

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00879

· 论 著 ·

人胰腺癌细胞株 HHIP 基因甲基化状态检测和分析

高飞, 刘枫, 李兆申*, 黄浩杰, 张玲, 满晓华, 薄陆敏

第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433

[摘要] 目的:探讨人胰腺癌细胞株 HHIP 表达与其甲基化的关系,为胰腺癌发生机制的研究提供新的信息。方法:以人胰腺癌细胞株 BxPC-3、CFPAC-1、PANC-1、AsPC-1 和 PaTu8988s 为研究对象,用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫细胞化学染色(S-P)法检测去甲基化制剂——DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)处理前后各胰腺癌细胞株 HHIP mRNA/蛋白表达的变化,用甲基化特异性 PCR(MSP)结合测序检测 HHIP 基因 CpG 岛甲基化状态。结果:5-Aza-CdR 处理前,胰腺癌细胞株 BxPC-3、CFPAC-1、PANC-1、AsPC-1 和 PaTu8988s 无 HHIP mRNA/蛋白表达;经 5-Aza-CdR 处理后,HHIP mRNA/蛋白重新表达。MSP 结合测序显示上述胰腺癌细胞株 HHIP 基因 CpG 岛存在高甲基化。结论:人胰腺癌细胞株 HHIP 表达抑制与其基因 CpG 岛高甲基化相关。HHIP 基因 CpG 岛高甲基化可能在胰腺癌的发生、发展中起一定作用。

[关键词] 胰腺肿瘤;肿瘤细胞系;HHIP 基因;DNA 甲基化

[中图分类号] R 735.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)08-0879-05

Detection and analysis of methylation status of HHIP gene in human pancreatic cancer cell lines

GAO Fei, LIU Feng, LI Zhao-shen*, HUANG Hao-jie, ZHANG Ling, MAN Xiao-hua, BO Lu-min

Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the relationship between HHIP expression and its hypermethylation in human pancreatic cancer cell lines, so as to provide new insights into the tumorigenesis of pancreatic cancer. **Methods:** Human pancreatic cancer cell lines BxPC-3, CFPAC-1, PANC-1, AsPC-1 and PaTu8988s were used in the present study. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocytochemical S-P method were used to detect the expression of HHIP at mRNA and protein levels before and after treatment with 5-aza-2-deoxycytidine (5-Aza-CdR), a DNA methyltransferase inhibitor. Methylation-specific PCR (MSP) combined with DNA sequencing were adopted to identify the CpG island methylation of HHIP gene. **Results:** Expression of HHIP mRNA/protein was absent in the five pancreatic cancer cell lines before 5-Aza-CdR treatment, and re-expressed after treatment with 5-Aza-CdR. CpG island hypermethylation of HHIP gene was observed in the five pancreatic cell lines by MSP and DNA sequencing. **Conclusion:** Hypermethylation in CpG island of HHIP gene is correlated with the inhibition of HHIP expression in human pancreatic cancer cell lines, and it might play an important role in the development and progression of pancreatic cancer.

[KEY WORDS] pancreatic neoplasms; tumor cell line; HHIP genes; DNA methylation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(8):879-883]

胰腺癌是消化道常见的恶性肿瘤之一,其恶性程度极高,临床症状不典型,发现时多属晚期,故预后较差。近年来,胰腺癌的发病率呈明显上升趋势。在美国,胰腺癌造成的死亡居恶性肿瘤的第四位,5年生存率不到5%^[1],其中位生存期仅为3~6个月^[2]。在我国,胰腺癌病死率也迅速增高,已占恶性肿瘤死因的第7~8位^[3]。为此,有必要对胰腺癌发

生、发展过程的分子机制进行研究,以提高胰腺癌的早期诊断水平并且期望找到新的胰腺癌治疗手段。

研究发现,胰腺癌发生发展中的多种基因异常甲基化可导致其失活和表达静默,从而促进肿瘤的发展^[4,6]。HHIP (human hedgehog interacting protein, 音猬因子相互作用蛋白) 基因位于染色体

[收稿日期] 2009-01-19 **[接受日期]** 2009-03-07

[基金项目] 上海市卫生局青年科研项目基金(2007 Y85)。Supported by Medical Research Project for Young Scholars of Shanghai Municipal Health Bureau (2007 Y85)。

[作者简介] 高飞,博士,主治医师。现在沈阳军区总医院内窥镜科,沈阳 110016。E-mail:soar1999@163.com

*通讯作者(Corresponding author)。Tel:021-81873253, E-mail:li_zhaoshen@126.com

4q31.21~31.3,该区域高发胰腺癌等位基因缺失。它编码的一组跨膜糖蛋白能够与 Hedgehog 信号通路中的 3 个 Hh 蛋白相结合,负性调节 Hedgehog 信号通路活性^[7-8]。胰腺癌^[9]、胃肠道恶性肿瘤^[10]中 HHIP 基因表达抑制与其启动子区 CpG 岛高甲基化相关。本研究通过检测人胰腺癌细胞株 HHIP 在去甲基化制剂处理前后的表达变化,探讨 HHIP 表达与其基因启动子区 CpG 岛甲基化的关系,从而了解胰腺癌的发生机制,指导临床诊断和治疗。

1 材料和方法

1.1 细胞株和主要试剂

人胰腺癌细胞株 BxPC-3、CFPAC-1 和 PANC-1 购自中国科学院上海生命科学生物化学与细胞生物学研究所,AsPC-1 购自美国标准菌库(ATCC),PaTu8988s 由德国 Philipps-Universität Marburg 细胞生物学和分子病理学研究所 Elsasser H P 博士惠赠。

去甲基化制剂 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷(5-aza-2-deoxycytidine,5-Aza-CdR)为 Sigma 公司产品,TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,鼠抗人 HHIP 单克隆抗体购自 Abnova 公司,免疫组化染色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司,甲基化试剂盒(Qiagen Methylation-Gold KitTM)购自 Qiagen 公司,ZymocleanTM 凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天漠科技开发有限公司,TIANquick Midi 普通 DNA 产物纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,TaKaRa Ex TaqTM DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品。

1.2 细胞株培养和 5-Aza-CdR 处理

采用贴壁细胞培养法。用含 10% 新生牛血清和青霉素、链霉素各 10 U/ml 的 DMEM 培养液,于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养各胰腺癌细胞株。传代 24 h 后,培养瓶中分别加入终浓度为 5 × 10⁻⁶ mol/L 的 5-Aza-CdR 继续培养 48 h,终止培养。以未加 5-Aza-CdR 干预的细胞作为对照组。

1.3 RT-PCR 检测 HHIP mRNA 表达

用 TRIzol 试剂抽提各胰腺癌细胞株总 RNA,反转录合成 cDNA。HHIP 引物序列:5'-GAT GAA AGA GGA CTG CTA AGC C-3',5'-TTC TCA AAT CAA CTT GGT GTG GA-3',扩增片段长度 175 bp。内参照 GAPDH 引物序列:5'-ACA TCA AGA AGG TGG TGA AGC A-3',5'-TCA AAG GTG GAG

GAG TGG GT-3',扩增片段长度 118 bp。反应体系 20 μl,反应条件:95℃ 3 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4 免疫细胞化学方法检测 HHIP 蛋白表达

免疫细胞化学染色采用 S-P 法。2 cm × 2 cm 盖玻片经浓硫酸浸泡,高压消毒,ddH₂O 1:100 稀释多聚赖氨酸溶液固定;将已消毒的盖玻片置于 90 mm 培养皿中,按 2 × 10⁴/ml 的密度接种各种胰腺癌细胞株;3 d 后取出细胞爬片标本,PBS 清洗 3 次,各 1 min;95% 乙醇固定 15 min,空气干燥 5 min,PBS 清洗 3 次,各 2 min;HHIP 抗体(工作浓度 1:100)4℃ 孵育过夜,PBS 清洗 3 次,各 5 min;二抗工作液 37℃ 孵育 30 min,PBS 清洗 3 次,各 5 min;DAB 显色 5 min,蒸馏水洗 2 次,各 1 min,苏木精复染 1 min,自来水洗 30 min,稀盐酸分化 30 s,自来水洗 10 min,中性树胶封片。阳性结果判定标准:镜下观察细胞质和(或)细胞核内有棕黄色颗粒者为阳性细胞。

1.5 甲基化特异性 PCR (MSP) 结合测序检测 HHIP 基因 CpG 岛甲基化状态

酚/氯仿法抽提各胰腺癌细胞株 DNA,纯化 DNA,用甲基化试剂盒进行 DNA 甲基化修饰。以 MethPrimer 软件设计 HHIP MSP 引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。HHIP-M(甲基化引物)序列:5'-TGT TTC GTC GTC GTC GTC-3',5'-CCA CAA ATA TTC ACT TAT CCG TAT AAC G-3',扩增片段长度 86 bp;HHIP-U(非甲基化引物)序列:5'-GTT TGT TTT GTT GTT GTT GTT -3',5'-TTT GTT ATA TGG ATA AGT GAA TAT TTG TGG T-3',扩增片段长度 86 bp。反应体系 25 μl,内含 10 × 通用型 PCR 缓冲液 2.5 μl、2.5 mmol/L dNTP 2.5 μl、甲基化或非甲基化上下游引物各 0.25 μl、TaqDNA 聚合酶(2.5 U/μl) 0.1 μl、已修饰模板 DNA 2 μl 和 ddH₂O 17.4 μl。反应条件:95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,38 个循环;72℃ 5 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。ZymocleanTM 凝胶 DNA 回收试剂盒回收、纯化 AsPC-1 细胞 M 引物扩增的 86 bp 条带,送上海英骏生物技术有限公司进行测序分析。

2 结果

2.1 总 RNA 完整性和纯度鉴定

取 1 μl 总 RNA

进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,可见清晰的 18S rRNA 和 28S rRNA 条带,无拖尾现象,表明所抽提的总 RNA 是完整的。用紫外分光光度计测得总 RNA 样品 D_{260}/D_{280} 比值为 1.9 左右,表明 RNA 纯度较高,无 DNA、蛋白质等污染。

2.2 HHIP mRNA 表达 RT-PCR 扩增显示,未经 5-Aza-CdR 处理的 BxPC-3、CFPAC-1、PANC-1、AsPC-1 和 PaTu8988s 细胞无相应条带,证实该 5 种胰腺癌细胞株不存在 HHIP mRNA 表达;经 5-Aza-CdR 处理后,BxPC-3、CFPAC-1、PANC-1、AsPC-1 和 PaTu8988s 细胞可观察到对应于 HHIP mRNA 的 175 bp 条带,证实经过去甲基化处理后 HHIP mRNA 重新表达(图 1)。

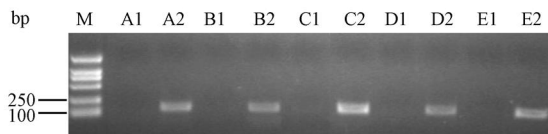


图 1 5-Aza-CdR 处理前后各胰腺癌细胞株 HHIP mRNA 的表达

Fig 1 Expression of HHIP mRNA in pancreatic cell lines before and after 5-Aza-CdR treatment

M: DL2000 marker; A: BxPC-3; B: PaTu8988s; C: AsPC-1; D: PANC-1; E: CFPAC-1. A1-E1: Before 5-Aza-CdR treatment; A2-E2: After 5-Aza-CdR treatment

2.3 HHIP 蛋白表达 免疫细胞化学染色显示,未经 5-Aza-CdR 处理的 BxPC-3、CFPAC-1、PANC-1、AsPC-1 和 PaTu8988s 细胞质中未见 HHIP 棕黄色细颗粒分布,说明这 5 种胰腺癌细胞株无 HHIP 表达。经 5-Aza-CdR 处理后,BxPC-3、CFPAC-1、PANC-1、AsPC-1 和 PaTu8988s 细胞核未见明显表达,细胞质中可见 HHIP 棕黄色细颗粒分布,证实 5 种胰腺癌细胞 HHIP 重新表达(图 2),与 RT-PCR 结果相符。

2.4 HHIP 基因 CpG 岛甲基化状态 5 种胰腺癌细胞株均成功抽提出 DNA。MSP 扩增显示 BxPC-3、CFPAC-1、PANC-1、AsPC-1 和 PaTu8988s 细胞以 M 引物扩增出 86 bp 的条带,U 引物未扩增出条带,说明 HHIP 基因 CpG 岛全部发生甲基化(图 3)。

AsPC-1 细胞 MSP M 引物扩增产物经测序后,与原碱基序列对照显示,所检测的 80 号位点 CpG 二核苷酸中的胞嘧啶保持不变,说明其因甲基化而未被亚硫酸氢盐所修饰(图 4A);除 80 号位点胞嘧啶发生甲基化外,其他位点 CpG 二核苷酸中的胞嘧啶也呈高甲基化状态。而图 4B 序列(非 CpG 岛)与原碱基序列对照显示,未甲基化的胞嘧啶被亚硫酸氢盐脱氨基而转变为尿嘧啶,尿嘧啶经扩增后被胸腺嘧啶所替代。

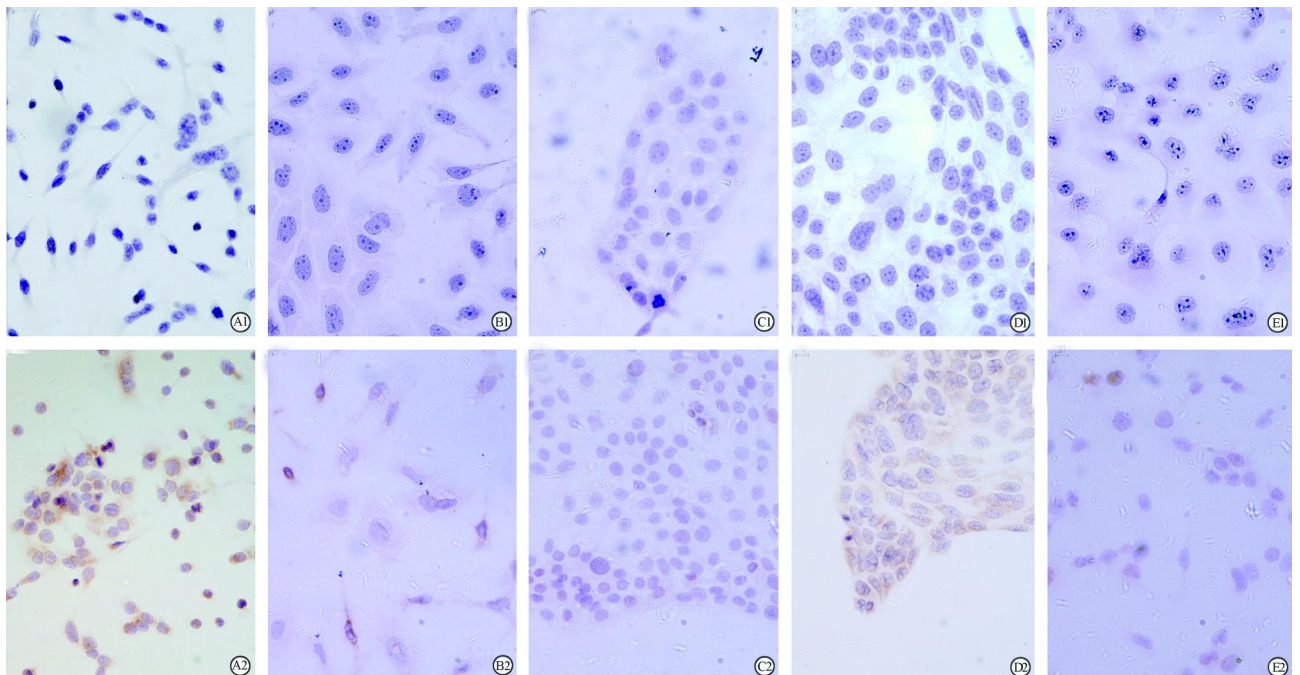


图 2 5-Aza-CdR 处理前后各胰腺癌细胞株 HHIP 蛋白表达

Fig 2 Expression of HHIP protein in pancreatic cell lines before and after 5-Aza-CdR treatment (immunocytochemical S-P method)

A: AsPC-1; B: PaTu8988s; C: BxPC-3; D: CFPAC-1; E: PANC-1; A1-E1: Before 5-Aza-CdR treatment; A2-E2: After 5-Aza-CdR treatment. Original magnification: $\times 400$

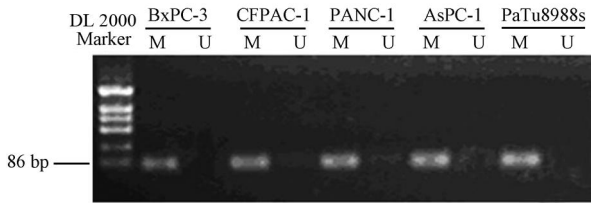


图3 各胰腺癌细胞株 HHIP 基因启动子区目的片段 MSP 扩增电泳图

Fig 3 Methylation-specific PCR of HHIP in pancreatic cell lines

M: Methylated primer; U: Unmethylated primer

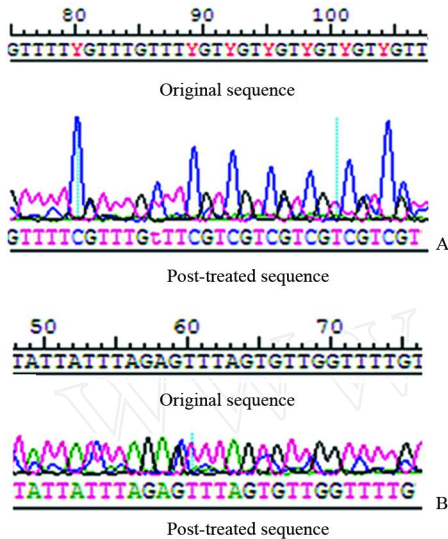


图4 胰腺癌细胞株 AsPC-1 HHIP 基因启动子区 MSP M 引物扩增产物测序

Fig 4 Sequencing results of MSP product of HHIP gene in pancreatic cell line AsPC-1

A: Methylated sequencing result; B: Unmethylated sequencing result

3 讨论

Hedgehog 信号转导通路由 Hh 配体、2 个跨膜蛋白质受体 PTCH 与 Smo 组成的受体复合物,及下游的转录因子 Gli 蛋白等组成。它在胚胎发生过程中对内胚层来源组织的发育起重要调节作用^[11],当胚胎形成后,Hedgehog 信号转导通路的活性消失或降低,并且在成人恶性肿瘤中异常活化^[12-14]。在胰腺导管腺癌及其癌前病变中,Hedgehog 信号通路成分表达增加,Hedgehog 蛋白小分子抑制剂能抑制胰腺癌和其他消化道肿瘤的生长^[13,15-16]。HHIP 基因编码的一组跨膜糖蛋白能够与 Hh 配体结合,竞争性抑制 Hh 和受体 PTCH 结合。在没有 Hh 配体信号刺激下,PTCH 抑制 Smo 的活性,阻止了信号的传递,进而遏制下游转录因子激活。

尽管 HHIP 在大多数胎儿及成人组织中发生表达^[17],但与相对应的正常组织相比,HHIP 在许多恶性肿瘤如肺癌、胃癌、结直肠癌及肝癌中表达降低^[18-19]。本研究采用 RT-PCR 及免疫细胞化学染色方法检测 HHIP 在 5 种胰腺癌细胞株 BxPC-3、CFPAC-1、PANC-1、AsPC-1 和 PaTu8988s 中的表达,两种检测方法的结果相符,即未经 5-Aza-CdR 处理的 5 种胰腺癌细胞株无 HHIP 表达,经处理后 HHIP 均重新表达。进而本研究采用了甲基化特异性 MSP 方法检测胰腺癌细胞株中 HHIP 的甲基化情况,了解 HHIP 在胰腺癌细胞株中表达下调的机制。

业已证明^[20],胰腺癌基因甲基化异常广泛而复杂,基因高甲基化已成为胰腺癌的标志。CpG 岛异常高甲基化不仅与基因表达的转录沉默相关,而且在肿瘤抑癌基因的失活中也起重要作用^[19]。本研究用 MSP 法扩增检测 HHIP 基因 CpG 岛甲基化状态。基于亚硫酸氢盐修饰的 MSP 扩增是一种简便、灵敏、特异性较高的甲基化检测方法,以亚硫酸氢盐修饰 DNA 后,甲基化的胞嘧啶不变,而未甲基化的胞嘧啶则脱氨基而转变为尿嘧啶,从而使甲基化和非甲基化序列的碱基组成发生改变。然后分别设计甲基化特异性 M 引物和非甲基化特异性 U 引物。若 M 引物扩增出相应大小的片段,则说明被检测基因存在甲基化;若 U 引物扩增出相应大小的片段,则说明被检测基因不存在甲基化;若 M、U 引物均扩增出相应大小片段,则说明被检测基因存在不完全甲基化。本研究中 5 种胰腺癌细胞株 M 引物均扩增出相应大小片段,U 引物未扩增出相应大小片段,证实这 5 种胰腺癌细胞株 HHIP 基因 CpG 岛存在高甲基化。同时对 MSP 扩增得到的甲基化产物进行凝胶 DNA 回收、纯化,直接测序判断扩增片段中 CpG 二核苷酸甲基化,测序结果证实 HHIP 基因 CpG 岛多个位点发生甲基化,与 MSP 结果相符。

综上所述,本研究证实胰腺癌细胞中 HHIP 表达降低,经去甲基化制剂 5-Aza-CdR 处理后 HHIP 表达恢复。MSP 结合测序检测证实 5 种人胰腺癌细胞株 HHIP 基因 CpG 岛存在高甲基化,其甲基化改变发生在多个位点。人胰腺癌细胞株 HHIP 表达抑制与其基因 CpG 岛高甲基化相关。HHIP 基因 CpG 岛高甲基化可能在胰腺癌的发生、发展中起

一定作用,其检测有望成为胰腺癌诊断的有效辅助手段。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun M J. Cancer statistics, 2007 [J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57: 43-66.
- [2] Rosenberg L. Pancreatic cancer: a review of emerging therapies [J]. Drugs, 2000, 59: 1071-1089.
- [3] 孙 罡, 王立夫. 进展期胰腺癌临床化学治疗进展 [J]. 内科理论与实践, 2009, 4: 61-65.
- [4] Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, Otto N, Gimm O, Dralle H, et al. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma [J]. Oncogene, 2003, 22: 3806-3812.
- [5] Kumagai T, Akagi T, Desmond J C, Kawamata N, Gery S, Imai Y, et al. Epigenetic regulation and molecular characterization of C/EBP alpha in pancreatic cancer cells [J]. Int J Cancer, 2009, 124: 827-833.
- [6] Melnikov A A, Scholtens D, Talamonti M S, Bentrem D J, Levenson V V. Methylation profile of circulating plasma DNA in patients with pancreatic cancer [J]. J Surg Oncol, 2009, 99: 119-122.
- [7] Kayed H, Kleeff J, Keleg S, Guo J, Ketterer K, Berberat P O, et al. Indian hedgehog signaling pathway: expression and regulation in pancreatic cancer [J]. Int J Cancer, 2004, 110: 668-676.
- [8] Chuang P T, Kawcak T, McMahon A P. Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung [J]. Genes Dev, 2003, 17: 342-347.
- [9] Martin S T, Sato N, Dhara S, Chang R, Hustinx S R, Abe T, et al. Aberrant Methylation of the Human Hedgehog Interacting Protein (HHIP) Gene in Pancreatic Neoplasms [J]. Cancer Biol Ther, 2005, 4: 728-733.
- [10] Taniguchi H, Yamamoto H, Akutsu N, Nosho K, Adachi Y, Imai K, et al. Transcriptional silencing of hedgehog-interacting protein by CpG hypermethylation and chromatin structure in human gastrointestinal cancer [J]. J Pathol, 2007, 213: 131-139.
- [11] Fukushima N, Walter K M, Uek T, Sato N, Matsubayashi H, Cameron J L, et al. Diagnosing pancreatic cancer using methylation specific PCR analysis of pancreatic juice [J]. Cancer Biol Ther, 2003, 2: 78-83.
- [12] Kawahira H, Ma N H, Tzanakakis E S, McMahon A P, Chuang P T, Hebrok M. Combined activities of hedgehog signaling inhibitors regulate pancreas development [J]. Development, 2003, 130: 4871-4879.
- [13] Karhadkar S S, Bova G S, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, et al. Hedgehog signaling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis [J]. Nature, 2004, 431: 707-712.
- [14] Berman D M, Karhadkar S S, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith M R, Briggs K, et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours [J]. Nature, 2003, 425: 846-851.
- [15] Berman D M, Karhadkar S S, Hallahan A R, Pritchard J I, Eberhart C G, Watkins D N, et al. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade [J]. Science, 2002, 297: 1559-1561.
- [16] Thayer S P, di Magliano M P, Heiser P W, Nielsen C M, Roberts D J, Lauwers G Y, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis [J]. Nature, 2003, 425: 851-856.
- [17] Bak M, Hansen C, Friis Henriksen K, Tommerup N. The human hedgehog-interacting protein gene: structure and chromosome mapping to 4q31. 21 q31. 3 [J]. Cytogenet Cell Genet, 2001, 92: 300-303.
- [18] Patil M A, Zhang J, Ho C, Cheung S T, Fan S T, Chen X. Hedgehog signaling in human hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5: 111-117.
- [19] Tada M, Kanai F, Tanaka Y, Tateishi K, Ohta M, Asaoka Y, et al. Down-regulation of hedgehog-interacting protein through genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14: 3768-3776.
- [20] Sato N, Goggins M. The role of epigenetic alternations in pancreatic cancer [J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2006, 13: 286-295.

[本文编辑] 商素芳, 邓晓群