

PTEN 在胃癌细胞中的表达及其 CpG 岛甲基化状态的研究

刘芬,于皆平,邓全军,齐元玲,于红刚

Studying the Expression of PTEN and Its CpG Island Methylation Status in Gastric Carcinoma Cells

LIU Fen, YU Jie-ping, DENG Quan-jun, QI Yuan-ling, YU Hong-gang

Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract :Objective To detect hypermethylation status of the 5' CpG island locating in the promoter region of PTEN gene and the expression level of their mRNA and protein in 4 gastric carcinoma cells.

Methods Using methylation-specific PCR(MSP) technique to detect methylation status of PTEN gene in 4 different differentiation gastric cancer cells (HGC-27, MG-803, BGC-823, SGC-7901), RT-PCR and Western blot technique to detect their mRNA and protein expression level. **Results** Except SGC-7901, other three cells were detected hypermethylation of PTEN gene. The mRNA and protein expression were highest in SGC-7901 ($P < 0.01$), higher in BGC-823、MG-803 ($P < 0.01$) and lowest in HGC-27 ($P < 0.01$). The level of PTEN mRNA, protein expression and their differentiation were correlated. **Conclusion** Hypermethylation can inactivate the transcription of PTEN and reduce its protein expression. It may be a considerable mechanism which leads to oncogenesis, metastasis of gastric carcinoma.

Key words: Gastric carcinoma; PTEN gene; Methylation

摘要 目的 检测抑癌基因 PTEN 在四种胃癌细胞中 mRNA 和蛋白表达水平及其 5' 启动子区 CpG 岛甲基化状态。方法 采用甲基化特异性聚合酶链反应 (Methylation-specific PCR, MSP) 检测四种不同分化程度的胃癌细胞 (HGC-27, MG-803, BGC-823, SGC-7901) 中 PTEN 基因启动子区域甲基化状态, RT-PCR 和 Western blot 法分别检测其 mRNA 和蛋白表达水平。结果 除 SGC-7901 外, 其他三种细胞可检测到 PTEN 基因启动子的甲基化。PTEN mRNA 和蛋白表达水平依次为: SGC-7901 最高 ($P < 0.01$), BGC-823、MG-803 次之 (两者间无显著性差异, $P > 0.05$), HGC-27 表达水平最低 ($P < 0.01$), 其表达与细胞分化程度呈正相关趋势。结论 PTEN 基因启动子区异常甲基化可能导致该基因转录表达失活, 使其蛋白表达减少甚至缺失, 这可能是导致胃癌发生、发展的原因之一。

关键词: 胃癌; PTEN 基因; 甲基化

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)09-0632-03

0 引言

胃癌的发生涉及癌基因功能增强, 抑癌基因突变或功能缺失。作为第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因 PTEN (Phosphates and Tension homolog deleted on chromosome Ten), 在多种肿瘤中存在失活现象, 其失活的原因除突变、缺失外, 5' CpG 岛异常甲基化可能是其失活的第三条途径。本研究采用敏感的甲基化特异性 PCR (MSP) 方法检测 PTEN 基因启动子在四种不同分化程度的胃癌细胞中的甲基化状态, 并通过 RT-PCR 和 Western blot 法检测该四种细胞中 PTEN mRNA 水平和蛋白表达, 探讨

PTEN 甲基化改变、表达异常与胃癌的关系, 为胃癌的发生机制提供分子生物学依据, 以期为胃癌的治疗探索新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 胃癌细胞 HGC-27 (未分化), MG-803, BGC-823 (低分化), SGC-7901 (中分化) 购自上海生命科学研究院。

1.1.2 主要试剂 Trizol 试剂盒, RPMI1640 培养基 (Gibco 公司); 胎牛血清 (Hyclone 公司); 亚硫酸氢钠, 氢醌, 鼠抗人 β -actin 抗体, 硝酸纤维素膜 (Sigma 公司); Wizard DNA clean up system (Promega 公司); SssI 酶 (New England Biolabs 公司); 小鼠抗人 PTEN 抗体, ECL 试剂盒 (Santa Cruz 公司); PTEN 甲基化和未甲基化引物及 PTEN 和 β -

收稿日期: 2005-09-09; 修回日期: 2005-12-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300154)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院消化内科

作者简介: 刘芬 (1981-), 女, 硕士, 主要从事消化道肿瘤研究

表 1 用于 MSP、RT-PCR 各引物序列、产物大小和退火温度

引物	上游 5' to 3'	下游 5' to 3'	扩增 片段(bp)	退火 温度(℃)
PTEN-M	TTCGTTCCGCGTCGTCGTATTT	<u>GCCGCTTAAC</u> TCTAAACC <u>GCAACCG</u>	206	63
PTEN-U	GTGTGGTGGA GGTA GTTGT TT	<u>ACCACTTAAC</u> TCTAAACC <u>ACAACCA</u>	162	63
PTEN	ACCA GTGGACTGTTGTTTCAC	TTCCCTCTGGCCTGGTA TGAAAG	289	54
-actin	CGAGCGGGAAATCGTGCCTGACATTAAAGGAGA	CGTCA TACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC	479	56

注:MSP 两对引物中经亚硫酸氢钠处理后改变的碱基用黑体字标出,甲基化和非甲基化引物序列中碱基的不同用下划线标出

actin 引物由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 4 种细胞用含 10 % 胎牛血清 (56 灭活 30min), 100u/ml 青霉素和 100u/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养液 (pH 7.2), 在 37 ℃、5 % 的 CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 RT-PCR 检测 PTEN mRNA 水平 Trizol 一步法提取细胞总 RNA, 经逆转录后再以 cDNA 为模板扩增。PTEN 基因和 -actin 的引物序列, 见表 1。PTEN PCR 反应条件: 94 3min, 以 94 30s, 54 30s, 72 45s 循环 20 次, 72 延伸 7min; -actin PCR 反应条件: 94 3min, 以 94 40s, 56 45s, 72 60s 循环 20 次, 72 延伸 7min。1.5 % 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统拍照并检测吸光度值, 将 PTEN 与 -actin 吸光度比值作为其 mRNA 水平的相对值。重复实验 6 次, 取均值。

1.2.3 Western Blot 法检测 PTEN 基因蛋白表达水平 提取细胞总蛋白, Bradford 法测蛋白浓度。10 % PAGE 凝胶电泳, 电转, 加入一抗二抗, 显色。暗室内 X 光底片感光成像并进行图像分析, 计算条带的积分吸光度 (IA), 将 PTEN 与 -actin 吸光度值的比值作为其蛋白表达的相对值。上述步骤重复 6 次, 取均值。

1.2.4 DNA 的提取、修饰和纯化 用经典的蛋白酶 K-苯酚-氯仿法抽提细胞 DNA, 参照 Herman 的方法^[1], 依次采用氯化铯及亚硫酸氢钠, Wizard DNA clean up 试剂盒修饰, 纯化 DNA。完全甲基化对照是将正常人外周血淋巴细胞 DNA 与 SAM (终浓度 160 μM), 1 × NEBuffer2 和 1U 的 SssI 酶共同 37 ℃ 孵育 2h 后再经亚硫酸氢钠修饰; 完全未甲基化对照仅用亚硫酸氢钠处理; 阴性对照分别用没有经亚硫酸氢钠处理的 DNA 和 H₂O 代替模板 DNA 进行 PCR。

1.2.5 MSP 引物设计根据 PTEN 基因序列 (GenBank accession number AF143312), MethPrimer 软件, 并参照 Salvesen HB, Kang GH, Kang YH 等^[2-4]合成, 见表 1。25 μl PCR 反应总体积为: 10 × Taq 酶 Buffer 2.5 μl, dNTP 2.0 μl (终浓度 200 μM), Taq 酶 0.5 μl (1u), 上下游引物各

25 pmol, MgCl₂ 1.0 μl, 模板 DNA 2 ~ 3 μl, 补足水至 25 μl。反应条件为: 94 热启动 11 min 后开始 35 个循环: 94 40s, 63 45s, 72 1 min, 最后于 72 延伸 12 min, 4 °C 保存。产物经 8 % 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳溴化乙锭染色后在紫外光下观察, 凝胶成像系统拍照。

1.3 统计学分析

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 PTEN mRNA 和蛋白表达水平 见表 2。

mRNA 和蛋白水平 SGC-7901 细胞显著高于 HGC-27 细胞 ($t = 18.1536$, $P < 0.01$) 及 MG-803 和 BG-823 细胞 ($t = 9.010$, $P < 0.01$; $t = 7.4567$, $P < 0.01$), 后两者显著高于 HGC-27 细胞 ($t = 9.14$, $P < 0.01$; $t = 10.697$, $P < 0.01$), 但是 MG-803 和 BG-823 细胞之间蛋白表达水平无明显差异 ($t = 1.5535$, $P > 0.05$)。如图 1、2 所示。可见随着胃癌细胞分化程度的降低, PTEN mRNA 和蛋白表达逐渐减少, 两者呈正相关趋势。

表 2 四种胃癌细胞中 PTEN mRNA 和

蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

胃癌细胞系	mRNA 表达水平	蛋白表达水平
HGC-27	0.113 ± 0.047	0.353 ± 0.036
MG-803	0.228 ± 0.055	0.559 ± 0.091
BG-823	0.232 ± 0.063	0.594 ± 0.042
SGC-7901	0.336 ± 0.079	0.762 ± 0.029

2.2 PTEN 基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态

HGC-27 (未分化)、MG-803、BG-823 (低分化) 细胞, 两种引物均有目的片段的扩增, 提示了这三种细胞 PTEN 基因 CpG 岛发生了部分程度甲基化, SGC-7901 (中分化) 只有 PTEN-U 有目的片段的扩增, 提示其没有发生甲基化。完全甲基化阳性对照只扩增出 206 bp 的条带, 完全未甲基化阳性对照只扩增出 162 bp 的条带, 阴性对照均无目的条带扩增, 见图 3。

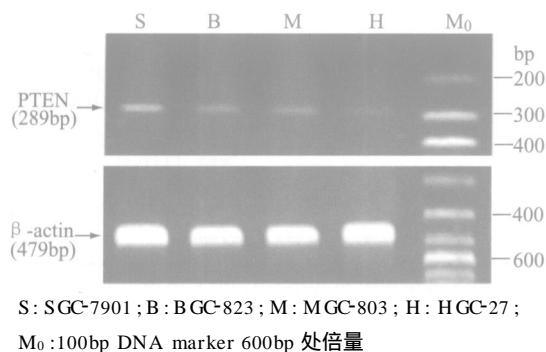


图 1 四种胃癌细胞系中 PTEN mRNA 的表达

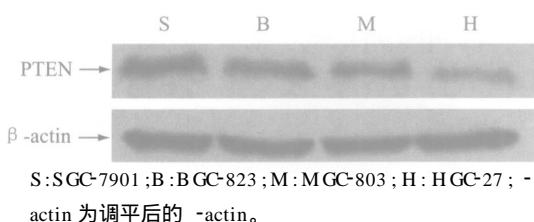
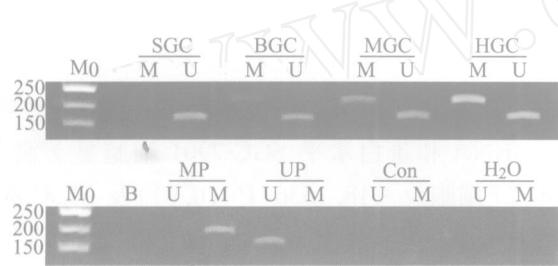


图 2 Western Blot 法检测四种胃癌细胞系 PTEN 基因蛋白表达水平



M :甲基化 ;U :未甲基化 ;MP:甲基化阳性对照;UP:未甲基化阳性对照;Con:代表未经亚硫酸氢钠处理的阴性对照;H₂O:阴性对照;B:空白对照;M₀:50bp DNA marker,250 bp 处倍量

图 3 MSP 法检测四种胃癌细胞系 PTEN 基因甲基化状态

3 讨论

自从抑癌基因 PTEN 被发现,至今已发现包括胃癌在内的多种肿瘤中都存在着 PTEN 改变,如子宫内膜癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、恶性黑色素瘤、非小细胞肺癌^[5-8]。肿瘤细胞中导致 PTEN 基因沉默的原因之一是缺失和突变;导致 PTEN 沉默的另一原因即是其 5'启动子区的 CpG 岛甲基化。PTEN 基因的 CpG 岛甲基化将导致转录抑制,进而导致其表达产物 PTEN 蛋白的减少甚至缺失。

本实验研究了四种胃癌细胞甲基化状态及其 mRNA 水平和蛋白的表达。HGC-27(未分化)、MGC-803、BGC-823(低分化)细胞 PTEN 基因启动子区 CpG 岛可检测到甲基化,SGC-7901(中分化)细胞则未检测到甲基化,且细胞分化程度越低,PTEN mRNA 与蛋白表达水平越低。这一结果与 Kang 等^[3]、Kang 等^[4]的报道一起说明 PTEN 在人

胃癌细胞和组织中均发生了一定程度的甲基化,这可能是引起 PTEN mRNA 表达减少并导致其蛋白表达减少或缺失的机制之一,但是,Sato 等^[9]研究却认为 PTEN 并未发生甲基化。这可能是由于 PTEN 基因启动子区富含的 CpG 岛并未全部发生甲基化,在进行 PCR 扩增中所设计的引物并未能针对已发生甲基化的区域扩增。另外,不同细胞株(即使是同一细胞株的不同细胞)来的 DNA 甲基化程度可能不一样,这都是导致结论不一的原因。另外我们发现,PTEN mRNA 和蛋白表达水平与细胞分化程度呈正相关趋势。一般来说,细胞分化程度越低,其恶性程度就越高,病人预后越差。

此实验通过对 PTEN 基因表达和甲基化状态的研究,为胃癌的发生机制提供了分子生物学依据,也为肿瘤的治疗提供了新的思路。但该结果仅从 DNA、RNA 和蛋白水平分析 PTEN 在胃癌发生发展中的异常改变,其参与肿瘤发生发展的机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93 (18) : 9821-9826.
- Salvesen HB, Stefansson I, Kretzschmar EI, et al. Significance of PTEN alterations in endometrial carcinoma: a population-based study of mutations, promoter methylation and PTEN protein expression[J]. International Journal of Oncology, 2004, 25 (6) : 1615-1623.
- Kang GH, Lee S, Kim WH, et al. Epstein-Barr Virus Positive Gastric Carcinoma Demonstrates Frequent Aberrant Methylation of Multiple Genes and Constitutes CpG Island Methylator Phenotype-Positive Gastric Carcinoma[J]. American Journal of Pathology, 2002, 160 (3) : 787-794.
- Kang YH, Lee HS, Kim WH, et al. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma[J]. Laboratory Investigation, 2002, 82 (3) : 285-291.
- Schondorf T, Ebert MP, Hoffmann J, et al. Hypermethylation of the PTEN gene in ovarian cancer cell lines[J]. Cancer Letters, 2004, 207 (2) : 215-220.
- Cheung TH, Lo KW, Yim SF, et al. Epigenetic and genetic alteration of PTEN in cervical neoplasm[J]. Gynecologic Oncology, 2004, 93 (3) : 621-627.
- Khan S, Kumagai T, Vora J, et al. PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers[J]. International Journal of Cancer, 2004, 112 (3) : 407-410.
- Furuta J, Umebayashi Y, Miyamoto K, et al. Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma[J]. Cancer Science, 2004, 95 (12) : 962-968.
- Sato K, Tamura G, Tsuchiya T, et al. Analysis of genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in gastric cancer[J]. Virchows Archiv, 2002, 440 (2) : 160-165.

[编辑:周永红]