

丁酸钠与 5- 氮杂 -2'- 脱氧胞苷协同诱导 U266 细胞 p16 基因重新表达

杜红玲¹、任立敏¹、陈华¹、袁燕¹、袁豫¹、北京大学第一医院¹血液内科袁中心实验室袁北京 100034 袁

摘要目的 探讨脱乙酰化酶抑制剂丁酸钠(SB)与去甲基化制剂 5- 氮杂 -2'- 脱氧胞苷(5-Aza-CdR)联合处理经骨髓瘤细胞系 U266 诱导高甲基化失活的 p16 基因重新表达的可能性及其对细胞生长的影响遥方法 用不同浓度药物处理 U266 细胞后测定细胞生长曲线曰流式细胞术分析细胞周期曰RT-PCR 和 Westernblotting 检测 p16 基因 mRNA 及其蛋白的表达水平遥结果 单用 5-Aza-CdR 或 SB 均抑制细胞生长袁联合用药对细胞的抑制作用明显增强曰单用 5-Aza-CdR 或 SB 对细胞 G₁ 期无影响袁与 5-Aza-CdR 联合作用发生显著的 G₁ 期阻滞曰单用 0.1 μmol/L 5-Aza-CdR 即可诱导 U266 细胞 p16 基因重新表达袁随着 5-Aza-CdR 浓度的增高袁 p16 表达增加袁单用 SB 只能诱导 p16 基因的弱表达袁联合用药明显增强 p16 基因表达遥结论 脱乙酰化酶抑制剂 SB 与去甲基化制剂 5-Aza-CdR 协同可显著诱导人骨髓瘤细胞 U266 因高甲基化失活的 p16 基因重新表达袁细胞生长受抑袁并使细胞阻滞在 G₁ 期遥

关键词骨髓瘤细胞系 U266 曰 p16 基因 曰 丁酸钠 曰 5- 氮杂 -2'- 脱氧胞苷 曰 基因表达 曰 药物协同作用

中图分类号 343 文献标识码 文章编号 000-2588 2002 11-0981-04

Re-expression of p16 gene in the myeloma cell line U266 induced by synergy of sodium butyrate and 5-Aza-2'-deoxycytidine

DU Hong-ling¹, REN Li-min¹, CHEN Hua¹, ZHU Yan¹, QI Yu²

¹Department of Hematology, ²Central Laboratory, First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China

Abstract: Objective To understand the synergic effect of histone deacetylase inhibitors sodium butyrate (SB) and demethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on cell growth and to explore the possibility of re-expression of the hypermethylated and silenced p16 gene in the myeloma cell line U266. Methods U266 cells were cultured in RPMI 1640 in the presence of varied doses of SB and 5-Aza-CdR, and the growth curve was obtained by trypan-blue exclusion assay and cell count. The cell cycle was analyzed by flow cytometry and the expression level of mRNA and protein of p16 gene were detected by reverse transcriptase-PCR and Western blotting, respectively. Results The cell growth was arrested by treatment with 5-Aza-CdR alone or SB alone. Increased inhibition effect was shown in synergic treatment of SB and 5-Aza-CdR. The G₁ phase of cell cycle was arrested by 5-Aza-CdR combined with SB, which, however, did not occur when SB or 5-Aza-CdR was used alone. 5-Aza-CdR alone induced the expression of p16 gene in a concentration-dependent manner, whereas SB alone only induced its low-level expression. The expression level of both mRNA and protein of p16 gene was increased significantly by synergic application of SB and 5-Aza-CdR. Conclusions Hypermethylated and silenced p16 gene in U266 cell line can be markedly reactivated by synergic treatment with demethylating agent 5-Aza-CdR and histone deacetylase inhibitor SB, and the cell growth can be inhibited and cell cycle arrested at G₁ phase.

Key words: human myeloma cell line U266; p16 gene; sodium butyrate; 5-Aza-2'-deoxycytidine; gene expression; drug synergism

参与细胞周期调控的抑癌基因 p16 因高甲基化失活与多种肿瘤 包括多发性骨髓瘤等血液系统肿瘤 的发生密切相关 遥研究发现 高甲基化所致基因表达受抑可能受 DNA 甲基化与组蛋白脱乙酰化两种途径的协同作用调控 遥为了探讨甲基化失表达的抑癌基因能否重新表达并发挥抑制肿瘤细胞生长的功能 本研究采用脱乙酰化酶 组蛋白 deacetylase, HDA 抑制剂丁酸钠 sodium butyrate, SB 和去甲基化制剂 5- 氮杂 -2'- 脱氧胞苷 5-Aza-2'-deoxycy-

tidine, 5-Aza-CdR 联合处理骨髓瘤细胞系 U266 袁观察其诱导 p16 基因重新表达的可能性及其对细胞生长的影响遥

1 材料和方法

1.1 药物和试剂

5-Aza-CdR 和 SB 购自 Sigma 公司遥 5-Aza-CdR 用含氯化钠的磷酸缓冲液 HB 6.8 配制成贮存液袁 -70 益保存 3 个月 曰 B 用 dH₂O 配制成贮存液袁 20 益保存遥 鼠抗人 p16 单抗及碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 均为 Santa Cruz 产品遥

1.2 细胞培养及实验分组

人骨髓瘤细胞系 U266 TCC 产品 按常规培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液遥 实验时细

收稿日期 2002-06-06

基金项目 国家自然科学基金 0070324 袁

作者简介 杜红玲 1971- 袁女 袁甘肃西峰人 袁 1996 年毕业于湖南医科大学 袁主治医师 袁现为北京大学在读博士研究生 袁电话 10-66171122-2874 袁 e-mail duhongling@yahoo.com

胞处于对数生长期时活细胞数达 95%~100% 时

实验分为以下 4 组: ①对照组: 同期培养不加药; ② 5-Aza-CdR 组: 加不同浓度 5-Aza-CdR 渊.1 渊.5 和 1.0 渊mol/L 冤培养 3 d 去药后继续培养 4 d; ③ SB 组: 加 1 mmol/L SB 培养 5 d 去药后继续培养 2 d; ④ 联合用药组: 加 5-Aza-CdR 培养 2 d 后换用 SB 培养 5 d 时

1.3 细胞生长曲线测定

收集对数生长期 U266 细胞渊按 2.3 伊 10⁵ 个 /ml 的浓度接种渊实验第一天开始渊用虫蓝拒染法每天计数活细胞数渊绘制生长曲线渊

1.4 细胞周期分析

收集培养细胞渊生理盐水洗两次渊调整细胞浓度为 1 伊 10⁶ 个 /ml 渊加 0% 冷乙醇 -20 益固定 24 h 渊加 RNaseA 至终浓度 1mg/ml 渊加 7 益温育 30min 渊加入碘化丙啶至终浓度 50 渊/ml 渊 1 h 内测定渊以流式细胞仪渊 Beckman Coulter 冤进行细胞周期分析渊

1.5 RT-PCR 检测 p16 基因 mRNA 表达

采用用 TRIZOL 试剂渊 Ibc 产品 冤渊一步法提取总 RNA 渊以 OligodT 为引物渊逆转录渊以 p16 特异引物进行 PCR 扩增渊以 GAPDH 为内对照渊

p16 引物序列为 渊'-GCCCAACGCACCGAAT AGT-3' 和 5'-CGATGGCCCAGCTCCTCAG-3' 渊扩增片段为 261bp 渊GAPDH 引物序列为 渊'-ACCACAG TCCATGCCATCAC-3' 和 5'-TCCACCACCTGTTG CTGTA-3' 渊扩增片段为 400bp 渊反应条件渊 4 益变性 60 s 渊 8 益退火 60 s 渊 2 益延伸 90 s 渊共 35 个循环渊结果经激光密度扫描仪 渊 Pharmacia LKB Ultrascan 冤测定渊以 p16 与 GAPDH 光密度比值相对定量渊以正常表达 p16 基因的白血病细胞系 KG1a 为阳性对照渊

1.6 Westernblotting 检测 p16 蛋白表达

收集约 1 伊 10⁶ 个细胞渊BS 洗两次渊用 1 伊 DS 凝胶加样缓冲液裂解细胞渊 100 益水浴 10min 渊超声粉碎 30 s 渊离心去上清渊Bradford 法测蛋白浓度渊取 100 渊蛋白进行 SDS-PAGE 电泳渊电转移至硝酸纤维素膜渊加鼠抗人 p16 单抗渊 0.05 渊温孵育 2 h 渊碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 渊 0.05 渊温孵育 2 h 渊显色渊以 KG1a 细胞为阳性对照渊

1.7 统计学处理

全部数据采用 SPSS10.0 进行统计分析渊数据以均值渊标准差表示渊采用方差分析渊

2 结果

2.1 细胞生长抑制作用

细胞生长曲线示渊单用 1 渊mol/L 5-Aza-CdR 或 1 mmol/L SB 均有抑制 U266 细胞生长的作用渊与对照组有显著差异渊 P < 0.05 冤渊见图 1 渊

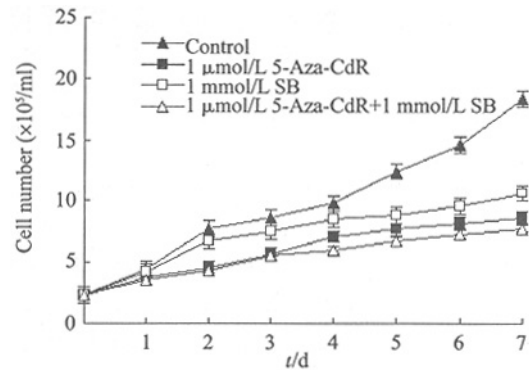


图 1 细胞生长曲线

Fig.1 Cell growth curve

0.1 渊.5 和 1.0 渊mol/L 的 5-Aza-CdR 与 1.0mmol/L SB 联合作用 7 天后渊细胞计数分别为 渊.57 渊.20 伊 10⁵/ml 渊渊.20 渊.12 伊 10⁵/ml 和 渊.76 渊.31 伊 10⁵/ml 渊抑制作用增强渊与对照组有显著差异渊 P < 0.05 冤渊

2.2 细胞周期结果

与对照组相比渊单独使用 5-Aza-CdR 或 SB 时渊 G₁ 期无明显改变渊联合用药组则有显著的 G₁ 期阻滞渊 P < 0.05 冤渊表 1 冤渊

表 1 联合使用 5-Aza-CdR 和 SB 对 U266 细胞周期的影响 渊, x 渊 冤

Tab.1 Effect of combined application of 5-Aza-CdR and SB on U266 cell cycle (% , Mean 渊SD)

Group	G ₁	S	G ₂
Control	43.05 渊.21	47.85 渊.19	9.15 渊.33
SB+5-Aza-CdR(0.1 渊mol/L)	54.70 渊.10	36.10 渊.67	7.30 渊.09
SB+5-Aza-CdR(0.5 渊mol/L)	59.10 渊.24	32.15 渊.91	8.75 渊.15
SB+5-Aza-CdR(1.0 渊mol/L)	70.25 渊.91*	26.55 渊.16	3.20 渊.11

*P < 0.05 vs Control

2.3 RT-PCR 结果

单用 5-Aza-CdR 可诱导 U266 细胞 p16 基因 mRNA 表达渊且呈剂量依赖性渊 SB 也可诱导 U266 细胞 p16 基因 mRNA 微弱表达渊 5-Aza-CdR 与 SB 联用可见明显的协同作用渊图 2 冤渊

2.4 Westernblotting 结果

单用 5-Aza-CdR 可诱导 U266 细胞 p16 蛋白表达渊 SB 也可诱导 U266 细胞 p16 蛋白微弱表达渊两药联用可见明显的协同作用渊图 3 冤渊

3 讨论

DNA 甲基化与组蛋白脱乙酰化对基因转录均有抑制作用渊近年研究发现渊二者对基因表达的调控作用有密切联系渊 DNA 甲基化可诱导局部组蛋白脱乙酰化渊使染色质乙酰化水平降低渊且甲基化的序列可募集甲基 CpG 结合蛋白渊 MeCP 冤渊与组蛋白脱乙酰

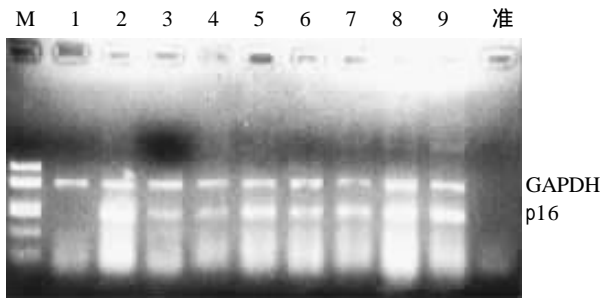


图 2 5-Aza-CdR 和 / 或 SB 诱导 p16 基因 mRNA 的表达
Fig.2 mRNA expression of p16 gene induced by 5-Aza-CdR and/or SB

M:Marker; Lane 1:Negativecontrol; Lane 2:Positivecontrol; Lane 3:1.0 滋mol/LSB; Lane 4-6:0.1,0.5 and 1.0 滋mol/L5-Aza-CdR; Lane 7-9:Combination of 0.1,0.5, 1.0 滋mol/L5-Aza-CdR and 1.0mmol/ISB; 准:Blank control

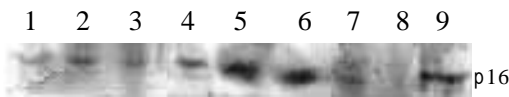


图 3 5-Aza-CdR 和 / 或 SB 诱导 p16 蛋白的表达
Fig.3 The protein expression of p16 induced by 5-Aza-CdR and/or SB

Lane 1-3:0.1,0.5 and 1.0 滋mol/L5-Aza-CdR; Lane 4-6:Combination of 0.1,0.5, 1.0 滋mol/L5-Aza-CdR and 1.0 滋mol/LSB; Lane 7:1.0 滋mol/LSB; Lane 8:Negativecontrol; Lane 9:Positivecontrol

化酶 HDA 复合物 MeCP-HDA 发挥对基因表达的抑制作用

抑癌基因高甲基化失活与多种肿瘤密切相关那么失活的抑癌基因能否通过去甲基化制剂或 / 和 HDA 抑制剂的作用重新表达本实验选用 p16 基因高甲基化失表达的 U266 细胞为研究对象观察了 SB 与 5-Aza-CdR 对 U266 细胞生长和细胞周期的影响以及诱导 p16 基因重新表达的可能性

HDA 抑制剂 SB 是丁酸类化合物丁酸及其衍生物在体外可抑制肿瘤细胞增殖及诱导分化本研究发现单用 SB 可诱导 U266 细胞重新表达 p16 基因但不及去甲基化制剂 5-Aza-CdR 的作用强适当 SB 浓度增至 5 mmol/L 时 p16 表达并未见显著增高低浓度去甲基化制剂 5-Aza-CdR 即可诱导 U266 细胞重新表达 p16 基因两药联用则使 p16 基因表达显著高于各单独用药组且其水平接近能正常表达 p16 基因的 KG1a 细胞的表达水平 HDA 抑制剂对去甲基化制剂的这种协同作用提示 HDA 可能也参与了甲基化抑制 p16 基因表达的过程组蛋白乙酰化可通过改变染色质结构参与基因表达的调控抑制肿瘤细胞增殖诱导分化曾有文献报道 HDA 抑制剂 TSA 不能上调高甲基化的 MLH1 尧 IMP3 等基因的表达

本研究以对 SB 的观察又一次证明通过改变组

蛋白乙酰化状态进而开放染色质结构可能不是高甲基化失表达基因重新表达的主要途径 SB 与 5-Aza-CdR 的协同作用提示 HDA 参与对 p16 基因的抑制可能是通过与高甲基化有关的途径去甲基化制剂改变基因的高甲基化状态影响 MeCP-HDA 在启动子区的结合 HDA 抑制剂则作用于 MeCP-HDA 复合物抑制其活性从而恢复基因表达 5-Aza-CdR 可诱导 p16 基因表达 SB 虽仅能诱导 p16 的弱表达但它能加强 5-Aza-CdR 的作用提示更有效恢复 p16 基因的表达需要两类药物的联合作用 p16 基因可有效调控细胞周期抑制肿瘤生长与细胞周期素 D cyclin D 竞争结合 CDK4 抑制后者的活性阻止细胞从 G₁ 期进入 S 期从而抑制细胞增殖

本研究对各用药组细胞的生长情况及细胞周期的观察结果显示单用 SB 可抑制细胞生长但较 5-Aza-CdR 组作用弱对细胞周期无明显阻滞单用 5-Aza-CdR 有生长抑制作用但即使在高浓度时也未见明显 G₁ 期阻滞这与文献报道一致而联合使用 SB 后抑制细胞生长的作用增强发生 G₁ 期阻滞这种阻滞与 p16 表达量有关结果提示 U266 细胞中 p16 表达达到一定水平时才能发挥其对细胞周期的调控作用

参考文献

喻哲 Gonzalez M, Mateos MV, Garcia-Sanz R, et al. De novo methylation of tumor suppressor gene p16/INK4 is a frequent finding in multiple myeloma patients at diagnosis 喻哲 Leukemia, 2000, 14(1): 183-7.

喻哲 Tsuda H, Yamamoto K, Inoue T, et al. The role of p16-cyclin D/CDK-pRb pathway in the tumorigenesis of endometrial-type endometrial carcinoma 喻哲 Br J Cancer, 2000, 82(3): 675-82.

喻哲 Jin M, Piao Z, Kim NG, et al. p16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma 喻哲 Cancer, 2000, 89(1): 60-8.

喻哲 Kim DH, Nelson H.H, Wiencke Jk, et al. p16/INK4 and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer 喻哲 Cancer Res, 2001, 61(8): 3419-24.

喻哲 Eden S, Hashimshony T, Keshet I, et al. DNA methylation models histone acetylation 喻哲 Nature, 1998, 394(6696): 842.

喻哲 Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex 喻哲 Nature, 1998, 393(6683): 386-9.

喻哲 Wade PA, Gogonne A, Jones PL, et al. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation 喻哲 Nat Gene, 1999, 23: 62-6.

喻哲 Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, et al. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex 喻哲 Nat Gene, 1999, 23(1): 58-61.

喻哲 Wong IH, Ng MH, Lee JC, et al. Transcriptional silencing of the p16 gene in human myeloma-derived cell lines by hypermethylation 喻哲

BrJHaematol,1998,103(1):168-75.

咱0咱TaskaT,AsouH,MunkerR, et al. Methylationofthep16INK4A geneinmultiplemyeloma咱咱BrJHaematol,1998,101(3):558-64.

咱1咱Koyama Y, Adachi M, Sekiya M, et al. Histone deacetylaseinhibitors suppressIL-2-mediatedgeneexpressionpriortoinduction ofapoptosis咱咱Blood,2000,96(4):1490-5.

咱2咱YangX,FergusonAT,NassSJ, et al. Transcriptionalactivationof estrogenreceptor inhumanbreastcancercellsbyhistonedecety-laseinhibition咱咱CancerRes,2000,60(24):6890-4.

咱3咱MunsterPN,Troso-SandovalT,RosenN, et al.Thehistonedecety-lase inhibitor suberoylanilidehydroxamicacid inducesdifferentia-tionofhumanbreastcancercells咱咱CancerRes,2001, 61(23): 8492-7.

咱4咱HanJW,AhnS.H,ParkSH, et al. Apicidin,ahistonedecetylasein-hibitor, inhibitsproliferation oftumorcellsviainductionofp21 WAF1/Cip1andgelsolin咱咱CancerRes,2000,60(21):6068-74.

咱5咱ButlerLM,AgusDB,ScherHI, et al. Suberoylanilidehydroxamic acid, aninhibitorof histone deacetylase, suppressesthegrowthof prostatecancer cells in vitro and in vivo咱咱CancerRes, 2000, 60 (18):5165-70.

咱6咱CameronEE, BachmanKE, Myohanen S, et al. Synergy of de-methylationandhistone deacetylaseinhibitionthere-expression ofgenesilencedincancer咱咱NatGene,1999,21(1):103-7.

咱7咱YinH,BlanchardKL.DNAMethylationrepresses theexpressionof thehumanerythropoietingenebytwodifferent mechanisms咱咱 Blood,2000,95(1):111-9.

咱8咱deFioreB,PalenaA,FelsaniA, et al. Cytosinemethylationtrans-formsanE2Fsiteintheretinoblastomagenepromoterintoabind-ing site for the generalrepressormethylcytosine-binding protein2 (MeCP2)咱咱NucleicAcidsRes,1999,27(14):2852-9.

咱9咱MagdinierF, WolffeAP. Selectiveassociationofthemethyl-CpG bindingproteinMBD2withthesilentp14/p16locusinhumanneo-plasia咱咱ProcNatlAcadSciUSA,2001,98(9):4990-5.

咱0咱BenderCM,PaoMM,JonesPA.InhibitionofDNAMethylationby 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses thegrowthofhumantumorcell lines咱咱CancerRes,1998,58(1):95-101.

消化道吻合器在食管胃超胸顶吻合中的作用

俞星火 河南省新乡市第二人民医院心胸外科 袁河南 新乡 453002 冤

摘要 目的 总结分析机械吻合用于食管胃胸内超胸顶吻合的临床意义 方法 使用管状吻合器对 98 例食管癌行食管胃超胸顶吻合 结果 所有病例吻合均一次完成 无手术死亡 无吻合口漏及喉返神经胸导管损伤 吻合口狭窄发生率为 2.04% 渊/98 冤 切除端癌残留率 1.02% (1/98) 结论 胸内食管胃超胸顶机械吻合术可扩大食管癌切除范围 类似颈部吻合 吻合简便 省时 可靠 安全

关键词 食管癌 / 外科学 吻合器

中图分类号 院 608 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588 渊 002 冤 1-0984-02

Application of digestive tract anastomotic device in super-cupula pleurae anastomosis of the esophagus and stomach

YUXing-huo

Department of Cardio-thoracic Surgery, Second People's Hospital of Xinxiang, Xinxiang 453002, China

Abstract: Objective To evaluate the clinical value of mechanical anastomosis in super-cupula pleurae anastomosis (using mechanical anastomosis connecting esophagus and stomach above the diaphragm) of the esophagus and stomach within the thoracic cavity. Method A total of 98 cases of esophageal carcinoma were treated surgically by super-cupula pleurae anastomosis of the esophagus and stomach by anastomotic tube. Result All anastomoses were completed in single attempt without mortality among the patients, who did not show sign of fistula or anastomosis or injury to recurrent laryngeal nerve and ductus thoracicus. The incidence of anastomosis stricture was 2.04% (2/98), with tumor remnant rate of the resected end of 1.02% (1/98). Conclusion Mechanical esophagus and stomach anastomosis of super-cupula pleurae in the thoracic cavity can expand the scope eligible for resection in esophageal carcinoma, resembling neck anastomosis that is simple, quick, dependable and safe.

Key words: anastomat; carcinoma, the esophagus; surgical resection