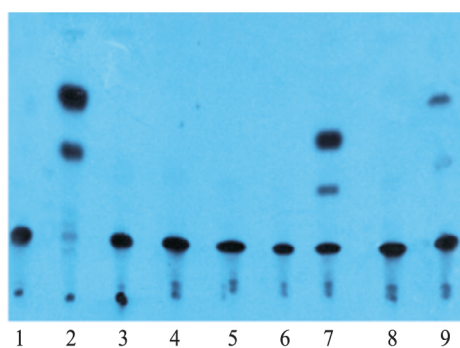


图 3 薄层层析法检测 CAT 的活性图

1: 空白对照; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照; 4: Random 甲基化重组体; 5: Random 非甲基化重组体; 6: *cdc42* 甲基化重组体; 7: *cdc42* 非甲基化重组体; 8: 甲基化 pCAT3-Enhancer 载体; 9: 非甲基化 pCAT3-Enhancer 载体

2.5 薄层层析分析报告基因 CAT 活性 薄层层析后将 X 线片在凝胶成像仪中拍照,用 Bio-Rad Quantityone 软件分析,获得各乙酰化氯霉素点的 OD 值,见图 4。经方差分析,多组均数比较得到 $F = 1\,081\,214.623$ 。与空白对照组比较,各组 OD 值差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。Random 甲基化重组载体与 Random 非甲基化重组载体组比较,表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。*cdc42* 甲基化重组载体与 *cdc42* 非甲基化重组载体比较,表达显著增高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

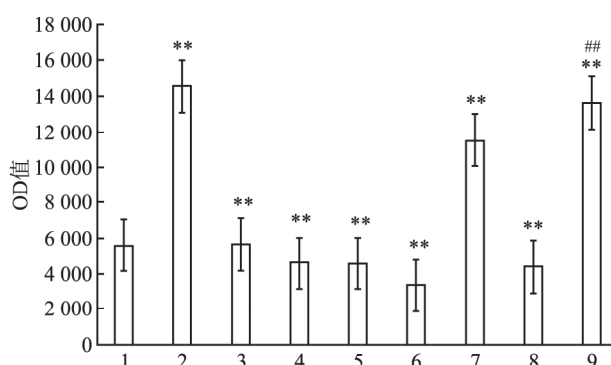


图 4 CAT 活性 OD 值比较图

1: 空白对照; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照; 4: Random 甲基化重组体; 5: Random 非甲基化重组体; 6: *cdc42* 甲基化重组体; 7: *cdc42* 非甲基化重组体; 8: 甲基化 pCAT3-Enhancer 载体; 9: 非甲基化 pCAT3-Enhancer 载体; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 *cdc42* 非甲基化重组体比较: ### $P < 0.01$

3 讨论

人类基因组 DNA 甲基化状态会受到体内外环境因素的影响而变化,其中包括内外环境因素,例如

理化因素、生物因素等。当甲基化时,染色体变得稳定,活性降低。基因表达受到两种不同机制的甲基化抑制^[10]。第一种方法是直接抑制,甲基化的染色体阻止转录酶的进入而阻止转录。第二种方法是间接抑制,两种类型的蛋白质甲基化结合蛋白——CpG 岛甲基化结合结构域和组蛋白去乙酰化酶被募集到染色体中,从而引起 DNA 甲基化和基因沉默^[11]。

当前甲基化调控研究集中在甲基化抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxy-cytidine 5-aza-dC)引起的甲基化水平降低,导致肿瘤抑制基因表达重新激活,进一步对细胞增殖产生抑制。甲基化抑制剂可以使甲基化的肿瘤抑制基因 CpG 岛去甲基化,从而治疗或减缓肿瘤的复发。5-aza-dC 可用作潜在的治疗指导^[10]。关于 DNA 甲基化和 DNA 甲基化调控基因表达复杂性的研究仍很少。Chou et al^[12]研究表明肺腺癌转录转移相关因子通过竞争性结合微小 RNA-1 (microRNA-1, miR-1) 从而影响 *cdc42* 的表达来调节乳腺癌细胞的迁移和侵袭。Shi et al^[13]研究显示 miR-29a、b、c 过度表达通过靶向作用于 *cdc42* 并随后降低磷酸化的 P21 激活激酶 1、2、3, LIM 激酶 1 和 2, 丝切蛋白来抑制神经胶质瘤细胞迁移和侵袭,此外 *cdc42* 表达与胶质瘤等级呈正相关,但与 miR-29a/b/c 表达和患者生存率呈负相关。目前暂无报道显示基因启动子区中 CpG 岛 DNA 序列的甲基化程度的改变直接参与基因表达的调节。课题组之前的研究结果表明,癌组织中 *cdc42* 的水平显著高于远端正常组织,且 35% 的标本与肿瘤转移相关。这些结果表明 *cdc42* 参与肿瘤细胞侵袭和转移调控与先前的研究结果一致,但 *cdc42* 基因的表达改变是否与启动子 CpG 岛甲基化的改变有关并不明确^[14]。

真核生物的基因调控机制很复杂,直接测定某基因上游调控元件的活性较难实现。若将该基因与一个易检测到活性的基因连接在一起构建成重组体,通过检测上游基因活性可间接监测下游基因的调控机制。当前应用最多的实验,是将目的基因的调控元件和报告基因构建在一起。本实验应用 *cdc42*CpG 岛 pCAT3-Enhancer 重组体(经甲基化修饰及未甲基化修饰的)转染至食管癌细胞株中,甲基化修饰的重组体与未甲基化修饰相比,CAT 酶的活性显著降低,说明在 Eca109 中,*cdc42* 启动子区 CpG 岛的甲基化降低了下游报告基因 CAT 酶的活性。*cdc42* 基因启动子区低甲基化或未甲基化,可能

参与了其在肿瘤组织中的高表达。

综上所述,在食管癌细胞株中 *cdc42* 基因启动子区甲基化状态的改变,参与调控了该基因表达的高低。

参考文献

- [1] Ushijima T. Epigenetic field for cancerization [J]. J Biochem Mol Biol 2007 40(2): 142–50.
- [2] Zuo T, Tycko B, Liu T M, et al. Methods in DNA methylation profiling [J]. Epigenomics, 2009 1(2): 331–45.
- [3] Kamiyama H, Suzuki K, Maeda T, et al. DNA demethylation in normal colon tissue predicts predisposition to multiple cancers [J]. Oncogene 2012 31(48): 5029–37.
- [4] Cornel K M C, Wouters K, Van de Vijver K K, et al. Gene promoter methylation in endometrial carcinogenesis [J]. Pathol Oncol Res, 2019 25(2): 659–67.
- [5] Li Y, Gong Y, Ning X, et al. Downregulation of CLDN7 due to promoter hypermethylation is associated with human clear cell renal cell carcinoma progression and poor prognosis [J]. J Exp Clin Cancer Res 2018 37(1): 276.
- [6] Boland C R, Shin S K, Goel A. Promoter methylation in the genesis of gastrointestinal cancer [J]. Yonsei Med J 2009 50(3): 309–21.
- [7] Taghavi N, Biramijamal F, Sotoudeh M, et al. p16INK4a hypermethylation and p53, p16 and MDM2 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. BMC Cancer, 2010, 10: 138.
- [8] Mohammad G S, Miotto E, Callegari E, et al. Associations of risk factors obesity and occupational airborne exposures with CDKN2A/p16 aberrant DNA methylation in esophageal cancer patients [J]. Dis Esophagus, 2010, 23(7): 597–602.
- [9] Sinha S, Yang W. Cellular signaling for activation of Rho GTPase *cdc42* [J]. Cell Signal 2008 20(11): 1927–34.
- [10] Liu Z, Zhang L, Ding F, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces retinoic acid receptor-beta(2) demethylation and growth inhibition in esophageal squamous carcinoma cells [J]. Cancer Lett, 2005, 230(2): 271–83.
- [11] Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin [J]. Gene, 2001 278(1–2): 25–31.
- [12] Chou J, Wang B, Zheng T, et al. MALAT1 induced migration and invasion of human breast cancer cells by competitively binding miR-4 with *cdc42* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 472(1): 262–9.
- [13] Shi C, Ren L, Sun C, et al. miR-29a/b/c function as invasion suppressors for gliomas by targeting *cdc42* and predict the prognosis of patients [J]. Br J Cancer, 2017, 117(7): 1036–47.
- [14] 刘赞, 李卉, 马文静, 等. *cdc42*、Rb 基因在哈萨克族食管癌中表达及其意义的研究 [J]. 地方病通报 2008 23(4): 1–4.

CpG island methylation in promoter of *cdc42* regulates the expression of report gene in Eca109

Liu Ling¹, Chen Yan¹, Li Hui², et al

(¹Basic Medical College, ²Central Laboratory, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011)

Abstract Objective To study whether the CpG island in the promoter of *cdc42* can be a regulator participated in the regulation of gene expression. The digestive tract cancer early related gene *cdc42* choosed as object, explored the change of their promoter CpG island methylation affect on the downstream report gene expression in esophageal cancer (EC) cell line Eca109, then got the relation of methylation and gene expression. **Methods** DNA cloning and thin layer chromatography (TLC) was used to detect the activity of chloramphenicol acetyl transferase (CAT). Used PCR to amplify *cdc42* gene promoter CpG island, and a sequence has not CpG islands, divided two sequences into two groups, one group was methylated, another group kept the original state. Constructed the recombinants one contained the methylated CpG island-pCAT3-Enhancer, another contained the unmethylated CpG island-pCAT3-Enhancer, transfected into the Eca109, detected the activity of CAT. **Results** After transfecting into Eca cell line, the activity of methylated empty vector CAT was significantly lower than that of unmethylated vector, and there was no difference between methylated and unmethylated random DNA-pCAT3-Enhancer recombinant CAT. The CAT activity of recombinant which has methylated *cdc42* promoter region CpG island-pCAT3-Enhancer was significantly lower than unmethylated. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** In EC cell line Eca109, methylated CpG island of *cdc42* reduces the CAT expression in the downstream, however, the unmethylated can maintain the high activity of CAT. This indicates that the change in the degree of methylation of CpG island in the promoter region of *cdc42* has the effect of regulate the expression of downstream genes.

Key words Eca109 cell line; *cdc42* gene; methylation; report gene