

. 实验研究 .

胶质瘤细胞 GDNF 基因启动子 I 区甲基化水平 对其基因转录的影响

续继军 孟 铸 李志鹏 陈 欣 任庆先 秦 汉

【摘要】目的 探讨胶质瘤细胞胶质细胞原性神经营养因子(GDNF)基因启动子 I 区甲基化水平对其基因转录的影响。**方法** 体外培养胶质瘤 U251 细胞,加入不同浓度 5-氮杂胞苷(浓度分别为 1、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$)干预,以加入 PBS 为对照。采用重亚硫酸盐测序法测定 GDNF 基因启动子 I 区甲基化水平,RT-PCR 检测 GDNF mRNA 的表达。**结果** 与 PBS 组相比,1 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮杂胞苷对 GDNF 基因启动子 I 区甲基化水平无显著影响($P>0.05$),5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮杂胞苷均显著降低其甲基化水平($P<0.05$)。与 PBS 组相比,1 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮杂胞苷对 GDNF mRNA 表达水平无显著影响($P>0.05$),5 $\mu\text{mol/L}$ 5-氮杂胞苷显著增加其表达水平($P<0.05$),但随着浓度进一步增加(10、20 $\mu\text{mol/L}$),其表达水平逐渐降低。**结论** 5-氮杂胞苷对 GDNF 基因具有去甲基化作用;GDNF 启动子 I 区去甲基化能够增加 GDNF 基因的转录水平。

【关键词】 胶质瘤; U251 细胞; 胶质细胞原性神经营养因子; 启动子; 甲基化; 基因转录

【文章编号】 1009-153X(2015)07-0410-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Effect of methylation levels of GDNF gene promoter I region on its transcription in glioma U251 cells

XU Ji-jun¹, MENG Zhu¹, LI Zhi-peng¹, CHEN Xin¹, REN Qing-xian¹, QIN Han². 1. Department of Neurosurgery, Traditional Chinese Medical Hospital of Tengzhou City, Tengzhou 277500, China; 2. Department of Neurosurgery, Wuhan General Hospital, Guangzhou Command, PLA, Wuhan 430070, China

【Abstract】Objective To explore the effect of methylation levels of glia cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promoter I region on its transcription in glioma U251 cells. **Methods** The methylation levels of GDNF promoter I region were detected before and after intervention with different concentrations of 5-aza-CR in glioma U251 cells. The GDNF mRNA expression was detected by RT-PCR in each group. **Results** The methylation levels of GDNF gene promoter I region declined after the intervention with 5-aza-cR compared to the control group. The methylation levels of GDNF gene promoter I region were significantly lower in 5 μmol , 10 μmol and 20 μmol 5-aza-CR intervention groups than that in the control group ($P<0.05$). The level of GDNF mRNA expression in U251 cells was significantly higher in the 5 μmol 5-aza-CR intervention group than those in the control group and 1 μmol , 10 μmol and 20 μmol intervention groups ($P<0.05$). There were insignificant differences in the levels of GDNF mRNA expression in U251 cells among the control group and 1 μmol , 10 μmol and 20 μmol 5-aza-CR intervention groups ($P>0.05$). **Conclusion** The demethylation of GDNF gene promoter I region, which is produced by 5-aza-CR, may influence the expression of GDNF in U251 cell.

【Key words】 Glioma; GDNF; U251 cells; Promoter; Methylation; Expression

胶质瘤是颅内最常见的原发性肿瘤^[1],其发生发展是一个复杂的过程。基因突变以及表观遗传学修饰引起一些基因异常表达或沉默对肿瘤的发生至关重要^[2]。胶质细胞源性神经营养因子(glia cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)基因在人脑胶质瘤细胞中表达显著增高,被认为与胶质瘤关系最密切的生长因子之一^[3]。GDNF 是胶质瘤细胞强有力的促增殖因子,也能通过氨基末端激酶(

N-terminal kinase, JNK)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)等信号通路促进胶质瘤细胞侵袭^[4]。本研究应用甲基化转移酶抑制剂 5-氮杂胞苷干预胶质瘤 U251 细胞 GDNF 基因启动子 I 区甲基化修饰,观察 GDNF mRNA 表达的变化。

1 材料与方法

1.1 实验分组 培养胶质瘤 U251 细胞系,传至第二代时,加入 500 μl (浓度分别为 1、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$) 5-氮杂胞苷(美国 Sigma 公司)继续培养 48 h。以加入 PBS 为对照。

1.2 DNA 提取 采用 QIAamp DNA Mini and Blood

Mini Handbook 试剂盒(德国 Qiagen 公司)提取 U251 细胞 DNA。针对 GDNF 基因启动子 I 区 DNA 片段设计一对引物进行 PCR 扩增,引物序列上游为 5'-CAG AGA ATC TCA AAG GTG CA-3',下游 5'-ACG ACA TCC CAT AAC TTC-3'。PCR 扩增条件:98 ℃ 预变性 4 min,98 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 引物退火 15 s,72 ℃ 引物延伸 30 s,72 ℃ 最后延伸 10 min;共 30 个循环。

1.3 GDNF 基因启动子 I 区甲基化测定 采用重亚硫酸盐测序(bisulfite sequencing, BSP)技术测定甲基化程度。按上述方法提取 U251 细胞 DNA,应用 EZ DNA Methylation-Gold™ 试剂盒(美国 Zymo 公司)进行重亚硫酸盐处理。

针对 GDNF 基因启动子 I 区制定 2 对 BSP 引物,进行 PCR 扩增,引物 1 上游 5'-GAA GGG ATT AGG GTT AGA ATT TTT-3',下游 5'-CCC AAA CAA AAA CRA TAT TTC T-3';引物 2 上游 5'-ATG YGT TTG ATT TTA TTT TTA AAG A-3',下游 5'-CTA CRC RAA CAA ACR AAA-3'。反应体系:10×缓冲液 5 μl, MgCl₂ (50 mmol/L) 2 μl, dNTP (10 mmol/L) 1 μl, 正向引物 2 μl, 反向引物 2 μl, DNA 5 μl, Platinum Taq (美国 Invitrogen 公司) 0.3 μl, 双氧水 32.7 μl。循环条件:95 ℃ 5 min×1, 95 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s×42, 72 ℃ 10 min×1。将回收的 PCR 产物与 pMD19-T (日本 Takara 公司) 室温连接 2 h 以上,取 10 μl 连接产物转染 DH5a 感受态细胞,接种于含氨苄青霉素抗性 LB 平板,37 ℃ 培养过夜。每个平板挑 8 个克隆进行菌落 PCR 鉴定,将菌落 PCR 呈阳性的 5 个克隆接种于 3 ml LB 液体培养基中,37 ℃ 培养过夜,用质粒小量提取试剂盒(美国 Axygen 公司)提取质粒,并送测序。在 <http://quma.cdb.riken.jp/> 网站上对各样本测序结果进行甲基化程度分析。

1.4 RT-PCR 检测 GDNF mRNA 表达 每个细胞培养瓶加入 1 ml TRIzol, 然后加入氯仿 (TRIzol 的 1/5 体积), 剧烈震荡, 室温静置 5 min, 12 000 g、4 ℃ 离心 15 min, 取上清; 再加入等体积异丙醇, 混匀后静置 10 min。12 000 g、4 ℃ 离心 10 min, 收集沉淀。加入 75% 乙醇 1 ml, 混匀, 12 000 g、4 ℃ 离心 10 min, 收集沉淀, 加入适量双氧水重悬沉淀。核酸分析仪测 260 nm 与 280 nm 光密度比值(1.9~2.1), 计算核酸浓度。GDNF 上游引物 5'-ATA AAC AAA TGG CAG TGC TT-3', 下游引物 5'-TTA GCG GAA TGC TTT CTT AG-3'。PCR 反应体系: 5×buffer, 6 μl MgSO₄, 1.2 μl dNTP, 0.6 μl 正向引物, 2 μl 反向引物, 2 μl

RNA, 2 μl AVM, 0.6 μl Tfl, 0.6 μl 双氧水, 共 15 μl。反应条件: 94 ℃ 变性 30 s, 51 ℃ 复性 30 s, 72 ℃ 延伸 40 s; 共 38 个循环。取扩增样品 6 μl, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参, 以 GDNF 与 GAPDH 灰度比值描述 mRNA 相对量。

1.5 统计学分析 应用 SPSS 16.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和 *t* 检验, *P* < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-氮杂胞苷对胶质瘤 U251 细胞 GDNF 基因启动子 I 区甲基化修饰的影响 与 PBS 组相比, 加入不同浓度 5-氮杂胞苷作用 48 h 后, 1 μmol/L 5-氮杂胞苷对 GDNF 基因启动子 I 区甲基化水平无显著影响 (*P* > 0.05), 5、10 和 20 μmol/L 5-氮杂胞苷均显著降低其甲基化水平 (*P* < 0.05), 见图 1。

2.2 5-氮杂胞苷对胶质瘤 U251 细胞 GDNF mRNA 表达的影响 与 PBS 组相比, 加入不同浓度 5-氮杂胞苷作用后, 1 μmol/L 5-氮杂胞苷对 GDNF mRNA 表达水平无显著影响 (*P* > 0.05), 5 μmol/L 5-氮杂胞苷显著增加其表达水平 (*P* < 0.05), 但随着浓度进一步增加 (10、20 μmol/L), 其表达水平逐渐降低, 见图 2。

3 讨论

胶质瘤在传统意义上被认为是一种基因病, 其发生发展是一个复杂过程。多数学者认为正常细胞发育过程中, 某些肿瘤相关基因发生突变, 从而导致肿瘤的发生。最近的研究表明, 表观遗传学修饰引起一些基因异常表达或沉默与基因突变对肿瘤的发生至关重要^[5]。DNA 甲基化是最常见转录后表观遗传修饰方式之一, 它所引起的基因沉默和组蛋白以及核染色体相关蛋白的修饰在调节基因的表达以及核染色体的结构上发挥重要的作用。DNA 甲基化是一种酶介导的化学修饰, 是指 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 催化 S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体, 将胞嘧啶转变为 5-甲基胞嘧啶的一种反应。近年来, DNA 甲基化与胶质瘤相关性研究表明, 胶质瘤组织许多肿瘤抑制基因、细胞周期调控基因、损伤修复基因、肿瘤侵袭相关基因等启动子区域都发生异常甲基化修饰。

5-氮杂胞苷是有效的 DNMT 抑制剂, 通过在 DNA 复制过程中取代胞嘧啶及与 DNMT 形成共价

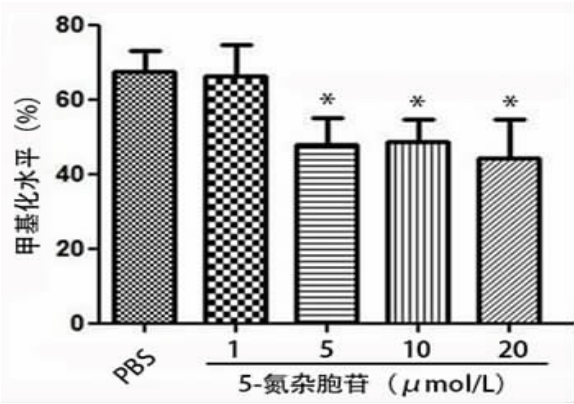


图1 5-氮杂胞苷对胶质瘤U251细胞胶质细胞源性神经营养因子基因启动子I区甲基化水平的影响与PBS组相比,* $P<0.05$

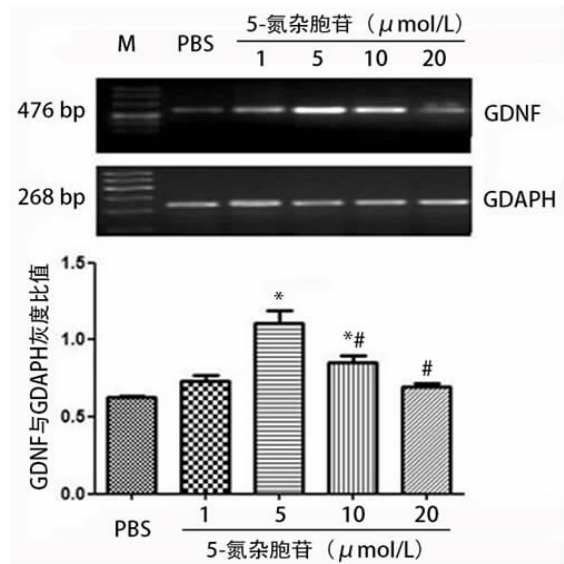


图2 5-氮杂胞苷对胶质瘤U251细胞GDNF mRNA表达水平的影响
GDNF:胶质细胞源性神经营养因子;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;与PBS组相比,* $P<0.05$;与5 mmol/L 5-氮杂胞苷组相比,# $P<0.05$

键后抑制 DNMT 的活性两种途径来抑制 DNA 甲基化,最终诱导基因表达和细胞分化^[6]。这些核苷类似物在肿瘤细胞 DNA 复制时参入到 DNA 中,通过抑制 DNMT,从而阻滞 DNA 甲基化,导致细胞内 DNA 甲基化水平降低,甚至消失。这些药物通过降低 DNA 甲基化激活肿瘤中异常沉默的抑癌基因,从而解除肿瘤细胞的生长抑制^[7]。

本研究发现 5-氮杂胞苷能够降低 GDNF 基因启动子 I 区甲基化水平,进而导致 GDNF mRNA 表达增高;1 μmol/L 5-氮杂胞苷对 GDNF mRNA 表达无显著影响,5 μmol/L 5-氮杂胞苷显著增高 GDNF

mRNA 表达($P<0.05$),但是随着 5-氮杂胞苷浓度进一步增高(10 μmol/L 或 20 μmol/L),GDNF mRNA 表达水平反而开始下降。这是由于低浓度 5-氮杂胞苷能够起到去甲基化作用,而高浓度 5-氮杂胞苷具有细胞毒作用^[8,9],抑制细胞生长。

DNA 甲基化修饰在肿瘤发生发展过程中发挥重要作用。由于肿瘤中 DNA 甲基化修饰是可逆的,明确肿瘤 DNA 甲基化状态,对肿瘤的诊断和治疗都会极大的帮助。然而,DNA 甲基化检测手段较为复杂,去甲基化药物毒副作用大,限制了 DNA 甲基化检测以及去甲基化药物在临床上的使用。我们相信,随着分子生物学、生物化学以及药理学等相关学科的发展,DNA 甲基化检测以及去甲基化药物将会为肿瘤患者带来福音。

【参考文献】

[1] 陈忠平. 重视胶质瘤的规范化治疗[J]. 中国临床神经外科杂志,2007,5(12): 257-258.

[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] François F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes [J]. Curr Opin Genet Dev, 2005, 15(5): 490-495.

[4] Howard G, Eiges R, Gaudet F, *et al.* Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice [J]. Oncogene, 2008, 27(3): 404-408.

[5] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer [J]. Cell, 2007, 128(4): 683-692.

[6] Liang G, Lin JCY, Wei V, *et al.* Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(19): 7357-7362.

[7] Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome [J]. Cell, 2007, 128(4): 669-681.

[8] 陈新军,袁先厚,江普查,等. 脑胶质瘤中hMLH1基因表达及启动子区的甲基化状态研究[J]. 中国临床神经外科杂志,2010,15:286-288.

[9] 赵庭生,徐培坤,朱立新. MGMT 基因甲基化在胶质瘤化疗中的意义[J]. 中国临床神经外科杂志,2010,15:378-380.

(2014-10-28 收稿,2015-04-14 修回)