

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.02.008

# 5-Aza-dC 对胰腺癌细胞系 Panc-1 中 TFPI-2 基因甲基化水平及表达的影响

郑浩, 汤志刚

**Effect of 5-Aza-dC on Expression and Methylation of TFPI-2 Gene in Panc-1 Pancreatic Cancer**

Zheng Hao, Tang Zhigang

Department of General Surgery, Affiliated Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, China

Corresponding Author: Tang Zhigang, E-mail: tangzg7031@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the effects of 5-aza-2',-deoxycytidine(5-Aza-dC), a methylation inhibitor, on the expression and methylation of TFPI-2 gene in Panc-1 cell lines of pancreatic cancer. **Methods** Panc-1 cell line was treated with different dosages of 5-Aza-dC. TFPI-2 gene DNA, mRNA and protein were determined by MSP, RT-PCR and Western blot respectively. **Results** MSP detection showed that the TFPI-2 gene hypermethylation has effectively been reversed by 5-Aza-dC. Moreover, the expression levels of TFPI-2 mRNA treated with 5-Aza-dC were increased ( $0.211 \pm 0.087, 0.327 \pm 0.068$  and  $0.609 \pm 0.017$ , respectively). Western blot indicated that 5-Aza-dC could recover the TFPI-2 protein expression ( $0.429 \pm 0.121, 0.675 \pm 0.044$  and  $1.132 \pm 0.124$  respectively). These effects within certain extent were dose and time dependent with statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The hypermethylation of promoter region was a main cause for transcriptional inactivation of TFPI-2 gene in Panc-1 cell lines. 5-Aza-dC might effectively reactivate the gene transcription through a demethylation role.

**Key words:** Pancreatic cancer; Panc-1; TFPI-2 gene; Methylation; 5-Aza-dC

**摘要:目的** 探讨甲基化酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-dC)对胰腺癌细胞系 Panc-1 中抑癌基因组织因子途径抑制物-2(TFPI-2)甲基化水平及基因表达的影响。**方法** 用不同浓度 5-Aza-dC 处理胰腺癌细胞系 Panc-1。用甲基化特异性 PCR(MS-PCR),反转录聚合酶链(RT-PCR)及蛋白印迹实验(Western blot)检测药物处理前后 Panc-1 细胞 TFPI-2 基因的甲基化状态, mRNA 及蛋白表达的改变。**结果** MSP 检测 Panc-1 细胞 TFPI-2 基因药物作用后异常甲基化得到逆转, RT-PCR 检测到不同浓度 5-Aza-dC 处理后 TFPI-2 基因 mRNA 重新表达, 相对表达量分别为 ( $0.211 \pm 0.087$ ), ( $0.327 \pm 0.068$ ), ( $0.609 \pm 0.017$ ), Western blot 检测 TFPI-2 基因蛋白重新表达, 相对表达量分别为 ( $0.429 \pm 0.121$ ), ( $0.675 \pm 0.044$ ), ( $1.132 \pm 0.124$ ), 以上作用呈时间、剂量依赖性 ( $P < 0.05$ ), 差异具有统计学意义。**结论** 胰腺癌细胞系 Panc-1 中抑癌基因 TFPI-2 启动子高甲基化可能是导致该基因表达下调甚至失活的主要原因。5-Aza-dC 能够较成功的逆转胰腺癌细胞 Panc-1 中 TFPI-2 基因的高甲基化状态, 并能恢复 TFPI-2 基因的 mRNA 及蛋白重新表达。

**关键词:** 胰腺癌; Panc-1; TFPI-2 基因; 甲基化; 5-氮杂-2'-脱氧胞苷

中图分类号: R735.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2012)02-0150-04

## 0 引言

胰腺癌是恶性程度最高的肿瘤之一, 其存活率在过去的 40 年中几乎没有任何改善, 5 年生存率仅 3%<sup>[1]</sup>。它的发生发展涉及到多个抑癌基因的异常

改变, 而抑癌基因的失活又涉及多种途径。其中, 抑癌基因启动子区 CpG 岛的高甲基化逐渐受到当今医学研究的重视, 并认为其可能是导致抑癌基因表达沉默甚至失活的主要原因之一<sup>[2]</sup>。本实验通过研究甲基化酶抑制剂 5-Aza-dC 对 Panc-1 细胞作用后 TFPI-2 基因的甲基化状态及该基因 mRNA 及蛋白表达的改变, 来探讨肿瘤发生发展过程中某些抑癌基因失活的可能机制及药物恢复抑癌基因表达的可能性, 以期探求胰腺癌治疗的新靶点及临床治疗的可能性。

收稿日期: 2011-05-24; 修回日期: 2011-09-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81071734)

作者单位: 230001 合肥, 安徽医科大学附属省立医院普外科胆胰病区

通信作者: 汤志刚, E-mail: tangzg7031@163.com

作者简介: 郑浩(1986-), 男, 硕士在读, 主要从事胰腺肿瘤的基础和临床研究

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

胰腺癌 Panc-1 细胞系购自南京凯基生物公司, DNA 提取试剂盒购自天根公司, DNA 修饰试剂盒购自 EPIGENTEK 公司, Taq DNA 聚合酶、dNTPs 均购自 Takara 公司, PCR 引物由大连宝生物工程公司合成。RNA 抽提试剂 Trizol Regent 购自 Gibco BRL 公司, RT-PCR 试剂盒购自 Thermo 公司, 单克隆抗鼠 TFPI-2 抗体购自 Santa Cruz 公司, Western blot 相关试剂购自碧云天公司。

### 1.2 细胞培养及药物处理分组

胰腺癌 Panc-1 细胞系用含 10% 胎牛血清, 100 u/ml 青霉素及 100  $\mu$ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。取对数生长期细胞进行实验。实验分组: (1) 对照组: 同期培养不加药的 Panc-1 细胞培养 96 h, 只换液; (2) 用含 5-Aza-dC 浓度为  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 的 DMEM 培养液培养 96 h。 (3) 用含 5-Aza-dC 浓度为  $5 \times 10^{-7}$  mol/L 的 DMEM 培养液培养 96 h。 (4) 用含 5-Aza-dC 浓度为  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 的 DMEM 培养液培养 96 h。

### 1.3 甲基化特异性 PCR

按 DNA 抽提试剂盒说明提取上述四组细胞 DNA, 用紫外分光光度计测 DNA 浓度, 取 DNA 1  $\mu$ g 使用 DNA 修饰试剂盒进行亚硫酸氢盐修饰, 按照试剂盒说明书操作, MSP 引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计, 甲基化上游引物: 5'-TTT CGT ATA AAG CGG GTA TTC-3', 下游引物: 5'-ACG ACC CGC TAA ACA AAA CG-3', 非甲基化上游引物: 5'-GGA TGT TTG TTT TGT ATA AAG TG-3', 非甲基化下游引物: 5'-AAA CAT CCA AAA AAA CAC CTA AC-3'。PCR 反应总体积为 25  $\mu$ l, PCR buffer 2.5  $\mu$ l, 2.5mM dNTP Mixture 0.5  $\mu$ l, 上游引物 0.5  $\mu$ l, 下游引物 0.5  $\mu$ l, Taq 酶 0.5  $\mu$ l, 修饰后的 DNA 模板 2.0  $\mu$ l, 三蒸水 18.5  $\mu$ l 补足总体积。反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 20 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 52 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 45 s; 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。用未经 5-Aza-dC 处理的 Panc-1 细胞和正常胰腺组织作为阳性和阴性对照, 用无菌双蒸水作为空白对照。取 5  $\mu$ l PCR 产物于 1% 的 PAGE 胶中, 100 V 电泳 40 min, 于凝胶成像系统中成像并摄像。

### 1.4 RT-PCR 检测 Panc-1 细胞 TFPI-2 基因 mRNA 的表达情况

用 Trizol 试剂提取上述四组细胞的总 RNA, 紫外分光光度计检测其浓度和纯度。采用两步法 RT-PCR 合成 TFPI-2 DNA, 引物采用 Primer Premier

5.0 软件设计, TFPI-2 上游引物: 5'-CAG AAT TCT ATG GAC CCC GCT CGC CCC-3' 下游引物: 5'-CAG TCG ACT TAA AAT TGC TTC TTC CG-3'。 $\beta$ -actin 作为内参照。反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 56 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s; 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 5 min。用未经 5-Aza-dC 处理的 Panc-1 细胞和正常胰腺组织作为阳性和阴性对照, 用无菌双蒸水作为空白对照。1% 琼脂糖凝胶电泳, 于凝胶成像系统上成像并摄像, 以目的基因条带吸光度(A)值/ $\beta$ -actin 条带吸光度(A)值作为 TFPI-2 mRNA 的相对表达强度。

### 1.5 Western blot 分析 Panc-1 细胞 TFPI-2 蛋白的表达情况

在上述四组细胞每瓶细胞中加入 495  $\mu$ l RIPA 裂解液和 5  $\mu$ l 蛋白酶抑制剂 PMSF 的混合液于冰上裂解 30 min。15 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心, 10 min 后取上清液提取总蛋白, Bradford 法蛋白定量。总蛋白 99 $^{\circ}$ C 变性 10 min 后, 配置浓度为 12% 的 SDS-PAGE 凝胶, 进行蛋白质电泳, 蛋白电泳分离后经电转移槽转移至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, PVDF 膜置于 1:500 稀释的 TFPI-2 单克隆抗体稀释液中 4 $^{\circ}$ C 冰箱内培养过夜, TBST 洗膜 30 min, 再置于 1:10 000 稀释的 HRP 标记的兔抗鼠 IgG 稀释液中 37 $^{\circ}$ C 培养 60 min, TBST 洗膜 30 min 后加入 ECL 发光液显色曝光。用未经 5-Aza-dC 处理的 Panc-1 细胞和正常胰腺组织作为阳性和阴性对照, 用无菌双蒸水作为空白对照。凝胶成像系统摄像并分析各条带吸光度值, 以目的基因条带吸光度(A)值/ $\beta$ -actin 条带吸光度(A)值作为 TFPI-2 蛋白的相对表达强度。

### 1.6 甲基化特异性 PCR 检测 45 例胰腺肿瘤患者肿瘤组织 TFPI-2 基因甲基化状态

选取 2010 年 1 月至 2010 年 12 月安徽医科大学附属省立医院胰腺癌患者肿瘤切除标本 45 例, 及距癌组织 5 cm 的相应癌旁组织 45 例, 30 例为男性(66.67%), 15 例为女性(33.33%), 平均年龄为(57.76  $\pm$  9.90)岁。8 例正常胰腺组织取自外伤剖腹探查患者及因胰腺囊肿行手术切除的患者。所有标本切取后立即置于液氮罐中保存, 所有病例术前均未经放疗、化疗, 且均经病理确诊。用组织 DNA 提取试剂盒提取 DNA 后按上述 MSP 方法进行检测。判定标准: 完全甲基化: 甲基化特异性引物扩增出条带, 非甲基化特异性引物未扩增出条带; 不完全甲基化: 甲基化和非甲基化特异性引物均扩增出条带, 可能是因为肿瘤细胞的一个等位基因发生了甲基化而另一个没有发生甲基

化造成的,此种情况也定义为甲基化阳性;非甲基化:甲基化和非甲基化特异性引物均未扩增出条带。

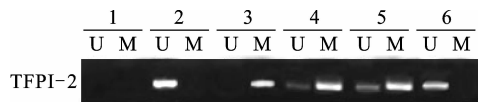
### 1.7 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,进行方差分析和 *t* 检验及其他统计处理, $P < 0.05$  表示两组差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Panc-1 细胞 TFPI-2 基因甲基化状态

未经 5-Aza-dC 作用的 Panc-1 细胞只有甲基化特异性引物扩增出条带,为完全甲基化。用含浓度为  $(1 \times 10^{-7})$  mol/L,  $(5 \times 10^{-7})$  mol/L 的 5-Aza-dC 培养液培养 4 d 的 Panc-1 细胞甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物均扩增出条带,为不完全甲基化,而用浓度为  $(1 \times 10^{-6})$  mol/L 的 5-Aza-dC 处理的 Panc-1 细胞只有非甲基化特异性引物扩增出条带,为非甲基化,见图 1。



1: H<sub>2</sub>O; 2: Normal pancreas tissue; 3: Panc-1 cell; 4:  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 5-Aza-dC; 5:  $5 \times 10^{-7}$  mol/L 5-Aza-dC; 6:  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 5-Aza-dC; M: methylated products; U: unmethylated products

图 1 不同浓度 5-Aza-dC 对 Panc-1 细胞 TFPI-2 基因甲基化状态的影响

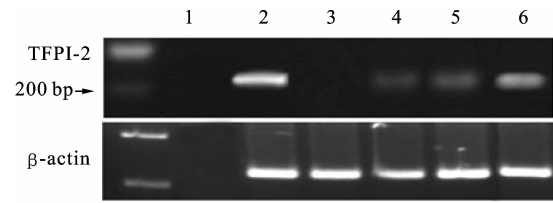
Figure 1 The effects of different dosages 5-Aza-dC on the methylation of TFPI-2 gene in Panc-1

### 2.2 Panc-1 细胞 TFPI-2 基因 mRNA 表达情况

未经 5-Aza-dC 作用前,Panc-1 细胞 TFPI-2 基因 mRNA 未见表达,而经不同浓度的 5-Aza-dC 处理后,均可见 Panc-1 细胞 TFPI-2 基因 mRNA 产物条带的表达。三种浓度作用后其相对值分别为  $(0.211 \pm 0.087)$ ,  $(0.327 \pm 0.068)$ ,  $(0.609 \pm 0.017)$ ,经统计学分析, $1 \times 10^{-7}$  mol/L 浓度组与  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 浓度组比较, $5 \times 10^{-7}$  mol/L 浓度组与  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 浓度组比较,差异具有统计学意义 ( $P = 0.039, 0.044$ ),见图 2。

### 2.3 Panc-1 细胞 TFPI-2 基因蛋白表达情况

Western blot 结果显示,未经 5-Aza-dC 作用前,Panc-1 细胞无 TFPI-2 基因蛋白的表达。经不同浓度 5-Aza-dC 处理 4 d 后,各组 Panc-1 细胞均有 TFPI-2 蛋白的表达。可见在相对分子质量为 27 kD 处不同灰度值条带的表达。通过计算机扫描后分析,其各组细胞表达蛋白的相对值分别为  $(0.429$

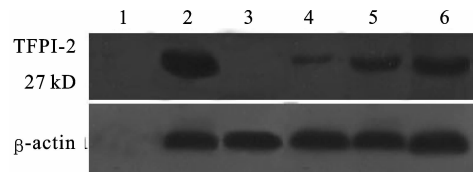


1: H<sub>2</sub>O; 2: Normal pancreas tissue; 3: Panc-1 cell; 4:  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 5-Aza-dC; 5:  $5 \times 10^{-7}$  mol/L 5-Aza-dC; 6:  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 5-Aza-dC

图 2 不同浓度 5-Aza-dC 对 Panc-1 细胞 TFPI-2 mRNA 表达的影响

Figure 2 The effects of different dosages 5-Aza-dC on the expression of TFPI-2 gene mRNA in Panc-1

$\pm 0.121)$ ,  $(0.675 \pm 0.044)$ ,  $(1.132 \pm 0.124)$ ,经统计学分析, $1 \times 10^{-7}$  mol/L 浓度组与  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 浓度组比较, $5 \times 10^{-7}$  mol/L 浓度组与  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 浓度组比较,差异具有统计学意义 ( $P = 0.006, 0.045$ ),见图 3。



1: H<sub>2</sub>O; 2: Normal pancreas tissue; 3: Panc-1 cell; 4:  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 5-Aza-dC; 5:  $5 \times 10^{-7}$  mol/L 5-Aza-dC; 6:  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 5-Aza-dC

图 3 不同浓度 5-Aza-dC 对 Panc-1 细胞 TFPI-2 蛋白表达的影响

Figure 3 The effects of different dosages 5-Aza-dC on the expression of TFPI-2 gene protein in Panc-1

### 2.4 45 例胰腺肿瘤组织及癌旁组织 TFPI-2 基因甲基化状态

45 例胰腺癌患者中 TFPI-2 基因甲基化阳性化率达到 71.11% (32/45) (包括完全甲基化和不完全甲基化),明显高于癌旁组织的 31.1% (14/45),差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。8 例正常胰腺组织中无一例发生甲基化。

## 3 讨论

人类组织因子途径抑制物-2 (TFPI-2),又名胎盘蛋白-5,是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂。它能够抑制细胞外基质 (ECM) 的降解,抑制肿瘤细胞的增殖,从而在抑制肿瘤细胞的浸润和转移等一系列生理病理过程中发挥重要的作用<sup>[3-4]</sup>。已经有研究证实,在胃癌、神经胶质瘤、乳腺癌等多种肿瘤中<sup>[5-10]</sup>,TFPI-2 基因的表达明显减弱,甚至失活,而导致该基因失活的主要原因可能正是因为该基因启动子区

出现了异常的高甲基化。我们对 45 例胰腺癌患者 TFPI-2 基因甲基化状态的研究后发现,肿瘤组织 TFPI-2 基因的甲基化阳性率明显高于癌旁正常组织和正常胰腺组织,而胰腺肿瘤组织中 TFPI-2 基因低表达我们也已经在前期的实验中得到证实<sup>[11]</sup>,我们考虑,异常甲基化可能是导致 TFPI-2 基因失活的主要原因,那么使因异常甲基化而失活的抑癌基因去甲基化以恢复活性就可能成为一条治疗胰腺肿瘤的新的思路。5-Aza-dC 作为一种甲基化酶抑制剂,能与 DNA 甲基化酶共价结合,抑制该酶的甲基化转移活性,从而逆转抑癌基因的高甲基化状态,恢复该基因的 mRNA 转录活性和蛋白表达<sup>[12]</sup>。我们希望通过实验来研究是否可以通过甲基化酶抑制剂 5-Aza-dC 的去甲基化作用来恢复胰腺癌 Panc-1 细胞中 TFPI-2 基因的活性,使之重新表达以及去甲基化的作用与 5-Aza-dC 剂量之间的关系。

本研究发现,随着 5-Aza-dC 作用浓度的升高,TFPI-2 基因的异常甲基化状态逐步得到逆转,相应的 mRNA 及蛋白也逐步得到表达,并且作用效果呈剂量依赖性。由此可见,甲基化酶抑制剂 5-Aza-dC 可通过使因启动子区高甲基化而失活的 TFPI-2 基因的异常甲基化状态得到逆转,而使该抑癌基因恢复其转录活性,以使该基因在肿瘤的发生发展中发挥可能的抑制肿瘤的作用。肿瘤的发生发展涉及多种途径和多种基因的改变,其中表观遗传学的变化逐渐受到医学研究的重视。异常甲基化是表观遗传学研究的一个重要内容,往往是导致抑癌基因失活的主要原因。我们希望能通过对 5-Aza-dC 的进一步研究,来寻求胰腺肿瘤治疗的新靶点。

参考文献:

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.  
 [2] Xie F, Xiang XY, Zhang JC, et al. Methylation of retinoic acid receptor  $\beta_2$  promoter in sporadic breast cancer tissue[J]. Cancer

Res Prev Treat, 2011, 38(4): 408-410. [谢飞, 向希映, 张吉才, 等. RAR- $\beta_2$  基因启动子异常甲基化与散发性乳腺癌的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(4): 408-410.]  
 [3] Du X, Chand HS, Kisiel W. Human tissue factor pathway inhibitor-2 does not bind or inhibit activated matrix metalloproteinase-1[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1621(3): 242-245.  
 [4] Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities[J]. Cell Sci, 2002, 115 (Pt 19): 3719-3727.  
 [5] Konduri SD, Srivenugopal KS, Yanamandra N, et al. Promoter methylation and silencing of the tissue factor pathway inhibitor-2, a gene encoding an inhibitor of matrix metalloproteinases in human glioma cells[J]. Oncogene, 2003, 22(29): 4509-4516.  
 [6] Hisashi Takada, Naoki Wakabayashi, Osamu Dohi, et al. Tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2) is frequently silenced by aberrant promoter hypermethylation in gastric cancer [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 197(1): 16-24.  
 [7] Guo H, Lin Y, Zhang H, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 was repressed by CpG hypermethylation through inhibition of KLF6 binding in highly invasive breast cancer cells[J]. BMC Mol Biol, 2007, 8: 110.  
 [8] Nobeyama Y, Okochi-Takada E, Furuta J, et al. Silencing of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in malignant melanomas [J]. Int J Cancer, 2007, 121(2): 301-307.  
 [9] Glöckner SC, Dhir M, Yi JM, et al. Methylation of TFPI2 in stool DNA: a potential novel biomarker for the detection of colorectal cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(11): 4691-4699.  
 [10] Tsunoda S, Smith E, De Young NJ, et al. Methylation of CLDN6, FBN2, RBP1, RBP4, TFPI2, and TMEFF2 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Oncol Rep, 2009, 21(4): 1067-1073.  
 [11] Sun ZY, Tang ZG, Hu HJ, et al. Expression of TFP1-2 and VEGF in pancreatic carcinoma angiogenesis[J] Chin J Clin Oncol, 2007, 34(23): 1327-1329. [孙振阳, 汤志刚, 胡何节, 等. TFPI-2 与 VEGF 在胰腺癌中的表达[J]. 中国肿瘤临床, 2007, 34(23): 1327-1329.]  
 [12] Jones PA. DNA methylation errors and cancer[J]. Cancer Res, 1996, 56(11): 2463-2467

[编辑:周永红;校对:刘红武]