

## 5-氮杂-2 脱氧胞苷去除 p14 启动子甲基化 对人肺癌细胞生物学功能的影响\*

贾炳阳 田凯华<sup>△</sup>

(青岛大学附属医院, 青岛 266003)

**摘要** 目的 探讨 5-氮杂-2 脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, DAC) 去除 p14ARF 基因启动子异常甲基化状态对人肺癌细胞生物学功能的影响。**方法** 利用巢式甲基化特异性 PCR(NMSP) 检测 spca1 细胞系及 beas2b 细胞系 p14ARF 启动子区域甲基化情况, 根据细胞类型及是否进行 DAC 处理将细胞分为 4 组: spca1 DAC 处理组、spca1 对照组、beas2b DAC 处理组、beas2b 对照组, 每组设置 6 个复孔, Western blot 检测各组 p14ARF 蛋白表达情况, 流式细胞术进行细胞凋亡检测。**结果** NMSP 检测到 spca1 细胞 p14 启动子区域存在异常的甲基化状态, 使用 DAC 去除 p14 启动子区异常甲基化 spca1 细胞中 ARF 蛋白的表达恢复, 细胞凋亡率 spca1 DAC 处理组 (20.69 ± 1.03)% 显著高于 spca1 对照组 (10.63 ± 0.82)% ( $t = 13.17, P < 0.05$ ); 而在 beas2b 细胞系以上结果均无明显差异, 其中细胞凋亡率 beas2b DAC 处理组 (7.38 ± 0.36)% 与 beas2b 对照组 (6.98 ± 0.42)% 无显著差异 ( $t = 1.25, P > 0.05$ )。**结论** DAC 去除 p14ARF 启动子区域异常甲基化后 ARF 蛋白表达恢复, 诱导 spca1 细胞凋亡, 对肺癌发生起到抑制作用。

**关键词** p14ARF; DNA 甲基化; 肺癌

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2019)02-001-04

### Effect of 5-Aza-2-deoxycytidine demethylating p14 promoter on biological function in human lung cancer cells

JIA Bingyang, TIAN Kaihua

(Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) demethylating the p14ARF gene promoter on the biological function in human lung cancer cells. **Methods** Nested methylation-specific PCR (NMSP) was used to detect the methylation status of p14ARF promoter region in spca1 cell line and beas2b cell line. According to cell type and DAC treatment, cells were divided into four groups: spca1 DAC treatment group, spca1 control group, beas2b DAC treatment group, beas2b control group, and there were three duplicate wells in each group. The expression of p14ARF protein in each group was detected by Western blot. Apoptosis detection was performed by flow cytometry. **Results** NMSP detected abnormal methylation status in the p14 promoter region of spca1 cells. The use of DAC to remove aberrant methylation of the p14 promoter region detected the recovery in ARF protein expression in spca1 cells, and the rate of apoptosis was significantly increased. There were significant differences in the experimental group (20.69 ± 1.03)% and control group (10.63 ± 0.82)% ( $t = 13.17, P < 0.05$ ). While there was no significant difference in the results of the beas2b cell line, there were no significant differences in the experimental group (7.38 ± 0.36)% and control group (6.98 ± 0.42)% ( $t = 1.25, P > 0.05$ ). **Conclusion** After DAC demethylates the p14ARF promoter region, the expression of ARF protein is recovering, which induces the apoptosis of spca1 cells. So p14 promoter aberrant methylation plays an important role in the development of lung cancer.

**Keywords:** p14ARF; Lung cancer; DNA Methylation

\* [基金项目] 山东省卫生厅科研项目 (2007H2035)

<sup>△</sup> [通信作者] 田凯华, E-mail: tiankaihua@163.com

目前,肺癌是最常见的呼吸系统恶性肿瘤,研究发现肺癌拥有所有癌症中最高的死亡率,其死亡人数约占所有癌症的 26%<sup>[1]</sup>。随着科学技术的不断进步,越来越多的治疗手段应用于肺癌,从化疗到靶向治疗再到免疫治疗<sup>[2]</sup>。虽然治疗方法在不断丰富,但医务工作者依然在努力寻找肺癌早期的诊断及治疗标志,从而完全攻克癌症。随着对表观遗传学的深入研究,我们发现表观遗传学的改变对于肺癌的发生起到不可替代的作用<sup>[3]</sup>。p14 在细胞生长过程中起到抑癌基因的作用<sup>[4]</sup>,而 p14ARF 基因启动子区域异常甲基化在肺癌与癌旁组织存在明显差异,提示 p14ARF 基因启动子区域异常甲基化与肺癌的发生发展有着密切的关系<sup>[5]</sup>。本实验利用巢式甲基化特异性 PCR(NMSP)对 spca1 细胞系进行甲基化分析,并通过 DAC 去除 p14ARF 基因启动子区域异常甲基化,检测其对 ARF 蛋白表达及肿瘤细胞凋亡的影响,由此得出 p14 启动子区异常甲基化对肺癌生物学功能的影响,初步研究去除 p14ARF 基因启动子区域异常甲基化对肺癌生物学功能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系及主要试剂

人肺癌细胞系 spca1、人支气管上皮细胞系 beas-2b 购自中科院上海细胞库;RPMI1640 培养基、胎牛血清购自 BI 公司;胰蛋白酶、双抗、ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒及 cck8 试剂盒购自 Solarbio 公司;5-氮杂-2 脱氧胞苷购自 MCE 公司;兔抗人 p14ARF、兔抗人  $\beta$ -actin 抗体、羊抗兔 IgG、RIPA 蛋白裂解液等试剂均购自 Abcam 公司;DNA 提取试剂盒 TIANamp Genomic DNA Kit、重亚硫酸修饰试剂盒、甲基化 pcr 试剂盒购自北京天根生化公司。

### 1.2 细胞培养

spca1 培养于含有 10% 胎牛血清与 1% 青链霉素的 RPMI1640 培养基中,beas2b 细胞培养于 BEGM 培养基中。培养箱条件为:5% CO<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度。

### 1.3 DNA 提取与修饰

按 TIANamp Genomic DNA Kit 试剂盒说明提取细胞 DNA,并测纯度在 1.8~2.0,用重亚硫酸盐修饰试剂盒对提取的基因组 DNA 进行修饰。将所有经亚硫酸氢盐转化的 DNA 样品储存在 -20℃ 直至后续 PCR。

### 1.4 DAC 处理

根据细胞类型及是否进行去甲基化处理将细胞分为 4 组,spca1 DAC 处理组、spca1 对照组、beas2b DAC 处理组、beas2b 对照组,每组设置 6 个复孔,其中各处理组用 10 $\mu$ M DAC 处理 4d。每天更换培养基和 DAC。

### 1.5 NMSP

NMPCR 引物由文献中查得<sup>[5]</sup>。p14ARF 外部引物是 5'-TGGGTTTTAGTTTGTAGTTAA-3'(正向)和 5'-CTCCTCAATAACATCAACAC-3'(反向)。甲基化特异性 p14ARF 引物是 5'-TTTTTGGTGTTA-AAGGGTGGTGTAGT-3'(未甲基化正向),5'-ACCA-CACACACACCAAATCCA-3'(未甲基化反向),5'-GTGTTAAAGGGCGCGGTAGC-3'(甲基化正向)和 5'-CGC-GACGAACCGCACGCGC-3'(甲基化反向)。对于亚硫酸氢钠修饰后的基因组 DNA 进行三轮 PCR,第一轮产物使用外部引物,产物包含目的基因,再将第一轮产物进行第二轮 PCR,实验步骤按照实验说明进行。最后得到的产物采用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳。

### 1.6 Western blot

用细胞刮擦除去细胞,并加入含有 1% 苯基甲磺酰氟(PMSF)的放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解缓冲液。然后,将生产物在冰上孵育 30min,并离心以除去细胞碎片。通过蛋白质定量试剂盒测定蛋白质浓度。在 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上将 50 $\mu$ g 蛋白质以 250mA 转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。将膜在含有 0.05% TBST 和 5% 脱脂奶粉的 TBS 中在室温下封闭 2h,然后加入 1:500 抗 ARF 抗体,1:1000  $\beta$ -肌动蛋白抗体,在 4℃ 保持过夜,用 TBST 洗涤。将膜孵育 3 次,然后与辣根过氧化物酶缀合的山羊抗兔二抗在 37℃ 下孵育 1h。使用 ECL 检测目的蛋白质。通过 Image J 软件定量条带的密度测定,实验重复 3 次。

### 1.7 流式细胞

为了评估细胞凋亡,将 4 组细胞分别消化并调节密度为 1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml,用冷 PBS 洗涤两次并加入 1ml binding buffer 以在离心后打浆,用 Annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI)对细胞进行荧光染色,由 FCM 检测细胞凋亡,实验重复 3 次。

### 1.8 统计学方法

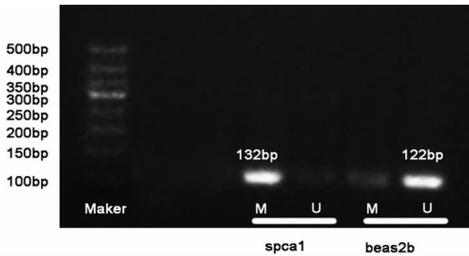
用 SPSS 进行统计学分析。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。通过 Student's *t* 检验分析两个独立组之间的

差异。检验水准为  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 p14 启动子区域甲基化状态

通过 NMSP 对 spca1 及 beas2b 细胞系进行 p14 基因启动子区甲基化状态进行检测,结果显示 spca1 细胞系 p14 基因启动子区呈甲基化状态,而 beas2b 此区域无甲基化。见图 1。



注:Maker, 分子量标记物;M,p14 启动子甲基化;U,p14 启动子非甲基化

图 1 各组细胞 p14 基因启动子甲基化情况

### 2.2 DAC 处理对细胞 ARF 蛋白表达的影响

我们用 DAC 使细胞 spca1 及 beas2b 细胞中的 p14 基因启动子区去甲基化,通过 Western blot 检测 ARF 蛋白表达,结果显示 DAC 处理的 spca1 细胞恢复了 ARF 蛋白的表达,而 beas2b 细胞 DAC 处理组与 beas2b 对照组表达无明显差异。这些结果表明去除 p14 启动子区域甲基化,可以使该蛋白重新表达。见图 2。

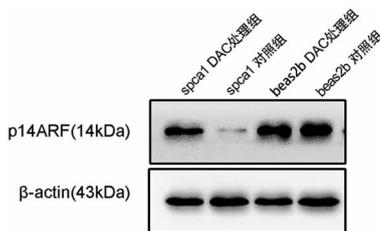
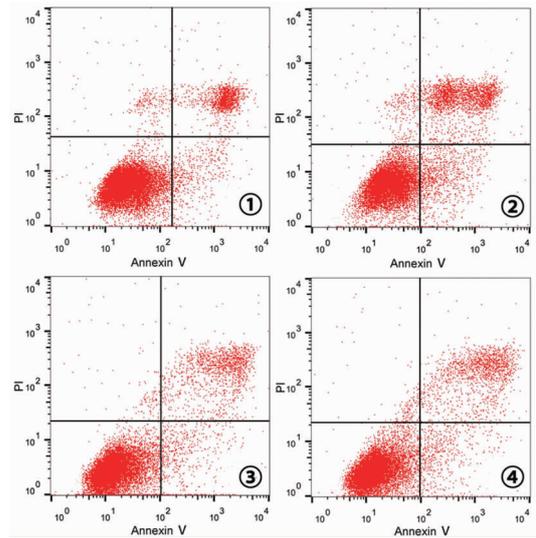


图 2 各组 p14ARF 蛋白表达情况

### 2.3 DAC 去甲基化处理对细胞凋亡的影响

应用  $10\mu\text{m}$  DAC 处理细胞 96h 后,经流式细胞检测,结果显示 spca1 DAC 处理组细胞凋亡率( $20.69 \pm 1.03$ )% 显著高于 spca1 对照组 ( $10.63 \pm 0.82$ )%, 差异有统计学意义 ( $t = 13.17, P < 0.05$ ); 而 beas2b DAC 处理组细胞凋亡率 ( $7.38 \pm 0.36$ )% 与 beas2b 对照组 ( $6.98 \pm 0.42$ )% 无显著差异,差异无统计学意义 ( $t = 1.25, P > 0.05$ )。该结果显示 p14 基因的去甲基化诱导 spca1 细胞的凋亡。见图 3。



注:①spca1 对照组;②spca1 DAC 处理组;③beas2b 对照组;④beas2b DAC 处理组

图 3 各组细胞凋亡情况

## 3 讨论

随着对表观遗传学的不断深入研究发现,DNA 甲基化作为表观遗传学的一部分,对于细胞正常的功能及癌症的发生发展都起到很重要的作用<sup>[6]</sup>。已有研究证明 p14ARF 在细胞中起到很多作用,p14 作为抑癌基因主要通过中和 E3 泛素连接酶 hMdm2 对癌细胞的抑制作用来稳定和激活 p53<sup>[7]</sup>,也有证据表明它可以通过 p53 非依赖途径来起到促使细胞周期停滞或凋亡,从而起到抑癌的作用<sup>[8-9]</sup>。导致 p14 基因的失活的因素有很多,本文主要针对 p14 基因启动子区域甲基化进行研究,验证其对 p14 表达的影响。

本文首先通过 NMSPCR 检测发现,肺癌肿瘤细胞系 spca1 中 p14ARF 启动子区域存在异常甲基化状态,而人正常支气管上皮细胞系 beas2b 此基因并未表现出异常甲基化,因此可以说明此区域甲基化对于肺癌的发展具有一定影响,这与它在肝癌、膀胱癌、肠癌等癌症中的发现结果一致<sup>[10]</sup>。已经有研究证明,ARF 的表达可以起到抑制癌症发生的作用<sup>[11]</sup>。本文结果显示 spca1 细胞系无 ARF 蛋白表达而 beas2b 细胞系此蛋白正常表达,证明 p14ARF 启动子区域甲基化抑制其蛋白的表达。

有研究表明,DAC 通过抑制 DNA 甲基转移酶 I 从而起到去甲基化的作用,从而可以恢复基因的作用<sup>[12]</sup>。因此,本文通过应用 DAC 处理 spca1 细胞系,使启动子异常甲基化的 p14 基因去除甲基

化,恢复 p14 基因的表达。根据 Western blot 检测结果,验证了 DAC 可恢复 ARF 蛋白表达的猜测。现有的研究表明,细胞凋亡是调控细胞正常生长与增值的重要因素<sup>[13]</sup>,而在癌细胞中细胞凋亡异常往往会导致癌细胞的异常增殖<sup>[14]</sup>。进而我们针对 ARF 恢复表达后对细胞凋亡的影响进行了检测,通过流式细胞凋亡检测显示 DAC 处理后 spca1 细胞系凋亡增加,而对于正常的 beas2b 细胞系以上检测结果均无明显差异。由此我们分析,这种差异的原因可能是恢复表达后的 p14 基因通过两条抑癌途径<sup>[15]</sup>,促进肺腺癌细胞凋亡,因此,可以得出 p14ARF 基因启动子区域异常甲基化可以抑制 ARF 蛋白的合成从而抑制肺癌细胞凋亡,使肺癌细胞异常增值。

综上所述,本文结果表明去除肺癌 p14ARF 启动异常甲基化对肺癌生物学功能存在影响,可以将其作为一种肺癌治疗靶点,或者影响其他抗癌药物的敏感性,为后续药物的研究提供一个研究方向。

#### 参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67 ( 1 ) : 7-30. DOI: 10. 3322/caac. 21387.
- [2] JWP B, Mayo-de-Las-Casas C, Berenguer J, et al. The present and future of liquid biopsies in non-small cell lung cancer: combining four biosources for diagnosis, prognosis, prediction, and disease monitoring [J]. *Curr Oncol Rep*, 2018, 20 ( 9 ) : 70. DOI: 10. 1007/s11912-018-0720-z.
- [3] Mehta A, Dobersch S, Romero-olmedo AL, et al. Epigenetics in lung cancer diagnosis and therapy [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2015, 34 ( 2 ) : 229-241. DOI: 10. 1007/s10555-015-9563-3.
- [4] Ito T, Nishida N, Fukuda Y, et al. Alteration of the p14 (ARF) gene and p53 status in human hepatocellular carcinomas [J]. *J Gastroenterol*, 2004, 39 ( 4 ) : 355-361. DOI: 10. 1007/s00535-003-1302-9.
- [5] Li L, Shen L, Wang M, et al. Tian. Identification of the methylation of p14 ARF promoter as a novel non-invasive biomarker for early detection of lung cancer [J]. *Clinical & Translational Oncology*, 2014, 16 ( 6 ) : 581-589. DOI: 10. 1007/s12094-013-1122-1.
- [6] Koch A, Joosten SC, Feng Z, et al. Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15 ( 7 ) : 459-466. DOI: 10. 1038/s41571-018-0004-4.
- [7] Sharpless NE. INK4 a/ ARF: a multifunctional tumor suppressor locus [J]. *Mutat Res*, 2005, 576 ( 1-2 ) : 22-38. DOI: 10. 1016/j. mrfmmm. 2004. 08. 021.
- [8] Weber JD, Jeffers JR, Rehg JE, et al. p53-independent functions of the p19 (ARF) tumor suppressor [J]. *Genes Dev*, 2000, 14 ( 18 ) : 2358-2365. DOI: 10. 1101/gad. 827300.
- [9] Mürer A, Overkamp T, Gillissen B, et al. p14 (ARF)-induced apoptosis in p53 protein-deficient cells is mediated by BH3-only protein-independent derepression of Bak protein through down-regulation of Mcl-1 and Bcl-xL proteins [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 ( 21 ) : 17343-17352. DOI: 10. 1074/jbc. M111. 314898.
- [10] Ozenne P, Eymin B, Brambilla E, et al. The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127 ( 10 ) : 2239-2247. DOI: 10. 1002/ijc. 25511.
- [11] Zindy F, Williams RT, Baudino TA, et al. Arf tumor suppressor promoter monitors latent oncogenic signals in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 ( 26 ) : 15930-15935. DOI: 10. 1073/pnas. 2536808100.
- [12] Karahoca M, Momparler RL. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy [J]. *Clin Epigenetics*, 2013, 5 ( 1 ) : 3, DOI: 10. 1186/1868-7083-5-3.
- [13] Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease [J]. *Cell*, 2011, 147 ( 4 ) : 742-758, DOI: 10. 1016/j. cell. 2011. 10. 033.
- [14] Shivapurkar N, Reddy J, Chaudhary PM, et al. Apoptosis and lung cancer: a review [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 88 ( 5 ) : 885-898. DOI: 10. 1002/jcb. 10440.
- [15] Ko A, Han SY, Song J. Regulatory network of ARF in cancer development [J]. *Mol Cells*, 2018, 41 ( 5 ) : 381-389. DOI: 10. 14348/molcells. 2018. 0100.

(收稿日期 2019-01-20)

(本文编辑:石俊强)