

应用 BSP 联合 TA 克隆测序检测胰腺癌中 RASSF1A 基因启动子区异常甲基化

彭 泉^{1,2}, 张立洁³, 蔡辉华¹, 高文涛¹, 赵成功², 钱祝银^{1*}, 苗 毅¹

(¹南京医科大学第一附属医院普外科, 江苏 南京 210029; ²解放军第 105 医院普外科, ³肿瘤科, 安徽 合肥 230032)

[摘要] **目的:**检测 Ras 相关区域家族 1A(Ras association domain family 1A, RASSF1A)在胰腺癌细胞株中的甲基化和表达状态,探讨其启动子异常甲基化在胰腺癌发病过程中的作用。**方法:**采用重亚硫酸盐测序 PCR(bisulfite genomic sequencing PCR, BSP)联合 TA 克隆测序检测胰腺癌细胞株 PANC-1 及胰腺癌组织、癌旁组织及正常胰腺组织中 RASSF1A 启动子区 CpG 岛的甲基化状态,以甲基化酶抑制剂 5-aza-2-deoxycytidine(5-aza-dC)处理 PANC-1,观察处理前后甲基化率变化情况,逆转录 PCR 观察 RASSF1A 的 mRNA 表达情况。**结果:**在 PANC-1 细胞中 RASSF1A 启动子的甲基化率平均为 100.00%,在正常胰腺、癌旁及癌组织中平均分别为 1.79%、93.75%和 100.00%,与正常胰腺组织相比,胰腺癌旁及癌组织的 RASSF1A 启动子甲基化率明显增高($P < 0.01$),而癌旁及癌组织之间无明显差异($P > 0.05$)。在 PANC-1 细胞、胰腺癌组织及癌旁组织中 RASSF1A 基因无表达,在正常胰腺组织中 RASSF1A 基因呈阳性表达;PANC-1 细胞经 5-aza-dC 处理后,RASSF1A 的甲基化率下降(88.89%, $P < 0.05$),mRNA 表达无变化。**结论:**胰腺癌细胞株 PANC-1 及癌组织、癌旁组织 RASSF1A 基因表达与启动子区甲基化状态有关,启动子区的高甲基化导致 PANC-1 中 RASSF1A 基因的表达沉默。该基因异常甲基化有望成为胰腺癌的早期诊断指标和治疗靶点。

[关键词] 胰腺癌; 甲基化; Ras 相关区域家族 1A; 重亚硫酸盐测序 PCR; TA 克隆

[中图分类号] Q756

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)01-072-05

The abnormal methylation of RASSF1A in pancreatic cancer detected by bisulfite genomic sequencing PCR combined TA clone sequencing technology

PENG Quan^{1,2}, ZHANG Li-jie³, CAI Hui-hua¹, GAO Wen-tao¹, ZHAO Cheng-gong², QIAN Zhu-yin^{1*}, MIAO Yi¹

(¹Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of General Surgery, ³Department of Oncology, The 105th Central Hospital of People's Liberation Army, Hefei 230032, China)

[Abstract] **Objective:**To explore the methylation status and expression of Ras association domain family 1A (RASSF1A), and the possible effect between promoter aberrant methylation and the pathogenesis of pancreatic cancer. **Methods:** We detected the methylation status of RASSF1A promoter CpG island (CGI) in pancreatic cancer cell line PANC-1, normal pancreatic tissue and 1 pairs of pancreatic tissues (cancer and para-cancerous tissue) by using bisulfite genomic sequencing PCR (BSP) combined with TA clone for sequencing. The methylation rate of RASSF1A in PANC-1 was compared before and after treatment of the inhibitor of DNA methyltransferase (5-aza-2-deoxycytidine, 5-aza-dC), and reverse transcription PCR (RT-PCR) were used to explore mRNA expression of the RASSF1A gene. **Results:**The average methylation rate of RASSF1A promoter CGI was 100.00% in PANC-1, 1.79% in normal pancreas, 93.75% in para-cancerous tissues, and 100.00% in cancer tissues. The methylation rate of para-cancerous or cancer tissue was higher than that of normal pancreas ($P < 0.01$), but there was no significant difference between para-cancerous tissues and cancer tissues ($P > 0.05$). After the treatment of 5-aza-dC, the methylation rate in PANC-1 was decreased to 88.89% ($P < 0.05$), but the mRNA of RASSF1A had no change. **Conclusion:** This promoter hypemethylation is correlated with RASSF1A gene expression in pancreatic cancer cell line PANC-1 and pancreatic tissues, and plays a key role in RASSF1A silencing. Aberrant hypermethylation of RASSF1A could probably become early diagnosis index and treatment target of pancreatic cancer.

[Key words] pancreatic cancer; DNA methylation; Ras association domain family 1A; bisulfite genomic sequencing PCR; TA clone

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(1): 072-076]

[基金项目] 江苏省 2010 年度留学人员科技活动项目

*通讯作者, E-mail: qianzhusilver@163.com

胰腺癌是高度恶性肿瘤之一,手术切除是治疗胰腺癌最好方法,但 80%以上的患者确诊时已经是晚期或不能手术切除,这也是切除率和生存率低的原因。在能够手术治疗的胰腺癌患者中,其 5 年生存率也仅为 0.4%-4.0%,故早期发现、早期诊断、早期治疗对改善胰腺癌的预后至关重要^[1-2]。

Ras 相关区域家族 1A (Ras association domain family 1A, RASSF1A) 基因属于 RAS 相关域 1 基因家族。人类 RASSF1A 是从第 3 号染色体短臂上 (3p21.3) 克隆出来的肿瘤抑制基因,近年对其表达情况进行研究发现,在许多肿瘤中其表达缺失,预示该基因的缺失可能与多种肿瘤的发生发展有关^[3-5]。有文献报道 RASSF1A 基因的异常甲基化可以作为肿瘤的早期诊断指标^[6-8]。在此,本研究采用重亚硫酸盐测序 PCR (bisulfite genomic sequencing PCR, BSP) 联合 TA 克隆测序的方法研究胰腺癌细胞株 PANC-1 及胰腺癌、癌旁和正常胰腺组织中 RASSF1A 基因启动子区甲基化水平。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);甲基化酶抑制剂 5-aza-dC、亚硫酸氢钠(美国 Sigma 公司);Wizard DNA Clean-up System(美国 Promega 公司);TRIzol(美国 Invitrogen 公司);DNA 提取试剂盒、dNTP(美国 Omega 公司);引物(上海 Invitrogen 公司);TA 克隆试剂盒(日本 TOYOBO 公司)。

胰腺癌细胞 PANC-1 购自上海细胞库,由南京医科大学第一附属医院普外科实验室保存。胰腺癌标本、癌旁组织标本(距肿瘤组织 1 cm)及正常胰腺组织标本采自南京医科大学第一附属医院胰腺外科,并经过组织病理学诊断。其中胰腺癌标本 15 例,癌旁组织标本 15 例,均为配对组织,正常胰腺

组织 4 例。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理

PANC-1 细胞培养于含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养液中,37℃,饱和湿度和 5% CO₂ 中传代培养。取对数生长期细胞按 5×10⁶ 个/ml 的浓度接种于 6 孔板,培养 24 h 后换液,分别加入 5 μmol/L 5-aza-dC 培养 96 h,每 24 h 更换培养液(含同样浓度的 5-aza-dC)。

1.2.2 基因组 DNA 提取、重亚硫酸盐处理

按照试剂盒说明书提取细胞或组织的基因组 DNA,将其进行重亚硫酸盐处理,使未甲基化的胞嘧啶(C)转化成胸腺嘧啶(T),而甲基化的 C 不变。亚硫酸氢盐修饰过程^[9]:①碱变性:取 DNA 约 4 μg 并稀释至 50 μl,加入 2 mol/L 的 NaOH 5.5 μl,37℃ 变性 10 min;②硫化与脱氢:加入 30 μl 新配制的 10 mmol/L 的对苯二酚及 3 mol/L NaHSO₃ 520 μl (以 10 mol/L 的 NaOH 调整 pH 值至 5.0),混匀,避光,置于 50℃水浴 16 h;③纯化与脱硫:利用 Wizard DNA 纯化试剂盒纯化修饰后的 DNA,于室温下加入 3 mol/L 的 NaOH 5.5 μl,放置 15 min 脱硫;④沉淀回收:加入 2 μl 10 mg/ml 糖原,66 μl 10 mol/L 乙酸铵及冰乙醇 450 μl 过夜,离心,洗涤,室温下干燥,加适量 TE(pH8.0)60 μl 溶解,-20℃保存。

1.2.3 BSP 反应

以修饰后的 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。反应体系:样品 DNA 2 μl,10×Buffer 5 μl,上下游引物各 2 μl(上游:5'-GGGGGAGTTTGAGTTTATTGA-3',下游:5'-CTACCCCTTAAC TACCCCTTCC-3'),dNTP 2.5 μl,Fast-Taq 酶 0.2 μl,去离子 H₂O 36.3 μl,扩增区域见图 1。采用 Touchdown-PCR 进行扩增,2%琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,Bio-Rad 自动成像仪成像。

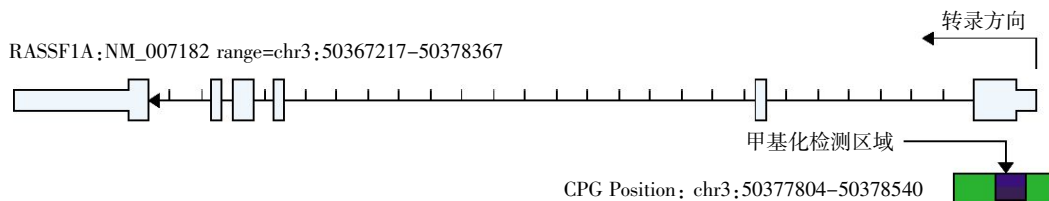


图 1 UCSC 数据库上 RASSF1A 基因,相邻 CPG 岛及甲基化检测区域示意图

Figure 1 CpG island and methylation detection site in RASSF1A gene

1.2.4 TA 克隆测序

从电泳板上切割含目的 DNA 片段的凝胶块,采用美国 Sigma 公司 DNA 纯化试剂盒回收、纯化 PCR 产物,按照试剂盒操作程序进行操作。将纯化

后产物进行 TA 克隆连接反应(氨苄青霉素抗性),反应体系如下:灭菌蒸馏水 1 μl,2×Ligation Buffer 5 μl,pTA2 Vector (50 ng/μl)1 μl;PCR 产物 2 μl,T4 DNA 连接酶 1 μl,共 10 μl,4℃条件下连接 12~18 h。

将上述连接产物转化感受态细菌,取适量菌液均匀涂抹于氨苄抗性 LB 平板中,放入 37℃ 恒温细菌培养箱,至长出单克隆菌落。挑取单克隆菌落至含有氨苄抗性 LB 培养基的 5 ml EP 管中,振荡培养,取 1 μl 菌液作为模板进行 PCR 反应,反应条件同前,将菌液 PCR 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳分离,取阳性反应的菌液送测序。

1.2.5 检测 RASSF1A mRNA 的表达水平

分别收集 5-aza-dC 处理前后细胞,提取总 RNA,以 1 μg 总 RNA 作为模板反转录合成 cDNA。引物 (F):5'-GTGGAGCGGGACACGAA-3',引物 (R):5'-GCTGTTGATCTGGGCATTGT-3',然后进行 PCR 扩增,反应体系:cDNA 2 μl,10×Buffer 2.5 μl,dNTP (2.5 mmol/L each) 2 μl,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μl,Taq 酶 0.2 μl,ddH₂O 15 μl,引物各 1 μl,总体积 25 μl。2% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,Bio-Rad 自动成像仪成像,实验重复 3 次。组织样品的处理与细胞样品相同。

2 结果

2.1 BSP 结果

Touchdown-PCR 进行反应,在如下条件 298 bp 目的条带较为清晰:95℃ 5 min,94℃ 30 s,68℃ 30 s,72℃ 30 s,2 个循环;94℃ 30 s,67.5℃ 30 s,72℃ 30 s,3 个循环;94℃ 30 s,67℃ 30 s,72℃ 30 s,4 个循环;

94℃ 30 s,66.5℃ 30 s,72℃ 30 s,5 个循环;94℃ 30 s,66℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环。PCR 产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离,Bio-Rad 自动成像仪成像(图 2)。



图 2 BSP 反应电泳图

Figure 2 The BSP results of PANC-1 cells, normal pancreatic tissue and 1 pairs of pancreatic tissues (cancer and para-cancerous tissue)

2.2 TA 克隆测序结果

将 TA 克隆阳性菌液送测序得出:PANC-1 中 RASSF1A 基因甲基化率为 100.00%,经 5-aza-dC 处理后为 88.89%;肿瘤组织中为 100.00%;癌旁组织为 93.75%;正常胰腺组织中甲基化率为 1.39%。经去甲基化处理,PANC-1 中 RASSF1A 的甲基化率略有下降($P < 0.05$);正常胰腺组织中 RASSF1A 的甲基化率明显低于胰腺癌组织和癌旁组织,但胰腺癌组织与癌旁组织相比甲基化率无明显差别($P > 0.05$)。将测序结果制图如下,图中实心圆代表发生甲基化的 CG 位点,空心圆代表未发生甲基化的 CG 位点(图 3)。

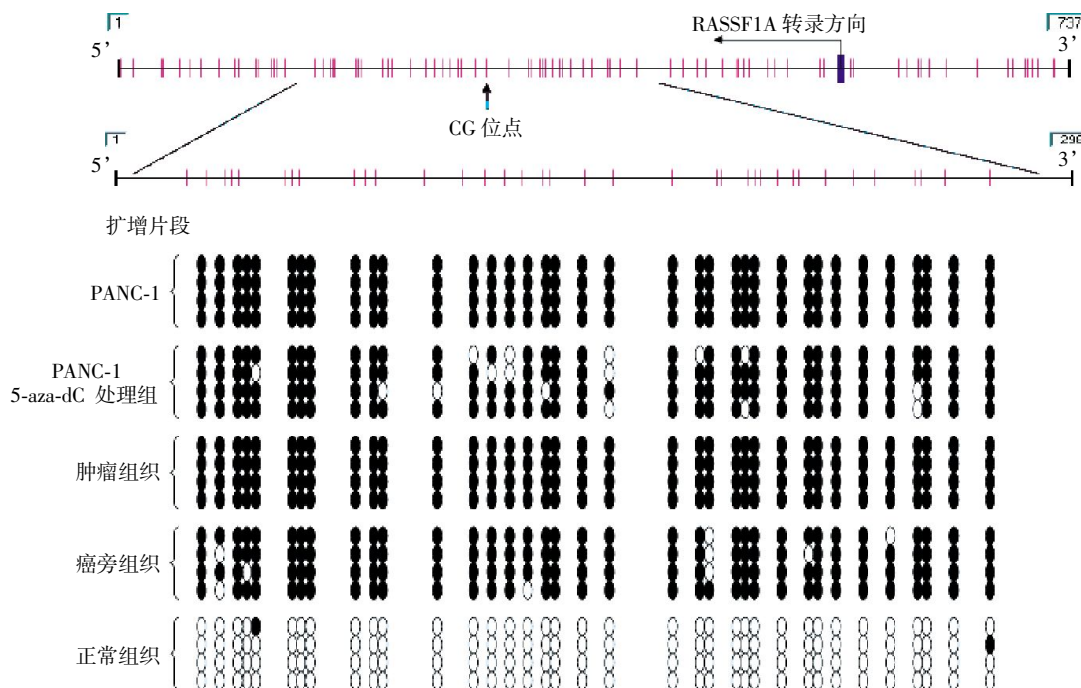


图 3 TA 克隆测序结果示意图

Figure 3 The sequencing results of TA clone

2.3 RASSF1A 基因 mRNA 表达变化情况

在退火温度为 63℃时, 获得 108 bp 目的条带。如图 4 所示: PANC-1 细胞株中 5-aza-dC 处理前后 RASSF1A 的 mRNA 均无明显表达; 在胰腺癌组织及癌旁组织中, RASSF1A 无明显表达, 正常胰腺组织中 RASSF1A 基因 mRNA 呈阳性表达。



图 4 RASSF1A 基因 mRNA 表达情况

Figure 4 The mRNA expression of RASSF1A expression in PANC-1 cells and each tissues

3 讨论

胰腺癌是恶性程度极高的消化系统肿瘤, 治愈率低, 预后极差, 其病死率占我国恶性肿瘤的第 6 位, 在诊断后的中位生存期为 4~6 个月。近年胰腺癌的发病率呈上升趋势, 探讨胰腺癌发病的分子机制, 找到有效的早期诊断及治疗方法成为十分迫切的问题^[10]。

RASSF1A 含 340 个氨基酸的开放阅读框, 编码相对分子量为 38 800 的蛋白多肽。RASSF1A 作为抑癌基因的具体作用机制目前存在两种观点。一种观点是 RASSF1A 通过 Rb 家族的细胞周期检查点的作用而诱导细胞周期的停滞。已有研究证明 Rb 基因家族控制 G1/S 期检验点, 但 cyclinD1 的累积可以形成一个旁路使细胞绕过 Rb 控制的检查点而促进细胞增殖。Shivakumar 等^[11] 通过研究认为 RASSF1A 从翻译水平上抑制了 cyclinD1 的聚集, 即阻断了 cyclinD1 介导的细胞增殖旁路, 从而阻止了细胞从 G1 向 S 期转变。另一种观点是与 Ras 通路相关的机制, 当 Ras 被上游信号激活后, 主要通过 Ras/RASSF1/ERK 通路将信号由细胞外传递到细胞内, 介导细胞的分化、增殖、存活及原癌基因的转化^[12]。RASSF1A 可能是 Ras 下游信号转导中的一个效应物, 与 Ras 蛋白以三磷酸鸟苷依赖的形式相互作用, 表现出受体活性, 诱导细胞凋亡^[13-14]。

目前认为 RASSF1A 基因表达失活主要是与启动子去特异的高甲基化、杂合子丢失及染色体缺失有关^[15-16]。现已确切证明 DNA 甲基化是肿瘤抑制基因失活的重要机制, 在某种情况下是唯一机制, 在肿瘤细胞中有 RASSF1A 的失活, 通常可见其启动

子区 CGI 高甲基化, 导致基因失活, 并可见 DNA 甲基化转移酶 I 的异常增高^[17]。

本研究以 BSP 结合 TA 克隆测序的方法检测胰腺癌细胞株 PANC-1、胰腺癌组织、癌旁组织及正常胰腺组织 RASSF1A 启动子区甲基化率, 这种方法可以同时检测一段序列中的多个 CG 位点, 相对于 COBRA^[18]法及甲基化特异性 PCR (methylmion specific PCR, MSP), 可以更直接、更准确地检测目的片段的甲基化情况。本研究发现胰腺癌细胞株、胰腺癌及癌旁组织的异常甲基化明显高于正常组织 ($P < 0.01$), 这与 RASSF1A 基因的 mRNA 表达相一致, 胰腺癌及癌旁组织之间甲基化率及表达均无明显差异, 说明 RASSF1A 启动子区异常甲基化对胰腺癌的发生发展来说是早中期事件, 有望成为胰腺癌的早期诊断指标。本实验中 PANC-1 细胞株 RASSF1A 启动子区甲基化率高达 100.00%, mRNA 无表达, 经过去甲基化处理后, 甲基化率有所下降, 但仍无 mRNA 表达, 这可能由于去甲基化处理不彻底所致, 因处理后甲基化率仍高达 88.89%。

DNA 甲基化是表观遗传学中的一种重要机制, 可在不涉及基因序列改变的情况下改变基因表达水平, 并且这种改变在细胞增殖过程中能稳定传递。由于基因的序列没有改变, 且甲基化是可逆性的基因修饰过程, 故在胰腺癌或癌前病变中通过去甲基化处理, 很可能对肿瘤的预防和早期治疗发挥积极作用。目前 5-aza-dC 已经进入临床试验, 该药物在其他恶性肿瘤中已取得了显著的疗效^[19-21]。值得注意的是, DNA 甲基化具有组织特异性, 因此 RASSF1A 基因在胰腺癌组织中的甲基化率、表达情况及其在肿瘤进展中所发挥的作用, 还需要在大规模的临床样本上进一步研究验证。

[参考文献]

- [1] 徐树建, 徐泽宽, 王富强, 等. 应用蛋白质组学技术筛选胰腺癌血清肿瘤标志物[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2009, 29(4): 534-538
- [2] 黄 胜, 何伯圣, 龚沈初, 等. 胰腺癌 MRI 检查技术及其诊断价值 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2008, 28(1): 104-105
- [3] Van der Auwera I, Bovie C, Svensson C, et al. Quantitative methylation profiling in tumor and matched morphologically normal tissues from breast cancer patients[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 97
- [4] Senchenko VN, Anedchenko EA, Kondratieva TT, et al. Simultaneous down-regulation of tumor suppressor genes

- RBSP3/CTDSPL,NPRL2/G21 and RASSF1A in primary non-small cell lung cancer[J]. *BMC Cancer*,2010,10:75
- [5] Juhlin CC,Kiss NB,Villablanca A,et al. Frequent Promoter Hypermethylation of the APC and RASSF1A Tumour Suppressors in Parathyroid Tumours [J]. *PLoS One*,2010,5(3):e9472
- [6] Hu L,Chen G,Yu H,et al. Clinicopathological significance of RASSF1A reduced expression and hypermethylation in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatol Int*,2010,4(1):423-432
- [7] Dumont N,Crawford YG,Sigaroudinia M,et al. Human mammary cancer progression model recapitulates methylation events associated with breast premalignancy [J]. *Breast Cancer Res*,2009,11(6):R87
- [8] Misawa A,Tanaka S,Yagyu S,et al. RASSF1A hypermethylation in pretreatment serum DNA of neuroblastoma patients;a prognostic marker [J]. *Br J Cancer*,2009,100(2):399-404
- [9] Herman JG,Graff JR,Myohanen S,et al. Methylation specific PCR:A novel PCR assay for methylation status of CpG island [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1996,93:9821-9826
- [10] 汤文浩,陈卫东,李俊生. 胰腺癌的术前分期进展[J]. *胰腺病学*,2007,7(5):340-341
- [11] Shivakumar L,Minna J,Sakamaki T,et al. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclinD1 accumulation [J]. *Mol Cell Biol*,2002,22(12):4309-4318
- [12] Tommasi S,Dammann R,Jin SG,et al. RASSF3 and NORE1;identification and cloning of two human homologues of the putative tumor suppressor gene RASSF1 [J]. *Oncogene*,2002,21(17):2713-2720
- [13] Khokhlatchev A,Rabizadeh S,Xavier R,et al. Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway [J]. *Curr Biol*,2002,12(4):253-265
- [14] Ortiz-Vega S,Khokhlatchev A,Nedwidek M,et al. The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1 [J].*Oncogene* 2002,21(9):1381-1390
- [15] Yu MY,Tong JH,Chan PK,et al. Hypermethylation of the tumor suppressor gene RASSF1A and frequent concomitant loss of heterozygosity at 3p21 in cervical cancers[J].*J Cancer*,2003,105(2):204-209
- [16] Chan MW,Chan LW,Tang NL. Frequent hypermethylation of promoter region of RASSF1A in tumor tissues and voided urine of urinary bladder cancer patients [J]. *Int J Cancer*,2003,104(5):611-616
- [17] Paulsen M,Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting development and disease[J]. *J Pathol*,2001,195(1):97-110
- [18] Xiong ZG,Laird WP. COBRA;a sensitive and quantitative DNA methylation assay [J]. *Nucleic Acids Res*,1997,25(12):2532-2534
- [19] Yu MY,Tong JH,Chan PK,et al. Hypermethylation of the tumor suppressor gene RASSF1A and frequent concomitant loss of heterozygosity at 3p21 in cervical cancers[J]. *J Cancer*,2003,105(2):204-209
- [20] Mack GS. Epigenetic cancer therapy makes headway[J]. *J Natl Cancer Inst*,2006,98(20):1443-1444
- [21] Shaker S,Bernstein M,Momparler LF,et al. Pre-clinical evaluation of antineoplastic activity of inhibitors of DNA methylation (5-aza-2'-deoxycytidine) and histone deacetylation (trichostatin A,depsipeptide) in combination against myeloid leukemic cells [J]. *Leuk Res*,2003,27(5):437-444

[收稿日期] 2011-07-07