

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2003.05.07

• 基础研究 •

支气管上皮细胞系BEP2D 恶性转化过程中 p16 基因甲基化改变研究

张文 孙玉鹗 蔡庆 卢光明

【摘要】 目的 研究人支气管上皮细胞系 BEP2D 恶性转化过程中 p16 基因甲基化改变以及 p16 基因 mRNA 转录情况。方法 选取正常人支气管上皮细胞系 BEP2D 及其经 α 粒子照射 20 周 (R-20)、21 周 (R-21)、35 周 (T-35) 和 54 周 (T-54) 的 BEP2D 细胞株作为研究对象 (其中 R-20、R-21 未发生恶性转化, 而 T-35、T-54 已发生恶性转化), 采用甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP) 检测各细胞株中 p16 基因的甲基化改变情况, 再运用半定量反转录 PCR (retro-translation PCR, RT-PCR) 检测 p16 基因 mRNA 在各细胞株中的表达情况。结果 ① 正常 BEP2D 细胞株 p16 基因未发生甲基化, 而 R-20、R-21、T-35 和 T-54 细胞的 p16 基因均发生了甲基化改变。② 与正常 BEP2D 细胞相比, R-20、R-21、T-35 和 T-54 细胞 p16 基因 mRNA 转录水平均降低。结论 p16 基因甲基化改变发生在肺癌形成的早期阶段。p16 基因甲基化可导致 p16 基因 mRNA 转录水平降低。

【关键词】 肺肿瘤 p16 甲基化 甲基化特异性 PCR

【中图分类号】 R562; Q523

Study on p16 methylation status of BEP2D cells during its malignant transformation ZHANG Wen, SUN Yu'e, CAI Qing, LU Guangming. Department of Thoracic Surgery, PLA General Hospital, Beijing 100853, P. R. China

【Abstract】 Objective To study p16 methylation status and p16 mRNA transcription of BEP2D cells during its malignant transformation. **Methods** Normal BEP2D cell and BEP2D cells irradiated by α particle for 20 weeks (R-20), 21 weeks (R-21), 35 weeks (T-35) and 54 weeks (T-54) respectively were chosen to study the p16 methylation status by methylation-specific PCR (MSP). Meanwhile, RT-PCR was used to study p16 mRNA transcription of the above cells. **Results** ① p16 methylation was found in R-20, R-21, T-35 and T-54 cells, but not in normal BEP2D cell. ② The p16 mRNA transcription levels of R-20, R-21, T-35 and T-54 cells were much lower than that of normal BEP2D cell. **Conclusion** The p16 methylation occurs in the early stage of lung cancer. The methylation of p16 gene may cause the inactivation of p16 gene.

【Key words】 Lung neoplasms p16 Methylation MSP

p16 基因是一种肿瘤抑制基因, 它的失活能引起细胞无限制分裂增殖, 最终导致肿瘤发生。最早, 人们发现基因缺失和基因突变是导致 p16 基因失活的主要原因, 近年来 p16 基因甲基化导致 p16 基因失活的机制越来越引起人们的重视。国外一些学者提出, p16 基因的甲基化发生在肺癌形成的早期阶段。本实验对人支气管上皮细胞系 BEP2D 恶性转化过程中 p16 基因甲基化改变以及 p16 基因 mRNA 的转录情况进行研究, 以验证 p16 基因甲基化是否发生在肺癌形成的早期阶段。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 人支气管上皮细胞系 BEP2D 及 α 粒子照射诱发恶转细胞株由军事医学科学院放射医学研究所提供。BEP2D 细胞 α 粒子照射诱发恶性转化具体过程简介如下^[1]: 将指数生长期的 BEP2D 5×10⁵ 细胞接种于照射皿中, 培养 24 h, 细胞贴壁后以 α 粒子照射, 照射剂量为细胞核剂量 1.5 Gy, 照射不均匀度 < ±5%, 照射时间为连续照射 54 周。正常 BEP2D 细胞, 照射 20、21 周 (R-20、R-21) 细胞接种至裸鼠后均未发现肿瘤形成, 而照射 35 周 (T-35) 和 54 周 (T-54) 细胞接种至裸鼠身上后长成肿瘤, 经病理学鉴定为中度分化鳞状上皮细胞癌。

本实验选取正常 BEP2D 细胞、R-20、R-21、T-35 和 T-54 细胞作为研究对象。

作者单位: 100853 北京, 解放军总医院胸外科 (通讯作者张文现在空军总医院胸外科, 邮编 100036)



1.1.2 试剂盒和试剂 DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Mini Kit 购自德国 QIAGEN 公司;DNA 纯化试剂盒 Wizard Plus Minipreps 购自美国 Promega 公司;RNA 提取试剂盒 TRIzol Reagent 购自美国 GIBCO 公司;100 bp 梯度 DNA 分子量标准参照物(100~1 000 bp)购自华美公司。其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 p16 引物 引物设计参考文献 2,由上海生物工程公司合成。野生型(p16-W)扩增产物为 140 bp,非甲基化型(p16-U)扩增产物为 151 bp,甲基化型(p16-M)扩增产物为 150 bp。

1.1.4 β -肌动蛋白(β -actin) 引物序列^[3]由北京赛百盛生物公司合成并纯化。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞基因组 DNA 和总 RNA 的提取 按照试剂盒说明书所述方法抽提 DNA 和总 RNA。

1.2.2 甲基化特异性 PCR(MSP)^[2] 其原理是双链 DNA 变性解链后,亚硫酸盐作用下发生 C→U 转化, C 若已有甲基化则无此改变;甲基化修饰只发生于 5'→3'方向 C-G 相联结构的 C 上,因此,在亚硫酸盐作用后,DNA 若无甲基化,则序列中的改变为 C→U、CG→UG,若已有甲基化则为 C→C、CG→CG,用不同的引物做 PCR,即可检测出这种差异,从而确定基因有无 CpG 岛甲基化。先将提取的基因组 DNA (5 μ g) 加到 0.2 mol/L NaOH 终浓度的 50 μ l 碱裂解液中,37℃ 保温 10 min;然后将 3 mol/L 亚硫酸氢钠 (pH5.0)520 μ l 与 10 mmol/L 氢醌 30 μ l 轻轻混合,立即加入碱变性后的 DNA,上面覆盖一层矿物油,50℃ 保温 16 h,对基因组 DNA 的碱基进行亚硫酸氢钠修饰。再用 DNA 纯化试剂盒 Wizard Plus Minipreps 脱盐,将 DNA 洗脱进 50 μ l 水中。最后将含有磺化尿嘧啶的 DNA 在碱性条件下 (NaOH 终浓度 0.3 mol/L) 室温处理 5 min,再用乙醇沉淀。DNA 重新溶于 50 μ l 水中,取少部分定量,其余-20℃ 冻存。按文献 2 所述方法进行 MS-PCR 扩增,反应体积均为 50 μ l,PCR 循环在 PE9600 扩增仪上完成。预变性 95℃ 2 min,主循环 35 次[变性 95℃ 30 s,退火温度 (p16-W、p16-M、p16-U 分别为 67℃、65℃ 和 62℃) 40 s],末次延伸 72℃ 4 min。反应完成后,将 PCR 产物与上样液按 6:1 混合后,于 2% 琼脂糖凝胶上电泳,于凝胶成像系统下检测、照相。

1.2.3 半定量 RT-PCR 进行 p16 基因 mRNA 转录分析 取总 RNA 5 μ g,在 65℃ 变性 5 min 后,依次加入 5 \times 反转录缓冲液 4 μ l,dNTP 0.5 mmol/L,随机引

物 0.5 μ g,M-MLV 反转录酶(美国 Promega 公司) 300 U,总反应体积 20 μ l。在 37℃ 反应 90 min 后,70℃ 加热 10 min 终止反应。取 15 μ l(β -actin 2 μ l) 反转录反应液作模板进行 PCR 反应,选用 β -actin 作为内参照^[3]。用凝胶成像系统扫描 p16 和 β -actin 电泳条带,以 p16/ β -actin 的比值来计算 p16 基因 mRNA 转录水平。

2 结果

2.1 BEP2D 及恶转细胞株中 p16 基因的甲基化改变情况 正常 BEP2D 细胞未发生 p16 基因甲基化,而 R-20、R-21、T-35 和 T-54 细胞均已发生了 p16 基因甲基化(图 1)。

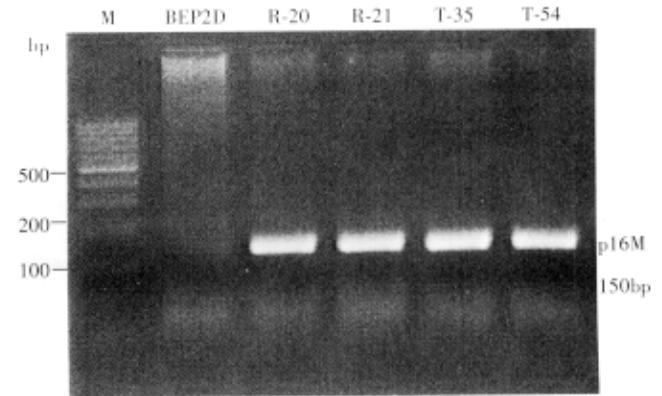


图 1 BEP2D、R-20、R-21、T-35、T-54 细胞 p16 MSP 电泳图
M: 100 bp DNA 梯度

Fig 1 p16 MSP electrophoretogram of BEP2D, R-20, R-21, T-35, T-54 cells

M: 100 bp DNA marker

2.2 p16 基因在 BEP2D 及恶转细胞株中的转录情况 表 1、2 为各细胞 p16 基因 mRNA 的 RT-PCR 分析结果。从表中可以看出,与 BEP2D 细胞相比,R-20、R-21、T-35、T-54 细胞 p16 基因 mRNA 转录量均降低(图 2)。

表 1 BEP2D、R-20、R-21 细胞 p16 基因 mRNA RT-PCR 分析结果

Tab 1 RT-PCR results of p16 mRNA of BEP2D, R-20, R-21 cells

Cell	p16 relative transcription level (p16/ β -actin)	Ratio to BEP2D
BEP2D	0.629 98 (29 596/46 979)	1
R-20	0.265 23 (12 377/46 666)	0.421 01
R-21	0.436 65 (20 142/46 128)	0.693 12

表 2 BEP2D、T-35、T-54 细胞 p16 基因 mRNA RT-PCR 分析结果

Tab 2 RT-PCR results of p16 mRNA of BEP2D, T-35, T-54 cells

Cell	p16 relative transcription level (p16/ β -actin)	Ratio to BEP2D
BEP2D	0.606 83 (28 376/46 761)	1
T-35	0.293 25 (13 675/46 632)	0.483 25
T-54	0.330 03 (15 369/46 568)	0.543 86

3 讨论

p16 基因是一种肿瘤抑制基因,它位于人染色体 9p21 区,全长 8.5 kb,由三个外显子和两个内含子组

成,它们共同编码 148 个氨基酸组成的 15.8 ku 的 p16 蛋白^[4,5]。p16 基因的失活会导致细胞无限制分裂增殖^[6]。研究表明,在许多肿瘤细胞系和原发性肿瘤中都有 p16 基因的改变。最早受到重视的是 p16 基因的缺失和突变,但研究中发现不带有上述改变的样品也会出现表达下调,后来证实基因甲基化也是表达下调的重要机制之一。p16 基因第一外显子和第二外显子部分区域富含 C 和 G,形成 CpG 岛,是 p16 基因甲基化的重要结构基础。从实验结果来看,BEP2D 细胞至少在受照射 20 周时就已发生了 p16 基因的甲基化,而此时将它们接种在裸鼠身上并不能长成肿瘤,说明此

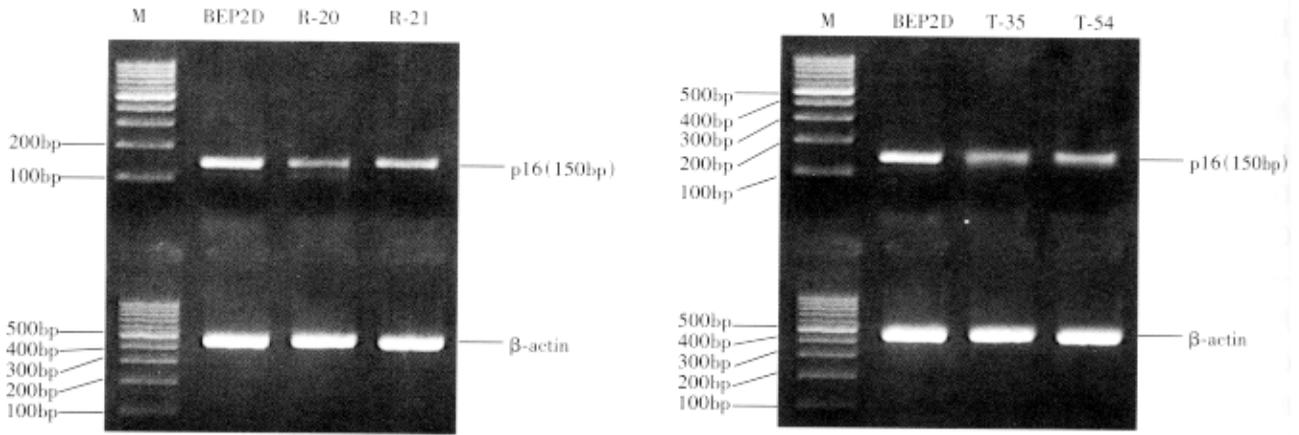


图 2 BEP2D、R-20、R-21、T-35、T-54 细胞 p16 基因 mRNA RT-PCR 电泳图

M: 100 bp DNA 梯度

Fig 2 p16 mRNA RT-PCR electrophoretogram of BEP2D, R-20, R-21, T-35, T-54 cells

M: 100 bp DNA marker

时细胞还没有发生恶变。随着照射继续进行,至受照射 35 周时,细胞发生恶性转化,裸鼠成瘤实验阳性,而此时细胞仍保持 p16 基因的甲基化改变,并且此后直到受照射 54 周时细胞还继续保持这种状况。这说明, p16 基因甲基化发生在肺癌形成的早期阶段,并且这种改变可以遗传给子代细胞。Belinsky 等^[7]对肺癌中 p16 基因甲基化的改变作了较为系统的研究,他们从肺癌患者的痰样品中检出 43%(3/7)有 p16 基因甲基化,而在没有肺癌的吸烟者痰样品中只检出 19.2%(5/26)有 p16 基因甲基化。他们发现,用香烟中的致癌成分诱导的大鼠肺腺癌中,94%的样品发生了 p16 基因甲基化改变。更为重要的是,在腺瘤和重度增生这样的癌前阶段也经常可以检测到 p16 基因的甲基化,说明它是致癌过程中的早期改变。在对鳞癌的研究中他们也发现,肺鳞癌在从基底细胞增生到原位癌的发展过程中,p16 基因甲基化亦有明显增高的趋势:

基底细胞增生、鳞状化生和原位癌中 p16 基因甲基化的检出率分别是 17%、24%和 50%,因此认为 p16 基因甲基化在人的肺癌发生中是一个早期事件,它有可能成为肺癌早期检测和评价预防措施效果的新的标志物。

实验发现,p16 基因在受照射 20 周以后的各代细胞中转录水平均降低,这一现象说明 p16 基因甲基化确实是导致 p16 蛋白表达降低的一个重要机制,但还不能简单地认为 p16 蛋白表达降低完全是由于 p16 基因的甲基化所致,因为军事医学科学院放射医学研究所对转化过程中的 BEP2D 细胞进行染色体研究时,发现部分 BEP2D 细胞发生了染色体的丢失、错位等变化,其中也包括 p16 基因所在的第 9 号染色体。另外,Gazzeri 等^[6]在对肺癌标本及细胞系进行研究时发现,部分 p16 蛋白表达降低的肺癌有 p16 基因的丢失、突变。那么,p16 基因的甲基化与 p16 基因的丢

失、突变之间是什么关系呢？目前已经知道，基因甲基化以后易于突变^[8]，基因甲基化的异常会引起基因组的不稳定，基因甲基化能促进染色体滞留^[9]导致基因丢失，还有研究表明基因甲基化在神经系统肿瘤中先于等位基因的缺失^[10]。通过以上几个事实可以推测，p16 基因的甲基化与 p16 基因的丢失、突变有内在联系，而且 p16 基因的甲基化比 p16 基因的丢失、突变发生得更早。

总之，本实验结果显示，p16 基因甲基化改变发生在肺癌形成的早期阶段，并且在肺癌形成后仍继续保持。它提示 p16 基因甲基化检测有希望成为肺癌早期诊断的新的标志物。

参 考 文 献

- 1 葛世丽, 楼铁柱, 项小琼, 等. α 粒子照射诱发 BEP2D 细胞恶性转化模型的建立. 癌症, 2001, 20(9) : 901-905.
- 2 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18) : 9821-9826.
- 3 魏海明, 刘杰, 田志刚, 等. 十四种细胞因子基因检测方法的建立及初步应用. 中华微生物学和免疫学杂志, 2000, 20(2) : 180-181.
- 4 Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regula-

- tor potentially involved in genesis of many tumor types. Science, 1994, 264(5157) : 436-440.
- 5 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature, 1993, 366(6456) : 704-707.
- 6 Gazzeri S, Gouyer V, Vourch C, et al. Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. Oncogene, 1998, 16(4) : 497-504.
- 7 Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(20) : 11891-11896.
- 8 Smith SS, Laayoun A, Lingeman RG, et al. Hypermethylation of telomere-like foldbacks at codon 12 of the human c-Ha-ras gene and the trinucleotide repeat of the FMR-1 gene of fragile X. J Mol Biol, 1994, 243(2) : 143-151.
- 9 Hsieh CL. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. Mol Cell Biol, 1994, 14(8) : 5487-5494.
- 10 Makos M, Nelkin BD, Chazin VR, et al. DNA hypermethylation is associated with 17p allelic loss in neural tumors. Cancer Res, 1993, 53(12) : 2715-2718.

(收稿: 2002-12-17 修回: 2003-07-29)

(本文编辑 李蓓兰)

• 简报 •

第一届中国西部暨第五届四川省肺癌学术会议简报

由中国抗癌协会肺癌专委会中国西部肺癌研究协作中心和四川省抗癌协会肺癌专委会共同主办，四川大学华西医院肿瘤中心承办的第一届中国西部暨第五届四川省肺癌学术会议，于 2003 年 9 月 28 日~9 月 30 日在四川省成都市金牛宾馆召开。虽然这是四川省、西部地区的一次肺癌学术会议，但同时也有来自美国、台湾以及国内其它省、市、自治区的知名专家的积极参与。大会收到论文 250 多篇，160 余人参会。孙燕院士、黄国俊教授、周清华教授、吴一龙教授等 13 位著名专家作了专题发言，近 30 篇论文在大会上进行了交流，内容涉及肺癌分子水平的基础研究，肺癌外科治疗，局部晚期肺癌扩大切除，电视胸腔镜、纵隔镜、PET 在肺癌诊治中的应用，肺癌影像学诊断，肺癌流行病学研究，以及肺癌化疗、放疗、多学科综合治疗等。

此次大会期间正式成立了中国抗癌协会肺癌专委会中国西部肺癌研究协作中心，选举产生了协作中心指导委员会、执委会，孙燕院士当选为指导委员会荣誉主任委员，张明和、黄国俊教授为指导委员会主任委员，刘锟、吴一龙教授为指导委员会副主任委员，周清华教授当选为执委会主任委员。中心将本着“团结、协作、求实、创新”的精神，积极开展肺癌临床和基础的多中心协作研究，肺癌防治知识普及教育，肺癌诊治规范的普及和统一；加强西部地区的学术交流、学术争鸣，以及与国内外的学术交流；加强西部地区肺癌防治人才培养，尤其是中青年骨干的培养。协作中心在会议期间协商了近期将要开展的临床多中心协作研究项目，并决定下一届西部肺癌学术会议将于 3 年后在新疆召开。

中国肺癌杂志

中国抗癌协会肺癌专委会中国西部肺癌研究协作中心

www.lungca.org 四川省抗癌协会肺癌专委会