

· 论 著 ·

siRNAi 沉默 DNMT1 基因对肺癌细胞 WIF-1 启动子甲基化的影响

刘煜亮,王海晶,宫 亮,唐春兰,杨和平[△]
(第三军医大学西南医院呼吸科,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨 DNA 甲基转移酶(DNMT1)siRNAi 对人肺癌 A549 细胞内抑癌基因 wnt 抑制因子-1(WIF-1)基因启动子高甲基化的影响。**方法** 利用 pSilencer 4.1-CMV neo 载体,通过 siRNAi 表达载体法制备 DNMT1 siRNAi。将 DNMT1 siRNAi 转染肺癌 A549 细胞,采用 RT-PCR 和 Western blot 检测观察转染前后肺癌 A549 细胞 DNMT1 内 DNMT1 基因的表达改变,并利用甲基化 PCR,直接测序法检测 WIF-1 基因启动子甲基化水平。**结果** 构建的 DNMT1 siRNAi 转染肺癌 A549 细胞后,明显抑制 DNMT1 基因的表达,mRNA 表达下降 75%,蛋白表达下调 82%;同时,WIF-1 基因启动子序列较转染前甲基化水平明显降低。**结论** 靶向 DNMT1 的 siRNAi 可明显下调靶基因 DNMT1 的表达,并逆转 WIF-1 基因启动子高甲基化水平。

关键词:基因;肺肿瘤;启动区遗传学
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.13.007 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2011)13-1266-03

siRNAi targeted DNMT1 silence induces WIF-1 promoter hypomethylation

Liu Yuliang, Wang Haijing, Gong Liang, Tang Chunlan, Yang Heping[△]

(Department of Respirating, First Affiliated Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of synthetic DNMT1 short interfering RNA (siRNAi) on the promoter hypermethylation of tumor suppressor gene (TSG) WIF-1. **Methods** Based on pSilencer 4.1-CMV neo vector, DNMT1 siRNAi was constructed and transfected into A549 cells. DNMT1 expression was determined by RT-PCR and Western blot. The promoter methylation state of WIF-1 was determined by methylation specific PCR (MSP) and DNA sequence. **Results** A pair of siRNAi sequence completely matched with target sequences. After transfected with DNMT1 siRNAi, the expression of DNMT1 mRNA and protein were reduced by 75% and 88%, respectively. And WIF-1 promoter was hypomethylated after transfection. **Conclusion** siRNAi directed against DNMT1 can significantly induce WIF-1 promoter hypomethylation, which indicates that DNMT1 may play an important role in the process of WIF-1 promoter hypermethylation.

Key words: genes; lung neoplasms; promoter regions (genetics)

肺癌是世界范围内发病率与病死率均居首位的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(NSCLC)占 85%~90%^[1]。肺癌的发生是多步骤、多因素参与的复杂的生物学过程,涉及遗传学(genetic)与表观遗传(epigenetic)的改变^[2]。DNA 甲基化是最重要的表观遗传修饰方式,高甲基化所致基因转录失活与胚胎发育和肿瘤密切相关^[3]。表观遗传学的研究表明,肿瘤的形成往往伴随着多种抑癌基因的启动子区域 CpG 岛的异常甲基化修饰^[4]。本研究拟探讨肺癌中高表达的 DNA 甲基转移酶 1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)对肺癌细胞内抑癌基因 WIF-1 启动子高甲基化中的作用,以便更加深入的了解肺癌内抑癌基因启动子高甲基化的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 肺癌 A549 细胞系由本实验室传代保存(购自美国 ATCC)。RPMI-1640 培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素双抗购自 Gibco 公司;pSilencerTM4.1-CMV neoKit 购自美国 Ambion 公司,Lipofectamine 2000、Opti-MEMI 培养基购自美国 Invitrogen 公司;RNA、DNA 提取试剂盒购自天根生化科技公司,DNA 硫化处理试剂盒 EZ DNA methylation kit 购自 Zymo(美国),PCR 相关产品购自 TaKaRa;DNMT1 一抗购自 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶标价 125 的山羊抗兔二抗购自中山金桥生物公司,其余 Western 相关产品购自碧云天生物试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 pSilencer4.1-CMV neo 载体 DNMT1 siRNAi 构建

使用 AB(Applied Biosystem)公司的在线 RNAi 设计软件 siRNAi target finder,根据 Genebank 中人 DNMT1 基因 mRNA 序列(NM_001379),按照 Tuschl 设计原则,选出符合条件针对 DNMT1 21 nt siRNAi。根据 pSilencer4.1-CMV neo 说明书组成长度为 55 nt 的寡核苷酸链。siRNAi 正义链:5'-GAT CCT CAG GAA CGC GCA CTG AAA TTC AAG AGA TTT CAG TGC GCG TTC CTG ATTA-3;反义链:5'-AGC TTA ATC AGG AAC GCG CAC TGA AAT CTC TTG AAT TTC AGT GCG CGT TCC TGA G-3'。该寡核苷酸链 5' 和 3' 端分别含有 BamH I 与 HindIII 的酶切位点,5' 端 19 nt 编码 siRNAi 正义链即靶序列,中间 9 nt(中间部分)转录后形成茎环结构,3' 端 19 nt 与 5' 端 19 nt 反向重复、编码 siRNAi 反义链,3' 末端 TT 为转录终止信号(图 1)。按说明书寡核苷酸退火后形成双链,并插入到 pSilencer 4.1 CMV 的 2 个酶切点 BamH I、Hind III 之间转化入感受态大肠杆菌,穿刺菌液接种于 LB 固体培养基,抽提质粒备用。

BamH I	sense sequence (19nt)	loop	antisense sequence (21nt)	HindIII
5'-GATCC	GAA GGTGTGCAITGATGCG	TTCAAGAGA	CGCATCAATGCACACCTTCTT	A-3'
3' G	CTTCCACACGTAACACTACGC	AAGTCTCT	GCGTAGTTIACGTGTGGAAGAA	TTCC A-5'

图 1 DNMT1 siRNAi 体外化学合成序列示意图

1.2.2 细胞培养及转染方法 肺癌 A549 细胞用含体积分数 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,于 37℃、体积分数为 5% CO₂ 条件下培养。转染前 1 d,取对数生长期的 A549 细胞配制细胞悬液,用 0.25%胰蛋白酶消化细胞并计数,在含血清,

[△] 通讯作者,Tel:(023)68765680;E-mail:yangheping5526@126.com。

不含抗生素的培养基中培养 1 d。次日,用 Opti-MEM I 培养基分别稀释质粒和 Lipofectamine2000 试剂,5 min 后将两者混合。混合物室温保温 20 min。在加入复合物前先移去培养基,替换无血清培养基,将复合物加入细胞中。在 37 ℃、5% 的 CO₂ 中培养 4 h 后加入血清。继续培养 24~72 h,隔天换培养基,检测各指标。实验分为 3 组,对照组:只加脂质体;阴性对照组:转染 pSilencer 4.1 CMV-nonspecific 质粒(由 Ambion 公司提供);DNMT1 siRNAi 组:转染靶向 DNMT1 基因的 siRNAi(siRNAi:脂质体=1:2)。

1.2.3 半定量 RT-PCR 方法检测转染前后细胞中 DNMT1 mRNA 表达情况 按照 Tripure 说明书提取各组细胞总 RNA,取 3 μg 总 RNA 按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行 RT-PCR 反应。取 1 μl cDNA 产物进行 PCR 反应,DNMT1 正义链 5'-TGT TTC ACG CCC ACT GGT TCT G-3',反义链 5'-GCT GCC TTT GAT GTA GTC GGA GTA TTT-3',反应条件:94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,35 个循环,扩增产物为 578 bp;内参 GAPDH (甘油醛磷酸脱氢酶)正义链 5'-CGG GAA ACT GTG GCG TGA-3',反义链 5'-CAA AGG TGG AGG AGT GGG-3',反应条件:94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,56.5 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,35 个循环扩增产物为 311 bp。将 PCR 扩增产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳并照相,然后应用图像分析软件对条带进行灰度计算。检测各组 DNMT1 基因 PCR 产物和与其对应的内参 GAPDH 基因 PCR 产物的灰度值,计算出 DNMT1 /GAPDH 值,依据各组的比值初步估计该 DNMT siRNAi 对细胞中 DNMT1 mRNA 表达量的影响。

1.2.4 Western blot 检测有效 DNMT1 siRNAi 转染后 A549 细胞中 DNMT1 蛋白的表达 转染 DNMT1 siRNAi 72 h 后用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗细胞 3 次,离心收集细胞,用 RIPA buffer 提取蛋白,用 BCA 法测蛋白浓度。每个孔上样蛋白量为 100 μg,经 SDS-PAGE 电泳分离后,将蛋白转移到 PVDF 膜上。用 5% 胎牛血清(BSA)(TBS,0.1% Tween220)封闭 1 h,加 DNMT1 多克隆抗体(1:1 000)和 GAPDH 抗体(1:1 000),4 ℃ 孵育过夜,次日用含有吐温的三羟甲基氨基甲烷盐溶液(TBST)0.1% Tween220/TBS 漂洗 3 次,加辣根过氧化物酶(HRP)标记的 II 抗(1:2 000)室温孵育 1 h,ECL 发光底物作用后,压片 1 min,曝光。

1.2.5 甲基化 PCR 使用天根 DNA 提取试剂盒,每孔细胞加入 1 mL 细胞裂解液充分混匀。常规方法提取细胞 DNA,紫外分光光度计检测 DNA 纯度及含量,将所得样品溶于少量含有乙二胺四乙酸的三羟甲基氨基甲烷盐溶液(TE)中,4 ℃ 贮存。取 20 μg DNA,参照 EZ DNA Methylation Gold Kit 说明书对基因组 DNA 行亚硫酸氢盐修饰。以亚硫酸氢盐修饰后 DNA 为模板,使用甲基化扩增试剂盒分别用甲基化引物和非甲基化引物进行 PCR 扩增,所有 PCR 扩增均使用 25 μL 反应体系。WIF-1 基因启动子区域甲基化引物为:5'-GGG CGT TTT ATT GGG CGT AT-3'(上游)与 5'-AAA CCA ACA ATC AAC GAAC-3'(下游)。非甲基化引物为:5'-GGG TGT TTT ATT GGG TGT AT-3'(上游)和 5'-AAA CCA ACA ATC AAC AAA AC-3'(下游) PCR 反应条件:95 ℃ 变性 10 min,94 ℃ 变性 30 s,62 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 60 s,共 38 个循环后,72 ℃ 延伸 5 min;PCR 扩增产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,观察表达量。

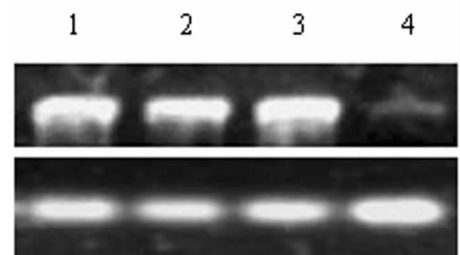
1.2.6 启动子 PCR 产物测序 使用天根 DNA 提取试剂盒,每孔细胞加入 1 mL 细胞裂解液充分混匀。常规方法提取细

胞 DNA,紫外分光光度计检测 DNA 纯度及含量,将所得样品溶于少量 TE 中,4 ℃ 贮存。取 20 μg DNA,参照 EZ DNA Methylation Gold Kit 说明书对基因组 DNA 行亚硫酸氢盐修饰。以亚硫酸氢盐修饰后 DNA 为模板,使用针对 WIF-1 启动子-555~-140 bp 的引物(第 1 个 ATG 设定为 0):5'-GAG TGA TGT TTT AGG GGT TT-3'(上游)和 5'-CCT AAA TAC CAA AAA ACC TAC-3'(下游),以及针对 WIF-1 启动子-161~+118 的引物:5'-GTA GGT TTT TTG GTA TTT AGG-3(上游)和 5'-TCC ATA AAT ACA AAC TCT CCT C-3'(下游)。由于引物设计为了适应甲基化和未甲基化的模板,因此使用降落 PCR 进行扩增,PCR 条件为:95 ℃ 变性 10 min,94 ℃ 变性 30 s,64 ℃ 退火 45 s(每个循环降低 0.5 ℃),72 ℃ 延伸 60 s,共 40 个循环。PCR 扩增产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,将反应产物相应大小的琼脂糖凝胶切下,使用 Zymo 公司的 Gel DNA recovery KitTM 将产物送上海生工生物公司进行测序。CpG 岛甲基化分析使用在线软件 CpG Island Searcher。

1.3 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

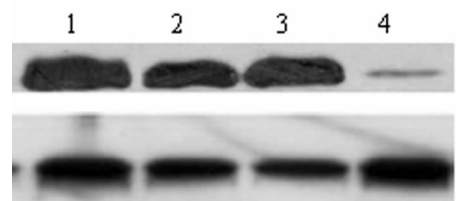
2.1 DNMT1 siRNAi 对肺癌细胞 A549 中 DNMT1 mRNA 水平的影响 DNMT siRNAi 转染 A549 细胞 72 h 后,RT-PCR 结果显示 DNMT1 mRNA 表达较对照组降低 75%(图 2),而脂质体对照组和阴性对照组对 DNMT1 mRNA 表达没有影响。



1: A549 细胞;2:脂质体对照组;3:阴性对照组;4: DNMT siRNAi 组。

图 2 转染后 A549 细胞 DNMT1 mRNA RT-PCR 检测

2.2 DNMT1 siRNAi 对肺癌细胞 A549 中 DNMT1 蛋白水平的影响 DNMT siRNAi 转染 A549 细胞 72 h 后,Western blot 结果显示 DNMT1 蛋白表达较对照组降低 82%(图 3),而脂质体对照组和阴性对照组对 DNMT1 蛋白表达没有影响。

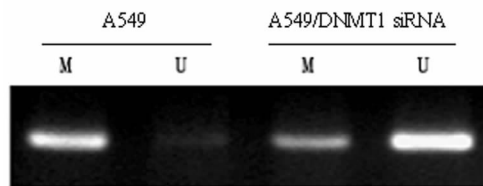


1: A549 细胞;2:脂质体对照组;3:阴性对照组;4: DNMT siRNAi 组。

图 3 转染后 A549 细胞 DNMT1 蛋白 Western blot 检测

2.3 DNMT1 siRNAi 对 WIF-1 启动子甲基化的影响 DNMT siRNAi 转染 A549 细胞 72 h 后,WIF-1 启动子区域甲基化水平明显降低。MSP 结果显示,经过 DNMT1 siRNAi 处理前后,未甲基化的 WIF-1 引物扩增出的 PCR 产物含量增加,而

甲基化的 WIF-1 引物扩增出的 PCR 产物含量降低(图 4)。通过测序的结果显示, DNMT1 siRNAi 处理前, WIF-1 启动子 64 个 CpG 岛中甲基化的比例占到 81.25%, 而 DNMT1 siRNAi 处理后, WIF-1 启动子 CpG 岛中甲基化的比例明显降低为 33.85%。



U: 未甲基化引物扩增出的 PCR 产物; M: 甲基化引物扩增出的 PCR 产物。

图 4 DNMT siRNAi 转染后 WIF-1 启动子甲基化 PCR 检测

3 讨 论

肺癌的发生是多步骤、多因素参与的复杂的生物学过程, 涉及遗传学与表观遗传学的改变。DNA 甲基化是最重要的表观遗传修饰方式, 高甲基化所致抑癌基因转录失活与肿瘤密切相关。抑癌基因 5'-CpG 岛甲基化是肺癌发生发展中较频繁的早期事件, 超过 40 种基因在 DNA 甲基化状态方面出现某种程度的改变, 包括 APC、p16、DKPK1、MGMT、RASSF1A 等^[5-9]。

WIF-1 是 Wnt 信号通路上的拮抗物之一, 可以阻断 Wnt 的经典通路^[10]。WIF-1 基因定位于人染色体 12q14.3, 其编码产物为 WIF-1 蛋白, 在人的前列腺、肺和脑中含量丰富。近年来的许多研究显示, 人类多种肿瘤中 WIF-1 蛋白表达减少甚至缺失, 均与其启动子的甲基化关系密切^[11-13]。研究发现人肺癌细胞内 Wnt 信号途径呈异常激活, 检测发现 WIF-1 基因表达降低甚至不表达^[14]。同时有研究发现, 83% 肺癌组织中 WIF-1 蛋白表达减少, 亦与其启动子的甲基化关系密切^[15], 还有研究表明抑癌基因 WIF-1 (Wnt inhibitory factor-1) 启动子高甲基化可作为 I 期 NSCLC 的独立诊断标志^[16]。本研究发现, 在肺癌细胞系 A549 中也存在着 WIF-1 启动子高甲基化, 由于 DNA 甲基化是靠 DNMT 来维持, 而 DNMT1 又在肺癌中高表达, 因此设想 WIF-1 启动子高甲基化可能与 DNMT1 的表达有密切的关系。通过抑制肺癌细胞内 DNMT1 的表达, 可能逆转 WIF-1 启动子高甲基化状态。

RNA 干扰是生物体细胞内沉默特定基因表达的一种现象, 当外源性或内源性的 dsRNA 进入细胞后在相关酶的作用下引起与其同源基因的 mRNA 特异性降解, 导致基因转录障碍和表达抑制, 因这一过程发生在转录后水平, 故也称为转录后基因沉默^[17]。为了达到对靶基因稳定而持久的抑制效果, 本实验使用 pSilencer4.1-CMV neo 作为载体, 构建了 DNMT1 siRNAi, 将此 DNMT1 siRNAi 转染入 A549 细胞后, 有效抑制 A549 细胞内 DNMT1 基因表达。同时作者检测了 A549 细胞内 WIF-1 启动子的甲基化状态, 发现原来高甲基化的 WIF-1 启动子出现了明显的去甲基化, 甲基化的 CpG 岛含量由原来的 81.25% 下降到 33.85%, 提示 DNMT1 在维持 WIF-1 启动子甲基化中的重要作用, 下调 DNMT1 表达能逆转 WIF-1 启动子甲基化水平。

参考文献:

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.

[2] Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics [J]. Int J Cancer, 2008, 123(1): 1-7.

[3] Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, et al. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 358(11): 1118-1128.

[4] Jones PA. DNA methylation and cancer[J]. Oncogene, 2002, 21(35): 5358-5360.

[5] 张丽霞, 潘世扬, 陈丹, 等. 肺癌细胞株 APC 基因启动子甲基化对其转录的影响[J]. 癌症, 2007, 26(6): 576-580.

[6] Toyooka S, Matsuo K, Ggzdar AF. DNA methylation in lung cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 358(23): 1118-1128.

[7] Shames DS, Girard L, Gao B, et al. A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies[J]. PLoS Med, 2006, 3(12): 2244-2263.

[8] Vaissiere T, Hung RJ, Zaridze D, et al. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors[J]. Cancer Res, 2009, 69(1): 243-252.

[9] Chen H, Suzuki M, Nakamura Y, et al. Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer[J]. Oncol Rep, 2006, 15(5): 1281-1285.

[10] Tang Y, Simoneau AR, Liao WX, et al. WIF1, a Wnt pathway inhibitor, regulates SKP2 and c-myc expression leading to G1 arrest and growth inhibition of human invasive urinary bladder cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(2): 458-468.

[11] Yang TM, Leu SW, Li JM, et al. WIF-1 promoter region hypermethylation as an adjuvant diagnostic marker for non-small cell lung cancer-related malignant pleural effusions[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(7): 919-924.

[12] Veeck J, Wild PJ, Fuchs T, et al. Prognostic relevance of Wnt-inhibitory factor-1 (WIF1) and Dickkopf-3 (DKK3) promoter methylation in human breast cancer[J]. BMC Cancer, 2009, 9(7): 217-218.

[13] Kawakami K, Hirata H, Yamamura S, et al. Functional significance of Wnt inhibitory factor-1 gene in kidney cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(22): 8603-8610.

[14] 徐新娟, 丁文柏, 韩钰, 等. 经典 Wnt 信号途径相关基因异常甲基化与肺癌发生的关系[J]. 广东医学, 2008, 29(6): 899-901.

[15] Mazieres J, He B, You L, et al. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer[J]. Cancer Res, 2004, 64(14): 4717-4720.

[16] Yoshino M, Suzuki M, Tian L, et al. Promoter hypermethylation of the p16 and Wif-1 genes as an independent prognostic marker in stage IA non-small cell lung cancers[J]. Int J Oncol, 2009, 35(5): 1201-1209.

[17] Vig K, Lewis N, Moore EG, et al. Secondary RNA structure and its role in RNA interference to silence the respiratory syncytial virus fusion protein gene[J]. Mol Biotechnol, 2009, 43(3): 200-211.