

人胃癌细胞肿瘤相关基因的表达与甲基化调控

杨 丽, 朱红音, 程中华, 陆 嵘, 陈紫暄, 房静远

杨丽, 同济大学附属同济医院消化科 上海市 200065
朱红音, 程中华, 陆嵘, 陈紫暄, 房静远, 上海第二医科大学附属仁济医院消化疾病研究所 上海市 200001
杨丽, 女, 1973-11-16 生, 山东省肥城市人, 汉族. 2003 年上海第二医科大学硕士.
国家自然科学基金资助项目, No. 30170413
通讯作者: 房静远, 200001, 上海市山东中路 145 号, 上海第二医科大学附属仁济医院消化疾病研究所. jingyuanfang@yahoo.com
电话: 021-63200874 传真: 021-63266027
收稿日期: 2005-01-24 接受日期: 2005-02-26

Expression and methylation of tumor-associated genes in human gastric cancer cell lines

Li Yang, Hong-Yin Zhu, Zhong-Hua Cheng, Rong Lu, Ying-Xuan Chen, Jing-Yuan Fang

Li Yang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai 200065, China
Hong-Yin Zhu, Zhong-Hua Cheng, Rong Lu, Ying-Xuan Chen, Jing-Yuan Fang, Institute of Digestive Disease, the Affiliated Renji Hospital of Shanghai Second Medical University, Shanghai 200001, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30170413
Correspondence to: Dr. Jing-Yuan Fang, Institute of Digestive Disease, the Affiliated Renji Hospital of Shanghai Second Medical University, 145 Shandong Zhong Road, Shanghai 200001, China.
jingyuanfang@yahoo.com
Received: 2005-01-24 Accepted: 2005-02-26

Abstract

AIM: To investigate the expression and methylation of tumor suppressor genes and oncogenes in the carcinogenesis of gastric cancer, and to further explore new methods for the treatment of gastric cancer.

METHODS: The gastric cancer MKN-45 and HGC-27 cell lines were cultured and then exposed to different concentrations (2 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$ and 10 $\mu\text{mol/L}$) of 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) for 24 and 72 hours. MTT assay was used to examine the viability of the cells. Then the DNA and RNA of the cells were extracted and the expression of p16^{INK4A}, p21^{WAF1}, p53, c-myc, and c-Ha-ras were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). At the same time, the cell cycles of MKN-45 and HGC-27 were observed by flow cytometry. Bisulfite modification and sequencing and methylation-specific PCR were used to detect the methylation of p16^{INK4A} and c-myc promoter region.

RESULTS: The concentrations and exposed time of 5-aza-dC had no significant effect on the viability of gastric cancer cells. p16^{INK4A} was expressed in both MKN-45 and HGC-27 cells before treatment. After treated with 5-aza-dC, p16^{INK4A} expression was increased in both kinds of the cells, and the 5-aza-dC concentration and exposed time were different between the two kinds of cells when the most markedly increased expression of p16^{INK4A} appeared. p53, p21^{WAF1}, c-myc and c-Ha-ras were all expressed before and after treatment. HGC-27 cells were blocked at G1 period, but no changes of MKN-45 cell cycle were observed. Methylation in p16^{INK4A} promoter region occurred so that the expression of this gene was reduced. After treated with demethylation agent 5-aza-dC, the expression of p16^{INK4A} was increased.

CONCLUSION: Methylation regulates the expression of p16^{INK4A}, but not p21^{WAF1}, p53, c-myc, and c-Ha-ras. 5-aza-dC can up-regulate the transcription of tumor suppressor gene through demethylation, in which its concentration and exposed time play an important role.

Key Words: Methylation; Tumor suppressor genes; Oncogene; Gastric cancer

Yang L, Zhu HY, Cheng ZH, Lu R, Chen YX, Fang JY. Expression and methylation of tumor-associated genes in human gastric cancer cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1493-1498

摘要

目的: 旨在阐明胃癌的发生中多种抑癌基因和癌基因甲基化情况, 以期为进一步深入探索通过改变抑癌基因的甲基化而为胃癌治疗提供新方法.

方法: 培养人胃癌细胞株 MKN-45 和 HGC-27 两种细胞, 在 MTT 确定去甲基化制剂 5-氮脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC) 浓度和时间对细胞生长活力没有影响后, 分别以 2, 5, 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度分别干预 24 和 72 h, 然后提取其 DNA 和 RNA, 用 RT-PCR 的方法检测 p16^{INK4A}, p21^{WAF1}, p53, c-Ha-ras 和 c-myc 等多种基因的表达情况; 同时以流式细胞仪分析药物干预后的 MKN-45 和 HGC-27 的细胞周期变化; DNA 分析则通过亚硫酸氢盐修饰和测序和甲基化特异性 PCR(MSP) 的方法检测 p16^{INK4A} 基因及 c-myc 启动子区甲基化的情况.

结果:我们所采用的 5-aza-dC 的浓度和时间对细胞的生长无显著性影响.5-aza-dC 干预前, MKN-45 和 HGC-27 两种胃癌细胞系中均有 p16^{INK4A} 表达, 5-aza-dC 干预后在 MKN-45 和 HGC-27 两种胃癌细胞系中 p16^{INK4A} 的表达增强, 且不同的胃癌细胞株表达增强最明显时的时间与浓度不同. p53, p21^{WAF1}, c-myc, c-Ha-ras 等多种基因在干预前后均有表达, 且在干预前后无明显变化. 在 5-aza-dC 干预后, HGC-27 细胞周期阻滞在 G1 期, 而 MKN-45 细胞的周期无明显改变. p16^{INK4A} 启动子区存在甲基化使得该基因的表达减少, 在去甲基化试剂处理后使其表达增强.

结论:人胃癌细胞系 MKN-45 和 HGC-27 中, p16^{INK4A} 启动子甲基化是其在表达减弱的主要原因, 其去甲基化程度取决于 5-aza-dC 干预的时间和浓度.

关键词: 甲基化; 抑癌基因; 癌基因; 胃癌

杨丽, 朱红音, 程中华, 陆嵘, 陈蒙恒, 房静远. 人胃癌细胞肿瘤相关基因的表达与甲基化调控. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1493-1498
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1493.asp

0 引言

DNA 甲基化在肿瘤的发生和发展中扮演着极其重要的角色, DNA 甲基化异常是通过影响癌基因和抑癌基因的表达以及基因组的稳定性而参与肿瘤的发生和发展的. 胃癌是危害我国人们生命和健康的主要癌症之一, 我们采用去甲基化作用的 5-aza-dC 处理 MKN-45 和 HGC-27 胃癌细胞株, 研究胃癌的与细胞增殖相关的基因甲基化紊乱情况, 澄清是否同一个体肿瘤发生过程中存在不同基因的低甲基化或高甲基化紊乱问题, 探索通过纠正 DNA 甲基化的化学干预, 而影响胃癌细胞的增殖, 进而控制肿瘤进程的可能性如下.

1 材料和方法

1.1 材料 MKN-45 和 HGC-27 人胃癌细胞株细胞来自上

海市消化疾病研究所, 5-氮脱氧胞苷 (5-aza-dC) (Sigma), RPMI1640 培养基 (Gibco), 小牛血清, 胰蛋白酶、HEPES、L-谷氨酰胺、焦碳酸二乙酯 (DEPC) (Amresco), 四甲基偶氮唑盐 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) (Sigma), 细胞培养瓶、96 孔细胞培养板 (Nunc), Trizol 试剂、RNA 酶抑制剂 (Gibco), 三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇 (分析醇) 购于上海化学试剂总公司, dNTP mixture (10 mmol/L)、TaqDNA 寡合酶 (5 MU/L) (Takara), oligo(dT)、RT-RCR 引物合成 (上海生工生物公司), M-MLV 逆转录酶: Peomega 公司产品, PCR Mark:100 bp DNA Ladder (上海生工生物公司), 琼脂糖 (华美公司), QIAamp DNA Mini kit (Germany, Cat.No. 51304)

1.2 方法 人胃癌细胞系 MKN-45 和 HGC-27 培养, MTT 比色实验筛选对细胞的生长无显著性影响的 5-aza-dC 浓度和时间. 细胞培养和相应药物浓度时间的干预, Trizol 等相关试剂抽提细胞 RNA, RT-PCR 扩增 p16^{INK4A}, p21^{WAF1}, p53, c-Ha-ras 和 c-myc 基因, 引物序列见表 1, 反应体系如下 (25 μ L): 10 \times buffer 2.5 μ L, Mg²⁺ 1.5 μ L, dNTP 0.5 μ L, 引物 1 1 μ L (10 pmol), 引物 2 1 μ L (10 pmol), cDNA 2.0 μ L, Taq 酶 1.5 U, 琼脂糖电泳分析. 流式细胞仪检测相关细胞周期. QIAamp DNA Mini kit 抽提 5-aza-dC 干预后的和对照组的 MKN-45 和 HGC-27 细胞 DNA. DNA 亚硫酸氢盐处理: 取 5 μ g DNA 加 NaOH 至终浓度为 0.2 mol/L, 37 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 向变性 DNA 中加入新鲜配置的 10 mmol/L 的氰脲 30 μ L 及 3 mol/L 的亚硫酸氢钠 (pH = 5) 520 μ L, 加入矿物油 200 μ L, 样品于 50 $^{\circ}$ C 孵育 16 h, 修饰后的 DNA 根据说明书用 Wizerd DNA 纯化树脂 (Promega) 纯化, 用水 50 μ L 洗脱. 加 5.5 μ L 3 mol/L NaOH 至洗脱液, 室温放置 5 min, 加 17 μ L 10 mol/L 的醋酸胺, 糖原 1 μ L 及 950 mL/L 冰冷乙

表 1 RT-PCR 各引物序列、反应条件和基因登录号

引物	正义(5' \rightarrow 3')	反义(5' \rightarrow 3')	反应条件及产物大小	GeneBank Number
β -Actin	GGC ATC GTG ATG GAC TCC G	GCT GGA AGG TGG ACA GCG A	94 $^{\circ}$ C 5 min, 92 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30 cycle, 72 $^{\circ}$ C 5 min; 612 bp	BC023204
p16 ^{INK4A}	CCC GCT TTC GTA GTT TTC AT	TTA TTT GAG CTT TGG TTC TG	94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 cycle, 72 $^{\circ}$ C 5 min; 355 bp	L27211
p21 ^{WAF1}	CCC AGT GGA CAG CGA GCA GC	ACT GCA GGC TTC CTG TGG GC	94 $^{\circ}$ C 5 min, 92 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 cycle, 73 $^{\circ}$ C 5 min; 450 bp	S 67388
p53	CAG CCA AGT CTG TGA CTT GCA CGT AC	CTA TGT CGA AAA GTG TTT CTG TCA TC	94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 cycle, 72 $^{\circ}$ C 5 min; 292 bp	XM 008679
c-myc	CCA ACA GGA GCT ATG ACC TC	CTC GGT CAC CAT CTC CAG CT	94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 cycle, 72 $^{\circ}$ C 5 min; 290 bp	V00568
c-Ha-ras	CAA GAG TGC GCT GAC CAT CC	CCG GAT CTC ACG CAC CAA C	95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 1 min, 63 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 cycle, 72 $^{\circ}$ C 5 min; 420 bp	BC006499

表2 甲基化测序引物序列及PCR扩增条件

引物	正义(5' → 3')	反义(5' → 3')	反应条件及产物大小	GeneBank Number
p16 ^{INK4A} SecA1	GTA GGT GGG GAG GAG TTT AGT T	TCT AAT AAC CAA CCA ACC CCT CC	95℃ 5 min, 95℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min, 40 cycle, 72℃ 5 min; 280 bp	AF022809
p16 ^{INK4A} SecA2	GGG GGA GAT TTA ATT TGG	CCC TCC TCT TTC TTC CTC	95℃ 5 min, 95℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min, 40 cycle, 72℃ 5 min; 190 bp	AF022809
c-myc meth-MSP (exon1-2)	TAG AAT TGG ATC GGG GTA AA	CGA CCG AAA ATC AAC GCG AAT	95℃ 5 min, 95℃ 1 min, 56℃ 2 min, 72℃ 3 min, 5 cycle, 95℃ 30 s; 131 bp 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 cycle, 72℃ 5 min,	AF002859
c-myc unmeth-MSP (exon1-2)	TAG AAT TGG ATT GGG GTA AA	CCA ACC AAA AAT CAA CAT GAA T	95℃ 5 min, 95℃ 1 min, 56℃ 2 min; 132 bp 72℃ 3 min, 5 cycle; 95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 cycle; 72℃ 5 min	AF002859

醇 500 μL 过夜, 14 000 g 4℃ 离心 30 min, 以 700 mL/L 乙醇洗沉淀物, 真空干燥, 加水 20 μL , 冻存 -70℃ 或 MSP 和测序. 设计巢式 PCR 引物及 MSP 引物见表 2, 巢式 PCR 扩增体系 1 (25 μL): 10 \times buffer 2.5 μL , Mg^{2+} 3 μL , dNTP 2 μL , 引物 1 2 μL (10 pmol/L), 引物 2 2 μL (10 pmol/L), 亚硫酸氢钠处理后的 DNA 6 μL , Taq 酶 1.5 U, 水补足体系至 25 μL , PCR 体系 2 (25 μL) 10 \times buffer 2.5 μL , Mg^{2+} 3 μL , dNTP 2 μL , 引物 1 2 μL (10 pmol), 引物 2 2 μL (10 pmol), DNA 6 μL , Taq 酶 1.5 U, 水补足体系至 25 μL , 加入物为 PCR 体系 1 产物, 对产物 p16^{INK4A} 启动子测序, MSP 检测 c-myc 甲基化.

2 结果

未分化胃癌细胞 HGC-27 细胞在 2 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-dC 干预 72 h 后细胞死亡, 故未对其进行 MTT 实验. 试验表明与对照组相比, 浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-dC 24 h 干预 HGC-27 胃癌细胞时, 对细胞活力没有明显变化 ($P>0.05$). p16^{INK4A} 在 MKN-45 细胞系的 10 $\mu\text{mol/L}$ 24 h、2 $\mu\text{mol/L}$ 72 h、5 $\mu\text{mol/L}$ 72 h 组处理后

增强, 且表达的增强与处理时间和剂量不呈依赖关系, 而 p53, p21^{WAF1}, c-myc, c-Ha-ras 的处理前后表达无明显变化 (图 1). p16^{INK4A} 在 HGC-27 细胞系的 5 $\mu\text{mol/L}$ 24 h 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 24 h 组处理后表达增强, 且表达的增强与处理时间和剂量不呈依赖关系, 而 p53, p21^{WAF1}, c-myc, c-Ha-ras 的处理前后表达无明显变化 (图 2). 肿瘤相关基因 p53, p21^{WAF1}, c-myc, c-Ha-ras 在 5-aza-dC 处理前后没有明显关系, 说明甲基化对上述基因 mRNA 表达的影响不明显. 抑癌基因 p16^{INK4A} 在不同浓度 5-aza-dC 干预下有不同程度的表达增强, 以 ACTIN 为对照进行光密度扫描. 干预前 MKN-45 和 HGC-27 细胞 02 和 88.2, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-dC 干预 24 h 为 106, 131, 141 和 118, 141, 135; 72 h 为 151, 165, 138. 采用流式细胞仪检测细胞周期, 与未处理对照组比较 $P<0.05$ (表 3). 对 PCR 体系 2 产物进行测序, 结果显示 p16^{INK4A} 因 5' 端, 对照组甲基化片段 (图 3A) 中所有的 CpG 二核苷酸中的胞嘧啶保持不变, 而 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-dC 干预组中非甲基化片断 (图 3B) 中所有的胞嘧啶都变成了胸腺嘧啶. HGC-27 细胞 c-myc MSP 结果表明 HGC-27 细胞的 c-myc 中有异常甲基化现象, 甲基化和非甲基化碱基共存,

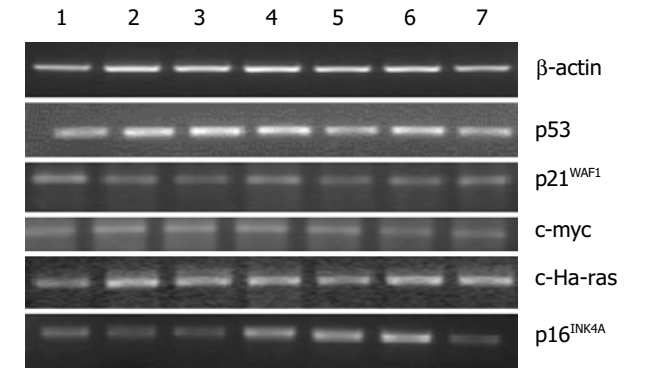


图1 5-aza-dC 对 MKN-45 细胞肿瘤相关基因表达的影响. 1: control; 2: 2 $\mu\text{mol/L}$ 24 h; 3: 5 $\mu\text{mol/L}$ 24 h; 4: 10 $\mu\text{mol/L}$ 24 h; 5: 2 $\mu\text{mol/L}$ 72 h; 6: 5 $\mu\text{mol/L}$ 72 h; 7: 10 $\mu\text{mol/L}$ 72 h.

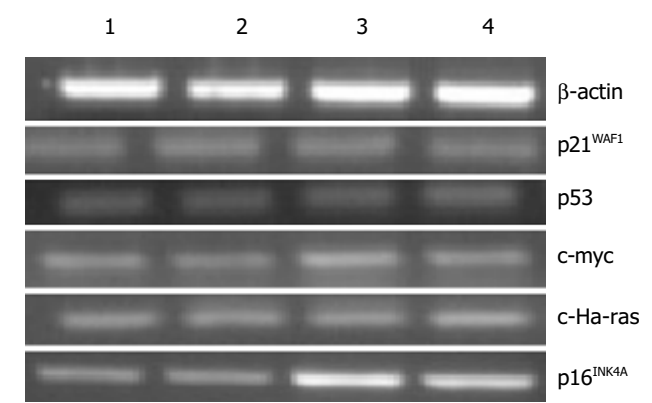


图2 5-aza-dC 对 HGC-27 细胞肿瘤相关基因表达的影响. 1: control; 2: 2 $\mu\text{mol/L}$ 24 h; 3: 5 $\mu\text{mol/L}$ 24 h; 4: 10 $\mu\text{mol/L}$ 24 h.

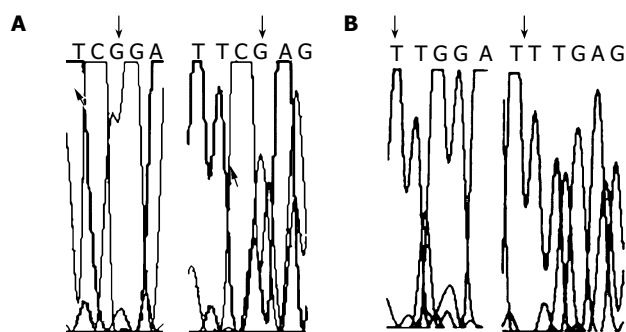


图3 p16^{INK4A} 启动子序列. A: Control; B: 5 μmol/L 5-aza-dC 干预 24 h.

且在去甲基化试剂处理前后没有明显变化(图4). MKN-45细胞的c-myc中也有异常甲基化现象, 甲基化和非甲基化碱基共存, 且在去甲基化试剂处理前后没有明显变化(图5).

表3 5-aza-dC 24h 对 HGC-27 和 MKN-45 细胞周期的影响 (mean±SD, %)

分组	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
HGC-27 对照组	43.7 ± 2.78	46.8 ± 5.95	11.5 ± 4.98
2 μmol/L 5-aza-dC	47.5 ± 1.36	39.4 ± 0.51	13.1 ± 1.25
5 μmol/L 5-aza-dC	51.8 ± 1.61 ^a	31.3 ± 1.60 ^a	17.0 ± 0.38 ^a
10 μmol/L 5-aza-dC	51.4 ± 2.34 ^a	32.5 ± 1.91 ^a	17.1 ± 3.13 ^a
MKN-45 对照组	70.4 ± 0.75	19.3 ± 0.15	10.3 ± 0.67
2 μmol/L 5-aza-dC	63.6 ± 7.21	23.9 ± 5.43	12.5 ± 1.79
5 μmol/L 5-aza-dC	63.0 ± 6.29	24.4 ± 5.16	12.6 ± 1.36
10 μmol/L 5-aza-dC	69.9 ± 3.14	19.3 ± 2.90	10.9 ± 1.17

^aP<0.05 vs 对照组.

3 讨论

在人类肿瘤中基因已知的三个失活途径包括: 缺失, 点突变和启动子甲基化, 后者属于表观遗传变化(epigenetic changes). DNA甲基化是指由DNA甲基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)催化的DNA的一种天然修饰方式, 他广泛存在于细菌、植物和哺乳动物, 在真核生物中DNA甲基转移酶以S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-methionine, SAM)为甲基供体将甲基转移到胞嘧啶第五位碳原子上. 甲基化的胞嘧啶多位于CpG岛上, 在DNA双链中呈对称性分布.

现已证实, DNA甲基化在肿瘤的发生和发展中扮演着极其重要的角色, DNA甲基化异常是通过影响癌基因和抑癌基因的表达以及基因组的稳定性而参与肿瘤的发生和发展的. 近来人们发现肿瘤细胞的总基因组甲基化水平比正常细胞低, 但是伴有某些特定CpG岛甲基化程度的增高. 抑癌基因的高度广泛甲基化使DNA发生转录抑制, 抑癌基因的不表达参与了肿瘤

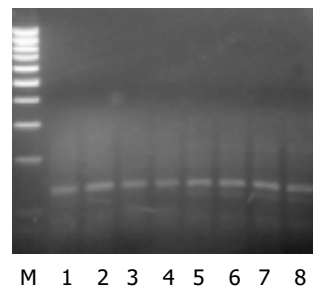


图4 HGC-27 细胞 c-myc MSP. M: Mark; 1: control; 2: 2 μmol/L; 3: 5 μmol/L; 4: 10 μmol/L; 5: control; 6: 2 μmol/L; 7: 5 μmol/L; 8: 10 μmol/L.

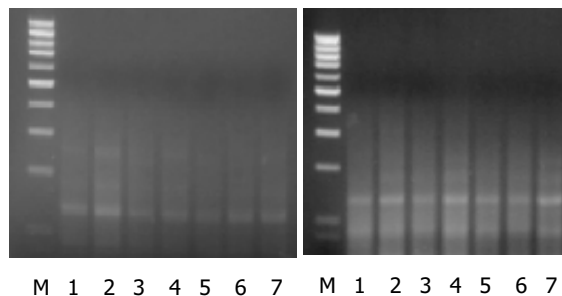


图5 MKN-45 细胞 c-myc, MSPM. Mark; 1: control; 2: 2 μmol/L; M: Mark; 1: control; 2: 2 μmol/L 3: 5 μmol/L 24 h; 4: 10 μmol/L 24 h; 3: 5 μmol/L 24 h; 4: 10 μmol/L 24 h; 5: 2 μmol/L 2 h; 6: 5 μmol/L 72 h; 5: 2 μmol/L 72 h; 6: 5 μmol/L 72 h 7: 10 μmol/L 72 h; 7: 10 μmol/L 72 h.

的发生. 转录抑制机制可能是: 1. CpG岛甲基化直接干扰转录因子(transcription factor, TF)与调控区DNA的结合, 如CAMP反应元件结合蛋白、AP-2、E2F等之后, TF不能于其相应的甲基化DNA结合位点相结合; 2. 甲基化DNA结合蛋白(MBD2)以及甲基胞嘧啶结合蛋白1和2(methylation binding proteins 1 and 2, MeCP1 and MeCP2)与甲基化DNA特异结合, 抑制基因转录; 3. DNA甲基化也可以改变染色质结构, 间接抑制基因转录. 癌基因和抑癌基因的甲基化与肿瘤的发生和发展之间的关系已成为肿瘤研究的另一热点.

我们采用体外培养胃癌细胞株研究甲基化与胃癌的关系. 首先MTT比色法测定发现, 给予的5-aza-dC药物浓度和时间对细胞的生长没有明显影响后, RT-PCR检测到两种细胞株的癌基因c-myc、c-Ha-ras和抑癌基因p21^{WAF1}、p53在处理前后表达没有明显变化, 说明甲基化对这两种细胞系的这几种基因mRNA表达影响不大, 而p16^{INK4A}在HGC-27细胞系的5 μmol/L 24 h组和10 μmol/L 24 h组处理后表达增强, MKN-45细胞系的10 μmol/L 24 h、2 μmol/L 72 h、5 μmol/L 72 h组处理后增强, 且表达的增强与处理时间和剂量不呈依赖关系, 提示各种细胞对5-aza-dC的敏感剂量各不相同, 这可能对今后选择药物的时间和剂量具有借鉴作用.

p16^{INK4A}基因是一抑癌基因, 除了等位基因缺失罕

见的失活性突变外, 多数的研究表明 p16^{INK4A} 基因启动子部位的甲基化的紊乱是基因静默的主要机制^[1-6]. p16^{INK4A} 基因 5-CpG 岛甲基化已经被证实并且与脑瘤、颈部肿瘤、肺癌、胃癌、食管癌和膀胱癌的转录抑制有密切的关系, 而且用 5-aza-dC 干预甲基化的细胞群导致启动子区域甲基化水平的严重下降而使 p16^{INK4A} 基因重新表达.

Lee *et al*^[7] 发现原发性胃癌中 p16^{INK4A} 基因的 mRNA 转录缺陷往往因为 DNA 甲基化的紊乱. 他们认为 DNA 甲基化可能是 p16^{INK4A} 基因失活的一条途径, 由此可进而发展为胃癌. 5' 端和第 1 外显子的异常甲基化, 使 p16^{INK4A} 基因在有些人胃癌细胞系中不能被检出, 且此转录抑制可因为应用 5-aza (5-aza-dC 类似物) 而逆转. Shim *et al*^[8] 也用 MSP 检测到胃癌中的 p16^{INK4A} 甲基水平: 42% 胃癌有高甲基化, 高甲基化病例中 (19/22) 有完全 p16^{INK4A} 的活性丢失, 而未甲基化病例 19 人中只有 2 人. p16^{INK4A} 高甲基化同免疫活性的相关性分析表明甲基化是胃癌中 p16^{INK4A} 失活的重要机制. 有学者^[9] 采用亚硫酸氢盐修饰和测序分析了 9 个胃癌细胞系, 发现 p16^{INK4A} 表达失活伴同其启动子区的高甲基化. 28 例患者中的 6 例有 p16^{INK4A} 表达缺失, 5 例有启动子区甲基化. 这表明启动子区特殊 CpG 岛的从头甲基化与 p16^{INK4A} 的转录静默有明显关系, RT-PCR 实验结果也初步的证实了 p16^{INK4A} 基因的 mRNA 表达受甲基化调控. 我们采用了同一方法检测发现, 在启动子区存在甲基化, 使该细胞基因的表达减少, 去甲基化试剂处理后, 使其甲基化程度减少. 序列分析中对照组在亚硫酸氢盐处理后 CG 没有变化, 说明其中的 C 是甲基化的, 而去甲基化处理后 CG 在亚硫酸氢盐处理后变为 TG, 说明其中的 C 是非甲基化的, 这可以解释处理组中的 p16^{INK4A} 表达增强. 我们还对癌基因 c-myc DNA 进行甲基化特异性 PCR (MSP) 分析^[10]. 证明 c-myc DNA 中有异常甲基化现象, 甲基化和非甲基化碱基共存, 且在去甲基化试剂处理前后没有明显变化, 这也解释了在这两种细胞中去甲基化试剂对癌基因的表达没有造成明显影响的原因.

p53 和 p21^{WAF1} 是重要的抑癌基因, 参与细胞增殖、监视 DNA 损伤和诱导细胞凋亡、影响其他基因表达. 但是在此肿瘤细胞系中未发现甲基化对其 mRNA 表达的影响不大. Shin^[11] 博士的结果也显示胃癌细胞中 p21^{WAF1} 基因启动子并未甲基化, 说明甲基化并不是胃癌细胞中 p21^{WAF1} 失活的机制. c-myc 和 c-Ha-ras 是胃癌中的癌基因, 参与多种细胞功能, 通常在正常组织的 c-myc 基因 3' 端 C. 既往的研究结果表明 c-myc 基因在胃癌和肝癌发生中低甲基化^[12-13]. c-Ha-ras 的 CGCG 序列在胃癌、肺癌以及肝癌中甲基化程度降

低, 但是我的研究未能得到此结论. 这可能与细胞系种类有关, 可能在这两种细胞系中癌基因的甲基化紊乱不起主要作用.

我们对细胞周期的研究也有部分发现. 细胞周期中各期均有其相应的周期素 (cycline)、周期素依赖激酶 (CDK) 和周期素依赖激酶抑制剂 (CDKI) 控制. CDKI 可抑制细胞周期进程, 例如 p16^{INK4A}、p21^{WAF1}、p27^{KIP1}、p57^{KIP2} 等都是对细胞周期起负调控作用的 CDKI. 一旦 p16^{INK4A} 基因失活, 可导致 CDK 激活, 细胞过度增殖, 细胞周期加速, 特别是在 DNA 没有被修复前就过早地进入 S 期, 会导致肿瘤的发生. 我们研究了两种细胞周期后发现 HGC-27 细胞在 5-aza-dC 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 24 h 组细胞阻滞于 G₁ 期 ($P < 0.05$), 而 MKN-45 细胞没有这种现象, 说明这种阻滞可能与 p16^{INK4A} 恢复表达量有关, 可能 p16^{INK4A} 达到一定水平时, 才能发挥其对细胞周期的调控作用. 上述结果可能得出: 5-aza-dC 通过恢复 p16^{INK4A} 阻止细胞过度增殖作用, 有组织特异性. 即组织来源不同, 5-aza-dC 的 G₁ 期阻滞作用表现很大差异, 可能与作用与 p16^{INK4A} 功能尚未完全恢复有关. 这与国外学者和国内学者的研究结果一致^[14-16]. 本研究还表明 HGC-27 细胞的 G₂/M 期阻滞也有意义, 现有研究阶段表明 G₂/M 的调控机制受 p53、p21^{WAF1} 和不依赖 p53 所影响, 但是细胞周期受多种基因和细胞因子的调控, 其机制复杂而又不完善, 有许多环节尚未被认识, 有待今后进一步研究.

总之, 本实验首次在同一胃癌细胞系中同时观察多个基因是否为甲基化调控, 显示了在人胃癌细胞系 MKN-45 和 HGC-27 中, 去甲基化能明显提高 p16^{INK4A} mRNA 的表达, 表明 p16^{INK4A} 启动子甲基化是其在表达减弱的主要原因, 且去甲基化程度取决于 5-aza-dC 干预的时间和浓度.

致谢: 感谢罗鸿好和沈冠凤协助流式细胞仪分析, 童菊芳和李恩灵在细胞培养工作的帮助!

4 参考文献

- 1 Rocco JW, Didransky D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001;264:42-55
- 2 Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995;1:686-692
- 3 Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1995;55:4531-4535
- 4 Sakuma K, Chong JM, Sudo M, Ushiku T, Inoue Y, Shibahara J, Uozaki H, Nagai H, Fukayama M. High-density methylation of p14ARF and p16INK4A in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2004;112:273-278
- 5 Koike H, Ichikawa D, Ikoma H, Otsuji E, Kitamura K,

- Yamagishi H. Comparison of methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) with reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in peripheral blood of gastric cancer patients. *J Surg Oncol* 2004;87:182-186
- 6 Ichikawa D, Koike H, Ikoma H, Ikoma D, Tani N, Otsuji E, Kitamura K, Yamagishi H. Detection of aberrant methylation as a tumor marker in serum of patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 2004;24:2477-2481
- 7 Lee YY, Kang SH, Seo JY, Jung CW, Lee KU, Choe KJ, Kim BK, Kim NK, Koeffler HP, Bang YJ. Alteration of p16INK4a and p15 INK4B genes in gastric carcinomas. *Cancer* 1997;80:1889-1896
- 8 Shim YH, Kang HG, Ro JY. Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Lab Invest* 2000;80:689-695
- 9 Song SH, Jong HS, Choi HH, Kang SH, Ryu MH, Kim NK, Kim WH, Bang YJ. Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16 (INK4a) expression in gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2000;87:236-240
- 10 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Neldin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG island. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-9826
- 11 Shin JY, Kim HS, Park J, Park JB, Lee JY. Mechanism for inactivation of the KIP family cyclin-dependent kinase inhibitor genes in gastric cancer cells. *Cancer Res* 2000;60:262-265
- 12 Shen L, Fang J, Qiu D, Zhang T, Yang J, Chen S, Xiao S. Correlation between DNA methylation and pathological changes in human hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1998;45:1753-1759
- 13 Fang JY, Zhu SS, Xiao SD, Jiang SJ, Shi Y, Chen XY, Zhou XM, Qian LF. Studies on the hypomethylation of c-myc, c-Ha-ras oncogenes and histopathological changes in human gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:1079-1082
- 14 杜红玲, 任立敏, 陈华, 朱燕, 戚豫. 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. 第一军医大学学报 2002;22:981-984
- 15 晁红霞, 孙建衡, 陆士新. 5-氮-2'-脱氧胞苷对子宫内腺癌裸鼠移植瘤细胞凋亡及细胞周期的影响. 癌症 2001;20:489-492
- 16 Bender CM, Pao MM, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res* 1998;58:95-101

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》 2004年版内科学类的核心期刊

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 依据文献计量学的原理和方法, 经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊, 编入《中文核心期刊要目总览》2004年版(第四版). 本版核心期刊研究, 被列为“2001年国家社会科学基金项目”. 该书定于2004-07由北京大学出版社出版.

该书已于1992, 1996, 2000年出版过三版, 在社会引起了较大反响、图书情报界、学术界、出版界和科研管理部门对该项研究成果都给予了较高评价, 普遍认为他适应社会需要, 为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据, 促进了中文期刊编辑和出版质量的提高, 已成为具有一定权威性的参考工具书. 为了及时反映中文期刊发展变化的新情况, 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 开展了新一版核心期刊的研究工作, 课题组认真总结了前三版的研究经验, 对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究, 在此基础上, 进一步改进评价方法, 使之更加科学合理, 力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况. 本版核心期刊定量评价, 采用了被索量、被引量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等7个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库达51种, 统计文献量达到943万余篇次(1999-2001年), 涉及期刊1万2千种. 本版还加大了专家评审力度, 1873位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1800种核心期刊, 分属七大编75个学科类目. 该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成, 不仅可以查询学科核心期刊, 还可以检索正在出版的学科专业期刊, 是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书.

该书由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会合编, 北京大学图书馆戴龙基馆长和蔡蓉华研究馆员任主编, 北京高校图书馆期刊工作研究会成员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学书报资料中心等相关单位的百余名专家和期刊工作参加了研究.(世界胃肠病学杂志 2004-05-05)