

采用蛋白质组学技术筛选鼻咽癌细胞的甲基化沉默基因*

张文静** 易斌** 易红 张鹏飞 李茂玉 李萃
阮林 陈主初 李建玲*** 肖志强***

(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 为筛选鼻咽癌的甲基化沉默基因, 采用二维凝胶电泳(2-DE)技术分离甲基转移酶抑制剂 5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-aza-2-dC)处理与未处理鼻咽癌细胞 5-8F 的蛋白质, PDquest 图像分析软件识别差异蛋白质点, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定差异蛋白质。然后采用 Western blotting 和 RT-PCR 检测差异蛋白质 nm23-H1 在药物处理与未处理 5-8F 细胞中的表达水平, 采用甲基化特异性 PCR(MS-PCR)检测 nm23-H1 基因在药物处理与未处理 5-8F 细胞中的甲基化水平。建立了 5-aza-2-dC 处理与未处理 5-8F 细胞蛋白质的 2-DE 图谱, 识别了 49 个差异表达的蛋白质点, 鉴定了 33 个差异表达的蛋白质, 其中包括 nm23-H1 在内的 15 个蛋白质在 5-aza-2-dC 处理后的 5-8F 细胞中表达上调, 而 18 个蛋白质表达下调。Western blotting 和 RT-PCR 结果显示, nm23-H1 在 5-aza-2-dC 处理 5-8F 细胞后表达上调, MS-PCR 结果显示, 在 5-aza-2-dC 处理 5-8F 细胞后 nm23-H1 基因甲基化水平下降, 结果证实, nm23-H1 基因是 5-8F 细胞中的甲基化沉默基因。15 个 5-aza-2-dC 处理后表达上调的基因可能是 5-8F 细胞中的甲基化沉默基因, 为筛选鼻咽癌甲基化失活基因提供了科学依据。

关键词 鼻咽癌, 甲基化沉默基因, 蛋白质组学, 甲基化特异 PCR, nm23-H1

学科分类号 R318.0

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方地区常见的一种恶性肿瘤, 发病率和死亡率均居世界首位, 但鼻咽癌的发病机制还不清楚。大量的研究表明, 肿瘤的发生发展是多基因参与、多阶段的病理过程, 其中癌基因的激活和抑癌基因的失活是肿瘤发生与发展的重要原因, 而启动子区 DNA 甲基化又是抑癌基因失活的重要机制之一, 它在多阶段癌变过程中发挥重要的作用^[1-3]。因此, 筛选鼻咽癌的甲基化失活基因不仅有助于揭示其发病机制, 而且能为鼻咽癌的防治提供科学依据。

DNA 甲基化(DNA methylation)修饰是基因表达调控的重要表观遗传学机制之一, 它通过多种机制如延迟 DNA 复制、抑制转录起始、改变染色质的物理或化学结构使基因转录沉默(silencing), 导致基因功能失活^[4]。DNA 甲基化在功能上与 DNA 突变一样可导致基因功能失活, 但它又与 DNA 突变不同, 即 DNA 甲基化是可逆的, 应用甲基转移酶抑制剂如 5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-2-dC)可逆转 DNA 甲基化,

使甲基化沉默的基因重新表达^[5]。

异常 DNA 甲基化与肿瘤的发生发展密切相关, 已成为近年肿瘤研究的热点领域之一。启动子区 CpG 岛高甲基化(hypermethylation)是抑癌基因、DNA 修复基因、促凋亡基因失活的主要方式之一。在许多人类肿瘤中, p16、RB、p53、p27、VHL 和 APC 等抑癌基因, hMLH1、hMSH2 和 MGMT 等 DNA 修复基因, DAPK 等促凋亡基因, 以及 E-cadherin 等转移抑制基因均可出现与转录沉默相关的启动子区 CpG 岛高甲基化^[6-8]。

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2001CB5120), 芙蓉学者特聘教授科研奖励基金(湘教通[2007]362号), 教育部跨世纪优秀人才培养计划基金(教计函[2002]48), 湖南省科技厅重大科技专项(06SK2004)资助项目。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

李建玲.Tel: 0731-4327334, Fax: 0731-4327332, E-mail: jianlingli2001@yahoo.com
肖志强.Tel: 0731-4327239, Fax: 0731-4327321, E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-07-22, 接受日期: 2007-10-30

筛选肿瘤甲基化失活基因的方法通常采用候选基因法,即以肿瘤组织(细胞)与匹配的正常组织(细胞)为样本,采用 MS-PCR、亚硫酸氢钠修饰后 DNA 测序等 DNA 甲基化检测方法分析某个或某些候选基因启动子区 CpG 岛的甲基化情况,通过比较两种样本中候选基因启动子甲基化的差异,识别肿瘤相关的甲基化失活基因。候选基因法通量低,一般只分析某个或某些基因的甲基化情况,不仅无法从全基因组范围筛选肿瘤相关的甲基化失活基因,而且难以发现新的肿瘤相关的甲基化失活基因^[9]。因此,若能从蛋白质表达谱的变化入手筛选肿瘤的甲基化失活基因,不仅能实现高通量,从全基因组范围筛选肿瘤相关的甲基化失活基因,而且对分析的基因不进行选择,可发现新的肿瘤相关的甲基化失活基因。

在鼻咽癌的表现遗传学研究领域,已有的研究发现, p15、p16、RASSF1A 等基因在鼻咽癌中存在甲基化失活^[10-12]。但这些研究均是采用候选基因法筛选鼻咽癌的甲基化失活基因,所分析的基因数量有限,鼻咽癌的甲基化失活基因有待进一步发现。为此,本研究以 NPC 细胞系 5-8F 为样本,用甲基转移酶抑制剂 5-aza-2-dC 处理 5-8F 细胞,使它的甲基化沉默基因重新表达。再采用蛋白质组学技术比较 5-aza-2-dC 处理与未处理 5-8F 细胞蛋白质表达谱的差异,识别、鉴定 5-aza-2-dC 处理 5-8F 后表达上调的蛋白质。然后采用 MS-PCR 检测表达上调蛋白质的编码基因是否在 5-aza-2-dC 处理后发生了启动子区 CpG 岛去甲基化,筛选鼻咽癌甲基化失活基因,为揭示鼻咽癌发病的表现遗传学机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系. 鼻咽癌细胞系 5-8F 由中山大学肿瘤研究所建株^[13],本室保存。用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基,于 5% CO₂、37℃ 恒温细胞培养箱中培养。

1.1.2 引物. a. nm23-H1 PCR 引物序列来源于文献[14]。上游引物, 5' GACCGTCCATTCTTTGC 3', 下游引物, 5' CTGCCCTCCTGTCATTC 3'。GAPDH: 上游引物, 5' GTCAGTGGTGGACCTGACCT 3', 下游引物, 5' TGAGGAGGGGAGATTCAGTG 3'。 b. nm23-H1 MS-PCR 引物序列。基于 nm23-H1 基因启动子序列(GenBank 登录号:

L34822), 用在线软件 (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) 预测 CpG 岛和设计甲基化和非甲基化引物。非甲基化引物(U 引物): 上游引物, 5' ATTGTTTATTTTTAAGAGGAAGTGT 3', 下游引物, 5' AATTTAACTACAACCTACAACCACC 3'。甲基化引物(M 引物): 上游引物, 5' ATTGTTTATTTTTAAGAGGAAGCGT 3', 下游引物, 5' AATTTAACTACGACTACAACCGC 3'。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.1.3 试剂. 小牛血清、RPMI1640 培养基为 Gibco BRL 公司产品。2D Quant Kit 蛋白定量试剂盒、丙烯酰胺、甲叉-双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、尿素、CHAPS、硫脲、过硫酸铵、IPG 缓冲液 pH 3~10、24 cm 固相化 pH 梯度干胶条、辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG、ECL 发光剂购自 Amersham Pharmacia 公司。二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、TPCK 处理的胰蛋白酶、铁氰化钾、三氟乙酸(TFA)、碳酸氢铵、硫代硫酸钠、乙腈、基质 α - 氰基 -4- 羟基肉桂酸 (CCA)、5-aza-2'-deoxycytidine、四氮唑蓝、DEPC(焦炭酸二乙酯)、氢醌、NaHSO₃、鼠抗人 β -actin 抗体购自 Sigma 公司; 逆转录试剂盒、DNA 抽提试剂盒(Genomic DNA purification kit)、DNA 纯化试剂盒 (DNA clean-up system kit) 购自 Promega 公司。兔抗人 nm23-H1 抗体购自 Abcam 公司。PVDF 膜购自 Millipore 公司。Taq DNA 聚合酶、DNA marker 购自 Takara 公司。磷酸、甘油、乙醇、EDTA 二钠、NaOH、乙酸铵为国产分析纯。

1.1.4 仪器. IPGphor 等电聚焦仪、Ettan DALT II 垂直电泳槽、ImagingScanner 扫描仪、LabScan 扫描软件均为 Amersham Biosciences 公司产品。Voyager-DE STR 4307 MALDI-TOF-MS 质谱仪为 Applied Biosystem 公司产品。PDQuest 7.0 凝胶图像分析软件为 Bio-Rad 公司产品。Mascot 肽质量指纹图数据库查询软件为 Matrixscience 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 5-aza-2-dC 处理鼻咽癌细胞. 实验组 5-8F 细胞以 30%~40% 的密度接种到 100 ml 培养瓶中,细胞贴壁后换含 5-aza-2-dC (5 μ mol/L) 新鲜培养液,每 24 h 更换含有 5-aza-2-dC 的培养液,培养 72 h 后收集细胞备用。对照组 5-8F 细胞用不含 5-aza-2-dC 的培养液同时培养。

1.2.2 细胞总蛋白质的提取. 收集实验组和对照组

5-8F 细胞, 加入细胞裂解液(8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 65 mmol/L DTT)室温裂解 2 h, 12 000 r/min、4℃离心 45 min, 取上清即为细胞总蛋白质. 蛋白质定量试剂盒 2D Quantification kit (Amersham Biosciences 公司)测定蛋白质浓度, 用于 2-DE 分析.

1.2.3 细胞总蛋白的 2-DE 分离. 操作步骤主要按照 IPGphor 等电聚焦系统使用指南进行. 0.6 mg 细胞总蛋白与水化液(8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol/L Tris, 18 mmol/L DTT, 0.5% IPG pH 3~10 缓冲液, 痕量溴酚蓝)混合至总体积为 450 μ l. 蛋白质样本于 IPGphor 等电聚焦仪上按如下条件: 30 V 水化 14 h 后经 500 V 1 h、1 000 V 1 h、8 000 V 10 h 进行等电聚焦. 等电聚焦结束后, 分别于 10 ml 平衡 A 液(50 mmol/L Tris-HCl、pH 8.8, 6 mmol/L 尿素, 30%甘油, 0.2% DTT, 痕量溴酚蓝)和 10 ml 平衡 B 液(50 mmol/L Tris-HCl、pH 8.8, 6 mmol/L 尿素, 30%甘油, 3%碘乙酰胺, 痕量溴酚蓝)各平衡 15 min. 平衡后的 IPG 胶条转移至 12% SDS-PAGE 胶上端, 在 Ettan DALT II 垂直电泳槽上进行第二向垂直电泳. 电泳结束后, 对 2-D 胶进行考马斯亮蓝染色. 实验重复三次.

1.2.4 图像分析. 应用 Imagescanner 扫描仪以及 LabScan 扫描软件扫描考染胶获取图像, PDQuest 2-DE 软件比较分析实验组与对照组 5-8F 细胞蛋白质二维电泳图谱的差异, 选取表达水平相差两倍以上蛋白质点进行质谱分析.

1.2.5 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析. 从胶中切取差异蛋白质点于 1.5 ml EP 管中, 50%乙腈和 50 mmol/L 碳酸氢铵脱色 30 min, 乙腈脱水冷冻抽干. 加入 10 μ l TPCK 处理的胰蛋白酶(0.1 mg/L)冰上吸胀 40 min, 37℃酶解 12 h, 30 μ l 萃取液[100%乙腈:5%三氟乙酸(1:1)]萃取 60 min, 重复萃取 1 次. 将萃取液收集于 0.5 ml EP 管、冷冻浓缩至 10 μ l, 取 0.5 μ l 样品与 1 μ l CCA 基质液混合, 点样于不锈钢板, 在 MALDI-TOF-MS 质谱仪上进行分析. MALDI-TOF-MS 分析采用反射模式, 正离子谱测定, 离子源加速电压 20 000 V, 反射电压比 1.12, N₂ 激光波长 337 nm, 脉冲宽度 3 ns, 离子延迟提取 100 ns, 真空度 4×10^{-7} Torr, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 使用胰蛋白酶自降解峰 m/z 842.50 和 m/z 2 211.10 作为内校正, 获得肽质量指纹图谱(PMF). Mascot 软件检索 SwissProt 数据库鉴定蛋白质.

1.2.6 RT-PCR. a. 逆转录反应. 按照 Trizol 试剂盒说明抽提对照组和实验组 5-8F 细胞的总 RNA. 取 2 μ g RNA 样品, 加无 RNase 水至 4 μ l, 加入 50 μ mol/L Oligo(dT)1 μ l, 70℃加热 2 min, 室温放置 5 min 后, 依次加入 RNase 抑制剂 1 μ l, 5 \times RT 缓冲液 4 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ l, 0.1 mmol/L DTT 2 μ l, MMV reverse transcriptionase 1 μ l, 无 RNase 水补足 20 μ l, 42℃反应 1 h, 70℃加热 10 min 中止反应, cDNA 模板-20℃保存备用. b. PCR 扩增. 在 25 μ l 反应体系中加入 2.5 μ l 10 \times 反应缓冲液, 0.5 μ l 1 mmol/L dNTP, cDNA 模板 1.0 μ l, nm23-H1 或 GAPDH 上游和下游引物各 0.5 μ l, Taq 酶 0.2 μ l, 加双蒸水至 25 μ l. PCR 扩增条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃ 45 s, 53.4℃ 40 s, 72℃ 1 min, 循环 30 次; 72℃延伸 10 min. 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物.

1.2.7 MS-PCR. 按 Genomic DNA purification kit 的说明抽提进行对照组和实验组 5-8F 细胞的 DNA. 30 μ l DNA(含 2 μ g DNA)中加入 3.3 μ l 3 mol/L NaOH, 37℃温浴 15 min 进行 DNA 变性. 将 33.3 μ l 变性 DNA 溶液与 333 μ l 碘化溶液(1.82 g NaHSO₃ 溶解于 2.8 ml H₂O 中, 加入 430 μ l 3 mol/L NaOH 和 210 μ l 0.05 g/ml 的对苯二酚)混匀, 加入 3 滴石蜡油覆盖, 于黑暗中 55℃水浴 4 h 进行碘化反应. 按 DNA clean-up system kit 说明纯化 DNA. 纯化后的 DNA 进行 PCR 反应, 在 50 μ l 反应体系中加入 5 μ l 10 \times 反应缓冲液, 1 μ l 1 mmol/L dNTP, DNA 模板 2.0 μ l, nm23-H1 甲基化(M)或非甲基化(U)上游和下游引物(10 μ mmol/L)各 0.5 μ l, Taq 酶 0.25 μ l, 加双蒸水至 50 μ l. PCR 扩增条件为: 94℃预变性 2 min; 94℃ 45 s, 52.4℃/50.7℃ 40 s, 72℃ 1 min, 循环 40 次; 72℃延伸 10 min. 2% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物.

1.2.8 Western blotting. 收集实验组和对照组 5-8F 细胞, 加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% NP40, 1 mmol/L PMSF, 25 mg/L Aprotinin, 25 mg/L Leupeptin)冰上裂解 30 min, 12 000 r/min、4℃离心 15 min 后取上清即为细胞总蛋白质, Bradford 方法测定蛋白质浓度. 30 μ g 总蛋白进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 蛋白电转移至 PVDF 上, 印迹膜用 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h, 1:1 000 稀释的兔抗人 nm23-H1 抗体室温温育 2 h, BST 缓冲液洗膜 3 \times 10 min,

1 : 2 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗室温温育 1 h, TBST 缓冲液洗膜 3×10 min, ECL 试剂发光、显影和定影。

2 结 果

2.1 实验组和对照组 5-8F 细胞蛋白质 2-DE 图谱的建立

5 μ mol/L 5-aza-2-dC 处理 5-8F 细胞 72 h 后, 二维凝胶电泳(2-DE)分离实验组和对照组细胞的总蛋白质, 在相同实验条件下进行 3 次 2-DE, 考马斯亮蓝染色显色后得到实验组和对照组 5-8F 细胞 2-DE 图谱各 3 张。使用 PDQuest 图像分析软件建

立处理组和未处理组 5-8F 蛋白质的 2-DE 图谱(各 3 块)的平均胶[即计算同组内 3 块凝胶上的同一蛋白质点的平均表达量, 某个蛋白质点的表达量由其在胶上的灰度体积(面积 \times 灰度)]。PDQuest 软件分析显示, 处理组蛋白质点数为 590 ± 40 , 未处理组为 600 ± 50 , 两块平均胶的匹配率为 91.5%。比较两组细胞平均胶的差异(t 检验, $P < 0.05$), 得到处理组和未处理组 5-8F 总蛋白表达变化差异大于 2 倍的蛋白质点共 49 个。图 1 为代表性的处理组和未处理组 5-8F 蛋白质的 2-DE 图谱, 图 1 中标出了质谱鉴定的 33 个蛋白质点。图 2 为局部放大的部分差异表达的蛋白质点。

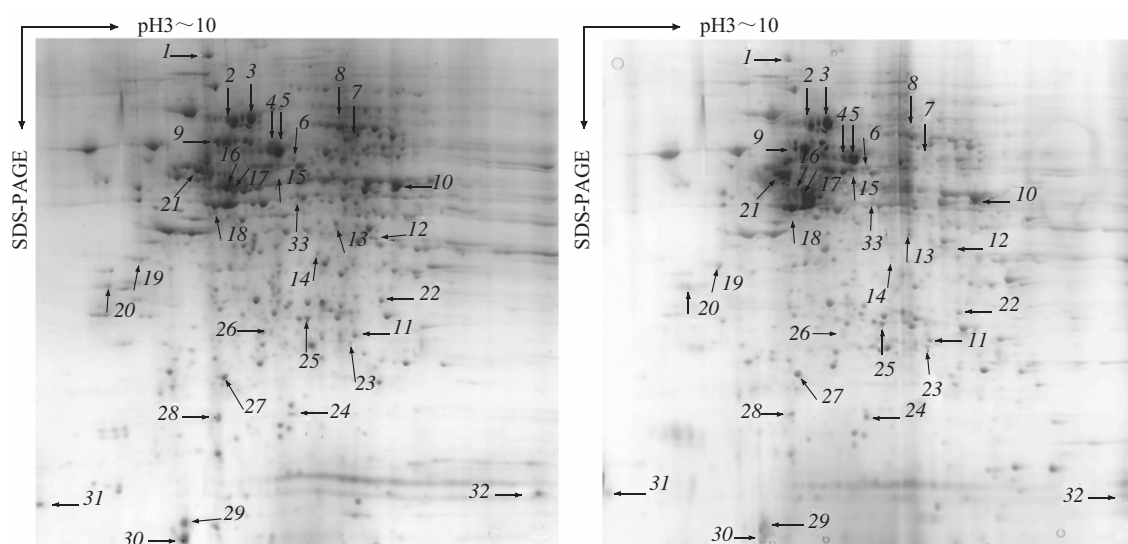


Fig. 1 2-DE maps of untreated (a) and treated (b) 5-8F cells with 5-aza-2-dC

The differential proteins identified by MS were labeled with arrows.

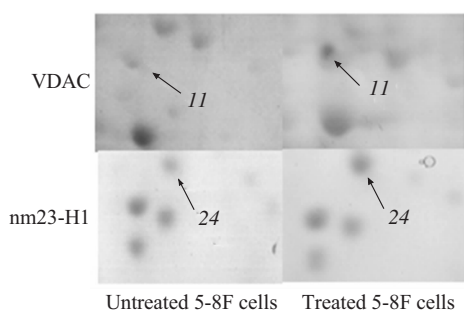


Fig. 2 Close-up image of partial differential expression protein spots in untreated and treated 5-8F cells with 5-aza-2-dC

2.2 差异蛋白质点的质谱鉴定

从 2-D 凝胶中切取所有 49 个差异蛋白质点,

采用 MALDI-TOF-MS 进行分析, 获得蛋白质点的肽质量指纹图谱(PMF), 利用 Mascot 软件检索 Swissprot 蛋白质数据库, 如果 Mascot 分数 > 63 分 ($P < 0.05$) 则认为得到阳性鉴定, 否则视为未得到鉴定。在 49 个蛋白质点中有 33 个差异蛋白质得到鉴定, 其中在处理组细胞表达上调的蛋白质点 15 个, 表达下调的蛋白质点 18 个, 它们在 2-DE 图谱上的位置和具体信息分别见图 1 和表 1。图 3 为 24 号蛋白质点的肽质量指纹图谱, 该差异蛋白的肽质量指纹图(PMF)检索 Swissprot 数据库显示为 nm23-H1。

2.3 nm23-H1 的甲基化分析

2.3.1 MS-PCR 检测 5-8F 细胞中 nm23-H1 基因的甲基化水平. 用 5 μ mol/L 5-aza-2-dC 处理 5-8F 细胞 72 h 后, 采用 MS-PCR 检测实验组和对照组细胞 nm23-H1 基因启动子的甲基化水平. 结果如图 4 所示, 甲基化 nm23-H1 基因的水平(*M*)在实验组(5-aza-2-dC 处理) 5-8F 细胞中明显低于对照组细胞, 而非甲基化 nm23-H1 基因的水平(*U*)明显高于对照组细胞. 结果说明, 5-8F 细胞中的 nm23-H1 基因存在高甲基化.

2.3.2 RT-PCR 和 Western blotting 检测 nm23-H1 基因的表达. 为探讨 5-8F 细胞 nm23-H1 基因甲基化对其表达影响, 采用 RT-PCR 和 Western blotting 分别检测实验组和对照组细胞 nm23-H1 基因 mRNA 和蛋白质表达水平. 结果如图 5 所示, 与对照组细胞比较, 实验组(5-aza-2-dC 处理)5-8F 细胞 nm23-H1 基因 mRNA 和蛋白质的表达水平明显上调, 进一步证实 nm23-H1 基因是 5-8F 细胞的甲基化沉默基因.

Table 1 Differential expressed proteins identified by MALDI-TOF MS between treated and untreated 5-8F cells with 5-aza-2-dC

Spot No.	Swissprot Accession No.	Name	Changing folds (experimental/control)	Function
1	Q9Y4L1	150 ku oxygen-regulated protein	0.41	Chaperone
2	P11142	Heat shock 70 ku protein 8	2.29	Chaperone
3	P38646	75 ku glucose-regulated protein	0.40	Chaperone
4	P60709	Beta-actin	0.27	Structural proteins
5	P30101	58 ku microsomal protein	2.19	Transcription & translation
6	P05091	Aldehyde dehydrogenase	2.30	Intermediary metabolism
7	Q9NR45	T-complex protein 1 subunit beta	2.90	Chaperone
8	Q6UYC3	Progerin	3.12	Signal transduction
9	P10809	HSP60	0.24	Chaperone
10	P06733	Alpha-enolase	2.09	Intermediary metabolism
11	P45880	Voltage-dependent anion channel	2.41	Signal transduction
12	P15121	Aldose reductase	0.25	Intermediary metabolism
13	Q59GX8	Mitochondrial ribosomal protein S22 variant	0.30	Signal transduction
14	Q59G89	26 S proteasome-associated pad1 homolog variant	0.23	Defence
15	P05787	Keratin 8	2.34	Structural proteins
16	P63261	β -actin	0.31	Structural proteins
17	P05783	Keratin 18	5.32	Structural proteins
18	Q9NYL9	Tropomodulin-3	3.74	Structural proteins
19	Q6FHF5	Proliferating cell nuclear antigen	2.19	Transcription & translation
20	Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein	0.22	Unknown
21	Q15084	Protein disulfide isomerase P5	5.29	Transcription & translation
22	P18669	Phosphoglycerate mutase 1	0.36	Intermediary metabolism
23	P47985	Rieske iron-sulfur protein	2.13	Energy & electron transport
24	P15531	nm23-H1	2.45	Structural proteins
25	P30040	Endoplasmic reticulum protein ERp29	0.43	Transcription & translation
26	Q5SZS5	Proteasome subunit, beta type, 4	0.37	Defence
27	P52815	39S ribosomal protein L12	0.45	Signal transduction
28	P63241	EIF5A	0.23	Transcription & translation
29	Q8TB65	Cytochrome c oxidase subunit Va	0.21	Energy & electron transport
30	P10599	Thioredoxin	0.20	Signal transduction
31	P62158	Calmodulin	0.39	Chaperone
32	Q567R6	Single-stranded DNA binding protein 1	0.22	Transcription & translation
33	Q96J01	THO complex subunit 3	2.07	Transcription & translation

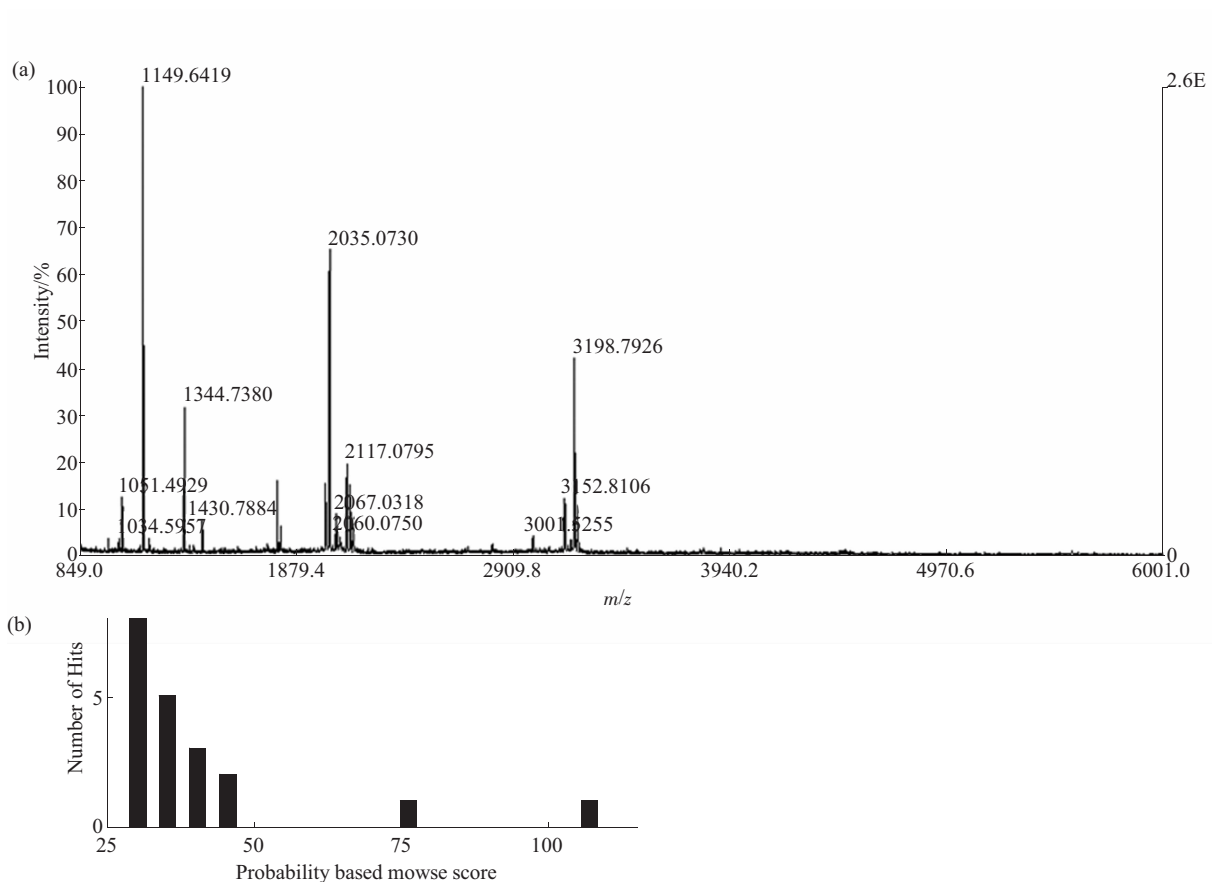


Fig. 3 MALDI-TOF-MS analysis of spot 24

(a) Peptide mass fingerprinting of protein spot 24. (b) Database query result and scores of spot 11.

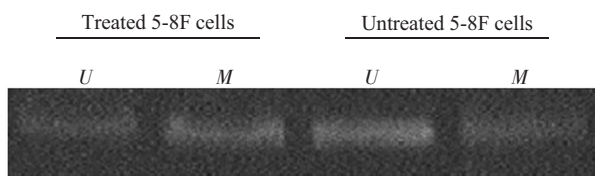


Fig. 4 Detection of methylation levels of nm23-H1 in treated and untreated 5-8F cells with 5-aza-2-dC by MS-PCR

U: Amplified product with primers recognizing an unmethylated sequence; *M*: Amplified product with primers recognizing a methylated sequence.

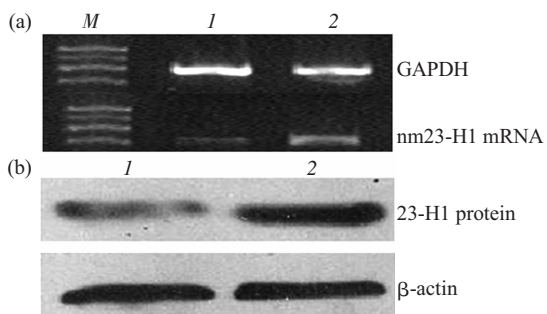


Fig. 5 The expression level of nm23-H1 in treated and untreated 5-8F cells with 5-aza-2-dC

(a) RT-PCR, GAPDH was used as a loading control. (b) Western blotting, β -actin was used as a loading control. 1: Untreated 5-8F cells with 5-aza-2-dC; 2: Treated 5-8F cells with 5-aza-2-dC.

3 讨 论

鼻咽癌是一种多基因参与、多阶段的复杂疾病, 其发生发展涉及遗传学和表观遗传学改变^[5]. 在鼻咽癌的表观遗传学研究领域, 已有的研究发现, p15、p16、RASSF1A 等基因在鼻咽癌中存在甲基化失活^[10~12]. 但这些研究均是采用候选基因法筛选鼻咽癌的甲基化失活基因, 所分析的基因数量有限, 鼻咽癌的甲基化失活基因有待进一步发现. 高通量的蛋白质组学技术能够同时分析组织细胞中数千个蛋白质表达的变化, 使我们从蛋白质组水平上筛选肿瘤的甲基化失活基因成为可能.

为此, 本研究提出了一种全新的研究思路, 即基于去甲基化药物 5-aza-2-dC 处理肿瘤细胞前后蛋白质表达谱的变化, 采用蛋白质组学技术从全基因组范围筛选肿瘤的甲基化失活基因. 这种研究思路的理论依据是: a. 5-aza-2-dC 处理肿瘤细胞将使细胞中的甲基化沉默基因重新表达, 导致肿瘤细胞蛋白质表达谱的变化; b. 高通量的蛋白质组研究技术能从蛋白质组水平识别、鉴定两种样本的差异

表达蛋白质；c. 理论上，5-aza-2-dC 处理肿瘤细胞后表达上调的基因为甲基化沉默基因。

本研究用 5-aza-2-dC 处理鼻咽癌细胞系 5-8F 细胞，建立了 5-aza-2-dC 处理与未处理 5-8F 细胞蛋白质的 2-DE 图谱，质谱分析鉴定了 33 个差异表达的蛋白质点，其中在 5-aza-2-dC 处理后表达上调的蛋白质 15 个，表达下调的蛋白质 18 个。15 个 5-aza-2-dC 处理后表达上调蛋白质的编码基因可能是 5-8F 鼻咽癌细胞的甲基化沉默基因。为了解表达上调蛋白质的编码基因是否为甲基化沉默基因，采用 MS-PCR、RT-PCR 和 Western blotting 方法分析 5-8F 细胞中 nm23-H1 基因的甲基化水平及其与表达的关系。结果显示，5-aza-2-dC 处理 5-8F 细胞后，nm23-H1 基因启动子甲基化水平降低、非甲基化水平增加，而且 nm23-H1 基因 mRNA 和蛋白质的表达水平明显上调，这说明 nm23-H1 基因是 5-8F 细胞中的甲基化沉默基因。nm23-H1 基因是 Steeg 等^[6]于 1988 年首先从小鼠黑色素瘤 K1735 细胞系中克隆到的能抑制癌细胞转移的基因。人类 nm23-H1 基因家族有 8 种不同的异构体^[6]，其中 nm23-H1 和 nm23-H2 与许多肿瘤转移有关，具有抑制乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃癌、肝细胞癌和黑色素瘤侵袭转移的作用^[7]，nm23-H1 被认为是肿瘤转移抑制基因，甲基化导致其表达下调将使肿瘤细胞的转移能力增强。本研究中，我们发现 nm23-H1 在鼻咽癌细胞 5-8F 中存在甲基化，提示 nm23-H1 基因的甲基化沉默可能与鼻咽癌转移有关，但需进一步研究。

在 5-aza-2-dC 处理 5-8F 细胞后，有 18 个蛋白质表达下调，其表达下调的可能机制是：表达上调的蛋白质对这些基因的间接调控作用，抑制其表达；5-aza-2-dC 去甲基化作用改变了基因局部的甲基化状态，影响甲基化 CpG 岛结合蛋白与组蛋白脱乙酰化酶结合，从而抑制组蛋白脱乙酰化酶的作用，组蛋白乙酰化水平升高，使基因表达水平上调。

本研究首次采用蛋白质组学技术从全基因组水平筛选鼻咽癌的甲基化失活基因，鉴定了 15 个 5-aza-2-dC 处理后表达上调的蛋白质，并证实 nm23-H1 基因是 5-8F 细胞中的甲基化沉默基因，提示，这些蛋白质的编码基因可能是鼻咽癌细胞的候选甲基化沉默基因，有进一步的研究价值。另外，本文研究方法为筛选与肿瘤发生发展相关的甲基化失活基因提供了新思路。

参 考 文 献

- 1 Jones P A, Laird P W. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, 1999, **21**(2): 163~167
- 2 Jones P A. Epigenetics in carcinogenesis and cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, **983**: 213~219
- 3 Herman J G, Baylin S B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 2003, **349**(21): 2042~2054
- 4 Costello J F, Fruhwald M C, Smiraglia D J, *et al.* Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet*, 2000, **24**(2): 132~138
- 5 Baylin S B, Herman J G, Graff J R, *et al.* Alternations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res*, 1988, **72**: 141~196
- 6 Merlo A, Herman J G, Mao L, *et al.* 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med*, 1995, **1**(7): 686~692
- 7 Hsu H S, Wen C K, Tang Y A, *et al.* Promoter hypermethylation is the predominant mechanism in hMLH1 and hMSH2 deregulation and is a poor prognostic factor in nonsmoking lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(15): 5410~5416
- 8 Schildhaus H U, Krockel I, Lippert H, *et al.* Promoter hypermethylation of p16INK4a, E-cadherin, O6-MGMT, DAPK and FHIT in adenocarcinomas of the esophagus, esophagogastric junction and proximal stomach. *Int J Oncol*, 2005, **26**(6): 1493~1500
- 9 Fraga M F, Esteller M. DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques*, 2002, **33**(3): 632, 634, 636~649
- 10 Kwong J, Lo K W, To K F, *et al.* Promoter hypermethylation of multiple gene in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2002, **8**(1): 131~137
- 11 Lo K W, Kwong J, Hui A B, *et al.* High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 2001, **61**(10): 3877~3881
- 12 Zhou L, Jiang W, Ren C, *et al.* Frequent hypermethylation of RASSF1A and TSLC1, and high viral load of Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma and matched tumor-adjacent tissues. *Neoplasia*, 2005, **7**(9): 809~815
- 13 宋立兵, 鄢 践, 简少文, 等. 鼻咽癌细胞亚株不同成瘤与转移潜能的分子机制. *癌症*, 2002, **21**(2): 158~162
SONG L B, YAN J, JIAN S W, *et al.* *Chinese Journal of Cancer*, 2002, **21**(2): 158~162
- 14 冯雪萍, 陈主初, 肖志强, 等. NM23-H1、DJ1 和 TIM1 在低分化鼻咽鳞癌组织和 CNE2 细胞株中共同表达. *生物化学与生物物理进展*. 2005, **32**(4): 338~346
FENG X P, CHEN Z C, XIAO Z Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(4): 338~346
- 15 Lo K W, Huang D P. Genetic and epigenetic changes in nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*, 2002, **12**(6): 451~462
- 16 Steeg P S, Bevilacqua G, Kopper L, *et al.* Evidence for a novel gene

associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst*, 1988, **80**(3): 200~204

metastasis: basic and translational advances. *Biochem Soc Symp*, 1998, **63**: 261~271

17 Freije J M, MacDonald N J, Steeg P S, *et al.* Nm23 and tumour

Identification of Hypermethylated Genes in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line by Proteomics*

ZHANG Wen-Jing**, YI Bin**, YI Hong, ZHANG Peng-Fei, LI Mao-Yu, LI Cui, RUAN Lin, CHEN Zhu-Chu, LI Jian-Ling***, XIAO Zhi-Qiang***

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

Abstract To screen for methylation silenced genes in nasopharyngeal carcinoma cell line 5-8F, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was performed to separate the proteins of treated and untreated 5-8F cells with demethylating agent 5-aza-2-dC, PDQuest software was used to analyze 2-DE images, and MALDI-TOF-MS was used to identify the differentially expressed proteins between the treated and untreated 5-8F cells. Then RT-PCR and Western blotting were performed to examine the expression levels of nm23-H1 mRNA and protein, one of the differential expression proteins, in the treated and untreated 5-8F cells, respectively. Methylation-specific PCR (MS-PCR) was performed to detect the methylated level of nm23-H1 gene in the treated and untreated 5-8F cells. 2-DE patterns of the treated and untreated 5-8F cells with 5-aza-2-dC were established, and a total of forty-nine differential protein spots were found in treated and untreated 5-8F cells. Thirty-three non-redundant differential proteins were identified by MS, 15 proteins of which were up-regulated after 5-aza-2-dC treatment. The results of Western blotting, RT-PCR and MS-PCR showed that nm23-H1 is a methylation silenced gene in 5-8F cell line. Encoding genes of 15 up-regulated proteins after 5-aza-2-dC treatment may be methylation silenced genes in NPC cell line 5-8F. The data will be helpful to screen for methylation silenced genes in nasopharyngeal carcinoma.

Key words nasopharyngeal carcinoma, methylation silenced genes, proteomics, methylation-specific PCR, nm23-H1

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2001CB510207), Government of Hunan Province for Hibiscus Scholars, Ministry of Education of China for Outstanding Scholars of New Era (2002-48) and Key Research Program from Science and Technology Committee of Hunan (06SK2004).

** ZHANG Wen-Jing and YI Bin contributed equally to this work.

***Corresponding author.

LI Jian-Ling. Tel: 86-731-4327334, Fax: 86-731-4327332, E-mail: jianlingli2001@yahoo.com

XIAO Zhi-Qiang. Tel: 86-731-4327329, Fax: 86-731-4327321, E-mail: zqxiao2001@yahoo.com.cn

Received: July 22, 2007 Accepted: October 30, 2007