

文章编号:1005-6947(2006)03-0190-05

· 实验研究 ·

反义调控 DNA 甲基转移酶 3b 基因对人胆管癌 细胞 QBC939 生长的影响

左石¹, 邹声泉¹, 陈勇军¹, 陈波¹, 唐启彬²

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 胆胰外科, 湖北 武汉 430030; 2. 中山大学附属第二医院 普通外科, 广东 广州 510120)

摘要:目的 观察转染反义 DNMT3b 基因真核表达质粒对人胆管癌细胞 QBC939 生长的影响, 初步探讨 DNMT3b 基因在胆管癌发生中的作用。方法 构建反义 DNMT3b 基因真核表达质粒, 用脂质体介导法将其转入人胆管癌细胞株 QBC939; Western blot 检测转染前后 DNMT3b 蛋白表达的变化; MTT 法和软琼脂克隆形成试验观察细胞的生长增殖能力; 流式细胞术观察细胞生长周期及凋亡率的变化。结果 转染反义基因能使 DNMT3b 蛋白表达水平降低; 转染反义 DNMT3b 基因不能抑制 QBC939 的生长曲线, 对其软琼脂克隆形成率亦无影响 ($P = 0.717$); 转染反义 DNMT3b 基因不能改变 QBC939 的细胞周期和促进细胞凋亡 ($P = 0.089$)。结论 转染反义 DNMT3b 基因真核表达质粒可下调 DNMT3b 在 QBC939 细胞中的表达水平, 但对 QBC939 的生长和增殖无影响, 也不能改变 QBC939 的细胞周期和促进细胞凋亡的发生。

关键词:胆管肿瘤/遗传学; 胆管癌细胞; 反义调控 DNA 甲基转移酶

中图分类号:R735.8; Q522 **文献标识码:**A

Effect of down-regulating DNMT3b expression by transfection with antisense gene on the growth of human cholangiocarcinoma cell line QBC939

ZUO Shi¹, ZOU Sheng-quan¹, CHEN Yong-jun¹, CHEN Bo¹, TANG Qi-bin²

(1. Department of Pancreatic-Biliary Surgery, the Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science & Technology University, Wuhan 430030, China; 2. Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of transfection with antisense DNMT3b gene eukaryotic expression plasmid on the growth of human cholangiocarcinoma cell line QBC939, and to explore the role of DNMT3b in the cholangiocarcinoma tumorigenesis. **Methods** The constructed antisense DNMT3b gene eukaryotic expression plasmid was transfected into QBC939 cells using liposome. The expression level of DNMT3b protein was detected by Western blot after stable transfection. The growth curves of transfected cells and un-transfected cells were observed by MTT method respectively. The cell proliferation ability was also observed by the test of colony formation in soft agar. The alterations of the cell cycle and the apoptosis rate were detected by FCM. **Results** Following the transfection, the protein level of DNMT3b decreased significantly; transfection with antisense DNMT3b gene eukaryotic expression plasmid did not affect the cell growth curve of QBC939, and did not decrease the cell colony formation rate ($P = 0.717$); transfection with antisense DNMT3b gene also did not result in cell cycle alterations or induce cell apoptosis ($P = 0.089$). **Conclusions** Transfection with antisense DNMT3b gene eukaryotic expression plasmid can down-regulate the expression level of DNMT3b in QBC939. It can not affect the growth and proliferation of human cholangiocarcinoma cell line QBC939, nor alter the cell cycle and induce cell apoptosis.

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2002AA214061)。

收稿日期:2005-09-17; **修订日期:**2006-02-23。

作者简介:左石,男,湖南道县人,华中科技大学同济医学院附属同济医院讲师,主要从事胆胰肿瘤的基础与临床方面的研究。

通讯作者:邹声泉 电话:027-83662398; E-mail:sqzou@tjh.tjmu.edu.cn。

Key words: Bile Duct Neoplasms/genet; Biliary Tract Carinoma Cell Line; Antisens Regulating DNMT36

CLC number: R735.8; Q522

Document code: A

研究表明, DNA 甲基化是许多抑癌基因表达缺失的表遗传学原因, 与肿瘤的发生发展密切相关^[1-3]。DNA 甲基化是由 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)催化发生的^[4]。DNA 甲基转移酶 3b (DNA methyltransferase 3b, DNMT3b) 是 DNMTs 家族成员之一, 其功能主要是参与从头甲基化(de novo methylation)。许多研究显示^[5-8], DNMT3b 在多种肿瘤细胞和组织中存在不同程度的高表达, 且与抑癌基因启动子高甲基化状态有明显关系。本课题组在前期研究中应用甲基转移酶抑制剂 5-氮-2-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)对胆管癌细胞的生长周期进行了观察^[9-10], 发现 5-Aza-CdR 可以在体内外抑制胆管癌细胞的增殖, 并促进其凋亡。说明 DNMTs 在胆管癌的发生、发展中扮演着重要角色。为了进一步研究 DNMT3b 基因在胆管癌细胞 QBC939 中的表遗传学机制, 笔者通过构建反义 DNMT3b 基因真核表达质粒, 用脂质体转染入人胆管癌细胞 QBC939 中, 观察其对 QBC939 细胞生长和增殖能力、生长周期和凋亡率的影响, 初步探讨 DNMT3b 基因在胆管癌发生发展中的作用, 为胆管癌的基因治疗提供新的理论依据。

1 资料和方法

1.1 材料

胆管癌细胞株 QBC939 由第三军医大学王曙光教授惠赠。真核表达载体 pcDNA3.1(+)由同济医学院黄保军博士和徐军发博士惠赠。RPMI1640 培养基和胎牛血清购自 Hyclone 公司; 质粒抽提试剂盒购自上海博亚生物技术公司; 脂质体 Lipofectamine 2000TM, G418 和 Trizol 购自 Invitrogen 公司; 限制性内切酶购自 NEB 公司; 逆转录试剂盒和聚合酶链式反应试剂盒购自 MBI 公司; 鼠抗人 DNMT3b 单克隆抗体购自 IMGENEX 公司; HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中山公司(Pierce 产品)。所有引物均由上海生工生物工程公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 反义 DNMT3b 基因真核表达质粒的构建与鉴定 根据 GenBank 中 DNMT3b 基因(收录号: NM_006892)的 cDNA 序列设计引物。上游引物为 5'-GAA ATC TAG AGT GTC CTT CCA CCC TCT CTT-3'; 下游引物为 5'-AAA TGG TAC CTA CCT TTA TGC CCA ACT C-3', 扩增片段长度为 485bp(1 641 ~ 2 125 bp)。划线部分分别为 Xba I 和 Kpn I 酶切位点。通过 RT-PCR 获得目的 DNA 片段, 将其反向插入真核表达载体 pcDNA3.1(+)的 Kpn I 和 Xba I 多克隆位点中进行构建, 并通过酶切鉴定和 DNA 测序鉴定。将构建好的反义 DNMT3b 基因真核表达质粒命名为 pcDNA-DNMT3b(AS)。

1.2.2 细胞转染与转染后鉴定 按照 Lipofectamine 2000TM说明书进行转染, 并用 pcDNA3.1(+)空质粒作为实验对照, 未转染组为空白对照。转染后 72h, 用 800 μg/mL 的 G418 进行筛选直至出现阳性集落。挑取单个细胞克隆进行传代培养, 用 200 μg/mL 的 G418 维持。将转染 pcDNA-DNMT3b(AS)的 QBC939 细胞命名为 QBC-DNMT3b(AS), 转染 pcDNA3.1(+)空质粒的 QBC939 细胞命名为 QBC-pcDNA。通过 PCR 检测外源性新霉素抗性基因(neomycin resistance gene, neo^R) 在转染细胞基因组中是否表达, 以确定转染是否成功。neo^R 基因引物序列和反应条件参见文献^[11]。

1.2.3 Western blot(免疫印迹)检测 DNMT3b 蛋白表达的变化 分别提取 QBC939, QBC-DNMT3b(AS)和 QBC-pcDNA 细胞的总蛋白, 经 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 电转移至 PVDF 膜上, 然后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2h; 漂洗后与一抗(1:200) 4℃ 缓慢摇动过夜; 用 TBS-T 洗脱后与 HRP 标记的二抗(1:1 000)室温孵育 2~3h; 再用化学发光试剂显色、曝光检测各组细胞中 DNMT3b 蛋白的表达情况, 同时以 β-actin 作为内参照。

1.2.4 MTT(四甲基偶氮唑盐)法绘制细胞生长曲线 将各组细胞按 5×10^3 /孔(0.2 mL)接种于 96 孔板上, 每组设 3 个复孔, 共接种 7 板。每日取出 1

板,弃去培养液,生理盐水漂洗1遍;每孔加入MTT (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 20 μL ,继续培养4h;弃上清,生理盐水漂洗2遍,加DMSO 150 $\mu\text{L}/\text{孔}$,振荡10min,使紫色结晶充分溶解;用酶联免疫检测仪测定波长490nm下的光吸收值(A值)。然后以A值为纵坐标,以时间(d)为横坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.5 软琼脂克隆形成试验测定细胞增殖能力

通过软琼脂克隆形成试验计数克隆形成率,可对细胞的增殖潜力作相对定量分析。实验步骤按照参考文献^[12]进行。待细胞生长至80%融合,用0.25%胰酶消化后进行细胞计数。将 1×10^3 个细胞悬浮在含0.3%琼脂及10%血清的RPMI 1640中,然后铺在底层是0.5%琼脂的12孔培养板中,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 饱和湿度下培养2周后,置于倒置显微镜下计数含有50个细胞以上的克隆。按以下公式计算克隆形成率。克隆形成率(%) = (平均克隆数/接种细胞数) \times 100%。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期和凋亡

将各组细胞分别传代 2×10^5 个细胞至6孔培养板培养72h,制成细胞悬液。各取细胞约 1×10^6 个,用磷酸盐缓冲液(PBS)(pH7.4)洗涤离心后,75%冷乙醇2mL混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。PBS洗涤后,加入含有RNase的碘化丙啶(PI)(50mg/L)300 μL 染色,室

温避光孵育30min。用流式细胞仪(美国BD公司产品,型号为FACSCalibur)分析细胞周期和检测细胞凋亡率。

1.3 统计学分析

各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS12.0软件统计包进行多均数之间两两比较的方差分析。

2 结果

2.1 各组细胞中DNMT3b蛋白的变化

Western blot结果显示(图1),与未转染的QBC939细胞相比,QBC-DNMT3b(AS)细胞中的DNMT3b蛋白条带明显变细,亮度减弱,而QBC-pcDNA细胞中的DNMT3b蛋白的表达未发生明显改变。说明转染反义DNMT3b基因真核表达质粒能使QBC939细胞中内源性DNMT3b蛋白表达水平下调,转染空质粒pcDNA3.1(+)对其表达水平无明显影响。

2.2 细胞生长曲线的变化

与未转染组细胞QBC939相比,QBC-DNMT3b(AS)细胞和QBC-pcDNA细胞与之生长趋于一致(图2)。说明转染pcDNA-DNMT3b(AS)和pcDNA3.1(+)对QBC939细胞的生长曲线无影响。

1: QBC939; 2: QBC-DNMT3b(AS); 3: QBC-pcDNA

图1 Western-blot检测各组细胞中DNMT3b蛋白表达的变化

图2 各组细胞的生长曲线

2.3 细胞增殖能力的变化

QBC939的克隆形成率为(38.020 \pm 4.120)%, QBC-DNMT3b(AS)为(36.800 \pm 5.549)%, QBC-pcDNA为(36.100 \pm 7.069)%。分别与QBC939细胞相比,QBC-DNMT3b(AS)转染组($P = 0.717$)和QBC-pcDNA转染组($P = 0.569$)的差异均无显著性。

2.4 对细胞周期和细胞凋亡率的影响

QBC-DNMT3b(AS)转染组和QBC-pcDNA转染组的细胞周期和凋亡发生率与QBC939细胞相比,其间的差异均无显著性($P > 0.05$)。说明通过转染反义DNMT3b基因下调其表达水平对QBC939的细胞周期的影响不大,也不能促进细胞凋亡的发生(表1)。

表 1 各组细胞的细胞周期和凋亡率(%)

细胞周期	QBC939 对照组	QBC-DNMT3b(AS)转染组		QBC-pcDNA 转染组	
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	<i>P</i> 值	$\bar{x} \pm s$	<i>P</i> 值
G ₀ /G ₁ 期	46.22 ± 3.80 [†]	49.39 ± 4.18	0.162	48.35 ± 3.66	0.342
S 期	33.18 ± 2.81 [†]	30.61 ± 2.46	0.114	32.05 ± 2.41	0.480
G ₂ /M 期	20.60 ± 5.01 [†]	20.00 ± 3.05	0.797	19.60 ± 3.62	0.668
凋亡率	1.63 ± 0.27 [†]	2.24 ± 0.39	0.089	2.19 ± 0.42	0.118

注: † 分别与 QBC-DNMT3b(AS)转染组、QBC-pcDNA 转染组各项相应指标比较,均为 $P > 0.05$

3 讨论

大量表遗传学研究表明,肿瘤细胞的甲基化模式发生了异常改变,主要表现为基因组的整体低甲基化和特殊部位的高甲基化,并认为这种正常甲基化模式的破坏是肿瘤细胞的重要特征;这些异常甲基化可通过肿瘤抑制基因的沉默和原癌基因的活化参与细胞的癌变过程,并在肿瘤相关基因的表达调控中具有重要作用^[1-3]。

DNA 甲基化是在 DNMTs 的催化下发生的。目前发现的该家族成员包括 DNMT1, DNMT2, DNMT3a 和 DNMT3b 4 个基因^[4]。其中 DNMT3b 定位于 20q11.2, cDNA 全长 4195 bp, 编码 859 个氨基酸的蛋白,其 C 端区域含有 5 个高度保留的 DNA 甲基转移酶基序, N 端含有一个富含半胱氨酸的区域。DNMT3b 基因的功能主要是参与从头甲基化 (de novo methylation), 即在无甲基化的 DNA 双链上进行甲基化的过程,在哺乳动物的胚胎植入和发育过程中发挥着重要作用。该基因在未分化的胚胎干细胞和睾丸组织中高表达,但在分化细胞和发育成熟的组织中几乎不表达。研究表明^[5-8], DNMT3b 在多种肿瘤细胞和组织中都存在不同程度的高表达,并可能通过抑癌基因启动子高甲基化和促使突变的不同机制参与肿瘤的发生。Beaulieu 等^[8]通过反义寡核苷酸降低 DNMT3b 在 A549 和 MDA-MB-231 等人类肿瘤细胞中表达水平的研究发现, DNMT3b 缺失可诱导抑癌基因 RASSF1A 的启动子去甲基化并使之重新表达,同时可抑制这些肿瘤细胞的生长,阻滞细胞周期

和促进细胞凋亡的发生。Leu 等^[13]利用 RNAi 对卵巢癌细胞 CP70 中的 DNMT1 和 DNMT3b 进行干预,结果显示单独下调 DNMT3b 表达对 TWIST, RASSF1A 和 HIN-1 等基因启动子的去甲基化效果和诱导这些基因重新表达的效果明显低于单独下调 DNMT1 表达或联合下调 DNMT1 和 DNMT3b,且对 CP70 细胞生长的影响甚微。提示 DNMT3b 在 CP70 细胞中扮演着次要角色。以上研究结果提示, DNMT3b 作为从头甲基化酶之一,在不同肿瘤组织和细胞中的作用尚需进一步探讨。

胆管癌是危害人类健康的恶性肿瘤,其发生与 p16 和 PTEN 等抑癌基因的表达降低和失活有关^[14-15],而启动子区高甲基化是这些抑癌基因缺失的原因之一。在本课题组前期研究^[9-10]中,笔者应用甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 作用于胆管癌细胞 QBC939 并观察其生长周期变化,发现 5-Aza-CdR 可在体内外抑制胆管癌细胞的增殖,促进细胞凋亡。说明 DNMTs 在 QBC939 中扮演着重要的角色。但究竟是 DNMT1, DNMT3a 或 DNMT3b 何者发挥主要作用,还是三者之间相互协同作用,目前尚无充分的实验依据。为此,本课题组进行了后续研究。本实验通过构建反义 DNMT3b 基因真核表达质粒,用脂质体介导将其转染到胆管癌细胞株 QBC939 中,观察反义调控 DNMT3b 表达对其生物学特性的影响,初步探讨该基因在 QBC939 中的作用。结果显示转染反义基因能调控 DNMT3b 的表达,使之降低。说明反义核酸技术作为一种基因下向调节作用方法,在抑制有关基因的表达上是有效的。在转染后的效应检测中,发现反义

调控 DNMT3b 基因对 QBC939 的生长和增殖没有影响,也不能改变 QBC939 的细胞周期和促进细胞凋亡的发生。其原因可能与细胞系有关,说明 DNMT3b 基因在 QBC939 细胞的生长和增殖中作用甚微,同时也说明肿瘤的发生是一个多基因、多因素参与的过程。结合前期研究结果^[9-10],提示甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 体内外抑制 QBC939 的增殖和促进其凋亡的主要机制可能与 5-Aza-CdR 抑制 DNMT3b 基因的活性无关,也提示 DNMT3b 基因在 DNMTs 介导胆管癌 QBC939 细胞恶变过程中可能起着协同作用。本研究为初步探讨 DNMT3b 在人胆管癌细胞 QBC939 中的表遗传学作用提供了实验依据,但有关 DNMT3b 在 DNA 甲基化中的作用以及与其他 DNMTs 成员的相互关系尚待进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(22): 4632 - 4642.
- [2] Egger G, Liang G, Aparicio A, *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy [J]. *Nature*, 2004, 429(6990): 457 - 463.
- [3] Ballestar E, Esteller M. The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(7): 1103 - 1109.
- [4] Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(19-20): 2571 - 2587.
- [5] Jin F, Dowdy SC, Xiong Y, *et al.* Up-regulation of DNA methyltransferase 3B expression in endometrial cancers [J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 96(2): 531 - 538.
- [6] Girault I, Tozlu S, Lidereau R, *et al.* Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(12): 4415 - 4422.
- [7] Nagai M, Nakamura A, Makino R. Expression of DNA (5-cytosin)-methyltransferases (DNMTs) in hepatocellular carcinomas [J]. *Hepatol Res*, 2003, 26(3): 186 - 191.
- [8] Beaulieu N, Morin S, Chute IC, *et al.* An essential role for DNA methyltransferase DNMT3B in cancer cell survival [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(31): 28176 - 28181.
- [9] 唐启彬, 孙华文, 邹声泉. 5-氮-2-脱氧胞苷体内外抑制胆管癌细胞生长的研究 [J]. *中华普通外科杂志*, 2004, 19(5): 295 - 297.
- [10] 唐启彬, 孙华文, 邹声泉. 甲基化抑制剂 5-氮-2-脱氧胞苷对胆管癌细胞株生长周期及凋亡影响的研究 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2004, 33(1): 34 - 36.
- [11] 陆嵘, 房静远, 朱红音, 等. 重组 DNA 甲基化酶 1 表达质粒对结肠癌细胞相关基因表达的影响 [J]. *中华消化杂志*, 2004, 24(2): 67 - 70.
- [12] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 2004. 249 - 250.
- [13] Leu YW, Rahmatpanah F, Shi H, *et al.* Double RNA interference of DNMT3b and DNMT3B enhances DNA demethylation and gene reactivation [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(19): 6110 - 6115.
- [14] 谷化平, 尚培中, 周翠玲. 胆管癌中 PTEN 和 p16 抑癌基因蛋白的表达及其临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(2): 101 - 102.
- [15] 高戈, 韦军民, 邹声泉, 等. 肝门胆管癌中 p16 基因突变及蛋白表达异常的研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(2): 98 - 100.