

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)24-2216-04

Dnmt1 基因对胃癌细胞株 AGS 细胞增殖凋亡的影响

陈道荣¹, 王丕龙¹, 杨雪琴³, 黄爱龙², 张秉强², 陶小红¹ (¹ 重庆医科大学附属第一医院消化内科, 重庆 400016, ² 病毒性肝炎研究所, 重庆 400010, ³ 重庆市巴南区人民医院消化内科, 重庆 401320)

Effects of Dnmt1 gene on proliferation and apoptosis of gastric cancer cell line AGS

CHEN Dao-Rong¹, WANG Pi-Long¹, YANG Xue-Qin³, HUANG Ai-Long², ZHANG Bing-Qiang², TAO Xiao-Hong¹

¹Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China, ²Institute of Viral Hepatitis, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China, ³Department of Gastroenterology, Chongqing People's Hospital of Banan District, Chongqing 401320, China

【Abstract】 AIM: To design a recombinant plasmid pshRNA-dnmt1 by RNA interference and to assess its effects on DNA methyltransferase (Dnmt1) gene expression in gastric cancer cell line AGS, and on the proliferation and apoptosis of AGS cells *in vitro*.

METHODS: The eukaryotic expression plasmid pshRNA-Dnmt1, containing the sequence of shRNA, was cloned and transfected into AGS cells. The mRNA levels of gene Dnmt1 were determined by RT-PCR, the protein expression levels by Western Blot, the cell survival index by MTT assay, and the apoptosis was also evaluated by AO/EB, electron microscope and TUNEL.

RESULTS: A recombinant plasmid pshRNA-Dnmt1 was successfully constructed and confirmed by sequencing analysis. PshRNA-Dnmt1 induced a 21.63% inhibition of Dnmt1 mRNA after 24 h treatment, 52.97% after 48 h, and 72.06% after 72 h. Dnmt1 protein levels in AGS cells appeared to reduce, with inhibition rate of 28.24% after 24 h of treatment, 68.54% after 48 h, and 81.47% after 72 h. MTT results showed that the cell survival rates of AGS cells after transfected with pshRNA-Dnmt1 at 24 h, 48 h and 72 h respectively were 79.49%, 51.63% and 39.16%. AO/EB, electron microscope and TUNEL test indicated: after transfection with the recombinant plasmid, there existed a lot of apoptotic and necrotic cells, and the apoptosis rate increased from about 5% to 35%. **CONCLUSION:** The recom-

binant plasmid pshRNA-Dnmt1 can efficiently and specifically inhibit the expression of gene Dnmt1, inhibit the proliferation of AGS cells, and induce the apoptosis.

【Keywords】 Dnmt1; RNA interference; stomach neoplasms; cell cycle

【摘要】目的: 利用 RNA 干扰 (RNAi) 技术, 以 Dnmt1 (DNA methyltransferase 1) 为靶基因, 设计构建重组体 pshRNA-Dnmt1, 研究其对胃癌 AGS 细胞增殖凋亡的影响。方法: 设计 shRNA 的寡核苷酸片断, 再克隆至载体 pTZU6 + 1 中构建重组体 pshRNA-Dnmt1, 转染胃癌细胞株 AGS, 用 Western Blot 检测 DNMT1 蛋白水平变化, 用 RT-PCR 法评估 mRNA 水平, MTT 法动态监测活细胞数, AO/EB 法、电镜和 TUNEL 观察其促凋亡作用。结果: 成功构建重组质粒 pshRNA-Dnmt1 后, 进行序列分析得到确证。RT-PCR 检测结果证实: 重组质粒 pshRNA-Dnmt1 对胃癌 AGS 细胞中 Dnmt1 基因的转录有着明显抑制作用, 转染后 24 h 抑制率在 21.63% 左右, 48 h 为 52.97%, 72 h 为 72.06%。Western Blot 检测结果表明: pshRNA-Dnmt1 转染 AGS 细胞后 24 h 出现 DNMT1 蛋白表达量减少, 抑制率为 28.24%, 48 h 为 68.54%, 72 h 为 81.47%。MTT 结果提示: 转染后 24, 48 和 72 h 细胞数存活率为对照组的 79.49%, 51.63% 和 39.16%。AO/EB 法、电镜和 TUNEL 都看见大量典型的凋亡和坏死细胞, 转染后 48 h 的细胞凋亡率由对照组的 5% 上升为 35% 左右。结论: 重组质粒 pshRNA-Dnmt1 能特异有效地抑制胃癌细胞株 AGS 内 Dnmt1 基因的表达, 能抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡, 从而为肿瘤的基因治疗开辟了新途径。

【关键词】 Dnmt1 基因; RNA 干扰; 胃肿瘤; 细胞周期

【中图分类号】 R734 **【文献标识码】** A

0 引言

近年来, 肿瘤的生物治疗已成为关注热点。研究表明, 部分基因启动子区域的超甲基化状态严重影响了该基因的表达, 尤其是部分抑癌基因的失活在肿瘤的发生中起着极其关键的作用^[1]。特异性 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, Dnmt) 负责在 DNA 启动子区域的特定胞嘧啶残基上添加甲基的过程, 其中 DNMT1 在成人细胞基因组 DNA 甲基化的维护中有着极其关键性的作用。因此, 我们准备应用 RNA 干扰技术, 构建靶向 Dnmt1 基因的 shRNA 干扰重组体,

收稿日期 2005-12-13; 接受日期 2006-02-17

基金项目: 国家自然科学基金 (30300298), 重庆市科委自然科学基金 (CSCT2005BB5311)

通讯作者: 陈道荣, 博士, 主治医师。Tel: (023) 89012921 Email: cdredren@yahoo.com.cn

将其转染到胃癌细胞 AGS 中,观察其对 DNA 甲基转移酶基因的表达抑制作用以及对胃癌细胞株 AGS 细胞增殖凋亡的影响,从而为探索胃癌的基因治疗打下理论和技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 Jm109 和载体 pTZU6 + 1 由重庆医科大学病毒性肝炎研究所保存。胃癌细胞 AGS 购自于中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。限制性内切酶 *Sal* I, *Hind* III, *Eco*R I, *Xba* I 和 T4DNA 连接酶 DMSO 均为 Promega 公司产品;柱离心式质粒抽提试剂盒和柱离心式胶回收试剂盒均购自上海华舜公司。胎牛血清购自于美国 Hyclone 公司。转染试剂 Lipofectamine2000 购于 Invitrogen 公司。RNA 提取试剂盒为 Qiagen 公司产品,RT-PCR 二步法试剂盒为 Takara 公司产品。兔抗人 DNMT1,羊抗人 beta-actin 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,兔抗羊 IgG (二抗)购于北京中山生物技术有限公司。化学显色试剂 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit 购自 Pierce 公司。TUNEL 反应试剂盒 *In Situ* Cell Death Detection. POD 为美国 Roche 公司产品。

1.2 方法 根据 GenBank 中报道的 DNMT1 的核苷酸序列(No. NM001379),参考小干扰 RNA(short interfering RNA siRNA)的设计策略,设计短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)序列如下(正义链带有 XhoI 的酶切位点,反义链带有 Xba I 的酶切位点)。正义链:5' TCGAGCAGCGGCTCAAAGATTTGTTTCGCAAATCTTTGAGCCGCCTGCTTTTT3';反义链:5' CTAGAAAA GCAGCGGCTCAAAGATTTGCGAACAAATCTTTGAGCCGCCTGC3'。参考 RT-PCR 引物设计原则设计引物如下:P1:5' TGCAGAAGGATGGAACGG AG3';P2:5' GCTTTTCCTTGTAATCCTGG3'。并设计 beta-actin 基因的引物序列如下:P1:5' TGCCACCACACCTTCTACAA3';P2:5' GCAGCTCGTAGCTCTTCTCC3'。采用化学合成方法合成单链寡核苷酸,经退火后得到双链 DNA^[6]。具体的转染步骤参见 Invitrogen 公司的转染操作手册。

1.2.1 胃癌细胞中 DNMT1 蛋白的检测 将 AGS 细胞于转染后 0, 24, 48, 72 h 用胰酶消化下来, PBS 洗 3 次。Western Blot 杂交按《分子克隆》实验操作指南进行,一抗为兔抗人 DNMT1,羊抗人 beta-actin 多克隆抗体;二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,兔抗羊 IgG。最后按 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit 操作说明,加入化学发光试剂反应 5 min,

应用 Syngene Bio Imaging 检测系统观察照相。

1.2.2 胃癌细胞中 dnmt1 基因 mRNA 检测 分别于转染后 0, 24, 48 和 72 h 将 AGS 细胞消化下来, PBS 洗 3 次,按试剂盒说明分别提取各组细胞的总 RNA。RT-PCR 反应体系中加入两对引物,第一对是内源对照 beta-actin 基因的引物,第二对是被沉寂的 DNMT1 基因的引物,具体操作见说明书。反应条件是 94℃ 4 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 50 s, 72℃ 10 min, 共 30 个循环。根据凝胶电泳中 beta-actin 基因片段条带的强弱判断模板的量,进而判断靶基因的 mRNA 被 shRNA 沉寂的程度。

1.2.3 检测细胞存活率 将 AGS 细胞按 1×10^4 /孔接种于 96 孔板,每孔 100 μL,常规培养。分别于转染 0, 24, 48 和 72 h 后,弃掉培养基,加入 MTT 及无酚红 RPMI1640,继续孵育 4 h 后加入 DMSO,震荡 10 min 使结晶充分溶解。在酶联免疫仪上 570 nm 处测定吸光度 A 值。以时间(t)为横轴,吸光度 A 值为纵轴绘制细胞生长曲线,按下面的公式计算细胞存活率: $A_{\text{实验孔}}/A_{\text{对照孔}} \times 100\%$ 。

1.2.4 检测细胞凋亡 将 AGS 细胞按 1×10^6 /孔接种于 6 孔细胞培养板中常规培养。按预定时间收集细胞,制成细胞悬液。吸 200 μL,加入 AO/EB 染液 10 μL,充分混匀,滴于玻片上分别计数。早期凋亡细胞(VA)核染色质着绿色,呈固缩状或圆珠状。晚期凋亡细胞(NVA)核染色质着橙黄色,呈固缩状或破裂状。坏死细胞(NVN)核染色质着桔红色,呈正常细胞结构。活细胞(VN)核染色质着绿色,呈正常细胞结构。细胞凋亡率(%) = $(VA + NVA) / (VN + NVN + VA + NVA) \times 100\%$ 。将剩余的细胞悬液再次离心,小心吸弃上清,加入 40 g/L 戊二醛,送重庆医科大学电镜室检测。另将细胞常规接种于预置玻片的 6 孔细胞培养板中,常规培养和转染,按规定时间采用 TUNEL 反应检测试剂盒检测各组 AGS 细胞内 DNA 片段化情况,具体的操作步骤见说明书。

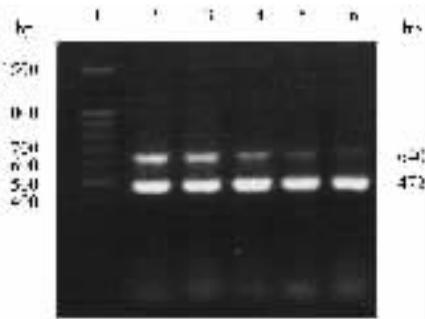
统计学处理:实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS10.0 软件,多组比较进行单因素方差分析,两两比较进行 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

PshRNA-Dnmt1 重组质粒的构建及体内转录生成 siRNA。测序显示(如下序列中下划线处)与设计 DNA 片段序列完全一致,进一步证实 Dnmt1 的 shRNA 即载体 pshRNA-Dnmt1 构建成功。CTAGTAAAAAGCGGACCGAAGTCCGCT CTAGAAAAAGCAGGCGGCTCAAAGATTTGCGAACAAATCTTTGAGCC-

GCCTGCCGGTGTTCGTCCTTTCCACAAGATAT-ATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTA-CGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAA-TTTTAAAAGTCAAACACTACCCAAGAAATTATTACT-TTCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTG-TTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTCTAA-CAGCCTTGTATCGTATATGCAAATATGAAGG.....

2.1 胃癌细胞 dnmt1 基因 mRNA 水平 5 组泳道中细胞内源 β -actin 基因扩增片段条带的亮度强弱相似,而 Dnmt1 基因电泳条带存在明显差异。脂质体组和 pTZU6 + 1 组的 Dnmt1 PCR 扩增带亮度较强,而 pshRNA-Dnmt1 组的 Dnmt1 PCR 扩增带亮度明显减弱(图 1)。脂质体组中 Dnmt1 的扩增条带为标准(亮度定为 100),pTZU6 + 1 组,pshRNA-Dnmt1 转染后 24、48 和 72 h 组的亮度分别是脂质体组的(98.8 ± 1.6)%、(78.4 ± 2.4)%、(47.0 ± 1.3)%和(29.9 ± 1.5)%。组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



1: Marker; 2: 脂质体; 3: pTZU6 + 1; 4: 转染 pshRNA-Dnmt1 后 24 h; 5: 转染 pshRNA-Dnmt1 后 48 h; 6: 转染 pshRNA-Dnmt1 后 72 h.

图 1 转染后 AGS 细胞内 Dnmt1 基因的 mRNA 水平

2.2 胃癌细胞中 DNMT1 蛋白的表达 各组内参 β -actin 蛋白的表达相近。脂质体组和 pTZU6 + 1 组的 DNMT1 蛋白杂交带明显强于 pshRNA-Dnmt1 组(图 2)。pTZU6 + 1 组,转染 pshRNA-Dnmt1 后 24、48 和 72 h 组的亮度分别为脂质体组的(99.1 ± 2.8)%、(71.8 ± 1.7)%、(31.5 ± 2.1)%和(18.5 ± 1.2)%。组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



1: Marker; 2: 脂质体; 3: pTZU6 + 1; 4: 转染 pshRNA-Dnmt1 后 24 h; 5: 转染 pshRNA-Dnmt1 后 48 h; 6: 转染 pshRNA-Dnmt1 后 72 h.

图 2 转染后 AGS 细胞内 DNMT1 蛋白的表达水平

2.3 细胞存活 与 pshRNA-Dnmt1 组比较 0 h 时 3

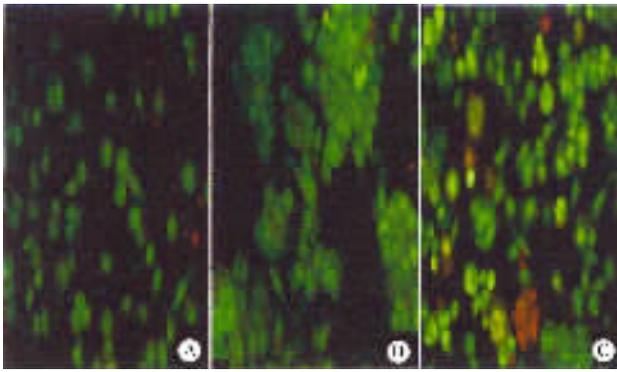
组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。24 h 后开始出现差异($P < 0.05$)。pshRNA-Dnmt1 组的活细胞数较同期的脂质体组或 pTZU6 + 1 组低,并且这种差异随着时间的延长而越来越显著。转染后 24 h 细胞存活率为 79.49%,48 h 为 51.63%,72 h 为 39.16%。各组内 AGS 活细胞数在不同时间段之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。脂质体组和 pTZU6 + 1 组的活细胞数随着培养时间的延长逐步增多,生长速度相当快,呈对数生长趋势。重组质粒 pshRNA-Dnmt1 组的活细胞数虽然也随时间延长而增多,但生长速度却落后于其他两组(表 1)。

表 1 转染后各组间 AGS 存活细胞的统计 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
脂质体	0.217 ± 0.016	0.312 ± 0.027	0.918 ± 0.037	1.453 ± 0.056
pTZU6 + 1	0.211 ± 0.008	0.298 ± 0.036	0.920 ± 0.016	1.386 ± 0.064
pshRNA-dnmt1	0.215 ± 0.021	0.248 ± 0.023 ^a	0.474 ± 0.022 ^a	0.569 ± 0.019 ^a
细胞存活	99.08	79.49	51.63	39.16

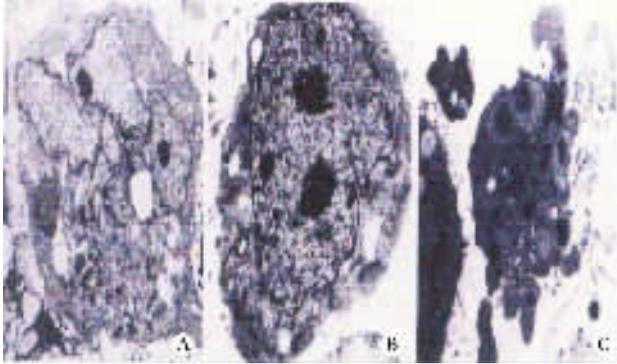
^a $P < 0.05$ vs 脂质体(同一转染时间)。

2.4 细胞凋亡 经 AO/EB 染色后,脂质体组中满视野均为绿色荧光的存活 AGS 细胞,极少发现凋亡细胞,偶有小量坏死细胞区。在 pshRNA-Dnmt1 组中出现大量凋亡细胞和坏死细胞,间或有少许的正常肿瘤细胞(图 3)。脂质体组,pTZU6 + 1 组和 pshRNA-Dnmt1 组 AGS 细胞凋亡率分别是(5.5 ± 0.4)%、(6.1 ± 0.6)%和(35.2 ± 1.1)%。前 2 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),而 pshRNA-Dnmt1 组与脂质体组/pTZU6 + 1 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。脂质体组 48 h 后 AGS 细胞形态电镜检查无明显变化,而 pshRNA-Dnmt1 组视野下出现大量异常细胞,可见典型凋亡特征性改变(图 4)。TUNEL 反应中,脂质体组细胞大部分贴壁较好,形态完整正常,视野下细胞核几乎都被染成淡蓝色,仅有极少量细胞核被染为浅褐色,但胞质仍为淡蓝色,还有极个别的坏死细胞(图 5)。PshRNA-Dnmt1 组的 AGS 细胞有部分脱落,部分核皱缩变小,呈不规则形,染色质凝聚,靠近核膜,被染成棕红色的细胞为凋亡细胞。视野中有少量肿瘤细胞。在坏死细胞区呈现弥散的、较浅的、非特异性的染色。由细胞凋亡率可以看出,脂质体组为(4.9 ± 0.2)%、pTZU6 + 1 组为(5.1 ± 0.8)%。组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。而 pshRNA-Dnmt1 组细胞凋亡率骤升至(34.8 ± 0.5)%。与前两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。



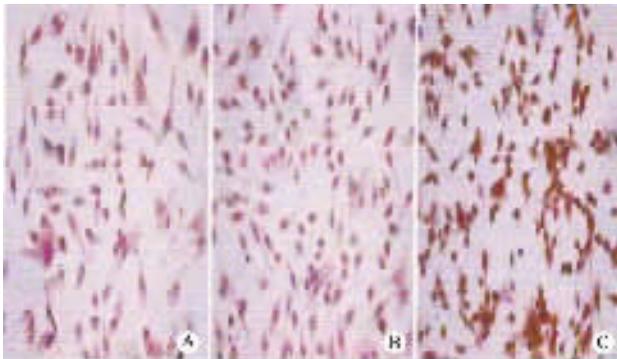
A :脂质体组 B :pTZU6 + 1 组 C :pshRNA-Dnmt1 组.

图3 AO/EB 法分析转染 48 h 后 AGS 细胞凋亡情况 ×400



A :脂质体组 (×4000) ; B :pTZU6 + 1 组 (×5000) ; C :pshRNA-Dnmt1 组 (×6000).

图4 电镜法检测转染 48 h 后 AGS 细胞的凋亡情况



A :脂质体组 B :pTZU6 + 1 组 C :pshRNA-Dnmt1 组.

图5 TUNEL 法分析转染 48 h 后 AGS 细胞凋亡情况 ×400

3 讨论

DNA 超甲基化状态与肿瘤形成的关系有着密不可分的关系. 正常组织细胞中, 广泛表达的基因启动子区域 CpG 岛常处于非甲基化状态; 肿瘤细胞中, 这些 CpG 岛常变为甲基化状态, 其相关基因的表达亦被关闭^[7-9]. 其中 DNA 甲基转移酶 1 在成人细胞基因组 DNA 甲基化维护中有着极其关键性的作用. 复制过程中, DNMT1 定位于复制复合物中, 可识别亲代

链中正确的甲基化 CpG 岛位点, 催化甲基基团添加到子代链相应的 CpG 岛位点上. DNMT1 能否有效地定位于分化细胞 DNA 复制点上直接影响着原有的甲基谱能否得到正确的维护^[10]. 因此, 我们希望能从基因水平入手, 应用 RNA 干扰技术, 在不破坏染色体结构的前提下直接降解转录出来的 mRNA, 靶向性减少 DNMT1 的产量, 同时使一些因启动子区域超甲基化而沉寂的基因重新激活, 一起发挥应有的抑制肿瘤功能. 我们已成功地运用 RNAi 技术构建重组质粒 pshRNA-Dnmt1, 并将其转染到人胃癌 AGS 细胞株中, 通过 Western Blot 试验和 RT-PCR 试验证实该重组质粒能有效地特异地抑制细胞内 dnmt1 基因的表达. MTT 试验结果显示它能明显抑制胃癌 AGS 细胞的生长; AO/EB 染色、电镜和 TUNEL 检查均强烈支持 pshRNA-Dnmt1 能促进 AGS 细胞的凋亡.

这些发现对于研究 Dnmt1 基因功能和探索肿瘤的基因治疗方面具有相当大的价值, 同时也为今后进一步的研究提供了坚实的理论和实验基础: ① 研究重组质粒 pshRNA-Dnmt1 引起胃癌 AGS 细胞凋亡的信号传导通路; Dnmt1 基因、已知的其他凋亡抑制因子和肿瘤细胞的抗凋亡机制之间的相互关系; ② 研究 Dnmt1 基因与细胞周期调节基因如何共同起作用影响肿瘤细胞的周期变化; ③ 既然重组质粒 pshRNA-Dnmt1 能成功地在体外培养的胃癌细胞株 AGS 中抑制细胞增殖促进凋亡, 那么在体内试验会不会得到相同的结论? 能否成为一种有着光明前景的肿瘤基因治疗试剂?

【参考文献】

- [1] Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2003, 4: 351-358.
- [2] 陈道荣, 王丕龙, 黄爱龙. DNMT1 靶向 RNA 干扰重组体的构建及序列分析 [J]. *重庆医科大学学报* 2004, 29(1): 8-11.
- [3] 宋斌, 王禾, 赵晶, 等. 短发卡状 PIT-1(PC-3) 基因特异性 RNA 干扰表达载体对 PC-3 细胞的体外效应 [J]. *第四军医大学学报* 2005, 26(9): 824-828.
- [4] 唐宽, 黄爱龙, 张秉强, 等. 应用 RNA 干扰技术抑制乙型肝炎病毒抗原表达的实验研究 [J]. *中华医学杂志* 2003, 83(15): 1309-1312.
- [5] 赵英, 任君琳, 孟艳玲, 等. hTERT siRNA 表达载体的构建及对转染的 HeLa 细胞生长抑制作用 [J]. *第四军医大学学报*, 2005, 26(9): 828-830.
- [6] 刘家云, 李庆霞, 黄红艳, 等. 瞬时转染和稳定转染对 RNAi 抑制乙型肝炎病毒 S 基因表达的影响 [J]. *第四军医大学学报*, 2005, 26(11): 961-964.
- [7] Kawasaki H, Taira K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells [J]. *Nature*, 2004, 431(7005): 211-217.
- [8] Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2003, 4(6): 351-358.
- [9] Sayf M. DNA methylation and cancer therapy [J]. *Drug Resist Updat*, 2003, 6(6): 341-353.
- [10] Guo G, Wang W, Bradley A. Mismatch repair genes identified using genetic screens in Blm-deficient embryonic stem cells [J]. *Nature*, 2004, 429: 891-895.