

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.01.014

鼻咽癌中 PCDH17 基因启动子甲基化状态的研究

胡 琴, 胡国华

(重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma, NPC)细胞株中 PCDH17 基因启动子区甲基化状态及其对转录表达的影响。探讨 PCDH17 在 NPC 中发挥的功能。方法:运用半定量反转录 PCR 和甲基化特异性 PCR(Methylation-specific PCR, MSP)检测 5 株 NPC 细胞株, 人喉鳞癌细胞株(Fadu), 正常鼻咽上皮永生细胞系(NP69)中 PCDH17mRNA 的表达情况及 PCDH17 的甲基化情况。去甲基化药物处理细胞株后 PCDH17 的表达及甲基化的变化。应用细胞克隆形成实验及划痕实验检测 PCDH17 在 NPC 中的功能。结果:5 株 NPC 细胞株中无 PCDH17mRNA 表达, Fadu 中无表达, NP69 有表达。去甲基化药物处理细胞株后 PCDH17mRNA 表达上调。细胞功能实验提示 PCDH17 可以抑制细胞克隆形成及迁移。结论: NPC 细胞株中 PCDH17mRNA 表达下调主要受甲基化调控, PCDH17 在 NPC 中发挥着抑癌基因的作用。

【关键词】鼻咽癌; 甲基化; PCDH17**【中国图书分类法分类号】**R766.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-09-05

Methylation status of the PCDH17 gene promoter in Nasopharyngeal carcinoma

HU Qin, HU Guohua

(Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate PCDH17 gene promoter methylation status and its impact on the transcriptional expression of PCDH17 in NPC (Nasopharyngeal carcinoma, NPC) cell lines, and to investigate the function of PCDH17 in nasopharyngeal carcinoma. **Methods:** Semi-quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR) and Methylation specific PCR (MSP) were used not only to detect transcription level and promoter methylation status of PCDH17 gene in five NPC cell lines, human laryngeal carcinoma cell line (Fadu), normal immortalized epithelial cell lines (NP69), but also after NPC cell lines were exposed to demethylating agent. The tumor-suppressive function of PCDH17 in NPC cancer was investigated further in vitro assays. **Results:** PCDH17 was not expressed in 5 NPC cell lines and in Fadu, but expressed in NP69. Demethylating agent could restore the expression of PCDH17 mRNA. The Cell function experiments suggest that PCDH17 could inhibit the cell colony formation and migration. **Conclusion:** The transcriptional inactivation in NPC cell lines is mainly caused by the DNA methylation. PCDH17 plays a role of tumor suppressor gene in NPC.

【Key words】nasopharyngeal carcinoma; methylation; PCDH17

鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma, NPC)在中国南方和东南亚地区广泛流行,尤其是在说粤语的地区流行。有研究发现 NPC 的发生发展是一个多基因多步骤的过程包括多种因素如表观遗传学改变、遗传易感性、EB 病毒感染、环境因素以及饮食习惯^[1,2]。NPC 的早期诊断对病人的生存率有很重要的意义,然而 NPC 通常只有很少或者没有特异的局部症状。所有的这些因素给 NPC 的早期诊断提出了巨大的挑战。

PCDH17 是原钙黏蛋白家族成员之一,原钙黏蛋白是钙

黏蛋白家族细胞表面分子最大的子群,它们编码钙黏蛋白相关的神经受体在特异性细胞与细胞之间的连接和功能中起作用^[3]。PCDH17 的功能目前知之甚少,PCDH17 位于 13q21.1 它可能有多个造成细胞间的粘附,信号转导和生长控制潜在的肿瘤抑制功能^[4]。为深入探讨 PCDH17 基因在 NPC 发生、发展中的作用,且能找到 NPC 一个早期诊断的方法。本研究利用 RT-PCR 检测 5 株 NPC 细胞株及人喉鳞癌细胞株 Fadu,正常永生上皮细胞株 NP69 中 PCDH17 mRNA 表达,同时用甲基化特异性 PCR(Methylation-specific PCR, MSP)方法检测细胞株中 PCDH17 基因启动子甲基化情况并探讨其与 NPC 发生、发展的相互关系。

作者简介:胡 琴(1984-),女,硕士,

研究方向:耳鼻咽喉科基础与临床。

通信作者:胡国华,男,教授,Email:hghcq@sina.com。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

细胞株(NPC细胞株HK1、HONE1、HNE1、CNE1和 C666-1,正常永生上皮 NP69 及人喉鳞癌细胞株 Fadu)由香港中文大学肿瘤表观学实验室陶谦教授惠赠。胎牛血清和 RPMI1640 培养基购自 GIBCO 公司;Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;PCDH17 反转录酶购自 Promeag 公司;无内毒素质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司;DNA 的亚硫酸氢盐修饰所需试剂(Hydroquinone、低熔点琼脂糖、矿物油、Sodium metabisulphite)、甲基化转移酶抑制剂(5-Aza-2'-deoxycytidine, AzA)购自 Sigma;组蛋白去乙酰化抑制剂(Trichostatin A, TSA)购自 Cayman Chemical Co 公司;甲基化酶试剂盒购自 NEB 公司;ExTaq 耐热性 DNA 聚合酶、Marker 购自大连宝生物工程有限公;引物购自上海英俊生物技术有限公司;G418(Amrsc), RnaseA 酶购自 Qiagen 公司;脂质体 Lipofectamine2000 购于 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与药物处理 NPC 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞长到 80%~90%收取细胞以备提取 DNA、RNA。药物处理细胞时,细胞分别以 1×10^6 个/ml 的密度接种在培养瓶中。过夜培养后,细胞经 AzA (10 μ mol/L) (甲基化转移酶抑制剂)处理,每 24 h 换新鲜培养液培养持续 72 h。对于 AzA 联合应用 TSA 处理者,经 AzA 处理 72 h,随后加用 TSA (100 ng/ml) 24 h。处理结束后收取细胞提取 RNA 和 DNA 用于 RT-PCR 及 MSP 实验。

1.2.2 DNA 的提取及亚硫酸氢盐修饰 采用经典的蛋白酶 K 消化,酚/氯仿抽提,乙醇沉淀的方法提取细胞株中的 DNA。用紫外分光光度计测 260 nm 和 280 nm 处吸光度(A_{260} 、 A_{280})值,计算浓度及 A_{260}/A_{280} 比值。 OD_{260}/OD_{280} 在 1.7~1.9 范围内者 DNA 纯度合格。提取的 DNA 随之用亚硫酸氢盐处理依据香港中文大学陶谦教授的方法^[9],稍加修改。简单来说,2 μ g 提取 DNA 放入 0.3 mol/L NaOH 37℃,变性 10 min。变性 DNA 放入 300 μ l 新鲜的事先准备好的 10 mmol/L 对苯二酚和 4.8 mol/L 亚硫酸氢钠溶液中稀释。接着 55℃黑暗中孵育 4 h,孵育之后,DNA 样本用基因组 DNA 清理系统(TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)去盐。稀释后的 DNA 室温下用 0.3 mol/L NaOH 处理 8 min,随后用醋酸氨和乙醇沉淀。甲基化修饰 DNA 重悬于 20 μ l of TE 溶液放入-20℃下保存备用。

1.2.3 总 RNA 提取及半定量反转录 PCR 采用 Trizol 试剂法提取细胞株中 RNA,用紫外分光光度计测 A_{260} 、 A_{280} ,计算浓度及 A_{260}/A_{280} 比值。 OD_{260}/OD_{280} 在 2.0~2.2 范围内者 RNA 纯度合格。反转录采用 Promega 公司的 PCDH17 反转录酶,按说明书进行第 1 链 cDNA 的合成。PCDH17 上游引物:5'-TGGAGGAGAGGAACGCCATG-3',下游引物:5'-AACAAA-CTGCTGCCTGCTGC-3';GAPDH (Glyceraldehyde-3-phos-

phate dehydrogenase, GAPDH)上游引物:5'-GATGACCTTGC-CCACAGCCT-3',下游引物:5'-ATCTCTGCCCCCTCTGCT-GA-3', β -actin 上游引物:5'-CCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'下游引物:5'-GTGTCACCTTCACCGTTCC-3'引物由上海英俊生物技术有限公司合成。PCR 程序经过预实验确立,PCDH17 (299 bp):95℃ 预变性 2 min;95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 延伸 3 min,25℃ 延伸 10 s。GAPDH (304 bp), β -actin (268 bp):95℃ 预变性 2 min;95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,23 个循环;72℃ 延伸 5 min。2%的琼脂糖凝胶电泳 (120 V, 25~30 min)检测 RCR 产物。

1.2.4 MSP PCDH17 基因 MSP 上游引物:5'-GATTA-TCGGGTGTCGTAGTTC-3' (正义链,位于+732 to+753 根据 NCBI 数据库的转录起始位点确定),下游引物:5'-CCC-TAACGCAACGTACGCG-3' (反义链,位于+800 to+819)。PCDH17 基因非 MSP 上游引物:5'-AGATTATTGGGTGTTG-TAGTTT-3' (正义链,位于+731 to+753),下游引物:5'-AAC CCTAACACAACATACACA-3' (反义链,位于+800 to+821)。引物由上海英俊生物技术有限公司合成。MSP 程序 (87 bp):95℃ 预变性 10 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。非甲基化特异性 PCR 程序 (90 bp):95℃ 预变性 10 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s 42 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。2%的琼脂糖凝胶电泳分析。所有用于此实验的引物已经通过证实不会扩增没有用亚硫酸氢钠处理的 DNA。所有的实验均重复 3 次。

1.2.5 克隆形成实验 选取 CNE-1 细胞株做克隆形成实验,细胞以 2×10^5 个/孔放入 6 孔板中培养过夜,待细胞长到 80%~90%时运用脂质体 2000 (Invitrogen) (5 μ l)。分别转入 PCMV-PCDH17 质粒 (实验组) 及空质粒 (PCMV) (对照组) (香港中文大学陶谦教授惠赠) (5 μ g) 转染 48 h 后,实验组及对照组分别用一孔细胞提取 RNA 检测基因转入与否。余下细胞用 G418 (400 μ g/ml) 筛选 1~2 周^[9],未转染细胞在 G418 筛选下不能存活。存活克隆 (≥ 50 cells/克隆) 在吉姆萨染色后计数。筛选 11 d 后计数克隆形成数及摄像。所有实验重复 3 次。

1.2.6 划痕实验 用划痕实验比较实验组和对照组的细胞迁移能力。稳转细胞 (用浓度为 400 μ g/ml G418 筛选 11~14 d 后) 放入 6 孔板中培养直至铺满。用 20 μ l 枪头小心在孔板中划线。用 PBS 洗细胞 3 次,去除划下的细胞,加入新鲜培养液培养。放入 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。按 0、12、24、36 h 取样,拍照。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

3 次独立克隆实验的数据 (表 1),对照组的克隆数被设定为 100%,实验组数据做对应变换 (表 2)。运用 EXCEL 软件计算出实验组与对照组的平均值及标准误差作统计图,用 SAS 8.0 统计分析软件包处理数据。配对 *t* 检验用于计算 3 次克隆形成实验之间的统计学差异。取 $\alpha=0.05$ 作为检验水平, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 3 次独立克隆实验实验组与对照组克隆形成数据

Tab.1 Data of three independent colony formation experiments between experimental group and the control group

组别	第 1 次实验	第 2 次实验	第 3 次实验
PCMV	227	236	242
PCDH17	85	94	102

2 结 果

2.1 PCDH17 基因的转录表达水平

半定量反转录 PCR 即 RT-PCR 示:在 5 株 NPC 及人喉鳞癌细胞株中无表达,而在鼻咽正常永生上皮细胞株有表达(图 1)。

2.2 PCDH17 在 NPC 细胞株中的甲基化状态

MSP 示:PCDH17 在 5 株 NPC 细胞株中甲基化率为 100%(5/5)而在 NP69 中无甲基化(图 1)。

2.3 AZA、TSA 处理 NPC 细胞株

PCDH17 在应用了去甲基化药物之后表达增高,而甲基化程度降低,非甲基化程度升高(图 1)。

2.4 PCDH17 抑制细胞的迁徙

PCDH17 表达 CNE-1 细胞沿着划痕边缘生长的速度明显慢于无 PCDH17 表达(空质粒)者,提示 PCDH17 确实有抑制细胞生长的功能,同时提示其发挥着抑癌基因功能(图 2)。

2.5 PCDH17 能抑制细胞克隆形成

我们发现实验组与对照组之间克隆形成有统计学差异($P<0.001$),这提示 PCDH17 能抑制细胞克隆形成(图 2)。

3 讨 论

NPC 是一种基因 CpG 岛高频率甲基化的肿瘤,DNA 甲基化引起的抑癌基因失活在 NPC 的抑癌基因改变中起着重要作用,在 NPC 中肿瘤相关基因的甲基化改变参与了包括细胞周期调控、DNA 修复、细胞凋亡及肿瘤浸润转移的全过程^[7]。

PCDH17 是原钙黏蛋白家族的成员之一,目前有很多原钙黏蛋白被证实为肿瘤抑癌基因^[6,8,9],PCDH17 基因在食管癌和喉鳞状细胞癌存在高频甲基化,并证实该基因为抑癌基因^[4,10]。然其确切功能没有界定清楚,PCDH17 可能有多造成细胞间的粘附,信号转导和生长控制潜在的肿瘤抑制功能^[4]。据此我们假设 PCDH17 在 NPC 中有类似现象,故进行此研究。

本研究发现,5 株 NPC(0/5)及人喉鳞癌细胞株中无表达,5 株 NPC 细胞株全部存在甲基化,正常永生上皮细胞株 NP69 中有表达而无甲基化,提示其表达下调或不表达的主要机制可能由于 PCDH17 启动子 CPG 岛存在高频甲基化。这一假想在 5 株缺乏 PCDH17 mRNA 表达的 NPC 细胞株中应用了 AzA 和 TSA 之后得到了证实,同时说明 PCDH17 的表达下调与组蛋白去乙酰化也有一定的作用。PCDH17 启动子去甲基化治疗可能成为 NPC 治疗的新靶点,对 NPC 的早期诊断有所帮助,且间接提示 PCDH17 在 NPC 中发挥着抑癌基因的作用。克隆形成实验及划痕实验结果提示 PCDH17 可以抑制细胞克隆形成及迁移,这也直接证实了 PCDH17 在 NPC 细胞

表 2 3 次独立克隆实验实验组与对照组的相对形成数的比较

Tab.2 Relative data of three independent colony formation experiments between experimental group and the control group

组别	第 1 次实验	第 2 次实验	第 3 次实验	平均值	标准误 SD	t	P
PCMV	100	100	100	100	0	44.390 0	0.000 5
PCDH17	37.400 0	39.800 0	42.100 0	39.766 6	2.350 2		

注:实验组(PCDH17)和对照组(PCMV)比较, $P<0.001$

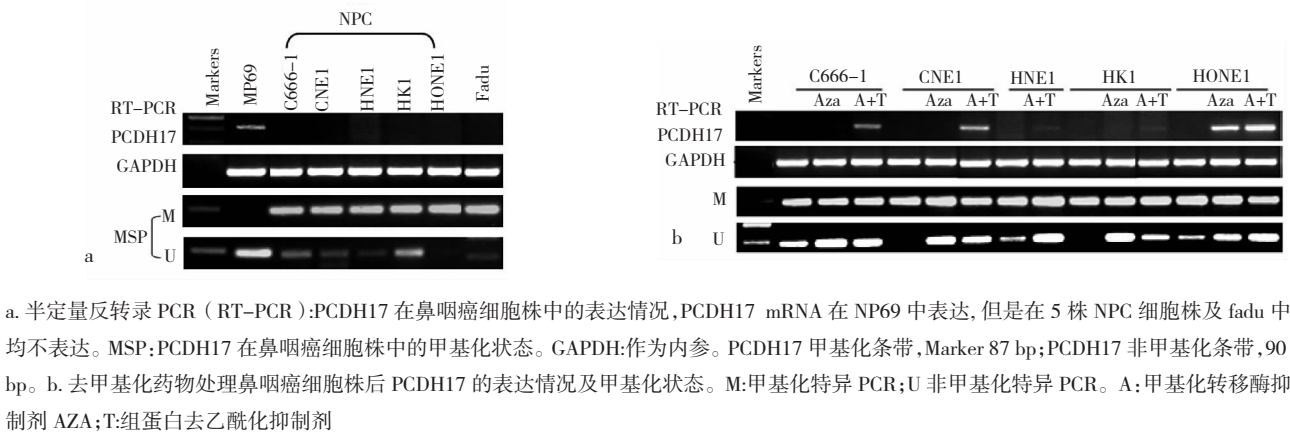


图 1 细胞株中 PCDH17 的表达及甲基化情况与用去甲基化药物之后的对比

Fig.1 Compare mRNA expression and methylation status of PCDH17 with after demethylating drugs in NPC cell lines

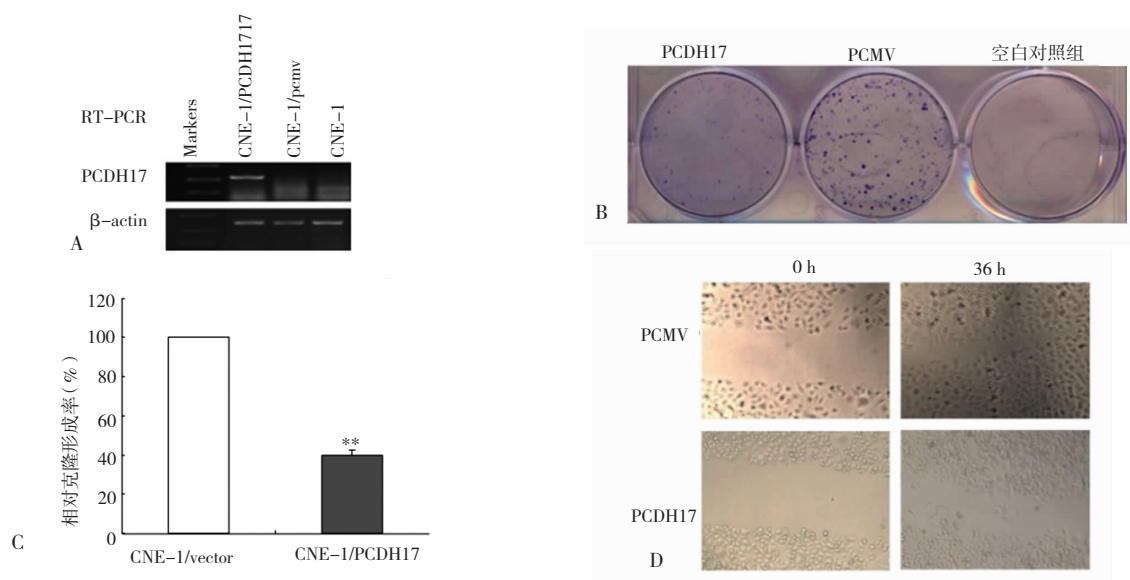


图 2 转染后细胞克隆形成及划痕实验结果
Fig. 2 Transfected cell colony formation and the scratch test results

胞株中发挥了抑癌功能,PCDH17 是 NPC 的一个抑癌基因。

参 考 文 献

- [1] Yao K T.Epidemiological characteristics and presumed carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma in Hunan province-based on 1973-1975 cancer mortality survey[J].Bull Hunan Med Coll,1982,7:10-17.
- [2] Choi P H,Suen M W,Huang D P,et al.Nasopharyngeal carcinoma; genetic changes,Epstein-Barr virus infection,or both A clinical and molecular study of 36 patients[J].Cancer,1993,72(10):2873-2878.
- [3] Yagi T.Clustered protocadherin family[J].Dev Growth Differ,2008,50(s1):131-140.
- [4] Shigeo Haruki,Issei Imoto,Ken-ichi Kozaki,et al.Frequent silencing of protocadherin 17,a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma[J].Carcinogenesis,2010,31(6):1027-1036.
- [5] Tao Q,Swinnen L J,Yang J,et al.Methylation status of the Epstein-Barr virus major latent promoter C in iatrogenic B cell lymphoproliferative disease.Application of PCR-based analysis[J].Am J Pathol,1999,155(2):619-625.

- [6] Ying J,Li H,Seng T J,et al.Functional epigenetics identifies a protocadherin PCDH10 as a candidate tumor suppressor for nasopharyngeal,esophageal and multiple other carcinomas with frequent methylation[J].Oncogene,2006,25(7):1070-1080.
- [7] Tao Q,Chan A T.Nasopharyngeal carcinoma;molecular pathogenesis and therapeutic developments[J].Expert Rev Mol Med,2007,9(12):1-24.
- [8] Waha A,Guntner S,Huang T H,et al.Epigenetic silencing of the protocadherin family member PCDH-gamma-A11 in astrocytomas[J].Neoplasia,2005,7(3):193-199.
- [9] Imoto I,Izumi H,Yokoi S,et al.Frequent silencing of the candidate tumor suppressor PCDH20 by epigenetic mechanism in non-small-cell lung cancers[J].Cancer Res,2006,66(9):4617-4626.
- [10] Maciej Giefing,Natalia Zemke,Damian Brauze,et al.High resolution arrayCGH and expression profiling identifies PTPRD and PCDH17/PCH68 as tumor suppressor gene candidates in laryngeal squamous cell carcinoma[J].Genes,Chromosomes & Cancer,2011,50(3):154-166.

(责任编辑:关蕴良)