

DNA 甲基转移酶 1 基因在人肝外胆管癌组织和细胞中的表达及意义*

左石¹, 邹声泉², 孙诚谊^{1**}

(1. 贵阳医学院附院 肝胆外科, 贵州 贵阳 550004; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 普外 II 科, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的: 研究 DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 在人肝外胆管癌组织和人胆管癌细胞系 QBC₉₃₉ 中的表达, 并分析 DNMT1 的表达与胆管癌临床病理因素之间的关系, 探讨其在胆管癌发生发展过程中的作用。方法: 用免疫组织化学法检测 DNMT1 在 24 例人肝外胆管癌组织和 20 例慢性胆管炎组织中的阳性细胞表达率, 将二者进行对比并分析其与胆管癌临床病理之间的关系; 用 RT-PCR 和 Western Blot 分别检测 DNMT1 在人胆管癌细胞系 QBC₉₃₉ 中转录水平和蛋白水平的表达情况。结果: (1) 在 24 例胆管癌组织中 DNMT1 蛋白阳性细胞表达率为 (37.57 ± 11.24)%, 而在 20 例伴慢性炎症的胆管壁组织中 DNMT1 蛋白阳性细胞表达率为 (10.73 ± 6.61)%, 二者之间的差异具有显著性意义 ($P=0.005$); (2) DNMT1 蛋白的异常表达与胆管癌组织的分化程度相关, 低分化肿瘤的表达水平最高, 其次为中等分化肿瘤, 高分化肿瘤的表达水平较低, DNMT1 蛋白的异常表达与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、有无淋巴结转移和临床分期无明显关系; (3) 在人胆管癌细胞系 QBC₉₃₉ 中, 通过 RT-PCR 和 Western Blot 均能检测到 DNMT1 基因 mRNA 和蛋白的表达。结论: (1) 在胆管癌组织中, DNMT1 蛋白的表达较慢性胆管炎组织明显增加, 并与肿瘤组织分化程度有关, 与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、有无淋巴结转移和临床分期无明显关系, 提示 DNMT1 的高表达可能与胆管癌的发生发展有关, 且可能是胆管癌发生中的一个早期分子事件; (2) DNMT1 在人胆管癌细胞系 QBC₉₃₉ 中存在表达。

[关键词] DNMT1 基因; 胆管肿瘤; DNA 甲基化; 基因表达

[中图分类号] R735.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2011)03-0221-05

The Expression and Significance of DNA Methyltransferase 1 Gene in Extrahepatic Cholangiocarcinoma Tissues and Cells

ZUO Shi¹, ZOU Shengquan², SUN Chengyi^{1*}

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of General Surgery, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong Science & Technology University, Wuhan 430030, Hubei, China)

[Abstract] Objective: To study the expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) in human extrahepatic cholangiocarcinoma (ECC) tissues and cell line QBC₉₃₉, and to analyze the relationship between the expression level of DNMT1 and clinicopathologic features of ECC, and so as to explore the roles of DNMT1 in the tumorigenesis of ECC. **Methods:** The expression of DNMT1 protein was detected in 24 ECC specimens and in 20 chronic cholangitis tissue specimens with immunohistochemistry method. The results of the two kinds of tissues were compared, and their relationship with the clinicopathologic features of ECC was analyzed. RT-PCR and Western Blot were used to detect the expression of DNMT1 gene and protein in human biliary tract carcinoma cell line QBC₉₃₉ respectively. **Results:** (1) The rates of positive DNMT1 protein expression cells were (37.57 ± 11.24)% and (10.73 ± 6.61)% in ECC specimens and in chronic cholangitis specimens respectively. There were significant

* [基金项目] 国家“863 计划”资助项目 (No. 2002AA214061), 贵州省科技厅 2010 年度社发攻关计划项目 [黔科合(2010)3162]。

** 通讯作者 E-mail: chengyisun@medmail.com.cn

differences between the two groups ($P=0.005$); (2) The increased expression of DNMT1 protein was correlated with differentiation grade of carcinoma. The protein levels of DNMT1 were high in poorly differentiated cholangiocarcinoma, moderate in moderately differentiated cholangiocarcinoma, and low in well differentiated cholangiocarcinoma. The increased expression of DNMT1 protein was not correlated with gender, age, size of tumor, tumor location, lymph node metastasis or clinical TNM stage. (3) DNMT1 mRNA and protein were both positive in human biliary tract carcinoma cell line QBC₉₃₉. **Conclusions:** (1) The expression level of DNMT1 protein in ECC is significantly higher than that in chronic cholangitis tissues. The increased DNMT1 protein level is correlated with the differentiation grade of tumor and is not correlated with gender, age, tumor size, tumor location, lymph node metastasis or clinical TNM stage. This result suggests that the over-expression of DNMT1 may relate to the pathogenesis of biliary tract carcinoma and may be an early molecular event during tumorigenesis of biliary tract carcinoma. (2) DNMT1 gene is detectable in human biliary tract carcinoma cell line QBC₉₃₉.

[**Key words**] DNA methyltransferase 1; bile duct neoplasms; DNA methylation; gene expression

肝外胆管癌是危害人类健康的恶性肿瘤,其发生与癌基因的激活和抑癌基因的失活相关。DNA 甲基化是表遗传学(epigenesis)的主要内容之一,在肿瘤相关基因的表达调控中具有重要作用,它可以通过基因启动子及其附近区域内 CpG 岛胞嘧啶的甲基化关闭某种组织或细胞不必需的基因,使之不表达或沉寂。越来越多的研究表明,抑癌基因的失活和表达降低与其启动子区域的高甲基化状态有关^[1~4]。DNA 甲基化是由 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)催化发生的。目前发现的该基因家族成员包括 DNMT1、DNMT2、DNMT3a 和 DNMT3b 四个成员^[5],其中以 DNMT1 最为重要,起着维持甲基化(maintenance of methylation)的作用。在本研究中,应用免疫组织化学、RT-PCR 和 Western Blot 分别检测了 DNMT1 在肝外胆管癌组织和胆管癌细胞系 QBC₉₃₉ 中的表达情况,初步探讨 DNMT1 肝外胆管癌发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 实验标本和材料 收集华中科技大学同济医学院附属同济医院和贵阳医学院附属医院 2002 年 1 月~2004 年 12 月手术切除肝外胆管癌石蜡包埋标本共 24 例,其中男 14 例,女 10 例,男女比例为 1.4:1;年龄 39~72 岁,平均(53.58±9.42)岁;肿瘤胆管上段 8 例、中段 6 例、下段 10 例,分别占 33.33%、25.00%、41.67%;高分化 10 例,中分化 7 例,低分化 7 例,分别占 41.67%、29.17%、

29.17%;TNM 分期:I~II 期 14 例,III~IV 期 10 例;发生淋巴或远处转移者 9 例,未发生转移者 15 例,分别占 37.50%、62.50%。另外分别取经病理检查证实为胆管炎的石蜡包埋标本 20 例作对照。所有标本均经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片,并经病理证实。人胆管癌细胞系 QBC₉₃₉ 由第三军医大学西南医院王曙光教授惠赠。

1.1.2 主要试剂 SP 试剂盒和 DAB 底物试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。鼠抗人 DNMT1 单克隆抗体(IMGEX 公司),HRP 标记山羊抗小鼠 IgG[北京中山公司(Pierce 产品)],RPMI1640 培养基和胎牛血清(Hyclone 公司),Trizol 试剂(Invitrogen 公司),RT 试剂盒(MBI 公司),PCR 试剂盒(北京天为时代),化学发光试剂(ECL)购自 PIERCE 公司,引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组织化学染色 采用链霉素亲和生物素-过氧化物酶免疫组化方法(S-P 法),按照 SP 免疫组织化学试剂盒说明书上所给步骤进行操作。一抗稀释浓度为 1:200,二抗稀释浓度为 1:1 000。采用双盲法由 2 名富有经验的病理科医师观察并计数。计数方法:光镜下每张切片取 5 个有代表性的高倍视野(×400)进行细胞计数,每视野分成 10×10 共 100 个小格,每个视野随机计数 300 个肿瘤细胞或上皮细胞,共计数 1 500 个细胞,计算染色阳性细胞在同类细胞中所占百分率(%)。以阳性细胞百分率≥10% 为表达阳性,<10% 为表达阴性。

1.2.2 细胞培养 QBC₉₃₉ 细胞在含 10% 胎牛血清

的 RPMI1640 培养基中,于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度下培养。

1.2.3 RT-PCR 检测 QBC939 细胞中 DNMT1 基因 mRNA 表达 采用 MBI 公司的 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit,并按照试剂盒说明书进

行操作。以合成的 cDNA 为模板进行 PCR, DNMT1 基因引物序列见表 1。为排除假阴性的影响,同时在 PCR 反应体系中加入 β-actin 引物作为内参照,β-actin 引物序列见表 1。PCR 退火温度为 60 ℃,30 个循环。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察。

表 1 RT-PCR 扩增 DNMT1 基因的引物序列

Tab. 1 Primer sequences of DNMT1 gene for amplification by RT-PCR

引物名称	引物序列	产物长度	退火温度
DNMT1 (sense)	5'-TGACGAGGACGAAGATGG-3'	442 bp	60 ℃
DNMT1 (antisense)	5'-CAGGTGACCGTGCTTACAG-3'		
β-actin (sense)	5'-TCTACAATGAGCTGCGGTGTG-3'	682 bp	59 ℃
β-actin (antisense)	5'-ATCTCCTTCTGCATCCTGTG-3'		

1.2.4 Western Blot 检测 QBC₉₃₉ 细胞中 DNMT1 蛋白的表达 分别提取 QBC₉₃₉ 细胞的总蛋白,经 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移到 PVDF 膜上,然后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,漂洗后与一抗(1:800 稀释)4 ℃ 缓慢摇动过夜,用 TBS-T 洗脱后与 HRP 标记的二抗(1:1 000 稀释)室温孵育 2~3 h,再用化学发光试剂显影、曝光分别观察 DNMT1 蛋白的表达情况。

1.3 统计学处理

各组实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 统计软件包进行非配对 *t* 检验及多均数之间两两比较的方差分析。

2 结果

2.1 DNMT1 蛋白在肝外胆管癌组织中的表达

2.1.1 DNMT1 蛋白在肝外胆管癌组织中的表达率及分布特征 DNMT1 蛋白阳性表达产物均分布于细胞核或胞核伴胞质内,呈棕黄色颗粒。从表 2 可以看出,在 24 例胆管癌组织中, DNMT1 蛋白阳性表达率为(37.57 ± 11.24)%,而在 20 例慢性炎症的胆管壁组织中的阳性率为(10.73 ± 6.61)%,二者之间的差异具有显著性意义($P = 0.005$),说明 DNMT1 在肝外胆管癌组织中的表达水平较胆管炎组织明显升高。

2.1.2 DNMT1 蛋白异常表达与胆管癌临床病理因素之间的关系 统计结果表明,在表 3 的临床病理因素中, DNMT1 蛋白的异常表达与肿瘤组织分化程度有关,其中低分化胆管癌组织的阳性细胞率明显高于中等分化程度的胆管癌组织($P = 0.000$),而中等分化的胆管癌组织 DNMT1 阳性细胞率高于高分化胆管癌组织($P = 0.014$)。DNMT1 蛋白的异常表

达与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、有无淋巴结转移和临床分期无明显关系($P > 0.05$)。

表 2 DNMT1 蛋白在胆管癌组织和胆管炎组织中的表达

Tab. 2 DNMT1 protein expression in ECC tissues and in chronic cholangitis tissues

组别	<i>n</i>	DNMT1 阳性细胞(%)
胆管癌组织	24	37.57 ± 11.24
胆管炎组织	20	10.73 ± 6.61

注:与胆管炎组织比较, $t = 9.397, P = 0.005, P < 0.01$ 。

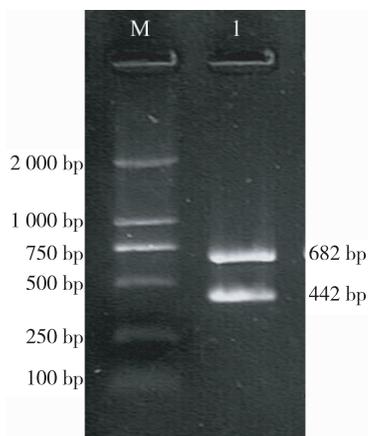
表 3 DNMT1 蛋白异常表达与胆管癌临床病理因素之间的关系

Tab. 3 The relationship between abnormal expression of DNMT1 protein and the clinicopathologic features of ECC

相关因素	例数(<i>n</i>)	阳性细胞(%)	<i>P</i> 值	
性别	男	14	37.43 ± 8.72	0.054
	女	10	40.57 ± 14.00	
年龄	<50	8	37.57 ± 11.68	0.849
	≥50	16	37.58 ± 11.41	
肿瘤大小	<2 cm	4	33.33 ± 9.61	0.292
	≥2 cm	20	38.42 ± 11.57	
肿瘤部位	上段	8	36.33 ± 13.21	上段:中段 0.694
	中段	6	38.86 ± 11.50	中段:下段 0.862
	下段	10	37.79 ± 10.55	下段:上段 0.795
分化程度	高度	10	28.68 ± 5.21	高度:中度 0.014
	中度	7	35.46 ± 5.20	中度:低度 0.000
	低度	7	52.38 ± 4.91	低度:高度 0.000
淋巴结转移	有	9	36.94 ± 11.20	0.633
	无	15	37.95 ± 11.64	
临床分期	I ~ II	14	37.31 ± 11.81	0.758
	III ~ IV	10	37.94 ± 11.02	

2.2 DNMT1 在人胆管癌细胞系 QBC₉₃₉ 中的表达

2.2.1 DNMT1 基因 mRNA 在 QBC₉₃₉ 细胞中的表达 从图 1 可以看出,泳道中出现了 2 条 DNA 条带,一条为 β -actin 基因条带,大小为 682 bp;另外一条为 DNMT1 基因条带,大小为 442 bp,与预期大小相符,说明 DNMT1 基因在 QBC₉₃₉ 细胞中是表达的。



M: marker, 1: QBC₉₃₉ 细胞

图 1 DNMT1 基因 mRNA 在 QBC₉₃₉ 细胞中的表达 (RT-PCR)

Fig. 1 The expression of DNMT1 gene mRNA in QBC₉₃₉ cells detected by RT-PCR

2.2.2 DNMT1 蛋白在 QBC₉₃₉ 细胞中的表达 Western Blot 结果显示, QBC₉₃₉ 中除表达 β -actin 蛋白外,同时在相应的膜上出现 DNMT1 蛋白条带,结果与 RT-PCR 结果一致,说明 DNMT1 基因在人胆管癌 QBC₉₃₉ 细胞中一旦转录成 mRNA 后,可通过转录后加工翻译成相应的蛋白质在细胞中表达。

3 讨论

肿瘤是现代人群的多发病及常见病,预后差、死亡率高。虽然已发现一些因素,如饮食、c-myc 原癌基因的激活和 p53 抑癌基因的失活与肿瘤近来发生率的升高有一定的关系,但是肿瘤确切的发生发展机制尚不清楚。在肿瘤发生的诸多因素中,肿瘤抑制基因 (TSG) 失能和原癌基因 (POG) 获能引起的细胞增殖、凋亡失控和基因组稳定性下降是肿瘤发生过程的中心事件。过去认为,基因失活有两个途径,即基因突变和基因缺失。但目前研究发现,肿瘤细胞基因的失活可通过一条基因突变,而另外一个等位基因维持启动子甲基化状态,并证实这种甲基化状态是 TSG 失活的第三种机制,而且

在某些情况下是 TSG 失活的唯一机制^[6,7]。

DNA 甲基化是表遗传学 (epigenesis) 的主要内容之一,在肿瘤相关基因的表达调控中具有重要作用^[8-10],它可以通过基因启动子及其附近区域内 CpG 岛胞嘧啶的甲基化关闭某种组织或细胞不必要的基因,使之不表达或沉寂。目前认为, DNA 甲基化引起相关基因沉寂主要有 2 种可能机制^[11]: (1) DNA 甲基化引起 DNA 分子构象的改变从而影响特定蛋白质及其黏附能力而直接干扰特异转录因子和各种启动子识别位点的结合,从而引起转录抑制; (2) 甲基 - CpG 结合域 (MBD) 蛋白选择性地与甲基化启动子结合形成复合物,阻断了转录因子结合部位。DNMTs 活性增加可使 DNA 发生异常甲基化,基因活性改变和染色体不稳定。

DNA 甲基化是在 DNMTs 的催化下发生的。目前发现的该基因家族成员包括 DNMT1、DNMT2、DNMT3a 和 DNMT3b 四个成员^[5]。DNMT1 是最早发现的 DNA 甲基转移酶,定位于 19p13.3 ~ p13.2,其 cDNA 全长 5 434 bp,由 1 495 个氨基酸组成,蛋白产物的表现分子量为 190 kD。其 C 端为保守的催化甲基化反应结构域, N 端含有一个半胱氨酸富含区,具有结合和调节功能。DNMT1 是 DNMTs 中最为重要的一员,起着维持甲基化 (maintenance of methylation) 的作用,即根据亲本链上特异的甲基化位点,在 DNA 半保留复制出的新生链相应的胞嘧啶上进行甲基化修饰的过程。许多研究发现, DNMTs 在多种肿瘤中的表达是明显上调的^[12-15],其发生往往先于甲基化模式异常,因而是肿瘤细胞的一个具有特征的早期分子改变。DNMTs 活性增加可以促进甲基化的胞嘧啶脱氨基,引起胞嘧啶转变为胸腺嘧啶的速率增加,促进 DNA 的点突变发生;并可促进肿瘤抑制基因发生高甲基化引起其表达沉寂,使之丧失抑制肿瘤的生物效应^[11]。胆管癌是危害人类健康的恶性肿瘤,目前还没有关于 DNMTs 在胆管癌组织中表达及与临床病理因素之间相关性的报道,本课题对此进行了研究。

在实验中,应用免疫组织化学方法检测了 24 例胆管癌组织和 20 例胆管炎组织中 DNMT1 蛋白的表达情况,并分析了其与胆管癌临床病理因素之间的关系。结果表明, DNMT1 蛋白在胆管癌组织中的阳性细胞表达率分别为 (37.57 ± 11.24)%, 明显高于其在胆管炎组织中的阳性细胞表达率。DNMT1 的高表达与肿瘤组织的分化程度有关,在

低分化肿瘤中表达最高,其次为中等分化肿瘤,最低为高分化肿瘤,但其高表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、有无淋巴结转移和临床分期无明显关系,说明 DNMT1 蛋白在胆管癌组织的表达是增高的,并且可能成为判断肿瘤恶性程度的指标之一。在本实验中,同时应用 RT-PCR 和 Western Blot 分别检测了 DNMT1 在人胆管癌细胞系 QBC₉₃₉ 中转录水平和蛋白水平的表达情况,结果发现这两个甲基化酶均在 QBC₉₃₉ 中表达。遗憾的是,仅做了一株胆管癌细胞,且没有正常胆管上皮细胞系作对照,结果只能说明 DNMT1 和 DNMT3b 在 QBC₉₃₉ 中是表达的,但相对正常胆管上皮细胞而言,其表达是增高还是降低尚未得知。为了探讨 DNMT1 和 DNMT3b 在 DNA 甲基化和胆管癌发生发展中的作用,尚需进一步研究。

4 参考文献

- [1] Au Yeung CL, Tsang WP, Tsang TY, et al. HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53[J]. *Oncol Rep*, 2010(6):1599 - 1604.
- [2] Yang B, House M G, Guo M, et al. Promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2005(3):412 - 420.
- [3] Chik F, Szyf M. Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors[J]. *Carcinogenesis*, 2011(2):224 - 232.
- [4] Zuo S, Luo J, Liu M, et al. Suppressing effects of down-regulating DNMT1 and DNMT3b expression on the growth of human cholangiocarcinoma cell line [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2008(3):276 - 280.
- [5] Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004(19 - 20): 2571 - 2587.
- [6] Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics [J]. *Science*, 2001(5532):1068 - 1070.
- [7] Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer [J]. *Nat Rev Genet*, 2002(6):415 - 428.
- [8] Song J, Rechkoblit O, Bestor TH, et al. Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation [J]. *Science*, 2011(6020): 1036 - 1040.
- [9] Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy [J]. *Nature*, 2004(6990): 457 - 463.
- [10] Ferguson LR, Tatham AL, Lin Z, et al. Epigenetic regulation of gene expression as an anticancer drug target [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011(2):199 - 212.
- [11] Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2005(4):631 - 647.
- [12] Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia [J]. *Blood*, 2001(5): 1172 - 1179.
- [13] Luszczek W, Cheriya V, Mekhail TM, et al. Combinations of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors induce DNA damage in small cell lung cancer cells: correlation of resistance with IFN-stimulated gene expression [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010(8): 2309 - 2321.
- [14] Robert MF, Morin S, Beaulieu N, et al. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells [J]. *Nat Genet*, 2003(1): 61 - 65.
- [15] Xiong Y, Dowdy SC, Xue A, et al. Opposite alterations of DNA methyltransferase gene expression in endometrioid and serous endometrial cancers [J]. *Gynecol Oncol*, 2005(3):601 - 609.

(2011 - 05 - 16 收稿, 2011 - 05 - 19 修回)