

文章编号:1005-6947(2008)08-0755-05

· 基础研究 ·

胍曲嗪和丙戊酸对胆管癌 ASC/TMS1 基因甲基化的影响

舒艺¹, 李宏¹, 王冀¹, 汪昕², 王剑明¹, 邹声泉¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 普通外科, 湖北 武汉 430030; 2. 湖北省武汉市妇女儿童医疗保健中心 普通外科, 湖北 武汉 430016)

摘要:目的 研究甲基化酶抑制剂胍曲嗪和组蛋白脱乙酰化酶抑制剂丙戊酸联合干预对胆管癌细胞 QBC939, ASC/TMS1 基因甲基化调控的影响, 并探讨 caspase-1 介导的细胞凋亡与 ASC/TMS1 甲基化的关系。**方法** 利用胍曲嗪和丙戊酸单独或联合干预胆管癌细胞 QBC939, 用 Annexin-FITC 和 Propidium 双染检测干预后细胞凋亡率; 用 RT-PCR 和 MSP 技术检测干预后 ASC/TMS1 基因甲基化状态的改变和 mRNA 的转录水平, 用 RT-PCR 检测干预后 caspase-1 的 mRNA 转录水平。**结果** 单用胍曲嗪或丙戊酸盐干预对 ASC/TMS1 表达无明显恢复, 而联用以上两药后 ASC/TMS1 表达明显增加 ($P < 0.05$)。两药合用 48 h 组基因表达量高于合用 24 h 组表达量 ($P < 0.05$); 且 caspase-1 表达也明显增加 ($P < 0.05$), 胆管癌细胞生长明显受抑制, 凋亡率明显增加 (49.88 ± 0.044)%。**结论** 胍曲嗪和丙戊酸联合干预对 ASC/TMS1 去甲基化有明显的协同作用。两药联用后胆管癌细胞凋亡率的增加可能系因去甲基化后 ASC/TMS1 基因表达增加, 通过 caspase-1 途径诱导细胞凋亡。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(8): 755-759]

关键词: 胆管肿瘤; 基因, ASC/TMS1; DNA 甲基化; 细胞凋亡

中图分类号: R 735.8

文献标识码: A

The effects of hydralazine and valproic acid on the methylation of ASC/TMS1 of human cholangiocarcinoma cell line

SHU Yi¹, LI Hong¹, WANG Ji¹, WANG Xin², WANG Jianming¹, ZOU Shengquan¹

(1. Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huangzhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Department of General Surgery, Wuhan Medical & Healthy Center for Woman and Child, Wuhan 430016, China)

Abstract: Objective To investigate changes of methylation status of ASC/TMS1 in QBC939 cell line of cholangiocarcinoma before and after combined DNA methylation and histone deacetylase inhibitors treatment, and the correlation of the apoptosis which is induced by caspase-1, and methylation status of ASC/TMS1.

Methods Apoptosis was detected by mixed dye including both Annexin-FITC and Propidium with flow cytometry technique, and changes of methylation and transcription of mRNA were explored by RT-PCR and MSP techniques after the intervention of hydralazine and valproic acid either alone or combined for 24 hours and 48 hours. **Results** The transcription of mRNA of TMS1/ASC gene and caspase-1 re-expressed again after the combined intervention of hydralazine and valproic acid, which was higher than that of the cells treated with either hydralazine or valproate alone ($P < 0.05$). The demethylation effect of 48 h by combined intervention treatment was better than that of 24 h ($P < 0.05$). The growth of the QBC939 cell line was inhibited, and flow cytometry showed marked increase of apoptosis (49.88 ± 0.044)%. **Conclusions** TMS1/

收稿日期: 2008-05-26; 修订日期: 2008-07-01。

作者简介: 舒艺, 女, 华中科技大学同济医学院附属同济医院硕士研究生, 从事胆道肿瘤的甲基化与治疗方面的研究。

通讯作者: 邹声泉 E-mail: SqZou@tjh.tjmu.edu.cn

ASC gene and caspase-1 may re-express after the synergistical intervention of hydralazine and valproic acid, and the effect is more obvious as the treatment time is extended. The apoptosis of QBC939 cell line is increased, which may be induced by caspase-1 passway.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17 (8) : 755 - 759]

Key words: Biliary Tract Neoplasms; Gene, ASC/TMS1; DNA Methylation; Apoptosis

CLC number: R 735. 8

Document code: A

TMS1 / ASC^[1] 基因是近年来发现的一个备受关注的基因,包括 PYRIN 域和 CARD 域,它是信号复合物死亡控制域中的一部分,介导细胞凋亡和核因子- κ B 炎症反应信号通路。报道称在乳腺癌^[2]、前列腺癌^[3]、恶性神经胶质细胞瘤^[4]等多种肿瘤的发生过程中出现 TMS1/ASC 基因失活。Liu 等^[5]报道,胆管癌中 TMS1/ASC 基因出现明显的甲基化改变,导致肿瘤细胞抗凋亡和免疫监视逃逸等肿瘤发生的早期事件。Cruz^[6-9]报道胍曲嗪和丙戊酸可恢复因表观遗传学改变而失活的抑癌基因的表达。

本课题通过使用甲基化酶抑制剂胍曲嗪和/或去乙酰化酶抑制剂丙戊酸干预胆管癌细胞 QBC939,研究 TMS1/ASC 基因 mRNA 的表达及甲基化状态的改变,并探讨 caspase-1 介导的细胞凋亡和 ASC/TMS1 基因甲基化的关系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

胆管癌细胞 QBC939(第三军医大学西南医院王曙光教授惠赠),置于 5% CO₂, 37 °C 恒温培养箱培养。试剂:RPMI1640 培养基和 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司),胍曲嗪和丙戊酸(sigma 公司)。PCR 所用引物均购自 TAKARA 公司

1.2 实 验 方 法

1.2.1 分 组 (1) 实验组:药物溶于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中。将处于对数生长期的细胞分别给予胍曲嗪 1 μ mol/L(胍曲嗪组),丙戊酸 10 μ mol/L(丙戊酸盐组)和胍曲嗪 1 μ mol/L + 丙戊酸 10 μ mol/L(联合组)干预的胆管癌 QBC939 细胞。(2) 对照组:将处于对数生长期的细胞,加入同等量的不含药培养基。

1.2.2 检测技术和步骤

1.2.2.1 细胞凋亡检测 悬浮细胞离心(2 000 r/min, 5 min)后收集,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 次(2 000 r/min, 5 min),收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 细胞,500 μ L 结合缓冲液重悬浮细胞,5 μ L Annexin-FITC(膜粘连蛋白),5 μ L Propidium Iodide

(碘化丙啶),混匀,室温、避光反应 5 ~ 15 min 进行流式细胞仪观察和检测。

1.2.2.2 基因组 RNA 的提取和反转录-聚合酶连反应(RT-PCR) 采用 Trizol 试剂(Invitron 公司)取细胞总 RNA。用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Inc.) 将总 RNA 转录成 cDNA。使用设计的 mRNA 引物(表 1)扩增细胞系 cDNA。检测 TMS1/ASC 基因的 PCR 反应体积为 20 μ L, 96 °C 热启动 3 min, 后 96 °C 变性 30 s, 退火 60 °C 30 s, 72 °C 延伸 30 s; 共 34 个循环, 72 °C 延伸 40 min。PCR 产物在 3% 琼脂糖凝胶电泳中分析。检测 caspase-1 基因的 PCR 反应体积为 20 μ L, 96 °C 热启动 5 min, 后 94 °C 变性 30s, 退火 60 °C 45 s, 72 °C 延伸 1 min; 共 30 个循环, 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物在 3% 琼脂糖凝胶电泳中分析。

1.2.2.3 基因组 DNA 模板的修饰 在 25 μ L 体系中加入 22.5 μ L (50 ng/ μ L) DNA, 及 3 mol/L NaOH 液 2.5 μ L, 混匀后 42 °C 温育 30 min。再加入 275 μ L 新鲜配置的 3.6 mol/L 亚硫酸氢钠(pH5)10 mmol/L, 对苯二酚混合液, 混匀, 加盖矿物油, 55 °C 温育 15 h。用 DNAClean-up Sytem 回收 DNA, 用 NaOH(终浓度 0.3 mol/L)终止修饰反应, 37 °C 温育 15 min。最后用 10 mol/L 醋酸铵中和, 无水乙醇沉淀 DNA, 70% 乙醇漂洗后空气中干燥 15 min, 用 20 μ L 去离子水溶解 DNA, 4 °C 保存, 备用。

1.2.2.4 甲基化特异性 PCR PCR 反应扩增体系 25 μ L, 0.5 μ mol/L 上游引物, 0.5 μ mol/L 下游引物, 0.2 μ mol/L d NTPs, 10 ~ 20 ng 双亚硫酸盐修饰的 DNA, 0.1 U/ μ L Herculase 热启动聚合酶和 8% DMSO。检测 TMS1/ASC 基因的 PCR 反应: 95 °C 热启动 5 min, 后 95 °C 变性 30 s, 退火 58 °C 30 s, 72 °C 延伸 30 s; 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 40 min。PCR 产物在 3% 琼脂糖凝胶电泳中分析。

1.3 统 计 学 处 理

各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS13.0 软件统计包进行 *t* 检验和方差分析。

表1 本研究中所用的各种引物

引物用途	引物序列	产物长度(bp)
甲基化特异性 PCR	甲基化引物	
	正链:TTG TAG CGG GGT GAG CGG C	191
	反链:AAC GTC CAT AAA CAA CGC G	
	非甲基化引物	
正链:GGT TGT AGT GGG GTG AGT GGT	196	
反链:CAA AAC ATC CAT AAA CAA CAC A		
ASC/TMS1	正链:GGG GTT TTA ATT TAG AGG TTT GGG	455
反链:CCR ACC ATC TCC TAC AAA CCC ATA		
caspase-1	正链:AAG GTC CTG AGG GCA AAG AG	500
反链:GTC TTG CAG ATA ATG AGG GC		

2 结果

2.1 细胞凋亡率

联合组干预 24 h 和 48 h 后, QBC939 细胞凋

亡率高于胍曲嗪组和丙戊酸组。随干预时的间延长,联合组干预 48 h 后细胞凋亡率较干预 24 h 后更加明显(表 2)。

表2 胍曲嗪和丙戊酸对 QBC939 细胞凋亡率的影响

细胞凋亡率	空白组/ $\bar{x} \pm s$	胍曲嗪组/ $\bar{x} \pm s$	丙戊酸组/ $\bar{x} \pm s$	联合组/ $\bar{x} \pm s$
24 h	3.95 ± 0.007	13.04 ± 0.026 ¹⁾	10.82 ± 0.42 ¹⁾	17.40 ± 0.041 ²⁾
48 h	3.95 ± 0.007	26.30 ± 0.023 ¹⁾	12.51 ± 0.053 ¹⁾	49.88 ± 0.044

注:1)与联合组比较, $P < 0.05$; 2)与 48 h 组比较, $P < 0.05$

2.2 甲基化特异性 PCR (MSP) 分析

3 组 24 h 和 48 h TMS1/ASC 基因甲基化状态:空白组甲基化引物扩增出条带,而非甲基化引物未扩增出条带;干预 24 h,胍曲嗪组、丙戊酸组及联合组均同时出现甲基化和非甲基化条带;干预 48 h,联合组仅表现为非甲基化条带(图 1)。

2.3 ASC/TMS1 基因 RT-PCR 分析

联合组干预 24 h 和 48 h 后, ASC/TMS1 基因 mRNA 转录水平高于胍曲嗪组和丙戊酸组。随干预时的间延长,联合组干预 48 h 后基因 mRNA 恢复转录活性的恢复较干预 24 h 后更加明显。空白组无特异性扩增条带(图 2)。

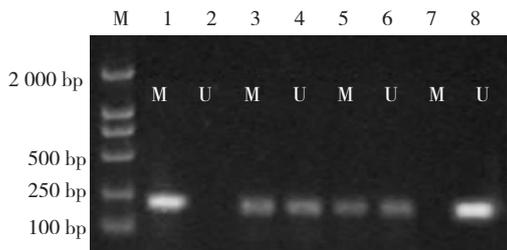


图1 48 h 后 ASC/TMS1 基因甲基化程度 1,2:空白组; 3,4:胍曲嗪组; 5,6:丙戊酸组;7,8:联合组; M0:Mark, DL2000; M:甲基化引物扩增产物; U:非甲基化引物扩增产物

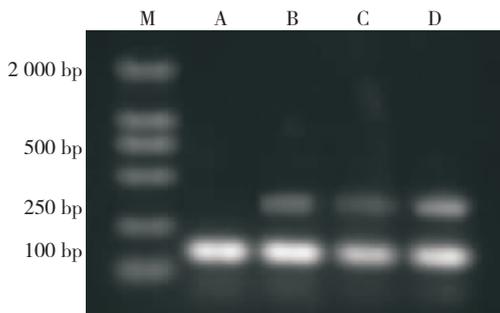


图2 48 h 后 ASC/TMS1 基因表达 M:DL2000; A:空白对照组; B:胍曲嗪组; C:丙戊酸组; D:联合组

2.4 caspase-1 基因 RT-PCR 分析

联合组干预 24 h 和 48 h 后, caspase-1 发生甲基化而转录沉默的 Caspase mRNA 转录活性恢复, 且转录水平均高于胍曲嗪组和丙戊酸组。随干预时间的延长, 联合组 Caspase mRNA 转录活性的恢复在干预 48 h 后较干预 24 h 后更加明显。空白组无特异性扩增条带(图 3)。

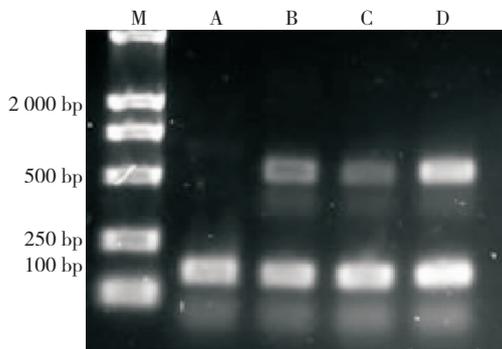


图 3 48 h 后 caspase-1 基因表达 M: DL2000; A: 空白对照组; B: 胍曲嗪组; C: 丙戊酸组; D: 联合组

3 讨论

DNA 甲基化导致基因表达变化是肿瘤形成的重要原因。目前已发现许多恶性肿瘤存在一个或多个抑癌基因 CpG 岛甲基化^[10], 这些基因的失活涉及多个环节^[11]。CpG 岛的甲基化引起抑癌基因失活是一个可以逆转的表观遗传学基因的修饰过程。目前认为同时抑制甲基化酶和组蛋白脱乙酰化酶有助于染色质恢复正常转录构型, 恢复抑癌基因的表达^[12]。

ASC/TMS1^[13-15] 翻译后的蛋白 CARD 控制区与 caspase-1 的 CARD 蛋白以 CARD-CARD 的形式相互作用结合激活 caspase-1, caspase-1^[16-17] 对产生前炎症细胞因子白细胞介素 1 和白细胞介素 8 及肿瘤坏死因子 TNF 具有重要作用。而 PYD 控制域同样可以在细胞凋亡和炎症信号通路中调节蛋白之间的相互作用。本实验 caspase-1 基因在联合干预后出现表达明显增加, 这可能是 ASC/TMS1 通过去甲基化表达增加后诱导细胞凋亡率明显升高。caspase 家族在细胞程序性死亡过程中起重要作用。

本实验还发现单用乙酰化酶抑制剂并不出现细胞凋亡率明显增加, 基因表达恢复也不明显, 推测其在去甲基化过程中, 对去甲基化酶抑制仅起协同辅助作用; 这符合 Cameron^[18] 的报道。Zhu^[19] 也曾报道对肺癌细胞株联合应用上述两种抑制剂证实在乙酰化酶抑制剂存在条件下可以

增强去甲基化酶抑制剂的作用。

总之, 高甲基化状态导致 TMS1/ASC 基因沉默, 通过减少炎症因子的产生和影响 caspase 介导的细胞凋亡过程促进胆管癌的发生。联合给予甲基化酶抑制剂和脱乙酰化酶抑制剂能去启动子甲基化, 增加 TMS1/ASC 的表达, 同时可能通过 caspase-1 途径诱导胆管癌细胞凋亡率的增加。

参考文献:

- [1] Parsons MJ, Vertino PM. Dual. Role of TMS1/ASC in death receptor signaling [J]. *Oncogene*, 2006, 25 (52): 6948 - 6958.
- [2] Taro Yokoyama, Junji Sagara, Xin Guan, *et al.* Methylation of ASC/TMS1, a proapoptotic gene responsible for activating procaspase-1, in human colorectal cancer [J]. *Cancer Letters*, 2003, 202(1): 101-108.
- [3] Pas PM, Ramachandran K, Vanwert J, *et al.* Methylation mediated silencing of TMS1/ASC gene in prostate cancer [J]. *Mol Cancer*, 2006, 5(1): 28.
- [4] Martinez R, Schackert G, Esteller M, *et al.* Hypermethylation of the proapoptotic gene TMS1/ASC: prognostic importance in glioblastoma multiforme [J]. *J Neurooncol*, 2007, 82(2): 133 - 139.
- [5] Liu XF, Zhu SG, Zhang H, *et al.* The methylation status of the TMS1/ASC gene in cholangiocarcinoma and its clinical significance [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2006, 5(3): 449 - 453.
- [6] Segura-Pacheco B, Trejo-Becerril C, Pérez-Cárdenas E, *et al.* Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(5): 1596 - 1603.
- [7] Arce C, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, *et al.* Hydralazine target: from blood vessels to the epigenome. [J]. *J Transl Med*, 2006, 4(1): 10 - 25.
- [8] Zambrano P, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, *et al.* A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes [J]. *BMC Cancer*, 2005, 5(1): 44 - 55.
- [9] Chávez-Blanco A, Segura-Pacheco B, Pérez-Cárdenas E, *et al.* Histone acetylation and histone deacetylase activity of magnesium valproate in tumor and peripheral blood of patients with cervical cancer. A phase I study [J]. *Mol Cancer*, 2005, 4(1): 22 - 30.
- [10] Leung WK, Yu J, Ng EK, *et al.* Concurrent hypemethylation of multiple tumor related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues [J]. *Cancer*, 2001, 91(12): 2294 - 2301.
- [11] Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases and cancer [J]. *Oncogene*, 2001, 20(24): 3139 - 3155.
- [12] Egger G, Liang G, Aparicio A, *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy [J]. *Nature*, 2004, 429(6990): 457 - 463.
- [13] Bruey JM, Bruey-Sedano N, Newman R, *et al.* PAN1/NALP2/PYPAF2, an inducible inflammatory mediator that regulates NF- κ B and caspase-1 activation in macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(50): 51897 - 51907.
- [14] Mc Connell BB, Vertino PM. TMS1/ASC: The cancer connection [J]. *Apoptosis*, 2004, 9(1): 5 - 18.
- [15] Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, *et al.* The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1 [J]. *J. Biol. Chem*, 2002, 277(24): 21119 - 21122.
- [16] Fantuzzi G, Puren AJ, Harding MW, *et al.* Interleukin218 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice [J]. *Blood*, 1998, 91(6): 2118 - 2125.

- [17] Keller M, Rüeegg A, Werner S, *et al.* Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion [J]. *Cell*, 2008, 132(5): 818-831.
- [18] Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, *et al.* Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer[J]. *Nat Genet*, 1999,

21(1):103-107.

- [19] Zhu WG, Lakshmanan RR, Beal MD, *et al.* DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(4): 1327-1333.

文章编号:1005-6947(2008)08-0759-01

· 病案报告 ·

胃颗粒细胞瘤 1 例

马骏, 寸英丽, 艾良

(云南省肿瘤医院 腹部肿瘤外科, 云南 昆明 650118)

关键词: 胃肿瘤; 颗粒细胞瘤; 病例报告

中图分类号: R 735.2

文献标识码: D

患者 女, 41 岁。因剑突下胀痛 2 个月余入院。体查: 一般情况可; 心肺未见异常, 腹平软, 中腹部轻压痛, 未触及肿块, 肝脾未触及。胃镜检查: 食道、贲门、胃底未见异常, 胃体中段前壁见直径约 2.0 cm 黏膜下肿物, 顶部见约 0.5 cm × 0.6 cm 溃疡, 表覆白苔 (图 1)。取活检组织 3 块, 质稍硬。病理检查: (胃体黏膜) 慢性浅表性胃炎, 黏膜下见

少许束状梭形细胞, 取材局限, 不排除胃肠间质瘤可能 (图 2)。入院诊断: 胃间质瘤可能。手术情况: 触诊发现肿瘤位于胃体前壁, 光滑、质硬, 约 2.5 cm × 3.0 cm 大小。距离肿块边缘 3 cm 切开胃壁, 见肿块表面胃黏膜小部分浅溃疡, 底平坦、色白。将肿块及周边 3 cm 胃壁一并切除。术后剖视: 胃壁肌间见一肿块, 2.0 cm × 2.2 cm 大小, 切面灰白实

性, 与周围分界清。病理检查: 瘤细胞排列成条索状, 细胞界限不清楚, 胞质丰富, 呈嗜酸性颗粒状, 核小, 居中, 深染, 圆形 (图 3)。免疫组化: Vim (+), SMA (-), Syn (-), Ck (-), CD117 (-), NSE (+), S-100 (+), CD34 (-), CD68 (+), Des (-), IgA (-)。符合颗粒细胞瘤, 不排除恶性。



图 1 胃镜下病灶改变

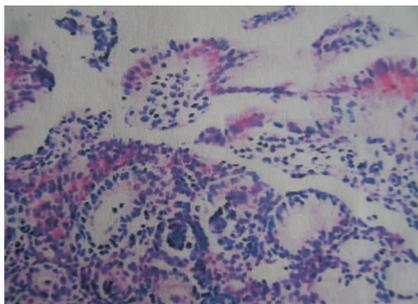


图 2 组织活检病理改变

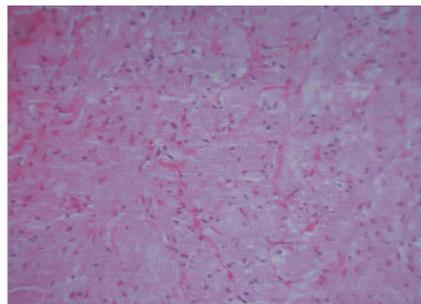


图 3 术后病理切片

讨论 颗粒细胞肿瘤 (granular cell tumor, GCT) 较少见, 由 Muller 于 1836 年和 Virchow 于 1854 年首先描述。1926 年 Abrikosoff 认为此瘤是一种良性肿瘤, 来源于肌肉并常发生于舌部, 并将之命名为成肌细胞肌瘤。近年来随着内镜及免疫组化的广泛开展, 发现其组织学起源为雪旺氏细胞来源。GCT 可见于全身各部位, 消化道颗粒细胞瘤少见, 仅占全部颗粒细胞瘤的 1%~8%, 其中以食管最为

常见, 其次是胃、结肠和胆道。此瘤可发生于任何年龄, 但多见于 40 岁左右的患者, 女性多见。多数患者无症状, 于内镜检查时偶然发现, 并经病理证实; 少数患者表现有吞咽不畅、厌食、呕吐、腹部不适或消化道出血等症状。此瘤在内镜下难于同胃肠道间质瘤 (gastrointestinal stromal tumor, GIST) 鉴别, 免疫组化该瘤 S-100 蛋白弥漫阳性, c-kit/CD117 阴性 (GIST 则相反) 是主要鉴别点。绝大多数 GCT 为良性, 恶性颗粒细胞瘤极少见。当细胞及核出现异形性, 有明显的核仁及核分裂相 (> 5/50HPF) 时, 要高度怀疑恶性的可能。瘤组织体积大 (> 5 cm), 生长迅速, 有淋巴结转移及血管浸润是较细胞

形态学为可靠的恶性依据。但文献中有近 1/3 的恶性肿瘤直径在 4 cm 以下, 所以大小不能作为一个独立的指标来预测生物学行为, 而只能在组织学证据不足时作为一项重要的参考因素。在治疗方面, 较小的肿瘤可选择通过内镜下切除或局部切除, 而对于恶性颗粒细胞肿瘤, 广泛性局部切除手术加上必要的区域淋巴结清扫仍是目前最主要的治疗手段, 辅助性化疗和 (或) 放疗并不能明显改善患者的预后^[1]。

参考文献

- [1] 王坚, 朱雄增, 张仁元. 恶性颗粒细胞瘤 10 例临床病理学观察及文献复习 [J]. *中华病理学杂志*, 2004, 33(6): 497-502.

收稿日期: 2008-05-10。

作者简介: 马骏, 男, 云南省肿瘤医院主治医师, 主要从事胃肠肿瘤外科方面的研究。

通讯作者: 马骏 E-mail: mddiou@gmail.com