

靶向抑制 DNMT1 对人脑胶质瘤细胞增殖的影响

李 佳, 卞尔保, 贺小军, 马春春, 宗 钢, 王洪亮, 赵 兵

摘要 目的 应用靶向 DNA 甲基转移酶 1(DNMT1) 基因的小干扰 RNA (siRNA) 重组质粒来转染体外培养的人脑胶质瘤细胞, 观察其对胶质瘤细胞增殖活性的影响。方法 实验组予以 siRNA-DNMT1 序列进行转染, 对照组仅予以 siRNA-阴性对照序列。应用 qRT-PCR 分析 DNMT1 基因表达变化, Western blot 法分析 DNMT1、PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达变化, MTT 法检测细胞增殖生长能力, 细胞克隆法分析细胞增殖克隆形成能力。结果 与对照组比较, qRT-PCR 结果表明实验组 DNMT1 mRNA 表达明显减少 ($P < 0.01$); Western blot 法表明实验组 DNMT1、PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$); MTT 法检测表明实验组中活细胞数明显低于对照组 ($P < 0.05$); 细胞克隆法表明实验组细胞的增殖克隆形成能力明显低于对照组 ($P < 0.01$)。结论 靶向 DNMT1 基因的 siRNA 重组质粒可减少人脑胶质瘤细胞内 DNMT1 基因的表达, 从而抑制胶质瘤细胞的增殖。

关键词 胶质瘤; 基因; 转染; 细胞增殖

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0740-05

DNA 甲基化是指在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 作用下, 以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体, 将甲基转移至 DNA 某些碱基上的过程^[1]。在哺乳动物细胞中, 已知具有生物功能的 DNMT 包括 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B, 其中最重要的是 DNMT1^[2]。DNMT1 通过介导抑癌基因启动子 CpG 的甲基化促使其转录沉默^[3]。启动子甲基化异常导致的转录失活是多种肿瘤发病的共同机制之一^[4]。Kreth et al^[5] 发现 DNMT1 在人脑胶质瘤细胞中呈过度表达, 但 DNMT1 基因是否影响胶质瘤细胞增殖目前尚未见文献报道。该研究应用靶向 DNMT1 基因的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 重组质粒, 转染体外培养的人脑胶质瘤细胞, 敲减细胞内 DNMT1 基因的含量, 随后研究

其对胶质瘤细胞增殖活性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 人脑胶质瘤细胞株 A172 购自上海科学院细胞库; 培养基 DMEM、胎牛血清、胰酶消化液均购自美国 Hyclone 公司; 脂质体 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; DNMT1 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; PCNA、Cyclin D1 抗体购自北京博奥生公司; 7900 型荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司; 20 μ l 的反应体系包括: 10 μ l 2 \times SYBR Green PCR Master Mix 购自美国 ABI 公司、5' 和 3' 端引物 (3 μ mol/L) 各 1 μ l 和 1 μ l 的 cDNA 模板、7 μ l dd H₂O; 兔抗人 DNMT1、羊抗人 β -actin 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、兔抗羊 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; SynGene Bio Imaging 检测系统购自英国 SYNGENE 公司; MTT 试剂购自美国 Sigma 公司; DMSO 试剂购自上海碧云天公司; siRNA 寡核苷酸片段由上海吉玛制药技术有限公司合成。其中 siRNA-DNMT1 序列和 siRNA-阴性对照序列见表 1。

表 1 正义链和反义链序列

项目	序列 (5'-3')
siRNA-DNMT1	F: GGGACUGUGUCUCUGUUAUTT R: AUAACAGAGACACAGUCCCTT
siRNA-阴性对照	F: UUCUCCGAAACGUGUCACGUTT R: ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.2 细胞转染 A172 细胞常规培养于含 10% 灭活胎牛血清、100 mg/L 链霉素、10⁵ U/L 青霉素的 DMEM 培养液中, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度为 5% CO₂。每 1~2 d 用 0.25% 胰酶消化传代。将对数生长期的 A172 细胞消化, 1 000 r/min 离心 5 min 后, 加入适量的仅含胎牛血清、无抗生素的 DMEM 培养基计数, 按 50 \times 10⁴/ml 接种于培养瓶中。接种约 24 h 待细胞长至培养板 85%~90% 时, 第一组仅予以 siRNA 阴性对照序列 (对照组), 第二组予以 siRNA-DNMT1 序列 (实验组) 进行转染。

1.3 qRT-PCR 检测 A172 细胞中 DNMT1 基因表达变化 细胞转染后, 提取其总 RNA, 并逆转录为

2015-03-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (编号: 81402078); 国家自然科学基金面上项目 (编号: 81072066); 安徽省自然科学基金 (编号: 1508085MH194)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院神经外科, 合肥 230601

作者简介: 李 佳, 男, 硕士研究生;

赵 兵, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhaopumcmd@yeah.net

cDNA。在 PCR 仪中进行反应扩增, DNMT1 上游引物: 5'-CGGCTTCAGCACCTCATTG-3', 下游引物: 5'-AGGTCGAGTCGGAATTGCTC-3'; GAPDH 上游引物: 5'-AGCAAGAGCACAAGAGGAAG-3', 下游引物: 5'-GGTTGAGCACAGGGTACTTT-3'。反应条件如下: 50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s; 60 °C 1 min; 共 40 个循环。反应结束后分别记录实验组和对照组结果。应用 PCR 软件分析实验组和对照组达到荧光阈值时的循环次数 (cycle threshold, Ct), 用 DNMT1 基因的 Ct 值 - 内参基因的 Ct 值, 计算出 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值, 以衡量目的基因的表达强度。

1.4 Western blot 法检测 A172 细胞中 DNMT1 蛋白表达变化 细胞转染 48 h 后用胰酶消化, 用 PBS 洗 3 次。一抗为兔抗人 DNMT1、羊抗人 β -actin 多克隆抗体; 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、兔抗羊 IgG。按照 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit 操作说明, 加入化学发光试剂反应 5 min, 应用 Syngene Bio Imaging 检测系统观察并照相。

1.5 MTT 法检测细胞生长 实验分组同上。将转染后 A172 细胞按 1×10^4 /孔接种于 96 孔板, 常规培养。分别于 0、12、24、48 h 后弃培养基, 每孔加入 MTT (5 mg/ml) 10 μ l, 继续孵育 4 h 后吸尽每孔中的培养液, 加入 DMSO 150 μ l /孔, 水平摇床上振荡 5 min, 测定 492 nm 的吸光度 (absorbance, A) 值。以时间 (t) 为横坐标, 细胞存活率为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。存活率 = 实验组细胞 A 值 / 对照组细胞 A 值 $\times 100\%$ 。

1.6 细胞克隆实验检测细胞增殖 将转染后的 A172 细胞按 200 个 /孔接种于 6 孔板, 常规进行培养。每孔加入培养基 1.5 ml, 每 2 d 换液并观察细胞增殖情况。1 周后弃培养基, 每孔加入 4% 多聚甲醛 1 ml 固定 20 min, 再加入吉姆萨染料 0.5 ml 染色 25 min。弃去染料, 轻轻漂洗数次后晾干, 放置到显微镜下观察并进行拍照。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验或方差分析。

2 结果

2.1 qRT-PCR 法检测 A172 细胞 DNMT1 基因表达 qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比较, 在 mRNA 水平上实验组 DNMT1 的表达量明显低于对照组, 两组差异有统计学意义 ($t = 8.96$, $P < 0.01$) (见图 1)。

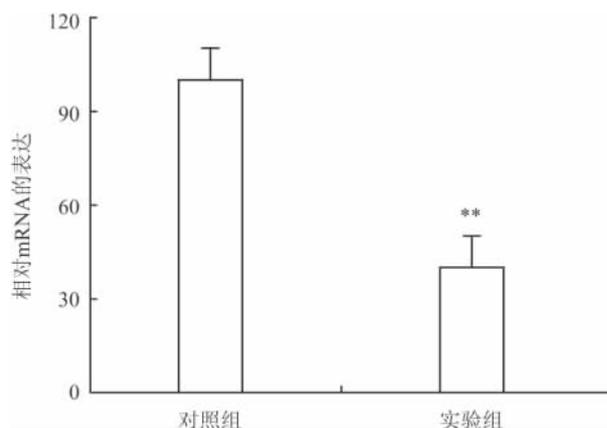


图1 实验组与对照组 DNMT1 mRNA 的表达情况
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.2 Western blot 法检测 A172 细胞 DNMT1 蛋白表达变化 Western blot 结果显示, 与对照组相比较, 两组内参 β -actin 蛋白的表达相近, 而实验组 DNMT1 蛋白表达明显减少, 两组差异有统计学意义 ($t = 10.32$, $P < 0.01$) (见图 2)。

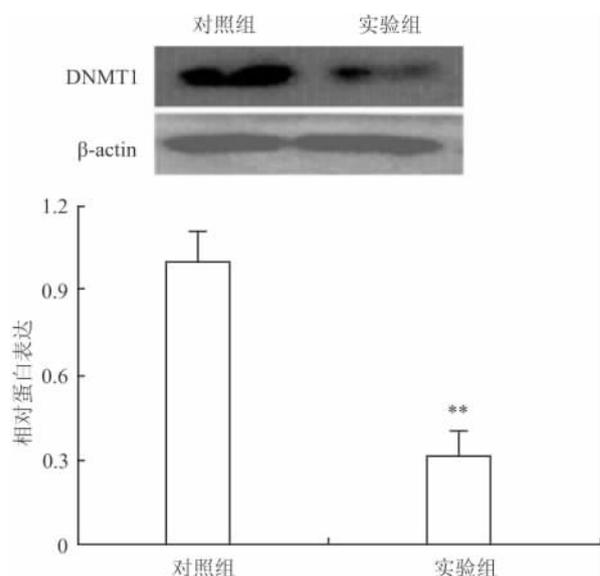


图2 实验组与对照组 DNMT1 蛋白的表达情况
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.3 MTT 法检测 DNMT1 基因对 A172 细胞增殖生长的影响 MTT 实验结果显示, 与对照组相比较, 实验组在转染 0、12、24 h 时 A172 细胞生长差异无统计学意义, 但转染 48 h 后, A172 细胞生长明显受抑制, 两组差异有统计学意义 ($F = 10.71$, $P < 0.05$) (见图 3)。

2.4 细胞克隆实验检测 DNMT1 基因对 A172 细胞增殖克隆形成能力的影响 1 周后将做细胞克隆

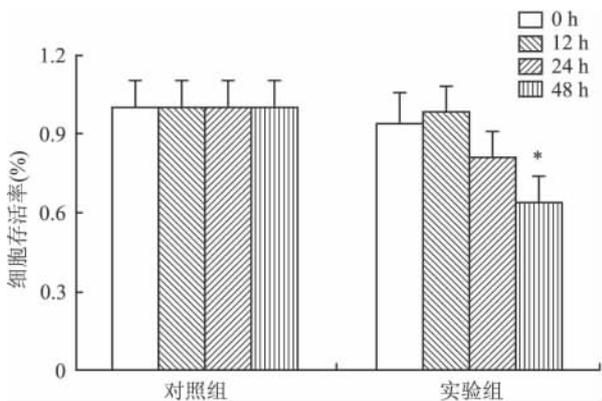


图3 实验组与对照组在不同时间点 A172 细胞增殖生长情况与对照组同一时间点比较: * $P < 0.05$

实验的 6 孔板放置在显微镜下,观察实验组与对照组细胞克隆增殖的情况。与对照组相比较,实验组细胞增殖明显受到抑制,两组差异有统计学意义 ($t = 11.96, P < 0.01$),见图 4。

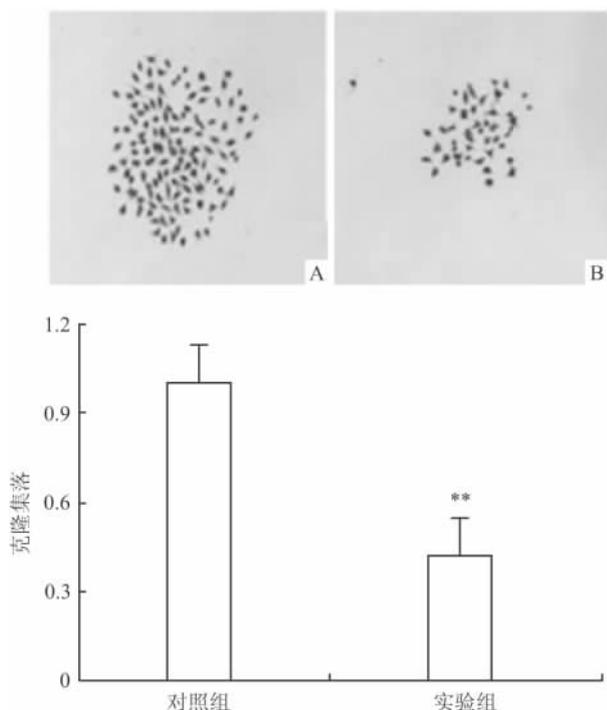


图4 实验组与对照组细胞克隆增殖形成情况 ×100
A: 对照组; B: 实验组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.5 Western blot 法检测 A172 细胞中 PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达变化 Western blot 结果显示,与对照组相比较,两组内参 β -actin 蛋白的表达相近,而实验组 PCNA 和 Cyclin D1 蛋白的表达明显减少,两组之间差异有统计学意义 ($t = 15.26, P < 0.01$),见图 5。

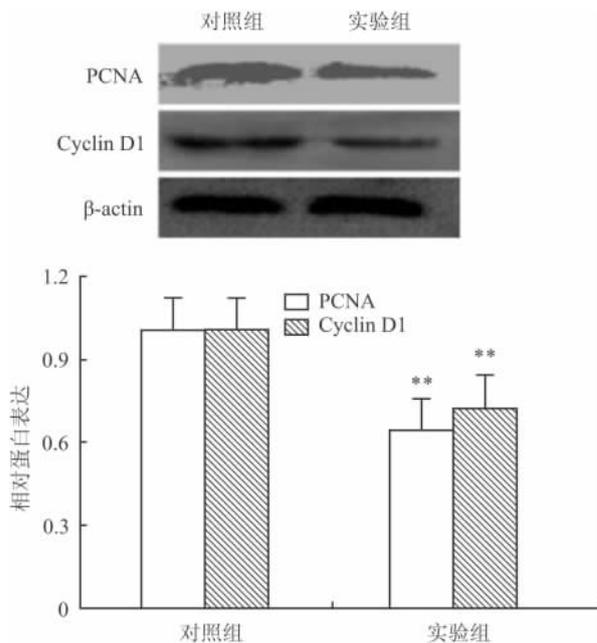


图5 实验组与对照组 PCNA 与 Cyclin D1 蛋白的表达情况与对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

恶性胶质瘤是成年人最好发的中枢神经系统恶性肿瘤。在全世界范围内原发中枢神经系统恶性肿瘤约是 6.3 例/每年每十万人,虽然发生率不高但其致死率很高^[6]。作为颅内最常见的恶性肿瘤,一直是神经外科研究的热点和难点。目前,胶质瘤的研究方向主要集中于阐明其发病机理,寻找与肿瘤相关的基因,从而寻找靶向治疗胶质瘤的药物。而能促进肿瘤细胞增殖的致癌基因无疑是这方面研究的热点。

DNMT1 是细胞生长发育必不可少的调控因子,可以通过影响基因组甲基化状态调整细胞内各种基因表达。目前,国内外已有很多文献^[7]和证据证实 DNMT1 与肿瘤关系密切,促进肿瘤增殖。本实验根据 DNMT1 基因的特点,采用稳定性好,操作简便的 siRNA 转染法将以靶向 DNMT1 的 siRNA 导入人脑胶质瘤细胞系 A172 中,将胶质瘤细胞内 DNMT1 基因敲减作为实验组,同时建立仅予以 siRNA 阴性对照序列的对照组与之相比较。对两组细胞进行实验后,首先 qRT-PCR 法和 Western blot 法结果证实 DNMT1-siRNA 可明显抑制胶质瘤细胞中 DNMT1 基因的 mRNA 转录和蛋白表达。随后,验证 DNMT1 是否影响胶质瘤细胞的增殖。MTT 实验结果显示实验组在转染 DNMT1-siRNA 后,细胞增殖生长明

显受到抑制,并且随着细胞生长时间的延长,抑制效应逐渐加强;克隆实验结果也显示实验组细胞增殖克隆形成能力明显受到抑制。实验结果均支持干涉 DNMT1 后,可以抑制胶质瘤细胞的增殖活性。由此可见 DNMT1 基因是一种重要潜在的原癌基因,在促进肿瘤增殖生长中起了不可或缺的作用。因此目前临床上常将其作为在基因水平上治疗肿瘤发生发展的重要靶点,是治疗肿瘤的关键基因之一。

最近有文献^[8]报道, DNMT1 促进肿瘤增殖的机制主要是通过催化抑癌基因的胞嘧啶发生甲基化,结合于抑癌基因或管家基因上游的转录调控元件(如 SP1 和 SP2) 结合位点,引起抑癌基因表达沉默;此外, DNMT1 可以与其他转录调控子(如 p21 等) 竞争性结合于 PCNA 上,干扰 PCNA 对转录的正常调控,从而促进肿瘤的增殖^[9]。

为进一步研究 DNMT1 调控胶质瘤细胞增殖的分子机制,检测了增殖相关蛋白 PCNA 与 Cyclin D1 在实验组和对照组中的表达。Western blot 结果显示敲减 DNMT1 基因后,实验组中增殖相关蛋白 PCNA 与 Cyclin D1 的表达和对照组比较明显抑制。以上实验结果提示,靶向敲减 DNMT1 基因从而抑制胶质瘤细胞的增殖可能与减少了增殖相关蛋白 PCNA 与 Cyclin D1 的表达有关。

结合以往的研究、文献报道及本实验结果综合考虑, DNMT1 基因与胶质瘤发生、发展密切相关。靶向敲减 DNMT1 基因后,明显抑制了 A172 胶质瘤细胞的增殖活性,这为胶质瘤临床基因治疗提供了新的思路和理论依据。最新有文献^[10-14]报道目前已经有针对 DNMT1 作用的药物应用于临床来治疗胶质瘤,如 5 氮杂-2-脱氧胞苷(5-Aza-dc);是一种 DNA 甲基转移酶抑制剂,通过抑制 DNMT1 的甲基转移活性来减弱其作用,从而达到减慢胶质瘤细胞增殖的治疗效果。

然而对于 DNMT1 基因还有许多问题需要进一步研究,如 DNMT1 基因对人脑胶质瘤细胞影响的确切作用机制、作用途径, DNMT1 基因与其他和胶质瘤相关的基因相互作用的关系,以及和 DNMT1 基因相关的体内实验是不是能得到相同的结论等。因此对于 DNMT1 基因的研究仍有广阔的前景和巨大的空间,需要不断地努力探索和开拓。

参考文献

- [1] Chen Z X, Riggs A D. DNA methylation and demethylation in mammals [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(21): 18347-53.
- [2] Kim J K, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(4): 596-612.
- [3] Bian E B, Huang C, Ma T T, et al. DNMT1-mediated PTEN hypermethylation confers hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 264(1): 13-22.
- [4] Bian E B, Zhao B, Huang C, et al. New advances of DNA methylation in liver fibrosis, with special emphasis on the crosstalk between microRNAs and DNA methylation machinery [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(9): 1837-44.
- [5] Kreth S, Thon N, Eigenbrod S, et al. O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) mRNA expression predicts outcome in malignant glioma independent of MGMT promoter methylation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e17156.
- [6] Hoffman S, Propp J M, McCarthy B J. Temporal trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1999 [J]. *Neuro Oncol*, 2006, 8(1): 27-37.
- [7] Robertson K D, Uzvolgyi E, Liang G, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(11): 2291-8.
- [8] Kishikawa S, Murata T, Kimura H, et al. Regulation of transcription of the Dnmt1 gene by Sp1 and Sp3 zinc finger proteins [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(12): 2961-70.
- [9] Araujo F D, Croteau S, Slack A D, et al. The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(10): 6930-6.
- [10] Yu J, Zhang H, Gu J, et al. Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviors of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma [J]. *BMC Cancer*, 2004, 4: 65.
- [11] Kim T Y, Zhong S, Fields C R, et al. Epigenomic profiling reveals novel and frequent targets of aberrant DNA methylation-mediated silencing in malignant glioma [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7490-501.
- [12] Ghoshal K, Bai S. DNA methyltransferases as targets for cancer therapy [J]. *Drugs Today (Barc)*, 2007, 43(6): 395-422.
- [13] 卢佳友, 卞修武. DNMT 在星形细胞瘤中的活性和表达及放疗对其影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2003, 25(22): 2029-31.
- [14] Gao Y, Guan M, Su B, et al. Hypermethylation of the RASSF1A gene in gliomas [J]. *Clin Chim Acta*, 2004, 349(1-2): 173-9.

非霍奇金淋巴瘤细胞株 JEOK 挥发性有机物的测定

储李婧, 夏海龙*

摘要 目的 寻找淋巴瘤细胞特征性的气体标志物,为应用呼气监测对淋巴瘤患者的早期诊断提供实验依据,评估固相微萃取-气相色谱/质谱技术(SPME-GC/MS)应用于淋巴瘤细胞顶空气体的检测的可行性。方法 采用 SPME-GC/MS 检测非霍奇金淋巴瘤细胞株 JEOK 细胞在培养瓶顶空气中挥发性有机物(VOCs)的成份,与人淋巴细胞株和空白对照组顶空气体中的 VOCs 比较,通过单样本秩和检验筛选出非霍奇金淋巴瘤细胞的特征性挥发性标志物。结果 在 JEOK 细胞培养瓶顶空气中可检测到二甲基硫、甲苯、邻二甲苯、1,3-二叔丁基苯、苯乙酮、十二烷,较人淋巴细胞升高;而乙醇、苯甲醛、正己醛明显减少。结论 非霍奇金淋巴瘤细胞株 JEOK 可以引起培养瓶顶空气中 VOCs 组成的改变,芳香族化合物与烷烃类化合物增多,乙醇及醛类含量减少,上述物质可能作为淋巴瘤细胞特征性标志物;SPME-GC/

MS 作为一种衡量物质检测方法,可以用于 JEOK 细胞株培养瓶顶空气中 VOCs 的检测。

关键词 非霍奇金淋巴瘤细胞株 JEOK;肿瘤;VOCs;气相色谱/质谱技术

中图分类号 R 552;R 733.41

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0744-05

淋巴瘤是我国常见的恶性肿瘤之一,全球发病率年增长率为 7.5%,是目前发病率增长较快的恶性肿瘤,全球每年死亡人数达 20 万^[1]。大部分淋巴瘤起病较为隐秘,多数患者在就诊时已属 III 期或 IV 期,直接影响患者使用药物的疗效和远期预后。因此开发有效、便捷的早期筛查手段相当重要。呼气分析是通过检测人体呼气中挥发性有机物(volatile organic compounds, VOCs)的改变,间接提示机体的细胞代谢及病理生理过程的改变,从而对疾病做出判断。该课题组曾运用质子转移反应质谱(proton transfer reaction-mass spectrometry, PTR-MS)检测 NB4 细胞顶空气体的改变,但 PTR-MS 只能依靠物质的质荷比推测 VOCs 成份;因固相微萃取与气相

2015-01-26 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:1308085MH159)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院血液内科,合肥 230022

作者简介:储李婧,女,硕士研究生;

夏海龙,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: xhl1999cn@163.com

* 对本文具有同等贡献

The effect of targeting inhibition of DNMT1 gene on the proliferation of human glioma cell

Li Jia, Bian Erbao, He Xiaojun, et al

(Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To transfect the human glioblastoma cells *in vitro* with the siRNA sequence targeting to DNA methyltransferase 1 (DNMT1) gene, and investigate its effect on proliferation of human glioblastoma cells. **Methods**

The experimental group was transfected by siRNA-DNMT1 sequence and the control group was given the siRNA negative sequence. The expression of DNMT1 gene was confirmed by qRT-PCR. The expression of DNMT1, PCNA and Cyclin D1, which were usually used as cell proliferation markers, was analyzed by Western blot. Cell survival and proliferation rate were determined by MTT and colony formation assay. **Results** Compared with the control group, qRT-PCR results showed that DNMT1 mRNA level was significantly decreased in DNMT1 siRNA transfected cells ($P < 0.01$). The protein expression levels of DNMT1, PCNA and Cyclin D1 were dramatically reduced in the experimental group as detected by Western blot ($P < 0.01$). MTT and colony formation assay results suggested that, the experimental group had a much lower cell survival ($P < 0.05$) and proliferation rate ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of DNMT1 gene of human glioblastoma cells *in vitro* is decreased by siRNA sequence targeting to DNMT1 gene, and the proliferation of human glioblastoma cells is also inhibited.

Key words glioblastoma; DNMT1; transfection; cell proliferation