



DNA 甲基化抑制鼻咽癌细胞系 膜联蛋白 A1 基因表达 *

谭双香^{1, 2)} 胡瑞成^{1)**} 戴爱国¹⁾ 汤参娥²⁾ 易 红²⁾

程爱兰²⁾ 陈主初²⁾ 李建玲²⁾ 肖志强^{2)**}

(¹⁾湖南省老年医院 - 湖南省老年医学研究所, 长沙 410016; ²⁾中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008)

摘要 为了研究不同分化程度和转移潜能鼻咽癌(NPC)细胞系膜联蛋白 A1(ANXA1)mRNA 和蛋白质表达情况及其与基因甲基化的关系. 培养 NPC 细胞系 CNE1、CNE2、5-8F、6-10B 和永生化非癌性人鼻咽黏膜上皮细胞 NP69 细胞用于实验, 用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)方法检测 ANXA1 基因甲基化状态, 同时利用逆转录 - 聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 ANXA1 基因的 mRNA 表达水平. 然后用不同浓度的 5- 杂氮 -2'- 脱氧胞苷(5-aza-2dC)对 NPC 细胞进行去甲基化处理, MSP 和 RT-PCR 方法检测处理组和对照组细胞 ANXA1 基因甲基化状况和 mRNA 表达水平, 并用 Western-blotting 方法检测 ANXA1 基因蛋白质表达水平. 结果发现, NP69 细胞 ANXA1 基因无甲基化, 4 株 NPC 细胞系 ANXA1 基因都存在不同程度的甲基化, 甲基化程度与细胞的分化程度和转移潜能相关. NPC 细胞 ANXA1 基因 mRNA 表达水平降低, 低于 NP69 细胞, 其降低的程度与基因的甲基化程度相关. 5-aza-2dC 能够剂量依赖性地引起 ANXA1 基因去甲基化, 经去甲基化处理后, NPC 细胞系 ANXA1 基因的 mRNA 和蛋白质的表达水平相应提高. 研究证明, NPC 细胞系 ANXA1 基因的 mRNA 和蛋白质表达水平出现下调, 甲基化是导致表达下调的主要原因, 5-aza-2dC 去甲基化处理能够恢复 ANXA1 基因的表达水平.

关键词 鼻咽肿瘤, 甲基化, 表观遗传, 膜联蛋白 A1, 脱氧胞苷

学科分类号 Q5, R73, R76

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00170

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)高发于我国华南地区和东南亚地区, 具有显著性的种族分布特点和地域分布特点^[1]. 虽然历经大半个世纪的研究, NPC 的发病机制目前仍未完全阐明, 一般认为 NPC 发病与遗传因素、病毒感染和环境等因素有关. 近年, 越来越多的研究证实基因甲基化参与了 NPC 的发生发展过程, 目前报道的 NPC 甲基化相关基因近 30 个, 主要涉及细胞凋亡、细胞周期调控、细胞粘附、应激、DNA 错配修复等功能领域^[2].

ANXA1 基因位于人染色体 9q12-q21.2, 编码膜联蛋白 A1(Annexin A1). Annexin A1 又名巨皮质素、脂调素、肾皮质激素、脂皮质素 1 等, 最初因为研究糖皮质激素的抗炎作用机制而发现, 是一种功能广泛的钙、磷脂结合蛋白, 参与对细胞迁移、生长、分化、凋亡等过程的调节^[3]. ANXA1 基因在鳞状细胞癌中普遍出现表达降低或缺失^[4~8], 在大多数腺癌中表达降低^[9~12], 而且与肿瘤的分化程

度、进展、转移、预后相关, 是一种新的肿瘤抑制蛋白, 也是一种具有重要潜在价值的肿瘤生物学标志物^[4~6, 10, 11].

ANXA1 基因的表达调节机制尚有待于进一步深入研究, 其在肿瘤中 mRNA 和蛋白质表达水平同时出现降低^[4, 12, 13], 提示表达调节主要发生在基因水平或转录水平. 有研究发现 B 细胞淋巴瘤中 ANXA1 基因表达降低系基因甲基化所致^[14]. 免疫组织化学染色和蛋白质组学方法都证实鼻咽癌中 Annexin A1 表达降低 / 缺失^[15, 16], 其机制研究未见报道. 本研究以 4 株不同分化程度和转移潜能的

* 教育部跨世纪优秀人才培养计划基金(教育部科技函[2002]48), 湖南省科技重点科研项目(06SK2004)和芙蓉学者特聘教授科学研究基金(湘教通[2007]362 号)资助项目.

** 通讯联系人.

胡瑞成. Tel: 0731-4762677, E-mail: huruicheng@hotmail.com

肖志强. Tel: 0731-4327239, E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-03-23, 接受日期: 2009-05-11

NPC 细胞系为对象, 并用不同浓度的 5- 杂氮 -2'- 脱氧胞苷(5-aza-2dC)进行去甲基化处理, 检测 ANXA1 基因甲基化状态及其与表达水平的关系.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系. 鼻咽癌细胞系 CNE1(高分化)、CNE2(低分化)、5-8F(低分化, 成瘤, 转移)、6-10B(低分化, 成瘤, 不转移)和永生化非肿瘤人鼻咽上皮细胞株 NP69-SV40T(简称 NP69)由中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室保存.

1.1.2 试剂. 小牛血清和 RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司; 5-aza-2dC、重亚硫酸钠、氢醌、琼脂糖、焦碳酸二乙酯和鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自 Sigma 公司; DNA 抽提试剂盒(Genomic DNA purification kit)和 DNA 纯化试剂盒(DNA Clean-up System)购自 Promega 公司; keratinocyte-sfm 培养基和核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)抽提试剂盒 Trizol 购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒、DNA marker、Taq 酶购自 Takara 公司; 兔抗人 Annexin A1 单克隆抗体购自 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗购自 Santa cruz 公司; PVDF 膜购自 Millipore 公司; 增强化学发光试剂盒 ECL、蛋白质分子质量标准、丙烯酰胺、N'-N' 亚甲双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠、苯甲基磺酰氟化物、二硫苏糖醇、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷、考马斯亮蓝和蛋白质含量测定试剂盒均购自 Amershan Biosciences 公司.

1.1.3 引物. 利用 Primer3 v. 0.4.0 软件(<http://frodo.wi.mit.edu>)设计逆转录 - 聚合酶链式反应(reverse transcriptional polymerase chain reaction, RT-PCR)扩增引物. Annexin A1 mRNA RT-PCR 扩增正向和反向引物序列分别为 5' GCAAGAAGGTAGAGATAAAG 3' 和 5' ATCTCTCTTCAGTTCCTCTC 3', 扩增长度 523 bp, 对应基因库中 gi: 11878001 mRNA 序列 149~671 位核苷酸. β -actin mRNA RT-PCR 扩增正向和反向引物序列分别为 5' GATCATTGCTCCTCCTGAGC 3' 和 5' CACCTTCACCGTTCCAGTTT 3', 扩增长度 308 bp, 对应基因库中 gi: 5016088 mRNA 序列 1 057~1 364 位核苷酸. 使用 MethyPrimer 软件(<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>)设计甲基化特异性聚合酶链式反应(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)扩增引物. 特异性扩增甲基化 Annexin A1 的

正向和反向引物序列分别为 5' TGGGATTATAGGCGTGTATTATTAC 3' 和 5' AACACTTTAAAAA-ACCGAAACGAC 3', 扩增长度 134 bp, 对应基因库中 gi:11878001 DNA 序列 144 176~144 309 位核苷酸(相对于 ANXA1 转录起始位点-3 778~ -3 645 位核苷酸). 特异性扩增非甲基化 Annexin A1 的正向和反向引物序列分别为 5' GGGATTATAGGTGTGTATTATTATGT 3' 和 5' CAACACTTTAAAAA-ACCAAAACAAC 3', 扩增长度 134 bp 对应基因库中 gi:11878001 DNA 序列 144 177~144 310 位核苷酸(相对于 ANXA1 转录起始位点-3 777~ -3 644 位核苷酸). RT-PCR 及 MSP 引物委托 Takara 公司合成.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与药物处理. NPC 细胞 CNE1、CNE2、5-8F 和 6-10B 用含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养. 取生长旺盛的细胞经胰蛋白酶消化后接种于 100 ml 培养瓶(每瓶约 2×10⁶ 个细胞), 培养 6 h 待细胞充分贴壁后改用含不同浓度 5-aza-2dC (0 μ mol/L、0.1 μ mol/L、1 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L)的培养基培养 72 h(期间每 24 h 更换培养基), 再更换为不含 5-aza-2dC 的培养基培养 48 h, 收集细胞用于实验. NP69 细胞不进行药物处理, 用含 10%小牛血清的 keratinocyte-sfm 培养基培养至 80%左右融合时收集细胞用于实验.

1.2.2 甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)检测 ANXA1 基因甲基化. MSP 简要步骤如下: a. 参照 Genomic DNA Purification Kit 试剂盒说明提取基因组 DNA, 1.4%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性, -80℃保存备用. b. 重亚硫酸钠修饰 DNA. 2 μ g DNA 稀释于 50 μ l 水中, 加入 5.5 μ l 新鲜配制的 3 mol/L 氢氧化钠, 42℃变性 30 min, 再加入 520 μ l 新鲜配置的 3.6 mol/L, pH 5.0 的重亚硫酸钠和 10 mol/L 氢醌 30 μ l, 石蜡油覆盖避光 55℃水浴 16 h. c. DNA 纯化. 参照 DNA Clean-up System 试剂盒说明进行 DNA 纯化回收, 重悬于 50 μ l 水中, -80℃保存备用. d. PCR 扩增: 25 μ l 的 PCR 反应体系中依次加入双蒸水 17 μ l、10×缓冲液 2.5 μ l、dNTP 1.0 μ l, 上下游引物各 0.75 μ l, DNA 模板 1.5 μ l、MgCl₂ 1.5 μ l. PCR 反应条件如下: 95℃预变性 5 min 后加入 Taq 酶 1.5 U, 然后 95℃变性 30 s, 54℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 35 个循环, 最后 72℃延伸 6 min. e. 取 5.0 μ l PCR 产

物经 2.0% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 溴化乙锭)电泳,以 DL2000 marker 作为分子质量标准,紫外凝胶成像系统扫描采集图像分析结果。仅甲基化引物能扩增出目的条带表示 ANXA1 基因完全甲基化,仅非甲基化引物能扩增出目的条带表示 ANXA1 基因无甲基化,甲基化引物和非甲基化引物均能扩增出目的条带表示 ANXA1 基因不完全甲基化。利用图像分析系统(上海 Tanon Gis-2010)对扩增产物条带进行 A 值半定量,计算甲基化比例,甲基化比例=甲基化引物扩增条带 A 值/(甲基化引物扩增条带 A 值+非甲基化引物扩增条带的 A 值)×100%。实验重复 3 次。

1.2.3 RT-PCR 检测 Annexin A1 mRNA 表达

RT-PCR 简要步骤如下: a. Trizol 一步法抽提组织细胞总 RNA,溶解于经焦碳酸二乙酯处理的去离子水中, -80℃ 保存备用; b. 取 2.0 μg RNA 样品,参照 RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录和 PCR 扩增, Annexin A1 cDNA 扩增 35 个循环,扩增 β-actin cDNA 25 个循环作为内对照; c. 取 5 μl PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,以 DL2000 marker 作为分子质量标准,紫外凝胶成像系统扫描采集图像,利用图像分析系统对扩增产物条带进行 A 值半定量,以 Annexin A1 扩增条带与 β-actin 扩增条带 A 值比作为 Annexin A1 mRNA 表达的相对强度。实验重复 3 次。

1.2.4 Western-blotting 检测 Annexin A1 蛋白表达

细胞与改良 RIPA 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.5% 脱氧胆酸钠, 1 mmol/L EDTA, 1% NP-40, 0.1 mg/L PMSF, 2 mg/L 亮抑素)混合,冰浴裂解 30 min(期间使用超声破碎仪破碎 3 次,每次 5 s),裂解结束后 4℃ 12 000 r/min 离心 30 min,弃除沉淀,上清液即为组织总蛋白溶液。测定上清液蛋白质浓度,调整至相同浓度后样品分装贮存于 -80℃ 备用。细胞总蛋白经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 100 V 恒压电泳分离,按照凝胶面积以 0.65 mA/cm² 恒电流转移 1.5 h,将蛋白质自凝胶转印至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,加入 1:1 000 稀释的一抗 4℃ 孵育过夜,封闭液漂洗后加入 1:2 000 稀释的二抗,室温孵育 1 h,漂洗后增强化学发光法发光,胶片显影。实验中检测 β-actin 蛋白表达水平作为内对照,利用图像分析系统对胶片上的条带进行 A 值分析,以 Annexin A1 蛋白条带与 β-actin 蛋白条带 A 值的比值作为 Annexin A1 蛋白表达的相对强度。实验重复 3 次。

1.2.5 统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 *t* 检验;多样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 鼻咽癌细胞系 Annexin A1 基因甲基化伴 mRNA 表达降低

4 株鼻咽癌细胞未经药物处理前 Annexin A1 基因都处于不完全甲基化状态而 NP69 细胞 Annexin A1 基因无甲基化(图 1)。RT-PCR 结果显示,4 株鼻咽癌细胞株的 Annexin A1 mRNA 表达水平都低于 NP69 细胞(*P* < 0.05),高分化的 CNE1 细胞 Annexin A1 mRNA 表达水平高于其他 3 株 NPC 细胞(*P* < 0.05),5-8F 细胞低于 6-10B 细胞和 CNE2 细胞(*P* < 0.05)(图 1)。

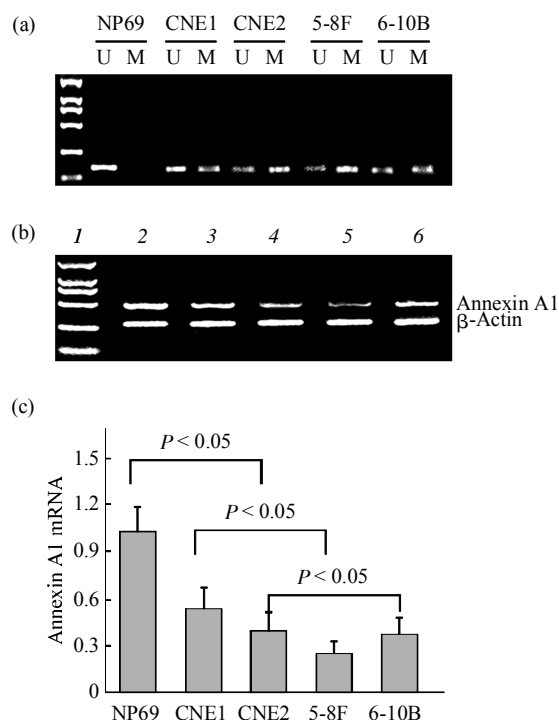


Fig. 1 ANXA1 gene methylation status and Annexin A1 mRNA expression in NPC cell lines and NP69 cells

(a) Electropherogram for MSP products. The left lane was loaded by DL2000 marker, the "U" labelled lanes were loaded by PCR products amplified by primer specific for unmethylated ANXA1 gene, and the "M" labelled lanes were loaded by PCR products amplified by primer specific for methylated ANXA1 gene. Electropherogram indicated that ANXA1 gene was partial-methylated in all of the four NPC cell lines whereas un-methylated in NP69 cells. (b) Electropherogram for Annexin A1 mRNA RT-PCR products. Lane 1~6 were loaded by DL2000 marker and products from NP69, CNE1, CNE2, 5-8F, 6-10B in order. The electropherogram show a decreased mRNA expression in all of the four NPC cell lines as compared with NP69. A statistic significant difference were tested as shown in chart (c).

2.2 5-aza-2dC 抑制 NPC 细胞 Annexin A1 甲基化并上调其 mRNA 表达

用不同浓度(0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$)的 5-aza-2dC 对 NPC 细胞系进行去甲基化处理, 以不加药物作为对照. 分别采用 MSP 和 RT-PCR 检测 5-aza-2dC 对 Annexin A1 基因甲基化

状态和 mRNA 表达水平的影响. MSP 结果显示, 5-aza-2dC 处理对 NPC 细胞系 Annexin A1 基因具有去甲基化作用, 作用效果具有浓度依赖性(图 2, 表 1). RT-PCR 结果显示, 随着启动子去甲基化, mRNA 表达水平逐渐升高(图 2, 表 2).

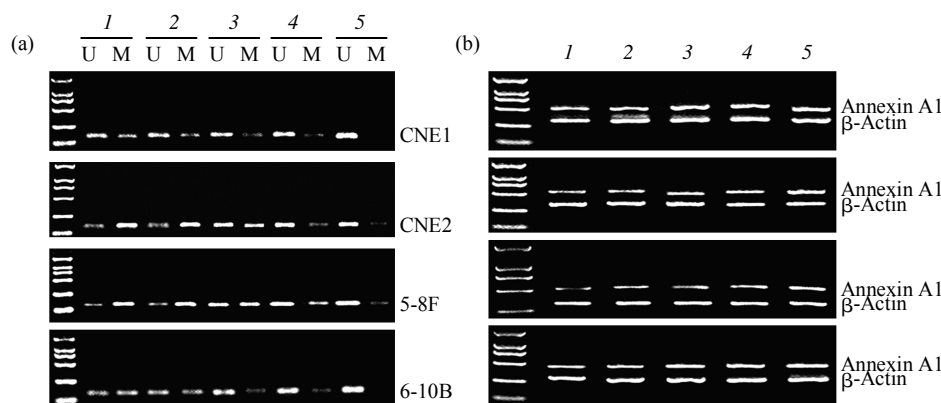


Fig. 2 The impact of 5-aza-2dC treatment to ANXA1 gene methylation status and mRNA expression in NPC cell lines

(a) Electropherograms for MSP products. (b) RT-PCR products. For all the electropherograms, the left lane was loaded by DL2000 marker, the "U" labelled lanes were loaded by PCR products amplified by primer specific for unmethylated ANXA1 gene, and the "M" labelled lanes were loaded by PCR products amplified by primer specific for methylated ANXA1 gene. 5-aza-2dC concentrations used for de-methylation treatment were given on the top of each column. Electropherogram indicated that 5-aza-2dC de-methylation treatment dose-dependently reverse ANXA1 methylation status and increased the mRNA expression levels in all of the four NPC cell lines. 1: 0 $\mu\text{mol/L}$; 2: 0.1 $\mu\text{mol/L}$; 3: 1 $\mu\text{mol/L}$; 4: 5 $\mu\text{mol/L}$; 5: 10 $\mu\text{mol/L}$.

Table 1 The impact of 5-aza-2'-dC to NPC cell lines ANXA1 methylation level

Cell line	n	c(5-Aza-2'-deoxycytidine)				
		0 $\mu\text{mol/L}$	0.1 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$
CNE1	3	38 $\pm$ 10	20 $\pm$ 5 ¹⁾	12 $\pm$ 3 ^{1,2)}	4 $\pm$ 2 ^{1,2,3)}	0 $\pm$ 0
CNE2	3	74 $\pm$ 12	56 $\pm$ 10 ¹⁾	37 $\pm$ 8 ^{1,2)}	13 $\pm$ 4 ^{1,2,3)}	4 $\pm$ 2 ^{1,2,3)}
5-8 F	3	84 $\pm$ 10	68 $\pm$ 9 ¹⁾	52 $\pm$ 7 ^{1,2)}	28 $\pm$ 6 ^{1,2,3)}	9 $\pm$ 3 ^{1,2,3,4)}
6-10B	3	62 $\pm$ 11	46 $\pm$ 9 ¹⁾	13 $\pm$ 3 ^{1,2)}	8 $\pm$ 3 ^{1,2,3)}	0 $\pm$ 0

¹⁾ Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-2dC group, $P < 0.05$; ²⁾ compared with 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-2dC group, $P < 0.05$; ³⁾ compared with 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-2dC group, $P < 0.05$; ⁴⁾ compared with 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-2dC group, $P < 0.05$.

Table 2 The impact of 5-aza-2'-dC to NPC cell lines Annexin A1 mRNA expression

Cell line	n	c(5-Aza-2'-deoxycytidine)				
		0 $\mu\text{mol/L}$	0.1 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$
CNE1	3	0.56 $\pm$ 0.13	0.64 $\pm$ 0.12	0.76 $\pm$ 0.15 ¹⁾	0.82 $\pm$ 0.16 ^{1,2)}	0.95 $\pm$ 0.08 ^{1,2,3)}
CNE2	3	0.40 $\pm$ 0.12	0.52 $\pm$ 0.16	0.67 $\pm$ 0.17 ¹⁾	0.78 $\pm$ 0.17 ^{1,2)}	0.93 $\pm$ 0.14 ^{1,2,3)}
5-8 F	3	0.25 $\pm$ 0.08	0.32 $\pm$ 0.10	0.41 $\pm$ 0.12 ¹⁾	0.72 $\pm$ 0.14 ^{1,2,3)}	0.86 $\pm$ 0.16 ^{1,2,3)}
6-10B	3	0.38 $\pm$ 0.10	0.42 $\pm$ 0.11	0.74 $\pm$ 0.13 ^{1,2)}	0.83 $\pm$ 0.11 ^{1,2)}	0.92 $\pm$ 0.09 ^{1,2,3)}

¹⁾ Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-2dC group, $P < 0.05$; ²⁾ compared with 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-2dC group, $P < 0.05$; ³⁾ compared with 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-2dC group, $P < 0.05$.

2.3 5-aza-2dC 去甲基化处理上调 NPC 细胞系 Annexin A1 蛋白表达

为检验 5-aza-2dC 抑制 NPC 细胞系 Annexin A1 启动子甲基化、上调 mRNA 表达的同时是否伴随 Annexin A1 蛋白表达变化, 采用 Western-blotting 方法检测 4 株 NPC 细胞 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-2dC 处理组和对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-2dC)的 Annexin A1 蛋白表达情况. 结果显示, 5-aza-2dC 处理后, 4 株 NPC 细胞系 Annexin A1 蛋白表达水平平均高于对照组, 统计分析表明差异具有显著性(图 3).

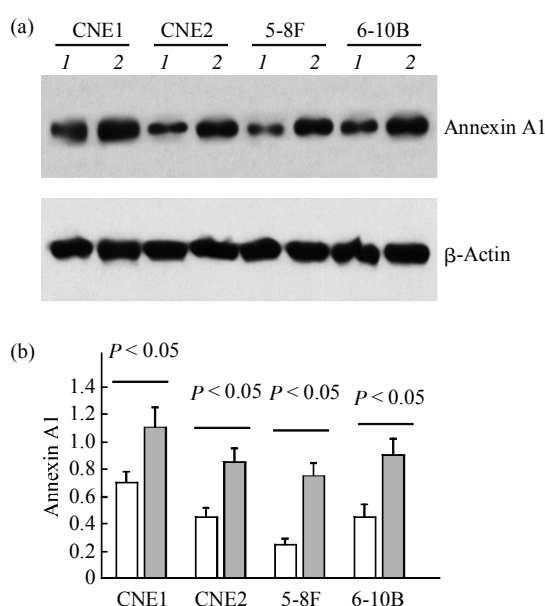


Fig. 3 The influence of 5-aza-2dC treatment on Annexin A1 protein expression in NPC cell lines

The result of Western-blotting discovered that 5 $\mu\text{mol/L}$ concentration 5-aza-2dC treatment increase Annexin A1 protein expression in all of the four cell lines (a), and a statistic significant difference were tested as shown in chart (b). (a) 1: 0 $\mu\text{mol/L}$; 2: 5 $\mu\text{mol/L}$. (b) $\square$: 0 $\mu\text{mol/L}$; $\blacksquare$: 5 $\mu\text{mol/L}$.

3 讨 论

Annexins 超家族是一个具有共同特征性空间结构的蛋白质家族, 目前发现的 Annexins 家族成员已经超过 1 000 个, 广泛分布于大多数真核细胞生物, 其功能相当复杂. 根据在生物界的分布将 Annexins 分为 5 组, 脊椎动物为 A 组, 无脊椎动物为 B 组, 真菌和单细胞生物为 C 组, 植物为 D 组, 原生生物为 E 组^[17]. A 组 Annexin 包含 13 个成员, 依次命名为 Annexin A1 ~ Annexin A13, Annexin A1 是 Annexin 超家族中第一个被克隆的

成员, 因此又称 Annexin I^[17]. Annexin A1 参与多种细胞功能和多条信号通路的调节, 其功能主要包括以下几个方面: a. 抗炎、退热、抗痛觉过敏, b. 抑制细胞粘附和迁移, c. 调节细胞增殖, d. 诱导细胞凋亡, e. 介导吞噬凋亡细胞, f. 调节先天免疫和后天获得性免疫, g. 调节神经内分泌^[13, 18, 19].

Annexin A1 是一种新的肿瘤抑制蛋白, 在多种肿瘤中表达降低, 而且与肿瘤的分化程度和分级、分期相关. Annexin A1 的抗肿瘤机制主要与调节细胞增殖、抑制细胞分化和诱导细胞凋亡有关. 研究显示, Annexin A1 能够通过内源性细胞凋亡途径促进肿瘤细胞凋亡^[20]. Annexin A1 抑制肺癌 A549 细胞的增殖和分化早有报道, 近来的研究发现, Annexin A1 抑制肿瘤细胞增殖至少涉及两个方面机制, 一方面, 激活细胞外信号激酶, 通过破坏肌动蛋白细胞骨架和阻断细胞周期蛋白 D1 表达从而抑制细胞增殖^[21], 另一方面, 通过抑制细胞质磷脂酶 A2 的活性和花生四烯酸级联反应从而抑制细胞增殖^[22, 23].

ANXA1 基因在鳞状细胞癌中普遍出现表达降低或缺失, 在大多数腺癌中表达降低, 提示 ANXA1 基因失表达可能是一种重要的肿瘤发病机制^[4~12]. 肿瘤中 ANXA1 基因失表达的机制目前尚缺乏深入研究. 研究证实等位基因丢失是引起食道鳞癌 ANXA1 基因表达下调的常见原因^[24]; Vishwanatha 等^[14]用 5-aza-2dC 对 B 细胞淋巴瘤细胞系进行去甲基化处理, 处理后 Annexin A1 表达上调, 间接说明基因甲基化导致 B 细胞淋巴瘤 Annexin A1 表达下调. 对结肠癌细胞系的 ANXA1 基因表达机制研究发现, 其基础表达受 P53 驱动^[25], 间接提示 P53 突变功能缺失可能是引起肿瘤 Annexin A1 表达降低的原因之一. 内源性微小 RNA(细胞内源性的负调节基因表达的非编码小分子 RNA)介导食道癌、乳腺癌、子宫内膜癌等多种肿瘤来源细胞系的 mRNA 降解^[12], 提示内源性微小 RNA 介导的 mRNA 降解加速可能是肿瘤 Annexin A1 表达降低的普遍机制.

关于 Annexin A1 与 NPC 的相关研究目前仅见两篇. Rodrigo 等^[16]通过对 20 例 NPC 组织和 4 例非癌性鼻咽黏膜进行 Annexin A1 免疫组织化学染色检测, 结果发现, 正常鼻咽上皮 Annexin A1 染色呈强阳性, NPC 中分化好的区域染色呈阳性而未分化区域呈阴性染色, 说明 NPC 中 Annexin A1 表达降低而且与肿瘤的分化程度相关. 中南大学湘

雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室程爱兰等采用激光捕获显微切割比较蛋白质组学方法对NPC组织和非癌性鼻咽黏膜上皮进行蛋白质表达差异分析,发现 Annexin A1 在NPC中表达下调^[15]。据知,NPC中 Annexin A1 表达降低的机制研究目前尚未见报道,由于多个基因甲基化参与了NPC的发生发展过程,而基因甲基化是引起肿瘤中 Annexin A1 表达降低的机制之一^[14],因此,推测NPC中 Annexin A1 表达降低可能与基因甲基化有关。

本研究选择4个具有不同分化程度和转移潜能的NPC细胞系作为研究对象,并以永生非肿瘤人鼻咽黏膜上皮细胞NP69作为对照,通过MSP检测发现,NP69细胞ANXA1基因无甲基化,4个NPC细胞系ANXA1基因都存在不同程度的甲基化,其中高分化的CNE1细胞甲基化程度最低,而恶性程度最高的5-8F细胞(低分化、成瘤、转移)甲基化程度也最高。RT-PCR结果发现,相对于NP69细胞,NPC细胞Annexin A1 mRNA表达水平出现不同程度的降低,其中以5-8F细胞降低的幅度最大,而CNE1细胞降低的程度最小。4个NPC细胞系Annexin A1 mRNA降低程度的排列顺序与ANXA1基因甲基化程度排列顺序完全一致,提示基因甲基化可能是引起Annexin A1 mRNA表达下调的决定性因素。实验结果提示,ANXA1基因表达水平与NPC细胞的分化程度和转移潜能相关,分化程度越低表达水平越低,转移潜能越强表达水平越低。

本研究用不同浓度的去甲基化药物5-aza-2dC对4个NPC细胞系进行了去甲基化处理,实验结果表明,5-aza-2dC能够浓度依赖性地引起NPC细胞ANXA1基因去甲基化,相应地,5-aza-2dC能够浓度依赖性引起NPC细胞Annexin A1 mRNA表达上调,实验结果进一步证实基因甲基化是引起Annexin A1 mRNA表达下调的主要原因。本研究通过Western-blotting检测发现,去甲基化处理能够上调Annexin A1蛋白表达水平,说明基因甲基化在引起Annexin A1 mRNA表达下调的同时导致Annexin A1蛋白表达水平降低。

本研究结果提示,ANXA1基因甲基化引起表达降低可能参与了NPC的发生和发展,也提示去甲基化处理可能成为治疗NPC的有效策略。本研究为体外研究,不能完全代表临床病例研究,也不能排除其他机制,如等位基因丢失、内源性微小

RNA介导mRNA降解加速、P53功能障碍等,参与NPC细胞系ANXA1基因表达调节的可能性。进一步研究NPC组织ANXA1基因甲基化状态及其对表达水平的影响,以及深入研究NPC组织ANXA1基因表达调节机制,将有助于进一步阐明NPC的发生发展机制。

总之,本研究结果说明,NPC细胞Annexin A1 mRNA和蛋白质表达下调,ANXA1基因甲基化是引起Annexin A1 mRNA表达下调的主要原因,并进一步导致Annexin A1蛋白表达下调,去甲基化处理能够恢复ANXA1基因的表达水平。本研究为进一步阐明NPC的发病机制和探索新的治疗策略提供了理论依据。

参 考 文 献

- 1 Wei W I, Sham J S. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet*, 2005, **365** (9476): 2041~2054
- 2 谭双香,肖志强. DNA甲基化与鼻咽癌. *国际肿瘤学杂志*, 2007, **34**(12): 904~907
- 3 Tan S X, Xiao Z Q. *J Int Oncol(China)*, 2007, **34**(12): 904~907
- 4 Lim L H, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J*, 2007, **21**(4): 968~975
- 5 Zhang L, Yang X, Zhong L P, *et al.* Decreased expression of Annexin A1 correlates with pathologic differentiation grade in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 2009, **38**(4): 362~370
- 6 Wang L D, Yang Y H, Liu Y, *et al.* Decreased expression of annexin A1 during the progression of cervical neoplasia. *J Int Med Res*, 2008, **36**(4): 665~672
- 7 Garcia Pedrero J M, Fernandez M P, Morgan R O, *et al.* Annexin A1 down-regulation in head and neck cancer is associated with epithelial differentiation status. *Am J Pathol*, 2004, **164**(1): 73~79
- 7 薛丽燕,腾梁红,邹霜梅,等. 膜联蛋白I在多种癌组织中的表达. *中华肿瘤杂志*, 2007, **29**(6): 444~448
- 8 Xue L Y, Teng L H, Zou S M, *et al.* *Chin J Oncol*, 2007, **29**(6): 444~448
- 8 Silistino-Souza R, Rodrigues-Lisoni F C, Cury P M, *et al.* Annexin 1: differential expression in tumor and mast cells in human larynx cancer. *Int J Cancer*, 2007, **120**(12): 2582~2589
- 9 Shen D, Nooraie F, Elshimali Y, *et al.* Decreased expression of annexin A1 is correlated with breast cancer development and progression as determined by a tissue microarray analysis. *Hum Pathol*, 2006, **37**(12): 1583~1591
- 10 Patton K T, Chen H M, Joseph L, *et al.* Decreased annexin I expression in prostatic adenocarcinoma and in high- grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Histopathology*, 2005, **47**(6): 597~601
- 11 Yu G, Wang J, Chen Y, *et al.* Tissue microarray analysis reveals strong clinical evidence for a close association between loss of annexin A1 expression and nodal metastasis in gastric cancer. *Clin Exp Metastasis*, 2008, **25**(7): 695~702

- 12 Luthra R, Singh R R, Luthra M G, *et al.* MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene*, 2008, **27**(52): 6667~6678
- 13 Shen D J, Chang Helena R, Chen Z G, *et al.* Loss of annexin A1 expression in human breast cancer detected by multiple high-throughput analyses. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **326**(1): 218~227
- 14 Vishwanatha J K, Salazar E, Gopalakrishnan V K. Absence of annexin I expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas and cell lines. *BMC Cancer*, 2004, **4**: 8
- 15 Cheng A L, Huang W G, Chen Z C, *et al.* Identification of novel nasopharyngeal carcinoma biomarkers by laser capture microdissection and proteomic analysis. *Clin Cancer Res*, 2008, **14** (2): 435~445
- 16 Rodrigo J P, Garcia-Pedrero J M, Fernandez M P, *et al.* Annexin A1 expression in nasopharyngeal carcinoma correlates with squamous differentiation. *Am J Rhinol*, 2005, **19**(5): 483~487
- 17 Moss S E, Morgan R O. The annexins. *Genome Biol*, 2004, **5**(4): 219
- 18 D'Acquisto F, Perretti M, Flower R J. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br J Pharmacol*, 2008, **155**(2): 152~169
- 19 Buckingham J C, John C D, Solito E, *et al.* Annexin 1, Glucocorticoids, and the Neuroendocrine-Immune Interface. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, **1088**: 396~409
- 20 Debret R, ElBtaouri H, Duca L, *et al.* Annexin A1 processing is associated with caspase-dependent apoptosis in BZR cells. *FEBS Lett*, 2003, **546**(2~3): 195~202
- 21 Alldridge L C, Bryant C E. Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the ERK1/2 MAPK signal. *Exp Cell Res*, 2003, **290** (1): 93~107
- 22 Sakaguchi M, Murata H, Sonegawa H, *et al.* Truncation of annexin A1 is a regulatory lever for linking epidermal growth factor signaling with cytosolic phospholipase A2 in normal and malignant squamous epithelial cells. *J Biol Chem*, 2007, **282**(49): 35679~35686
- 23 Nakanishi M, Rosenberg D W. Roles of cPLA2 alpha and arachidonic acid in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1761**(11): 1335~1343
- 24 Xia S H, Hu L P, Hu H, *et al.* Three isoforms of annexin I are preferentially expressed in normal esophageal epithelia but down-regulated in esophageal squamous cell carcinomas. *Oncogene*, 2002, **21**(43): 6641~6648
- 25 Lecona E, Barrasa J I, Olmo N, *et al.* Upregulation of annexin A1 expression by butyrate in human colon adenocarcinoma cells: role of p53, NF-Y, and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*, 2008, **28**(15): 4665~4674

DNA Methylation Inhibites ANXA1 Gene Expression in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Lines*

TAN Shuang-Xiang^{1,2)}, HU Rui-Cheng^{1)**}, DAI Ai-Guo¹⁾, TANG Cen-E²⁾, YI Hong²⁾,
CHENG Ai-Lan²⁾, CHEN Zhu-Chu²⁾, LI Jian-Ling²⁾, XIAO Zhi-Qiang^{2)**}

¹⁾ Hunan Institute of Gerontology, Hunan Province Geriatric Hospital, Changsha 410016, China;

²⁾ Key Laboratory of Cancer Proteomics of Chinese Ministry of Health, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract In order to investigate the messenger ribonucleic acid(mRNA) and protein expression status of ANXA1 gene in nasopharyngeal carcinoma cell lines, so as to explore the correlation between ANXA1 methylation status and gene expression, four nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell lines, including CNE1, CNE2, 5-8F, 6-10B, and immortalized non-neoplastic human nasopharyngeal epithelial cell line NP69 were cultured *in vitro* for research. Methylation status of ANXA1 gene was detected by methylation specific polymerase chain reaction (MSP), while mRNA expression level were also evaluated by reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR). Subsequently, different end concentration (0 $\mu\text{mol/L}$ as control, 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$) of 5-aza-2'-deoxycytidine(5-aza-2dC) were added into culture medium of NPC cell lines for 72 hours' de-methylation treatment, then methylation status of ANXA1 gene were detected by MSP and mRNA expression were evaluated by RT-PCR. In addition, ANXA1 protein expression was detected by Western-blotting. Without de-methylation treatment, ANXA1 gene was methylated in all the four NPC cell lines but NP69, and the methylation extent is correlated with differentiation state and metastasis potential of the cells. mRNA expression was lower in all of the four NPC cell lines without de-methylation treatment compared with NP69, and the expression level was correlated with gene methylation level. 5-aza-2dC de-methylation treatment reversed ANXA1 methylation status, and increased the expression levels of mRNA and protein in all the four NPC cell lines. In summary, the current research verified down-regulated ANXA1 gene expression in NPC cell lines from both mRNA and protein level, the expression down-regulation was mainly caused by gene methylation, and 5-aza-2dC de-methylation treatment restored the down-regulated expression of ANXA1 in NPC cell lines to the level in the non-neoplastic cell line NP69.

Key words nasopharyngeal neoplasms, methylation, epigenetic, ANXA1, deoxycytidine

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00170

*This work was supported by grants from Trans-century Excellent Talent Foster Program Foundation of Chinese Ministry of Education (Science and Technology Letter of Chinese Ministry of Education [2002]48), Key Science and Technology Research Program of Hunan Province (06SK2004) and Furong Scholar(Invited Professor) Research Foundation (Bulletin of Education Department of Hunan Province [2007]362).

**Corresponding author.

HU Rui-Cheng. Tel: 86-731-4762677, E-mail: huruicheng@hotmail.com

XIAO Zhi-Qiang. Tel: 86-731-4327239, E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

Received: March 23, 2009 Accepted: May 11, 2009