

消痰散结方对胃癌细胞系 P16基因甲基化的影响

郭 维 魏品康 桂牧微 秦志丰

(中国人民解放军第二军医大学附属长征医院中医科,上海市黄浦区凤阳路 415号, 200003)

[摘要] 目的 研究消痰散结方含药血清对胃癌细胞系基因甲基化的影响,探讨该方抗癌作用机制。方法 培养胃癌细胞系 MKN45、BGC823,制备消痰散结方药物血清。细胞分为空白对照组、空白血清组(无药大鼠血清)、药物血清组(消痰散结方药物血清)、5-Aza-CdR组(5-Aza-CdR)。CCK-8测定细胞活力,RT-PCR法测定 P16基因表达,Methylight法测定基因 P16甲基化水平。结果 5-Aza-CdR和消痰散结方含药血清给药后 72h 后细胞增殖受到明显抑制,在 MKN45细胞系中经过 5-Aza-CdR和消痰散结方含药血清给药后 72h 后细胞增殖分别降低为 76.14%和 83.15%,在 BGC823细胞系中经过 5-Aza-CdR和消痰散结方含药血清给药后 72h 后细胞增殖分别降低为 76.17%和 83.44%,且消痰散结方药物血清组细胞增殖率明显低于 5-Aza-CdR组。5-Aza-CdR和消痰散结方药物血清均能逆转 P16基因甲基化,增加 P16 mRNA 表达,与空白对照组比较有统计学差异($P < 0.05$)。结论 消痰散结方可以有效抑制胃癌细胞生长,逆转 P16基因甲基化可能是其作用机制之一。

[关键词] 胃癌;胃癌细胞系;抑癌基因;基因甲基化;消痰散结方;药物血清

Effect of Xiaotan Sanjie Formula on DNA Methylation of P16 Gene in Gastric Cancer Cell Lines

GUO Wei, WEI Pinkang, GUI Muwei, QIN Zhifeng

(Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

ABSTRACT Objective This study aimed to evaluate the effect of Xiaotan Sanjie Formula-containing serum on DNA methylation of P16 in gastric cancer cell lines to study its mechanism of anticancer. **Methods** Human gastric cancer cell lines, MKN45 and BGC823 were cultured and Xiaotan Sanjie Formula-containing serum was prepared. Cells were divided into four groups, i.e. blank control group, blank serum group, Xiaotan Sanjie Formula-containing serum group and 5-Aza-CdR group. Cell viability was determined by CCK8. The expression of P16 gene was detected by using RT-PCR. DNA methylation level of P16 gene was detected by Methylight method. **Result** Cell proliferation was obviously inhibited 72 hours after 5-Aza-CdR or Xiaotan Sanjie Formula-containing serum administered. In the MKN45 cell line, cell proliferation rate was decrease to 76.14% and 83.15% after treated with 5-Aza-CdR and Xiaotan Sanjie Formula-containing serum respectively; in the BGC823 cell line, the above indices were 76.17% and 83.44% respectively. The cell proliferation rate of Xiaotan Sanjie Formula-containing serum group was obviously lower than that of the 5-Aza-CdR group. Both drug containing serum could reverse methylation of P16 gene and increase expression of P16 mRNA. There was significant difference as compared with the blank control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Xiaotan Sanjie Formula could suppress gastric cancer cell proliferation by reversing DNA methylation of P16 gene.

Key Words Gastric cancer; Cancer cell line; Tumor suppressor gene; DNA methylation; Xiaotan Sanjie Formula; Drug containing serum

DNA 甲基化是目前研究较多的一种表观遗传机制,在胃癌发生、发展中起重要作用^[1]。现已证实 DNA 甲基化是基因突变及缺失之外抑癌基因失活的第 3 种机制,在某些情况下是其失活的唯一机制^[2]。P16 是公认的抑癌基因,在胃癌中 P16 基因启动子区发生甲基化引起表达缺失,进而促进肿瘤的发生^[3]。去甲基化剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)可以逆转基因高甲基化而抑制肿瘤,但其毒性较大,且对于胃癌等实体瘤疗效不确切,尚需进一步探索。有报道消痰散结方治疗胃癌效果较好^[4]。为进一步探讨其作用机理,本课题从表观遗传学角度着手,研究消痰散结方对胃癌细胞系

MKN45、BGC823 中 P16 基因甲基化的影响。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

消痰散结方由半夏、天南星、全蝎、蜈蚣、白花蛇舌草、鸡内金、重楼、地龙、甘草组成,由第二军医大学附属长征医院药材料提供,产地明确,经第二军医大学药学院生药教研室鉴定,旋转蒸发仪煎煮成水煎剂,按人与大鼠换算比计算出剂量(含生药量 2.51g/ml)。5-Aza-CdR 为 Sigma 公司产品。RPMI-1640 培养液及胎牛血清购自 Gibco 公司。细胞活性计数试剂盒 CCK-8 (cell counting kit 8)同仁公司产品(批号 NN0152)。RNA 提取试剂盒(批号 D9108A)、DNA 提取试剂盒(批号 D305A)、RT-PCR 试剂盒(批号 DR001A)购于 Takara 公司。Methylight 试剂盒(批号 GM S2002401)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(90709044)

通讯作者:魏品康, czzyk73@163.com, (021) 81885476

购于上海杰美基因医药公司。

1.2 动物

6周龄 SD雄性大鼠 10只,体重 (350± 20)g, SPF级,购自中国科学院上海实验动物中心,动物许可证号: SCXK(沪) 2007-0005

1.3 细胞株

细胞系 MKN45 BGC823由上海市普陀区中心医院李琦副教授馈赠。细胞生长液为含 10%胎牛血清、100IU /ml青霉素 100μg /ml链霉素的 RPMI1640溶液。

1.4 药物血清制备

SD大鼠随机分成空白对照组、中药组,每组 5只。中药组给予消痰散结方水煎剂(含生药量 2. 51g /ml),空白对照组给予生理盐水。每次灌胃 2ml,每日 2次,连续给药 4天。第 5天早晨一次性灌服 4ml,给药后 1h股动脉活体取血。全血静置 3h, 2200r /min离心 10min,收集血清, 56℃水浴灭活补体 30min, 0. 22μm滤膜过滤灭菌, - 70℃保存备用。

1.5 细胞培养及分组

人胃癌细胞系 MKN45 BGC823置 37℃, 5% CO₂培养箱中培养至对数生长期后,胰酶消化 2min,收集细胞。将细胞调整计数为 1× 10⁴ /ml,以每孔 100μl接种于 96孔板中,加入无血清的 RPMI1640培养基饥饿 12h后,改用正常培养液培养,细胞随机分成 4组:①药物血清组,每孔加入消痰散结方药物血清 20μl;② 5-Aza-CdR组:每孔加 5-Aza-CdR 20μl,药物浓度为 5μmol /L;③空白血清组,每孔加入无药血清 20μl;④空白对照组,不加任何药物。每组设 5个复孔,培养 72h。

1.6 CCK-8检测细胞活力

分别加入药物血清培养 24h、48h、72h, PBS反复洗涤后,每孔加入 CCK-8 10μl, 4h后,酶标仪 450nm测各孔吸光度。另设空白调零组,不含细胞,加入同等浓度的 CCK-8及培养液,实验重复 3次。

1.7 RT-PCR测定 P16基因 mRNA表达

分别收集药物作用前和药物作用 72h后的细胞,提取总 RNA,紫外分光光度仪测纯度和浓度,按试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA,然后进行 PCR扩增。反应体系: cDNA 2μl, 10× PCR缓冲液 2. 5μl, dNTP 1μl, Taq酶 0. 2μl,双蒸水 17. 3μl,引物各 1μl,总体积 25μl。引物由上海生工生物技术公司合成,反应条件为: 94℃ 30S, 54℃ 30S, 72℃ 1min, 35循环。引物序列见表 1。实验重复 3次。

1.8 Methylight法测定 P16基因甲基化改变

1.8.1 DNA提取及亚硫酸盐修饰 收集药物作用前后的细胞,用 QIAamp DN A Mini kit试剂盒抽提细胞

表 1 RT-PCR引物及反应条件

基因名称	序列	产物长度
P16	正义链 5'CAACGCACCCGAATAGTTACGG3'	105bp
	反义链 5'GCGCAGTTGGGCTCCG3'	
GAPDH	正义链 5'AAGATCTGCCGTCCAGTCCA3'	247bp
	反义链 5'TCCACCACCTGTTGCTGTA3'	

表 2 Methylight引物及反应条件

基因名称	序列	探针序列
P16	正义链: 5'CCGGAGGCTGGCATTGATAAG3'	ACCCGACCC-CGAACCGCG
	反义链: 5'AACAACGTCCGCACCTCCT3'	
ALU	正义链: 5'GGTTAGGTATAGTGTTTATATTTGTAATTTT AGTA3'	CCTACCT-TAACCTCC
	反义链: 5'ATTAAGTAACTAATCTTAAACTCCTAACCTCA3'	

DNA按照文献 [5]方法进行重亚硫酸盐处理,应用 Wizard DN A Cleanup System纯化 DNA。

1.8.2 M. SssI处理 人外周血白细胞 (PBL) DNA (0. 05mg /ml)用 M. SssI (0. 05U /ml)和 0. 16mM的腺苷甲硫氨酸 (AdoMet) 37℃培养过夜。第 2天再加入 AdoMet (到 0. 20mM)和 M. SssI (到 0. 065U /ml),样品保存在 4℃, DNA按照前面描述的方法行亚硫酸盐处理。

1.8.3 P16基因甲基化定量 PCR测定 反应体系: 总体积 30ml, 200mM dNTPs, 0. 3mM引物, 0. 1mM探针, 3. 5mM MgCl₂, 0. 01% Tween-20, 0. 05% 明胶以及 0. 1U Taq酶。PCR反应条件: 95℃, 10min; 95℃, 15s; 60℃, 1min, 50循环。扩增样品用 ABI PRISM7700检测系统和软件进行分析。引物序列见表 2。与普通实时定量 PCR不同的是本实验采用 ALU作为内参,确定输入基因的量。用 M. SssI处理后的人外周血淋巴细胞 (PBL) DNA作为参照,以确定甲基化基因的比例。甲基化水平用甲基化率 (PMR)来表示,计算公式为 PMR = P16 ALU(待测样品)× 100 / P16 ALU (M. SssI处理 PBL DNA), PMR > 4判定为基因有明显甲基化 [6]。实验重复 3次。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 12. 0统计分析软件。计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-t检验。

2 结果

2.1 各组胃癌细胞系治疗前后细胞增殖率比较

表 3示 CCK-8比色实验的结果,空白血清组和空白对照组相比较无明显差别;与空白对照组相比,药物

表 3 各组胃癌细胞系治疗前后细胞增殖率比较 (x±s)

细胞	组别	24h		48h		72h	
		OD值	增殖率%	OD值	增殖率%	OD值	增殖率%
MKN45	空白对照组	0.11±0.004	100	0.119±0.004	100	0.163±0.005	100
	空白血清组	0.110±0.003	99.10	0.118±0.004	99.16	0.16±0.006	99.26
	药物血清组	0.104±0.004	94.22	0.1±0.004	93.59	0.124±0.003	76.14 [*]
	5-Aza-CdR组	0.105±0.005	95.13	0.112±0.004	94.77	0.135±0.003	83.15 [△]
BGC823	空白对照组	0.177±0.007	100	0.240±0.002	100	0.308±0.011	100
	空白血清组	0.174±0.010	98.75	0.237±0.004	98.75	0.305±0.008	99.26
	药物血清组	0.173±0.004	97.85	0.204±0.002	84.86	0.235±0.004	76.17 [*]
	5-Aza-CdR组	0.174±0.006	98.53	0.217±0.003	88.02	0.257±0.003	83.44 [△]

注:与 5-Aza-CdR组比较,* P<0.05;与空白对照组比较,△ P<0.05

表 4 各组胃癌细胞系 MKN45 BGC823 中 P16 基因甲基化水平比较 (x±s)

组别	细胞数	MKN45	BGC823
空白对照组	3	77.67±1.53	57.67±1.15
无药血清组	3	77.33±2.52	59.33±1.52
含药血清组	3	45.67±2.08 [*]	40.12±3.11 [△]
5-Aza-CdR组	3	-	6.33±1.52 [△]

注:与 5-Aza-CdR组比较,* P<0.05;与空白对照组比较,△ P<0.05

血清干预后,含药血清和 5-Aza-CdR均可抑制胃癌细胞株 MKN-45及 BGC823细胞增殖,药物血清组抑瘤率高于 5-Aza-CdR组。含药血清作用 72h 后抑瘤作用最强,细胞生长降低为 75%。

2.2 RT-PCR测定 P16 基因 mRNA 表达

图 1 示,胃癌细胞系 MKN45 BGC823 中 P16 基因弱表达,通过含药血清以及 5-Aza-CdR 作用 72h 后,P16 基因表达明显升高。5-Aza-CdR 组 P16 基因表达量高于药物血清组。

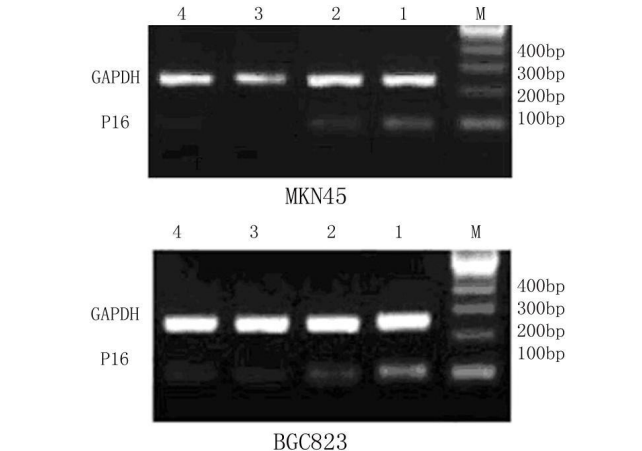


图 1 MKN45 和 BGC823 PCR 条带图 (M: Marker, 1. 5-Aza-CdR 组; 2. 药物血清组; 3. 空白血清组; 4. 空白对照组)

2.3 胃癌细胞系 MKN45 BGC823 中 P16 基因甲基化水平比较

表 4 示,胃癌细胞系 MKN45 BGC823 中 P16 基因

启动子明显甲基化 (PMR>4),经过通过含药血清以及 5-Aza-CdR 作用 72h 后,P16 基因甲基化水平均明显降低,与空白对照组比较 (P<0.05)。5-Aza-CdR 组 P16 基因甲基化水平明显低于药物血清组 (P<0.05)。在 MKN45 细胞中,经 5-Aza-CdR 作用 72h 后,无 P16 基因甲基化条带扩增。

3 讨论

在胃癌发生的分子机制中,DNA 甲基化起着重要的作用,研究胃癌特异性甲基化基因,有望为胃癌诊断以及治疗和预后判断提供有效证据^[7]。去甲基化剂 5-azacytidine 和 5-Aza-CdR 虽然均可通过逆转基因甲基化而抑制肿瘤细胞生长^[8],但是这两种药物应用范围局限,目前临床尚未用于胃肠道实体瘤的治疗。因此,进一步研究和探索逆转基因甲基化的有效药物是目前的研究热点。基于此,本课题从基因甲基化的角度探索中医药治疗胃癌的作用机理。

中医药对于胃肠道肿瘤的治疗作用早有报道,与化疗药物相比,中医药毒副作用较少,同时可以通过整体调节作用达到改善患者生存质量、延长生存期的作用。我们通过多年经验提出胃癌“痰证理论”学说^[9],拟定消痰散结方,作为院内制剂临床应用多年。方中君药半夏、天南星化痰散结,全蝎、蜈蚣搜风通络、散结止痛,辅助君药以消痰散结,再配伍白花蛇舌草、鸡内金等药共奏消痰散结、逐瘀通络之功。有研究表明,半夏、天南星均有明显的抗肿瘤作用^[10-11]。半夏能有效控制胃癌生长,抑制肿瘤坏死因子α产生的活性成分^[12],天南星对体外培养人胃癌、肺癌及肝癌细胞有杀伤和抑制作用^[13],全蝎、蜈蚣均有明显抗癌作用^[14-15],这些研究为消痰散结方提供了药理学支持。

P16 是已经确认的抑癌基因,该基因的失活在肿瘤细胞增生过程中起着重要作用^[16]。P16 基因的失活与胃癌、卵巢癌、肺癌等多种肿瘤密切相关,在胃癌中已被证实 P16 基因启动子区域异常甲基化是其失活的主要机制^[3]。本实验证实在胃癌细胞系 MKN45 和

BGC823中,P16基因启动子发生高甲基化是其失活的主要原因,这与朱新江等^[17]的研究相一致

目前,关于中医药影响肿瘤基因甲基化的报道很少,本研究表明,5-Aza-CdR与消痰散结方均能降低胃癌细胞系 MKN 45 BGC823中 P16基因甲基化水平。空白血清组中抑瘤率和 P16基因表达与空白对照组比较均无明显差异,提示无药大鼠血清对肿瘤增殖以及 P16基因表达无影响,表明含药血清对胃癌肿瘤细胞的生长抑制作用是通过本方发挥的,本方可以通过逆转抑癌基因甲基化而发挥抗肿瘤作用。消痰散结方药物血清可降低 P16基因甲基化水平,其作用虽然弱于 5-Aza-CdR($P < 0.05$),但消痰散结方药物血清能明显抑制胃癌细胞系的生长,其抑瘤作用明显优于 5-Aza-CdR($P < 0.05$)。提示消痰散结方可影响甲基化水平,另外还通过其他方面的作用抑制胃癌的生长。

综上所述,消痰散结方可以抑制肿瘤细胞生长,其机理可能与逆转抑癌基因 P16甲基化状态,提高 P16基因表达有关。胃癌发生涉及到多个基因的改变,本方对其他相关基因的干预机制有待进一步研究。

参考文献

[1] Kang GH, Lee S, Cho NY, et al. DNA methylation profiles of gastric carcinoma characterized by quantitative DNA methylation analysis [J]. Lab Invest, 2008, 88(2): 161-170.

[2] Lund AH, van Lohuizen M. Epigenetics and cancer [J]. Genes Dev, 2004, 18(19): 2315-2335.

[3] Shim YH, Kang GH, Ro JY. Correlation of P16 hypermethylation with P16 protein loss in sporadic gastric carcinomas [J]. Lab Invest, 2000, 80(5): 689-695.

[4] 陈天池. 消痰散结方治疗中晚期胃癌的疗效观察 [J]. 中华实用中西医杂志, 2006, 19(19): 2314-2315.

[5] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18): 9821-9826.

[6] Eads CA, Lord RV, Kurumboor SK, et al. Fields of aber-

rant CpG island hypermethylation in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 2000, 60(18): 5021-5026.

[7] Chan MW, Chu ES, To KF, et al. Quantitative detection of methylated SOCS-1, a tumor suppressor gene, by a modified protocol of quantitative real time methylation-specific PCR using SYBR green and its use in early gastric cancer detection [J]. Biotechnol Lett, 2004, 26(16): 1289-1293.

[8] Sun D, Toan X, Chen Y, et al. Mammalian target of rapamycin pathway inhibition enhances the effects of 5-aza-dC on suppressing cell proliferation in human gastric cancer cell lines [J]. Sci China C Life Sci, 2008, 51(7): 640-647.

[9] 许玲, 魏品康, 李相勇. 胃癌从“痰”论治浅探 [J]. 中医杂志, 2002, 43(10): 728-729.

[10] 戈宏焱, 杨金刚, 房学讯, 等. 制半夏抑制基质金属蛋白酶活性及抗肿瘤机理的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2838-2840.

[11] 张麒, 李燕玲, 任连生, 等. 马钱子天南星对小鼠移植性肿瘤 H 的抑瘤作用 [J]. 中国药物与临床, 2005, 5(4): 272-274.

[12] 韩美华, 杨秀伟, 钟国跃, 等. 鲜半夏中抑制肿瘤坏死因子- α 产生的活性成分 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(17): 1755-1759.

[13] 杨宗辉, 尹建元, 魏征人. 天南星提取物诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及其机制的实验研究 [J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(1): 142.

[14] 张红梅, 刘岩峰, 张景海. 蝎及蝎毒抗肿瘤作用研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(6): 401-403.

[15] 孙捷, 高莉, 单保恩, 等. 动物毒素抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15(13): 1044-1046.

[16] Song SH, Jong HS, Choi HH, et al. Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate P16(INK4a) expression in gastric adenocarcinoma [J]. Int J Cancer, 2000, 87(2): 236-240.

[17] 朱新江, 孟春风, 彭过, 等. 5-Aza-dC 和 TSA 对胃癌细胞系 P16 和 Hmlh-1 基因甲基化水平及表达的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(17): 1837-1841.

(收稿日期: 2009-12-30; 修回日期: 2010-07-03)

[编辑: 行之]

第十二次全国特色医疗名医学术交流暨肿瘤白血痛痛风论坛

为了交流推广中医药在治疗各种肿瘤、白血病、痛风等难治病和常见多发病方面的特色优势和经验, 本次会议由北京聚医杰医药科学研究院等单位主办, 定于 2010 年 1 月下旬在广西桂林召开, 特邀请各级中医、中西医结合医、乡村中医、民间中医中的特色医疗名医参会交流。

1. 会议内容: (1) 邀请中医肿瘤、白血病、痛风等方面的专家到会作专题学术讲座; (2) 代表交流在中医药治疗常见病多发病及肿瘤、白血病、痛风等难治病方面的经验; (3) 评选表彰一批中医药治疗肿瘤、白血病、痛风等难治病方面的特色医疗名医; (4) 组织部分代表参加“中国特色医疗名医考察团”去越南首都河内市等地参观考察。2. 征文要求: 中医药、中西医结合及民间疗法治疗肿瘤、白血病、痛风、风湿病、肝病、肾病、糖尿病等难治病方面的经验均可, 题材不限, 论文须打印, 附 200 字以内作者简介。论文经评审入选后将安排在有关杂志发表, 并颁发“优秀论文证书”或“特色医疗学术成果证书”。3. 会议颁发: (1) 继续教育学分证书; (2) 优秀论文或特色医疗学术成果证书; (3) 优秀者授予“聚医杰中医肿瘤病特色医疗名医”等荣誉称号; (4) 资料及纪念品等。四、会议费用: 每位代表须交报名费 200 元, 会务费 750 元, 食宿、参观统一安排, 费用自理。有论文发表者另交版面费 350 元, 去越南考察者另需交费 2800 元 (请提前在当地公安局办好护照)。5. 报名方式: 请将论文 (无论文者也可报名) 作者 1 寸像片 4 张 (反面写上姓名) 报名费 200 元在 1 月 10 日前寄北京市 100036-98 信箱会务组江玲收, 邮编 100036, 或发 Email 100036-98@163.com, 详情登录 www.zgtsyl.com, 联系电话: 010-63772051 13366005273。