

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00977

• 短篇论著 •

启动子甲基化导致人前列腺癌雄激素非依赖性细胞株 PC-3 中 EphA1 基因低表达

Promoter methylation reduces EphA1 expression in prostate cancer cell line PC-3

周水根^{1,2}, 孙颖浩^{2*}, 许传亮², 王建东³, 高建平¹, 周晓军³

1. 第二军医大学南京临床医学院, 南京军区南京总医院泌尿外科, 南京 210002

2. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

3. 第二军医大学南京临床医学院, 南京军区南京总医院病理科, 南京 210002

[摘要] **目的:**观察前列腺癌细胞株中 EphA1 基因表达及甲基化情况,探讨 DNA 甲基化酶抑制剂对其表达及甲基化的影响。**方法:**采用实时定量 RT-PCR 法检测雄激素依赖性、非依赖性前列腺癌细胞系 LNCaP、PC-3 中 EphA1 基因表达情况;用 DNA 甲基化酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dC)处理细胞,实时定量 RT-PCR 法观察处理后 EphA1 基因表达的变化。亚硫酸氢钠处理后,采用 DNA 测序法对前列腺癌细胞 EphA1 基因进行甲基化状态分析。**结果:**LNCaP、PC-3 细胞中 EphA1 基因表达低下;5-Aza-dC 作用后,LNCaP 细胞 EphA1 基因无明显变化,而 PC-3 细胞中 EphA1 基因表达显著恢复($P < 0.001$)。PC-3 细胞中 EphA1 基因启动子区存在高甲基化,而 LNCaP 细胞该区域较少发生甲基化。**结论:**启动子甲基化可能是导致雄激素非依赖性 PC-3 细胞 EphA1 基因表达下调的重要机制。

[关键词] 前列腺肿瘤;EphA1;DNA 甲基化

[中图分类号] R 737.25

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2009)08-0977-03

Eph 基因家族是受体酪氨酸激酶家族中最大的亚群,在人类至少有 14 种受体基因(Eph)和 8 种配体基因(ephrin),其表达产物 Eph 家族蛋白广泛存在于各器官,可能与肿瘤的发生、发展及预后密切相关^[1]。我们的前期研究^[1-2]发现,雄激素依赖性、非依赖性前列腺癌细胞株 LNCaP、PC-3 中 EphA1 基因表达降低,但具体机制不很清楚。为进一步探讨前列腺癌细胞 EphA1 基因低表达与基因甲基化的相关性,本研究采用 DNA 甲基化酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dC)处理上述两株细胞,应用实时定量 RT-PCR 法观察处理前后的细胞 EphA1 基因表达的变化,并应用 DNA 测序法分析 EphA1 基因甲基化状态,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 前列腺癌雄激素依赖性、非依赖性细胞系 LNCaP、PC-3 购自中国科学院上海细胞生物研究所。LNCaP 细胞培养于含 1 mmol/L L-谷氨酰胺、10%胎牛血清(Invitrogen 公司,美国)、100 U/ml 青霉素 G 和 100 mg/ml 链霉素的 F12 培养液(北京海克隆生物化学制品有限公司)

中,37℃、体积分数 5%CO₂ 进行培养。PC-3 细胞使用 RPMI 1640 培养液。5-Aza-dC 购自美国 Sigma 公司,用二甲基亚砜(DMSO)溶解备用。

1.2 实时定量 RT-PCR 测定 EphA1 基因表达

1.2.1 细胞培养及获取 用 0.25%胰蛋白酶(美国 Gibco 公司)消化处于对数生长期的前列腺癌细胞 LNCaP、PC-3,用 RPMI 1640 培养液调至终密度为 5×10^4 /ml 的单细胞悬液,接种于 25 cm² 的培养瓶中,24 h 使细胞同步化。吸去培养液,PBS 洗涤 2 遍,经 0.25%胰蛋白酶消化后,收集细胞。

1.2.2 抽提 RNA 及 cDNA 合成 加入 2 ml TRIzol 试剂,在 15 ml 塑料离心管充分振荡,室温放置 5 min 后以 $2\ 000 \times g$ 离心 15 min。将上清液体吸入 1.5 ml 的离心管中,加入 0.2 ml 的氯仿,室温下颠倒混匀 3 min。 4°C $18\ 000 \times g$ 离心 15 min。利用异丙醇沉淀 RNA,然后以 70%冷乙醇清洗沉淀。在空气条件下待沉淀干燥后,加入二乙基焦磷酸酰胺(DEPC)处理的三蒸水溶解 RNA。用紫外分光光度计和甲醛琼脂糖变性电泳对提取的总 RNA 进行纯度和含量鉴定。利用反转录试剂盒(Promega 公司)将 2 μg 总 RNA 反转录成 cDNA,具体操作按试剂盒说明书进行。

[收稿日期] 2008-12-31 **[接受日期]** 2009-05-06

[基金项目] 国家杰出青年基金(30225046),南京军区科学技术“十一五”计划资助项目(06MA117)。Supported by Foundation for National Excellent Young Scientists (30225046) and the “11th Five-Year Plan” for Science and Technology of PLA Nanjing Military Area Command (06MA117).

[作者简介] 周水根,博士生,副主任医师。E-mail: zsg1711@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873409, E-mail: sunyinghao@medmail.com

1.2.3 引物和探针的设计与合成 按照引物和 TaqMan 探针设计原则,分别设计扩增 EphA1 和内标基因 GAPDH 的引物和探针,序列见表 1。探针的 5'端采用 FAM 荧光基团

标记,3'端连接 Eclipse 标记的淬灭基团。引物和探针均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

表 1 EphA1 和 GAPDH 基因引物和探针序列

基 因	引物序列	产物长度 (bp)
EphA1(NM_005232)		
F	5'-ATC TTT GGG CTG CTG CTT GG-3'	127
R	5'-GCT TGT CCT CTC GAT CCA CAT C-3'	
P	5'-(FAM)CGG TCA CGC TGC CTC TGC TGC C(Eclipse)-3'	
GAPDH(NM_002046)		
F	5'-CCA GGT GGT CTC CTC TGA CTT-3'	130
R	5'-GTT GCT GTA GCC AAA TTC GTT GT-3'	
P	5'(FAM)-AAC AGC GAC ACC CAC TCC TCC ACC(Eclipse)-3'	

1.2.4 实时定量 RT-PCR 反应 反应体系组成:1×缓冲液,1 U 热启动酶,200 μmol/L 三磷酸脱氧核苷(dNTPs),0.3 μmol/L 引物,0.6 μmol/L 5-羧基-X-罗丹明(ROX)和 2 μl cDNA,加入 0.2 μmol/L 探针。反应在 ABI7000 实时 PCR 仪上进行。95℃ 预变性 2 min,按下列参数进行 40 个循环:94℃ 变性 30 s,59℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 1 min。标准样品制备:选一管高浓度的总 RNA 标本,反转为 cDNA,以蒸馏水稀释 10 倍,分装于 5 管,于 -30℃ 冰箱冻存,作标准品备用。自定义未稀释的 EphA1 和 GAPDH 的浓度为 1,将实时定量 RT-PCR 产物按照 10 倍比例稀释的方法依次倍比稀释至浓度为 10⁻⁴。将扩增结果与标准曲线进行比较,计算 EphA1 基因 mRNA 和 GAPDH 的表达量,并以 GAPDH 标化 EphA1 的表达。实时定量 RT-PCR 测定重复 5 次,取平均值。

1.3 5-Aza-dC 处理细胞 将 5×10⁵ 前列腺癌细胞接种于直径 100 mm 的培养皿中,培养 48 h 后加入 100 mmol/L 的 5-Aza-dC。再培养 48 h 后,用 PBS 清洗 3 次,换新鲜培养液,细胞继续培养 48 h 后,按常规方法分离提取细胞总 RNA 并反转成 cDNA,再采用上述方法进行 EphA1 基因表达测定,并与药物处理前结果进行比较。

1.4 DNA 测序法分析 EphA1 基因甲基化状态 将 1 μg DNA 溶解于 50 μl 蒸馏水中,经 3 mol/L 的 NaOH 变性后加入亚硫酸氢钠(Sigma 公司,美国)等试剂,53℃ 水浴过夜。应用 Wizard DNA 纯化试剂盒(Promega 公司,美国)纯化,2 mol/L NaOH 终止反应。冷乙醇沉淀 DNA 后溶解在 30 μl 蒸馏水中。对处理后的 DNA 进行测序。针对 EphA1 基因翻译起始点上游的 DNA 序列设计 1 对引物:5'-GTT GAG TTT AGG ATT AGA ATT GG-3' (上游引物),5'-ATT CCC TCC CCA CTC CCA-3' (下游引物)。PCR 产物用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(Qiagen 公司,德国)纯化后用直接法测序,分析基因甲基化状态。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析,定量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 前列腺癌细胞 EphA1 基因表达 5-Aza-dC 处理前,LNCaP、PC-3 细胞中 EphA1 基因表达均明显低下。5-Aza-dC 处理后,LNCaP 细胞 EphA1 基因表达无明显变化(0.06±0.007 vs 0.07±0.007);而 PC-3 细胞 EphA1 基因表达明显升高(0.07±0.009 vs 0.64±0.07),差异具有统计学意义(*P* < 0.001)。

2.2 DNA 甲基化分析结果 前列腺癌细胞 EphA1 基因启动子区转录开始位点-263~+304 有 48 个 CG(5' CpG 岛),对其中 22 个 CG 位点进行测序,结果(图 1)显示:PC-3 细胞基因该部位多数 CG 中的胞嘧啶发生了甲基化,包括等位基因的完全和不完全性甲基化;而细胞 LNCaP 在这个区域内的 CpG 岛较少发生甲基化。

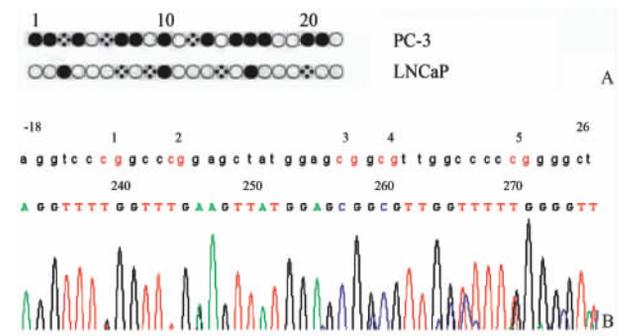


图 1 前列腺癌细胞系 EphA1 基因启动子区甲基化分析结果 A:黑圆、花圆、白圆分别代表完全甲基化、不完全甲基化及未甲基化的 CG 位点;B:PC-3 细胞 EphA1 基因启动子区甲基化测序部分结果,显示在翻译起始位点(atg)上游 -18 和下游 26 碱基之间有 5 个 CG,其中第 3、4 个 CG 发生了甲基化,而第 1、2、5 个 CG 未发生甲基化

3 讨 论

我国前列腺癌发病率呈上升趋势,但其发生、发展的具体机制仍不清楚^[3]。基因启动子区 CpG 岛甲基化是抑癌基因失活的重要机制,可能与前列腺癌的发生、发展密切相

关^[4-5]。甲基化的启动和维持有赖于 DNA 甲基转移酶, 5-Aza-dC 是胞嘧啶类似物, 作用于嘧啶的 C-5 位置, 可作为 DNA 甲基转移酶的抑制剂, 抑制甲基化。

EphA1 是第一个被发现的 Eph 基因, 广泛存在于人体上皮细胞, 其中以皮肤、胃、肠等组织表达较高, 与卵巢癌、乳腺癌、恶性胶质瘤及皮肤非黑色素瘤密切相关^[6-9]。Fox 等^[10]研究发现 EphA1 基因表达水平与前列腺癌恶性程度负相关, 认为 EphA1 基因可能参与了阻止正常前列腺细胞表型恶性转化过程。本课题组的 RT-PCR^[2]、实时定量 RT-PCR 法研究结果均证实前列腺癌 LNCaP、PC-3 细胞中 EphA1 基因均低表达, 与 Fox 等^[10]研究结果类似。

进一步的甲基化分析结果发现, PC-3 细胞 EphA1 基因存在高甲基化, 5-Aza-dC 处理后, PC-3 细胞 EphA1 基因表达部分恢复。结果提示, 前列腺癌细胞 PC-3 中 EphA1 基因表达低下的原因可能与启动子的高甲基化密切相关。而对雄激素依赖性的 LNCaP 细胞分析结果发现, LNCaP 细胞 EphA1 基因同样存在低表达, 但甲基化分析未见明显甲基化, 5-Aza-dC 处理也不能恢复其基因表达。结果提示 LNCaP 细胞 EphA1 基因低表达可能与启动子甲基化关系不大, 还存在其他机制; 也同样说明, 雄激素依赖性及非依赖性前列腺癌细胞中 EphA1 基因表达存在不同的调控机制。

本研究结果显示, EphA1 基因在雄激素非依赖性前列腺癌细胞中呈现低表达及高甲基化现象, 提示该基因可能具备抑癌功能, 其表达水平的降低与前列腺癌向雄激素非依赖性转化有关, 或许可成为新的前列腺癌诊断的标志物。另外, 该基因表达能被 DNA 甲基化酶抑制剂恢复, 提示该基因可作为前列腺癌治疗的新靶点。

[参考文献]

[1] 王建东, 周晓军. 酪氨酸激酶受体 Eph 基因及其与肿瘤的关系

[J]. 医学研究生学报, 2006, 19: 935-938.

- [2] 周水根, 孙颖浩, 王建东, 董迎春, 许传亮, 高建平, 等. 前列腺癌中 EphA1 基因表达的初步研究[J]. 医学研究生学报, 2008, 21: 451-454.
- [3] 孙颖浩. 我国前列腺癌的研究现状[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25: 77-80.
- [4] Li L C, Okino S T, Dahiya R. DNA methylation in prostate cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1704: 87-102.
- [5] Woodson K, O'Reilly K J, Hanson J C, Nelson D, Walk E L, Tangrea J A. The usefulness of the detection of GSTP1 methylation in urine as a biomarker in the diagnosis of prostate cancer [J]. *J Urol*, 2008, 179: 508-511.
- [6] Hafner C, Schmitz G, Meyer S, Bataille F, Hau P, Langmann T, et al. Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers[J]. *Clin Chem*, 2004, 50: 490-499.
- [7] Herath N I, Spanevello M D, Sabesan S, Newton T, Cummings M, Duffy S, et al. Over-expression of Eph and ephrin genes in advanced ovarian cancer: ephrin gene expression correlates with shortened survival[J]. *BMC Cancer*, 2006, 6: 144.
- [8] Fox B P, Kandpal R P. Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318: 882-892.
- [9] Hafner C, Becker B, Landthaler M, Vogt T. Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in human skin and down-regulation of EphA1 in nonmelanoma skin cancer [J]. *Mod Pathol*, 2006, 19: 1369-1377.
- [10] Fox B P, Tabone C J, Kandpal R P. Potential clinical relevance of Eph receptors and ephrin ligands expressed in prostate carcinoma cell lines[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342: 1263-1272.

[本文编辑] 贾泽军