

甲基化寡核苷酸灭活 DKK3 基因对肝癌细胞增殖的影响

李侨¹, 丁丽娟¹, 蔡骊骊²

1. 第二军医大学学员旅, 上海 200082; 2. 上海市利群医院消化内科

摘要: **目的** 研究甲基化寡核苷酸灭活 Dickkopf 相关蛋白 3(Dickkopf-related protein 3, DKK3) 基因对 HepG2 肝癌细胞增殖的影响。**方法** 采用甲基化特异性 PCR 法检测肝癌细胞 DKK3 基因启动子甲基化状态。将寡核苷酸(分别为 MON 组、UMON 组、CON1 组和 CON2 组)转染 HepG2 肝癌细胞,比较转染后 DKK3 基因启动子甲基化状态、细胞增殖和凋亡的差异。**结果** HepG2 肝癌细胞 DKK3 基因启动子未检测到甲基化,Hep3B、SMMC-7721 和 HuH-7 肝癌细胞 DKK3 基因启动子处于甲基化状态。MON 可成功诱导其互补序列 CG 位点产生甲基化,而 UMON、CON1 和 CON2 寡核苷酸无法诱导甲基化。UMON 组、CON1 组和 CON2 组 HepG2 肝癌细胞在 D0-D6 吸光度、G₀/G₁ 期、S 期、G₂/M 期、增殖指数(proliferation index, PI)和凋亡率方面差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);MON 组 HepG2 肝癌细胞 G₀/G₁ 期比例和凋亡率均显著低于 UMON 组、CON1 组和 CON2 组(均 $P<0.05$),而 D1-D6 吸光度、S 期、G₂/M 期和 PI 均显著高于 UMON 组、CON1 组和 CON2 组。**结论** 甲基化寡核苷酸可成功诱导 DKK3 基因甲基化,导致 HepG2 肝癌细胞细胞增殖增加而凋亡下降。

关键词: 甲基化寡核苷酸; DKK3; 肝癌; 细胞增殖

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**B **文章编号:**1006-3110(2018)10-1258-03 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2018.10.032

Dickkopf 相关蛋白 3(Dickkopf-related protein 3, DKK3)属于 Dickkopf 家族成员,研究发现其通过 Wnt 信号传导通路抑制细胞增殖及促进凋亡的作用^[1-2]。研究发现肝癌组织 DKK3 基因 mRNA 表达水平显著低于癌旁组织,推测可能与肝癌发病机制存在关联^[3]。甲基化寡核苷酸是人工合成的一段与靶基因互补的寡核苷酸序列,目前在多个研究中均证实甲基化寡核苷酸可成功诱导产生靶向基因沉默,为研究基因甲基化与肿瘤发病机制间的关联提供新思路。本研究采用互补甲基化寡核苷酸诱导灭活 HepG2 肝癌细胞 DKK3 基因,研究其对肝癌细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂 HepG2、Hep3B、SMMC-7721 和 HuH-7 肝癌细胞购于美国 ATCC 公司;新生牛血清(NCS)、高糖 DMEM 和 DNA 提取试剂购于武汉天根公司;Effectene 转染试剂购于美国 Qiagen 公司;甲基化检测试剂盒购于美国 ZYMO RESEARCH 公司;CCK-8 试剂盒购于碧云天公司;引物和甲基化寡核苷酸由 Takara 公司合成纯化。HepG2 肝癌细胞完全培养基由 10%NCS+90%高糖 DMEM,细胞培养条件为 37℃、5%CO₂ 无菌培养箱。

基金项目:第二军医大学教学研究与改革项目(JYA2016005)
作者简介:李侨(1995-),男,满族,辽宁本溪人,本科学历,学员,研究方向:消化病学。
通信作者:蔡骊骊, E-mail:caililicoco@126.com。

1.2 寡核苷酸序列 根据 DBTSS 数据库(<http://dbtss.hgc.jp/>)获取 DKK3 基因启动子序列设计甲基化寡核苷酸,序列见表 1,MON 和 DKK3 基因启动子序列互补且 CG 均为¹⁸CG,UMON 与 MON 序列相同但无¹⁸CG,CON1 为随机序列,与 DKK3 基因启动子不互补,且无¹⁸CG,CON2 含有¹⁸CG,但与 DKK3 基因启动子不互补。

表 1 MON、UMON 组、CON1 组和 CON2 组寡核苷酸碱基序列

分组	甲基化寡核苷酸序列
MON 组	G ¹⁸ CGCG ¹⁸ CGGGGCT ¹⁸ CGGGG ¹⁸ CGGGG ¹⁸ CGG
UMON 组	GCGGGCGGGGCTCGGGCGGGGGCGG
CON1 组	AATCGCAATTTCGCAAGCGATGTTCCG
CON2 组	AAT ¹⁸ CGCAATT ¹⁸ TCGCAAG ¹⁸ CGATGTT ¹⁸ CGC

1.3 寡核苷酸转染 HepG2 肝癌细胞融合度为 30% 时进行转染,根据 Effectene 转染试剂说明书操作,分别将 MON、UMON、CON1 和 CON2 寡核苷酸转染至 HepG2 肝癌细胞,转染后无菌 PBS 洗涤 3 次加入完全培养基培养,根据转染 MON、UMON、CON1 和 CON2 寡核苷酸序列不同将 HepG2 肝癌细胞分为 MON 组、UMON 组、CON1 组和 CON2 组。每组细胞均设置五组平行对照组,后续检验结果取均值。

1.4 甲基化特异性 PCR 法检测肝癌细胞 DKK3 基因启动子甲基化 采用甲基化特异性 PCR 检测 DKK3 基因启动子甲基化,针对 DKK3 基因启动子区域 CpG 岛设计甲基化特异性 PCR 引物,引物序列见表 2,提取四种肝癌细胞基因组 DNA,重亚硫酸盐转化后采用甲

基化特异性 PCR 检测 DKK3 基因启动子甲基化。

表 2 DKK3 基因启动子甲基化特异性 PCR 检测引物序列

引物序列	甲基化引物(M)	未甲基化引物(U)
上游引物	5'-AGTTTGGAGGTTAGAGAAGACG-3'	5'-GTAAGTTTGGAGGTTAGAGAAGATGG-3'
下游引物	5'-ACCATTAACCAACCGAAACG-3'	5'-CATTAACCAACCAACCAACG-3'

1.5 重亚硫酸盐测序法检测 DKK3 基因启动子甲基化 分别提取 MON 组、UMON 组、CON1 组和 CON2 组 HepG2 肝癌细胞基因组 DNA。采取重亚硫酸盐测序法检测 DKK3 基因启动子甲基化状态。甲基化引物采用 MethPrimer 设计,上游引物序列为 AGTT-TAGTTTTTTTTTGGTGGATGTG,下游引物序列为 AAAC-CCCAACTCACCTAAACTCTAT,扩增反应条件为:95 ℃ 预变性 8 min,95 ℃ 变性 1 min,61 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,循环 30 个周期,最后 72 ℃ 延伸 8 min。PCR 产物采用 TA 克隆方法测序,测序结果采用 BiQ Analyzer 分析。

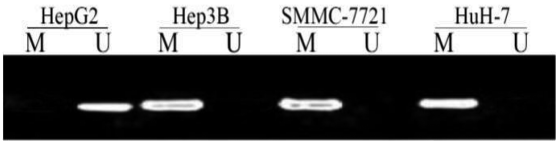
1.6 细胞增殖检测 采用 CCK-8 试剂盒检测 HepG2 肝癌细胞增殖。加入检测试剂后酶标仪测定 490 nm 波长的吸光度,吸光度(A)= 所测吸光度(A)-空白对照组吸光度(A)。以吸光度为纵坐标,时间(D)为横坐标,绘制转染前(D0)、第 1 d(D1)至第 6 d(D6)增殖曲线。

1.7 细胞周期和凋亡检测 采用流式细胞仪检测 5-氮杂胞苷处理前后 HepG2 肝癌细胞周期及细胞凋亡,增殖指数 (proliferation index, PI) = (S + G₂/M)/(G₀/G₁ + S + G₂/M)。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理与统计学分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计描述,多组数据的组间比较采用单因素方差分析,进一步通过 Student-Newman-Keuls 检验进行两两比较。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

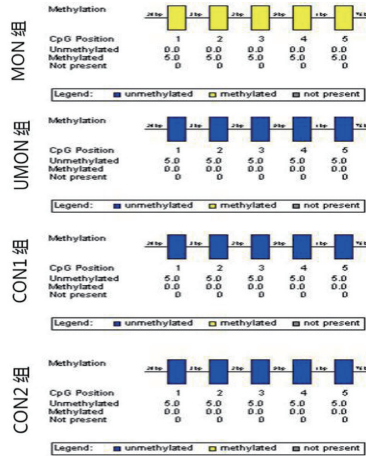
2.1 肝癌细胞 DKK3 基因启动子甲基化 HepG2 肝癌细胞 DKK3 基因启动子未检测到甲基化,Hep3B、SMMC-7721 和 HuH-7 肝癌细胞 DKK3 基因启动子处于甲基化状态,见图 1。



注:M 为甲基化,U 为未甲基化。

图 1 HepG2、Hep3B、SMMC-7721 和 HuH-7 肝癌细胞 DKK3 基因启动子甲基化

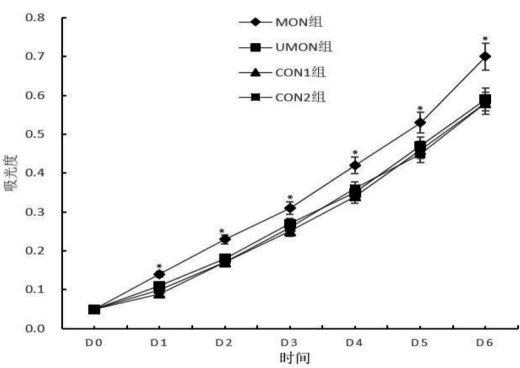
2.2 DKK3 基因启动子甲基化 MON 组 HepG2 肝癌细胞 DKK3 基因启动子第 1~5CG 位点甲基化率为 100.0%,UMON 组、CON1 组和 CON2 组 HepG2 肝癌细胞 DKK3 基因启动子第 1~5CG 位点甲基化率为 0.0%,表明 MON 可成功诱导其互补序列 CG 位点产生甲基化,而 UMON、CON1 和 CON2 寡核苷酸无法诱导甲基化,结果见图 2。



注:黄色为甲基化,蓝色为未甲基化。

图 2 MON 组、UMON 组、CON1 组和 CON2 组 HepG2 肝癌细胞甲基化状态

2.3 细胞吸光度对比 MON 组、UMON 组、CON1 组和 CON2 组 HepG2 肝癌细胞转染前(D0)吸光度差异无统计学意义,UMON 组、CON1 组和 CON2 组 HepG2 肝癌细胞 D1-D6 吸光度均显著低于 MON 组(均 $P < 0.05$),结果见图 3。



注:MON 组分别与 UMON 组、CON1 组和 CON2 组对比,* $P < 0.05$ 。

图 3 MON 组、UMON 组、CON1 组和 CON2 组 HepG2 肝癌细胞增殖曲线

2.4 细胞周期和凋亡比较 UMON 组、CON1 组和 CON2 组 HepG2 肝癌细胞在 G₀/G₁ 期、S 期、G₂/M 期、PI 和凋亡率方面差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);MON 组 HepG2 肝癌细胞 G₀/G₁ 期比例和凋亡率均显著低于 UMON 组、CON1 组和 CON2 组(均 $P < 0.05$),而 S 期、G₂/M 期和 PI 均显著高于 UMON 组、CON1 组和 CON2 组,结果见表 3。

表 3 MON 组、UMON 组、CON1 组和 CON2 组 HepG2 肝癌细胞转染后细胞周期和 PI 比较(%, $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期	PI	凋亡率
MON 组	57.2±1.8 *	23.5±1.5 *	5.7±1.1 *	34.4±2.5 *	17.8±1.2 *
UMON 组	61.3±3.1	16.7±1.4	3.6±0.8	25.2±1.5	29.1±2.7
CON1 组	61.5±3.4	16.9±1.8	3.7±0.9	25.1±1.6	29.2±2.9
CON2 组	61.2±2.9	16.6±2.1	3.7±0.7	25.4±1.5	29.1±3.2

注:MON 组分别与 UMON 组、CON1 组和 CON2 组比较, * $P<0.05$ 。

3 讨论

甲基化是不依赖于基因碱基序列改变的调控机制,是表观遗传学最常见及最重要的调控机制,其中基因启动子是甲基化最常见的调控区域^[4]。甲基化自身或甲基结合蛋白结合后可阻遏转录因子与基因启动子结合,降低基因表达而发挥转录前调控基因表达作用,在肿瘤中越来越多的基因被发现处于高甲基化表达抑制状态^[5-6]。DKK3 基因为经典的 Wnt 信号传导通路抑制因子,具有抑制细胞增殖及促进凋亡等作用,在多种肿瘤组织中检测到高甲基化表达下降状态,其甲基化异常与肿瘤发生、发展密切相关,可作为评估病情及预后的标志物^[7-8]。综合目前的研究证据及 DKK3 基因的功能,推测肝癌组织中 DKK3 甲基化异常与肝癌的发病机制密切相关,故模拟该过程对阐明 DKK3 在肿瘤中的发病机制具有重要意义。

甲基化寡核苷酸是人工合成的一段与靶基因互补的寡核苷酸序列,与靶向基因一条链互补结合后形成半甲基化 DNA,在 DNA 甲基转移酶作用下使互补 DNA 发生甲基化,随后甲基化 DNA 链与互补链形成复制叉结构,最终导致甲基化寡核苷酸靶向基因表达下降而失去正常功能,目前在多个研究中均证实甲基化寡核苷酸可成功诱导产生靶向基因沉默^[9-10],为研究基因甲基化与肿瘤发病机制间的关联提供新思路,但目前的研究多选择肿瘤细胞或胚胎干细胞为研究对象,可能与肿瘤细胞和胚胎干细胞可稳定将基因传递有关,而正常细胞因其自身增殖数代后凋亡或基因无法稳定遗传而不适用于甲基化寡核苷酸诱导实验。本研究中,HepG2 肝癌细胞 DKK3 基因启动子未检测到甲基化,Hep3B、SMMC-7721 和 HuH-7 肝癌细胞 DKK3 基因启动子处于甲基化状态,表明 HepG2 肝癌细胞适用于甲基化寡核苷酸诱导实验。根据甲基化寡核苷酸设计原理分别设计不同寡核苷酸,MON 和 DKK3 基因启动子互补且 CG 均为¹⁸CG,UMON 组与 DKK3 基因启动子碱基序列互补但无¹⁸CG,CON1 组为随机序列,与 DKK3 基因启动子不互补,且无¹⁸CG,CON2 组含有¹⁸CG,但与 DKK3 基因启动子不互补。研究发现 MON 组 HepG2 肝癌细胞 DKK3 基因启动子

第 1~5CG 位点甲基化率为 100.0%,UMON 组、CON1 组和 CON2 组 HepG2 肝癌细胞 DKK3 基因启动子第 1~5CG 位点甲基化率为 0.0%,这些证据表明 MON 可成功诱导其互补序列 CG 位点产生甲基化,而 UMON、CON1 和 CON2 寡核苷酸无法诱导甲基化。

各种因素导致 DKK3 基因表达下降时,Wnt 信号通路异常激活而导致肿瘤的发生,DKK3 基因表达沉默是肿瘤发病机制的重要原因,而启动子甲基化为其表达沉默的常见原因^[11]。本研究中 UMON 组、CON1 组和 CON2 组 HepG2 肝癌细胞在 D0-D6 吸光度、G₀/G₁ 期、S 期、G₂/M 期、PI 和凋亡率方面差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);MON 组 HepG2 肝癌细胞 G₀/G₁ 期比例和凋亡率均显著低于 UMON 组、CON1 组和 CON2 组(均 $P<0.05$),而 D1-D6 吸光度、S 期、G₂/M 期和 PI 均显著高于 UMON 组、CON1 组和 CON2 组,这些证据表明甲基化寡核苷酸诱导 DKK3 基因启动子甲基化后,导致其抑制细胞增殖及促进细胞凋亡功能下降,导致 HepG2 肝癌细胞增殖速度增加而凋亡减少,表明甲基化寡核苷酸诱导灭活 DKK3 基因可对肝癌细胞生物学行为产生影响,在未来的研究中可以尝试采用甲基化寡核苷酸诱导灭活正常肝细胞 DKK3 基因以更准确模拟 DKK3 基因甲基化导致肝癌产生的机制。

参考文献

- [1] Zhou S, Zhu Y, Mashrah M, et al. Expression pattern of DKK3, dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3, in the malignant progression of oral submucous fibrosis[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 979-985.
- [2] Poorebrahim M, Sadeghi S, Rahimi H, et al. Rational design of DKK3 structure-based small peptides as antagonists of Wnt signaling pathway and in silico evaluation of their efficiency[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172217.
- [3] 崔丹, 翟博, 张明, 等. Dkk3 在肝细胞肝癌中的表达及其临床意义[J]. *肝胆外科杂志*, 2014, 22(4): 304-307.
- [4] Li JJ, Zheng PJ, Wang YZ. The correlations between DNA methylation and polymorphisms in the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene with postoperative recurrence in patients with thyroid carcinoma (TC)[J]. *World J Surg Oncol*, 2017, 15(1): 114-121.
- [5] Xu N, Barlow GM, Cui J, et al. Comparison of genome-wide and gene-specific DNA methylation profiling in first-trimester chorionic villi from pregnancies conceived with infertility treatments[J]. *Reprod Sci*, 2017, 24(7): 996-1004.
- [6] Gao SJ, Zhang GF, Zhang RP. High CpG island methylation of p16 gene and loss of p16 protein expression associate with the development and progression of tetralogy of Fallot[J]. *J Genet*, 2016, 95(4): 831-837.
- [7] Tao L, Huang G, Chen Y, et al. DNA methylation of DKK3 modulates docetaxel chemoresistance in human nonsmall cell lung cancer cell [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2015, 30(2): 100-106.
- [8] Kang WS, Cho SB, Park JS, et al. Clinico-epigenetic combination including quantitative methylation value of DKK3 augments survival prediction of the patient with cervical cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 139(1): 97-106.
- [9] 张万里. 甲基化寡核苷酸诱导灭活 EDNRB 基因在先天性巨结肠发病机制中的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
- [10] 陈武松, 郭圣龙. 甲基化寡核苷酸诱导灭活 RASSF1 基因在肝癌发病机制中的应用[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(2): 181-183.
- [11] 张晔, 杨斌, 王毅军, 等. 肝癌血浆游离 DNA 甲基化谱检测及临床意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 56(23): 1436-1440.

收稿日期: 2017-09-12