

食管癌Eca9706细胞中KRT19基因的 甲基化及表达

岳冬丽 董文杰 孙晓娟 樊青霞

郑州大学第一附属医院肿瘤科, 河南 郑州 450052

[摘要] 背景与目的: *KRT19*基因位于17q21.2, 编码CK19蛋白。*KRT19*基因启动子的甲基化在肾癌、神经母细胞瘤中已有报道, 而在食管癌中鲜见相关报道。本文研究甲基转移酶抑制剂5-氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)对食管癌Eca9706细胞株生长活性的影响, 并探讨5-Aza-CdR对食管癌Eca9706细胞株*KRT19*基因甲基化及其表达的影响。方法: 用MTT比色法检测不同浓度5-Aza-CdR处理前后Eca9706细胞的生长活性; 用结合重亚硫酸盐的限制性内切酶法(combined bisulfite restriction analysis, COBRA)检测应用5-Aza-CdR后与未用药对照组细胞的*KRT19*基因甲基化状态; 用Western blot法检测应用5-Aza-CdR后与未用药对照组细胞的*KRT19*基因蛋白的表达情况。结果: 5-Aza-CdR对食管癌Eca9706细胞系的增殖有抑制作用, 且呈时间、浓度依赖性; 食管癌Eca9706细胞株存在*KRT19*基因启动子区的甲基化; 对照组无*KRT19*蛋白的表达, 应用5-Aza-CdR后可以恢复其蛋白表达。结论: 5-Aza-CdR抑制食管癌Eca9706细胞的增殖; 5-Aza-CdR可以逆转*KRT19*基因启动子区的甲基化, 恢复其蛋白表达, *KRT19*基因启动子区的甲基化可能是其失表达的重要机制。这为食管癌诊疗提供了一个新的靶点。

[关键词] 食管癌; Eca9706细胞; *KRT19*基因; 结合重亚硫酸盐的限制性内切酶法; 甲基化

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2011.11.009

中图分类号: R735.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2011)11-0866-04

Methylation and expression of *KRT19* gene in esophageal Eca9706 cell line YUE Dong-li, DONG Wen-jie, SUN Xiao-juan, FAN Qing-xia (Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou Henan 450052, China)

Correspondence to: FAN Qing-xia E-mail: fqx2243@yahoo.com.cn

[Abstract] **Background and purpose:** *KRT19* gene located at 17q21.2, encodes the protein cytokeratin (CK) 19. It is reported that the methylation of *KRT19* gene promoter exists in renal cancer and neuroblastoma, but no relevant reports in esophageal cancer. The study investigated the effects of methyltransferase inhibitor 5-Aza-CdR on the growth activity of esophageal carcinoma cell line (Eca9706), and the influence of 5-Aza-CdR on the methylation and expression of *KRT19* gene in Eca9706 cell line. **Methods:** MTT assay was used to explore the growth activity of Eca9706 cell line before and after treating with 5-Aza-CdR. Combined bisulfite restriction analysis was employed to analyze the methylation status of *KRT19* gene. Western blot was utilized to detect the *KRT19* protein expression of 5-Aza-CdR group and untreated control group. **Results:** The proliferation of Eca9706 cell was inhibited by 5-Aza-CdR, showing time-dependence and concentration-dependence. The promoter of *KRT19* gene existed methylation in Eca9707 cell line. The *KRT19* protein was not expressed in the untreated control group and 5-Aza-CdR could restore its expression. **Conclusion:** 5-Aza-CdR inhibits proliferation of Eca9706 cell. 5-Aza-CdR can reverse methylation of *KRT19* gene promoter and restore its expression, so the methylation of *KRT19* gene promoter may be an important mechanism in its loss of expression. It provides a new target for treatment of esophageal cancer.

[Key words] Esophageal cancer; Eca9706 cell line; *KRT19* gene; Combined bisulfite restriction analysis; Methylation

食管癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,发病率在发展中国家较高,鳞癌占大多数。由于缺乏有效的早期诊断手段,故发现时大多数食管癌患者已是中晚期或已有淋巴结转移^[1]。食管癌的长期治疗效果并不理想,5年生存率为10%~20%^[2]。

*KRT19*基因位于17q21.2,编码CK19蛋白^[3],CK19蛋白是一种细胞角质素,是构成细胞骨架蛋白中间丝的成分。*KRT19*基因启动子的甲基化在肾癌^[4-5]、神经母细胞瘤^[6]中有报道。至今鲜有食管癌细胞中*KRT19*基因甲基化的相关报道。结合重亚硫酸盐的限制性内切酶法(combined bisulfite restriction analysis, COBRA)是一种甲基化检测方法,通过亚硫酸盐处理后,未甲基化的胞嘧啶会转化为尿嘧啶,甲基化的胞嘧啶不变,因此*Bst*U I只能消化切断甲基化的序列,而无法识别未甲基化的序列。本实验欲分析食管癌细胞*KRT19*基因甲基化与表达的关系。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

5-氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)(Sigma公司),RPMI-1640培养基(Solarbio公司),胎牛血清(Solarbio),胰酶(Solarbio公司),细胞基因组DNA提取试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司),甲基化修饰试剂盒(Qiagene公司),胶回收试剂盒(北京康为公司),限制性内切酶*Bst*U I (Biolabs公司),*Es* Taq MasterMix(TAKARA公司),MTT(Sigma公司),二甲基亚砜(DMSO公司),琼脂糖(Sigma公司),引物[生工生物工程(上海)有限公司],Actin抗体(Santa公司),*KRT19*抗体(Santa公司)。

1.2 细胞培养

食管癌Eca9706细胞株由本实验室保存。Eca9706细胞株为贴壁细胞,接种于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基(含100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素)中,置于37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养。取对数生长期的细胞进行实验,每隔2~3 d用消化液(0.25%的胰酶,0.02%EDTA)消化传代1次。

1.3 MTT法检测细胞生长活性

取对数生长期的Eca9706细胞,在96孔板中按4 000个细胞/孔接种Eca9706细胞,过夜贴

壁后去除旧的培养基,加入含5-Aza-CdR的培养基200 μL继续培养,每24 h更换1次含相同浓度5-Aza-CdR的培养基,按5-Aza-CdR终浓度分为:0、0.5、5、25和50 μmol/L 5组,每组设5复孔,24、48和72 h各时间点分别取一板,每孔加入20 μL MTT溶液(5 g/L),37℃继续培养4 h后弃去培养基,每孔再加入150 μL DMSO,水平摇床摇10 min,于酶标仪570 nm读取吸光度值(*D*值),其增殖能力大小以平均吸光度值分析。细胞增殖抑制率=(1-实验孔吸光度均值/对照组吸光度均值)×100%。

1.4 COBRA检测Eca9706细胞株中*KRT19*基因的甲基化状态

(1)细胞分组:取对数生长期的Eca9706细胞,将细胞以 8×10^4 /mL的密度接种于6孔板,过夜贴壁后去除旧的培养基,加入含5-Aza-CdR培养基继续培养,每孔培养基的总体积为2 mL,每24 h更换1次含相同浓度5-Aza-CdR的培养基,按5-Aza-CdR终浓度分为:0、0.5、5、20 μmol/L 4组,作用72 h后用于后续实验。(2)DNA提取:细胞基因组DNA提取严格按照说明书操作,用紫外分光光度计检测DNA的浓度和纯度。(3)亚硫酸氢钠修饰:严格按照试剂盒说明书进行操作。(4)PCR反应:*KRT19*的上游引物为5'-GTA AAT TTT TTA GGG TTT AGA TAT-3',下游引物为5'-CCC AAA CCC CTA CTT CTA ATA CC-3'。扩增条件:预变性94℃ 2 min;94℃ 30 s,退火56℃ 30 s,72℃ 30 s,35个循环;终末延伸72℃ 10 min。(5)琼脂糖凝胶电泳:取PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后采用凝胶成像仪观察结果并照相。(6)胶回收:将单一目的DNA条带从琼脂胶中切下,严格按照说明书操作,最后得到目的DNA溶液。(7)*Bst*U I酶消化:60℃反应2 h。(8)琼脂糖凝胶电泳:取酶切后产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳后采用凝胶成像仪观察结果并照相。

1.5 Western blot分析*KRT19*蛋白的表达

(1)细胞分组:取对数生长期的Eca9706细胞,将细胞以 8×10^4 /mL的密度接种于6孔板,过夜贴壁后去除旧的培养基,实验组加入含5-Aza-CdR浓度为5 μmol/L的培养基继续培养,每24 h更换1次含相同浓度5-Aza-CdR的培养基,作用72 h后用于后续实验。以同期培养的不加任何药物处理的细胞为对照组。(2)蛋白提取:具体步骤同参考文献[7],最后采

用DAB显色。

1.6 统计学处理

用SPSS 17.0软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用非参数检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-Aza-CdR对食管癌Eca9706细胞增殖的影响

显微镜下观察可见对照组食管癌Eca9706细胞呈快速增殖趋势, 加药组则增殖速度较慢, 较稀疏。5-Aza-CdR对食管癌Eca9706细胞的增殖有明显抑制作用, 并呈时间、浓度依赖性(表1)。

2.2 5-Aza-CdR对食管癌Eca9706细胞株中KRT19基因的甲基化状态的影响

Eca9706细胞经KRT19引物合成500 bp的目的条带(图1), 目的条带经胶回收后进行限制性内切酶BstU I 酶消化反应(图2), 目的条带可以被切开, 500 bp条带消失, 说明KRT19基因存在甲基化。经药物处理后的Eca9706细胞的目的条带部分被切开, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 药物组作用不明显, 5、20 $\mu\text{mol/L}$ 药物组未被切开的条带较明显, 且随着药物浓度的增加未被切开的条带越亮, 说明5-Aza-CdR有去甲基化作用, 使酶切位点恢复去甲基化状态, 且作用随着浓度的增加逐渐增强。

2.3 5-Aza-CdR处理前后食管癌Eca9706细胞株中KRT19蛋白表达水平的变化

经Western blot分析发现, 对照组细胞中无KRT19蛋白表达, 经5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR处理72 h后可见KRT19蛋白恢复表达, 说明KRT19基因因甲基化而失去表达, 应用去甲基化药物5-Aza-CdR 72 h后可使KRT19基因去甲基化而

恢复蛋白表达(图3)。

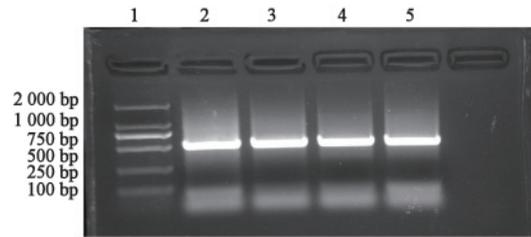


图1 甲基化修饰后PCR产物的琼脂糖电泳图片

Fig. 1 PCR gel electrophoresis of KRT19 gene after bisulfite conversion

1: Marker; 2: Control; 3: 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR; 4: 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR; 5: 20 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR.

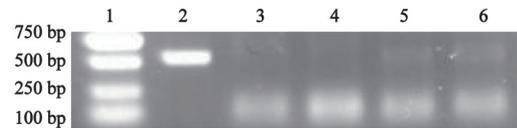


图2 COBRA法-限制性内切酶BstU I 酶切图片

Fig. 2 COBRA gel electrophoresis of KRT19 gene after digested by BstU I

1: Marker; 2: Control; 3-6: The results after digested by BstU I; 3: 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR; 4: 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR; 5: 20 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR.



图3 食管癌Eca9706细胞中KRT19蛋白表达

Fig. 3 The expression of KRT19 protein in Eca9706 cells

3 讨论

根据全国调查资料统计, 20世纪70年代

表1 食管癌Eca9706细胞在不同浓度5-Aza-CdR作用后增殖抑制率的变化

Tab. 1 The inhibiting rate of different concentrations of 5-Aza-CdR on the growth of Eca9706 cells

5-Aza-CdR / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Inhibiting rate at 24 h/%	Inhibiting rate at 48 h/%	Inhibiting rate of 72 h/%	Kruskal Wallis Test	
0 (control)	0	0	0		
0.5	7.52 \pm 14.28	23.75 \pm 12.30 ^{▲*}	30.52 \pm 13.80 ^{▲*}	H=12.577	P<0.05
5	21.45 \pm 22.73 [*]	39.98 \pm 13.31 ^{▲**}	55.53 \pm 12.38 ^{▲◆**}	H=17.377	P<0.05
25	35.85 \pm 9.34 ^{**}	53.49 \pm 10.12 ^{▲**}	64.04 \pm 5.89 ^{▲◆**}	H=21.744	P<0.05
50	45.83 \pm 12.63 ^{**◇}	61.49 \pm 5.06 ^{▲**◇}	73.69 \pm 6.96 ^{▲◆**◇}	H=19.149	P<0.05
Kruskal Wallis Test	H=51.504 P<0.05	H= 61.384 P<0.05	H=63.609 P<0.05		

Kruskal Wallis Test: the same time after 5-Aza-CdR treatment; ^{*}: $P<0.005$ vs control group; ^{**}: $P<0.005$ vs 0.5 $\mu\text{mol/L}$ group; [◇]: $P<0.005$ vs 5 $\mu\text{mol/L}$ group; [△]: $P<0.005$ vs 25 $\mu\text{mol/L}$ group (Test level $\alpha=0.05/10=0.005$). The same concentration for different time after 5-Aza-CdR treatment, [▲]: $P<0.0167$ vs 24 h group; [◆]: $P<0.0167$ vs 48 h group (Test level $\alpha=0.05/3=0.0167$).

中期我国食管癌死亡率平均为16.7%，中调率(中国人口年龄构成计算调整率)14.59%，世调率(世界人口构成计算调整率)为23.40%。食管癌死亡在恶性肿瘤中占21.8%，死因在胃癌之后，居恶性肿瘤第2位^[8]。

目前越来越多的证据表明，表观遗传学改变是抑癌基因失活的一个重要机制。表观遗传学改变指基因不发生改变的前提下，基因表型发生可遗传的、无DNA序列变化的改变，包括DNA甲基化、组蛋白修饰、基因印记、染色质重塑等改变。近年来的研究显示，一些抑癌基因启动子区CpG岛的甲基化使抑癌基因失表达，导致癌细胞的侵袭转移能力增强。

KRT19在肝细胞癌中过度表达与转移相关。血清KRT19水平可反映一些肝癌的病理进展，并可作为预测转移的指标及已经发生转移的肝癌患者治疗靶点^[9]。Paiva等^[5]报道KRT19基因在肾癌细胞系中因启动子的甲基化而失表达，两者呈负相关，然而与肾癌细胞系相反，在组织中KRT19基因的甲基化与表达无相关性，可能存在表观遗传学以外的因素影响基因的表达。Morris等^[4]也发现肾癌细胞株KRT19基因甲基化而失表达，经5 μmol/L 5-Aza-CdR处理后使mRNA恢复表达，在原发的肾癌组织中KRT19基因的甲基化率为38%(n=66)，在正常肾组织中未发现甲基化。Margetts等^[10]通过KRT19基因测序证明其5' CpG岛在神经母细胞瘤的3种细胞株(SK-N-F1、SK-N-BE和SK-N-DZ)存在高甲基化。

本实验MTT分析显示，5-Aza-CdR对Eca9706细胞的增殖有抑制作用，且呈时间、浓度的依赖性，在倒置显微镜中明显可见药物组细胞稀疏。在食管癌Eca9706细胞中，BstU I酶可以完全切开对照组和0.5 μmol/L 5-Aza-CdR组KRT19基因的甲基化PCR产物，而5、20 μmol/L 5-Aza-CdR组未能完全切开，证明其启动子存在甲基化，5-Aza-CdR可以使KRT19基因启动子去甲基化，从而使得BstU I酶无法切开。这是由于目的基因启动子若没有甲基化则在重亚硫酸盐修饰时会使未甲基化

的胞嘧啶变为胸腺嘧啶，导致BstU I酶无法切断该片段，反之若启动子存在甲基化，在重亚硫酸盐修饰时胞嘧啶不会改变，BstU I酶才可以识别酶切位点。本实验证明KRT19基因在Eca9706细胞中有启动子的甲基化，其启动子的甲基化是导致基因沉默的一个重要机制。

本实验是在食管癌细胞株中研究KRT19基因甲基化与表达的关系，未在组织标本做相关研究，没有体内实验的证据，今后将进一步研究KRT19基因甲基化与沉默的具体机制，为研究食管癌的发生、发展提供依据。

[参 考 文 献]

- [1] 徐淑宁, 何炜, 李克, 等. 沙利度胺联合PTX与NDP方案治疗晚期食管鳞癌的临床观察 [J]. 中华肿瘤, 2010, 17(9): 690-692.
- [2] 王琳, 樊青霞, 杜雅冰. 晚期食管癌三种化疗方案的疗效对比分析 [J]. 中国全科医学, 2008, 14(4B): 1250-1252.
- [3] BADER B L, JAHN L, FRANKE W W. Low level expression of cytokeratins 8, 18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene [J]. Eur J Cell Biol, 1988, 47(2): 300-319.
- [4] MORRIS M R, GENTLE D, ABDULRAHMAN M, et al. Functional epigenomics approach to identify methylated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma [J]. Br J Cancer, 2008, 98(2): 496-501.
- [5] PAIVA F, DUARTE-PEREIRA S, COSTA V L, et al. Functional and epigenetic characterization of the KRT19 gene in renal cell neoplasms [J]. DNA Cell Biol, 2011, 30(2): 85-90.
- [6] CARÉN H, DJOS A, NETHANDER M, et al. Identification of epigenetically regulated genes that predict patient outcome in neuroblastoma [J]. BMC Cancer, 2011, 11(66): 1-11.
- [7] 吕东津, 许哲源, 王平, 等. STK33基因在非小细胞肺癌中表达的临床研究 [J]. 中国癌症杂志, 2010, 20(8): 588-595.
- [8] 邹小农. 食管癌流行病学 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(18): 1-4.
- [9] DING S J, LI Y, TAN Y X, et al. From proteomic analysis to clinical significance: overexpression of cytokeratin 19 correlates with hepatocellular carcinoma metastasis [J]. Mol Cell Proteomics, 2004, 3(1): 73-81.
- [10] MARGETTS C D, MORRIS M, ASTUTI D, et al. Evaluation of a functional epigenetic approach to identify promoter region methylation in pheochromocytoma and neuroblastoma, endocrine-related cancer [J]. Endocr-Relat Cancer, 2008, 15(3): 777-786.

(收稿日期: 2011-08-05 修回日期: 2011-10-12)