

HHIP 基因去甲基化对 HCC827 肺腺癌细胞 Hedgehog 信号通路及增殖影响

许靖,张舒,肖中,王海涛,蔡峰

(上海中医药大学附属第七人民医院,上海 200137)

摘要:[目的] 探讨 HHIP 基因去甲基化后对 HCC827 肺腺癌细胞 Hedgehog 信号通路及其增殖的影响。[方法]应用细胞转染技术获得 HHIP 高表达的 HCC827 细胞,并将 HCC827 细胞分为空白对照组、过表达转染组及 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-2'-de-oxycytidine,5-Aza-CdR)处理组。采用甲基化特异性聚合酶链式反应和亚硫酸盐测序 PCR 检测 5-Aza-CdR 处理前后 HCC827 细胞 HHIP 基因启动子区甲基化状况,应用 Real-time qPCR 及 Western-blot 方法检测各组细胞的 Hedgehog 信号通路相关基因及细胞周期素 D2(CCND2)mRNA 及蛋白表达水平,CCK8 分析细胞增殖的变化。[结果] HHIP 基因去甲基化或过表达质粒转染后,HHIP 基因表达明显上调,其 Hedgehog 信号通路相关基因 PTCH,SHH 基因表达均明显下调,CCND 2 表达上调(P 均 <0.01),HCC827 增殖能力出现降低($P<0.01$)。[结论] 高甲基化抑癌基因 HHIP 基因去甲基化后,可抑制 HCC827 腺癌细胞 Hedgehog 信号通路的活化并抑制其增殖,这可能与 Hedgehog 信号通路负性调节因子 HHIP 基因恢复表达相关。

关键词:非小细胞肺癌;甲基化;Hedgehog 通路;HHIP 基因

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2019)09-0769-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2019.09.B001

Effect of HHIP Gene Demethylation on Hedgehog Signaling Pathway and Proliferation of Lung Adenocarcinoma HCC827 Cells

XU Jing,ZHANG Shu,XIAO Zhong,WANG Hai-tao,CAI Feng

(Seventh People's Hospital of Shanghai University of TCM,Shanghai 200137,China)

Abstract:[Objective] To investigate the effect of HHIP gene demethylation on Hedgehog signaling pathway and proliferation of lung adenocarcinoma HCC827 cells. [Methods] HCC827 cells with high expression of HHIP were obtained by cell transfection technique,and the HCC827 cells were divided into control group,overexpressed transfection group and 5-Aza-2'-de-oxycytidine(5-Aza-CdR)treatment group. By using methylation-specific polymerase chain reaction(MSP) and sulfite sequencing PCR (BSP) techniques,methylation status of HHIP gene promoter region in HCC827 cells before and after 5-Aza-CdR treatment was analyzed. The qRT-PCR and Western blot methods were used to detect the mRNA and protein expression levels of Hedgehog signaling pathway related genes and cyclin D2(CCND2) in each group. The changes of cell proliferation were analyzed by CCK8. [Results] After HHIP gene demethylation or overexpression plasmid transfection, the expression of HHIP gene was significantly up-regulated,and the expression of PTCH,SHH genes in Hedgehog signaling genes were significantly down-regulated,CCND 2 expression was up-regulated ($P<0.01$),HCC827 proliferation ability was decreased ($P<0.01$). [Conclusion] The demethylation of HHIP gene inhibits the activation of Hedgehog signaling pathway and proliferation of in lung adenocarcinoma HCC827 cells,which may be related to the re-expression of the negative regulatory factor HHIP gene in the Hedgehog signaling pathway.

Subject words:non-small cell lung cancer;methylation;Hedgehog pathway;HHIP gene

研究表明异常激活 Hedgehog 信号通路在多种肿瘤中发现,如基底细胞癌、胰腺癌、肝癌、前列腺

癌、胃癌等^[1-3]。Hedgehog 信号通路有 SHH、DHH、IHH 3 个配体,其中最常见 SHH,通过与 Ptch1 结合,解除对 SMO 抑制,启动 Gli-1 核转录,激活 HH 靶基因的转录。Hedgehog 信号通路的重要负性调节因子 HHIP 基因是该信号通路的重要调节子,Hedgehog 信号通路成分异常高表达常与肿瘤增强的迁移

基金项目:上海市浦东新区科技发展基金项目(PKJ2015-Y12)

通信作者:许靖,主任助理,主治医师,硕士研究生;上海市中医药大学附属第七人民医院呼吸内科,上海市浦东新区大同路 358 号(200137);E-mail:xujing311@163.com

收稿日期:2018-05-25;修回日期:2019-04-08

和侵袭能力相关^[4-5]。甲基化抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-de-oxycytidine, 5-Aza-CdR)可通过抑制基因启动子区的高甲基化以逆转肿瘤恶性表型^[6]。本研究以 5-Aza-CdR 处理肺腺癌 HCC827 细胞株,同时设置过表达 HHIP 基因质粒转染组作为对照,通过 RT-qPCR 及 Western-blot 方法对 Hedgehog 通路重要抑制因子 HHIP 基因及下游 PTCH、SHH、GLI1 等基因及细胞周期素 D2 进行 mRNA 及蛋白水平进行检测,并检测干预前后 HCC827 细胞增殖能力,探讨高甲基化的 HHIP 基因去甲基化后对肺腺癌 HCC827 细胞 Hedgehog 信号通路及增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和 5-Aza-CdR 干预

人肺癌 HCC827 细胞株由上海诺百生物科技有限公司保存、培养、传代,实验选用对数生长期的细胞。收集对数生长期细胞,计数并在细胞培养板铺孔,在倒置显微镜下观察每孔细胞生长情况。培养 1d 后,培养板加入 5 μ M 浓度 5-Aza-CdR,同时设空白调零孔(未接种细胞),在倒置显微镜下观察每孔细胞生长情况,常规培养 48h。

1.2 HHIP 基因过表达载体构建及慢病毒包装

HHIP 过表达慢病毒载体构建及包装:通过 NCBI 检索,查出人 HHIP mRNA 序列(NM_022475.2),设计特异性引物(F:AATTAAGGAAGCTAGCatgctgaagat-gctctcctttaa;R:TAAACCCAAGGCGGCCctatacaat-gtaactgttagatcc)酶切位点(Nhe I/ASC I)进行 PCR 扩增,重组到载体 PDS159_pL6.3-CMV-GFPa1-IRES-MCS 中,并测序验证。

HHIP 过表达慢病毒 LV493_PDS159-HHIP 以 MOI=20 感染靶细胞 HCC827,设置阴性慢病毒感染对照组,48~72h 后观察荧光比例。荧光比例达 80%以上即收集细胞,抽提 RNA, qPCR 检测 HHIP 表达。

用构建好的 HHIP 过表达慢病毒载体 CL830_PDS159-HHIP 和包装质粒共转染 293T 细胞,包装慢病毒,收集病毒液并测定滴度。

1.3 DNA 提取及亚硫酸氢盐测序

DNA 提取使用 DNA 提取试剂盒提取, DNA 样品经亚硫酸氢钠修饰,并使用 DNA 甲基化试剂盒(D5005, ZYMO, 中国北京)处理,处理过的 DNA 样

品选取 1 μ l, 采用甲基化 DNA 的特异性引物进行两次扩增, 两次扩增引物的上游序列为 5'-AGTAGT YGGGTAGTTTGGGAATT-3' 及 5'-GGTTTGTATTT-TYGAGGT TGGT-3', 反向序列均为 5'-CAACCA-CAAATATTCACCTTATCC-3', 将扩增后产物提交给上海生工生物有限公司进行测序。

1.4 RT-qPCR

Trizol 试剂提取细胞样品中总 RNA, cDNA 由逆转录试剂盒合成(Invitrogen, CA, USA), 并扩增, 应用 $R=2^{-\Delta\Delta Ct}=2^{-(\Delta Ct_{\text{待测样品}}-\Delta Ct_{\text{对照样品}})}=2^{-[(\text{MeanCt}_{\text{目}}-\text{MeanCt}_{\text{内}})\text{待测样品}-(\text{MeanCt}_{\text{目}}-\text{MeanCt}_{\text{内}})\text{对照样品}]}$ 。相对表达量公式方法定量 HHIP 基因及下游信号通路的 PTCH 基因、SHH 基因及细胞周期素 D2(CCND2)的相对表达量。

RT-qPCR 引物设计见 Table 1。实验条件为:在 95 $^{\circ}$ C 下 2min 变性, 95 $^{\circ}$ C 循环 40 次, 60 $^{\circ}$ C 退火 30sec, 70 $^{\circ}$ C 延长 45sec。

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Primer sequences
HHIP	Forward: 5'-CTGCTTCTGTATTTCAGGAGGAGGTT-3' Reverse: 5'-GGGATGGAATGCCAGGCTTA-3'
PTCH	Forward: 5'-CTGCTGGTATGCTCGGGACTG-3' Reverse: 5'-TAAATCGCTCGGAGTTTCTGG-3'
SHH	Forward: 5'-CCCCAATTACAACCCCGACA-3' Reverse: 5'-GGCCAAAGCGT TCAACTTGT-3'
CCND2	Forward: 5'-TGCTGTGGTTATGTTTAGTG-3' Reverse: 5'-ACAATACAACATCTAAACCAC-3'
GADPH	Forward: 5'-AGAGCTACGAGCTGCCTAGAC-3' Reverse: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

1.5 Western-blot

取样品采用 BCA 法测浓度, 上样 40 μ g 聚丙烯酰胺凝胶 90V 跑胶, 再将电压升至 200V 直到电泳结束。恒压 100V 转膜 1.5h 后恒流, PBST 洗涤 4 次, 每次 5min。5%脱脂奶粉封闭液中封闭 37 $^{\circ}$ C 1h, 用封闭液稀释一抗, 并在在一抗稀释液中 4 $^{\circ}$ C 过夜。膜取出后用 PBST 洗膜 4 次, 每次 5min, 用含 5%牛奶的封闭液稀释二抗, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h。反应完毕后, 洗膜 4 次, 每次 5min 后 ECL 显影, 曝光。

1.6 CCK8 分析细胞增殖的变化

细胞按照检测的时间点铺孔, 适当铺板量铺板, 边缘 PBS 补充, 5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C, 过夜培养。药物处理待到规定时间点, 拍照, 加入 CCK-8 10 μ l/孔, 适当时间孵育后, 在酶联免疫检测仪上测量各孔的吸光值。

1.7 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)进行表示, 两组独立样本比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, LSD 法比较组内差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HHIP 过表达慢病毒载体构建

三组细胞 HHIP 的 mRNA 基因表达存在差异 ($F=142.16, P<0.001$)。过表达载体转染靶细胞 HCC827-HHIP 相对 mRNA 相对表达量明显高于靶细胞 HCC827-KB、空质粒转染靶细胞 HCC827-NC(P 值均 <0.01), 提示 HHIP 过表达慢病毒侵染肺癌细胞 HCC827, 可成功上调 HHIP 基因 mRNA (Figure 1, 2)。

2.2 HCC827 细胞 HHIP 基因启动子区经 $5\mu\text{M}$ 5-Az-CdR 处理 CpG 岛甲基化状态

HCC827 细胞于 $5\mu\text{M}$ 5-Az-CdR 处理前经 DNA 亚硫酸氢盐测序, 可见 HHIP 基因其启动子区部分位点甲基化 (Figure 3), 经 $5\mu\text{M}$ 5-Az-CdR 处理后 72h 再次通过 DNA 亚硫酸氢盐测序结果提示其启动子区少部分位点甲基化 (Figure 4)。

2.3 5-Az-CdR 去甲基化及过表达 HHIP 基因对 Hedgehog 通路的影响

经过 5-Az-CdR 去甲基化或过表达质粒转染后,

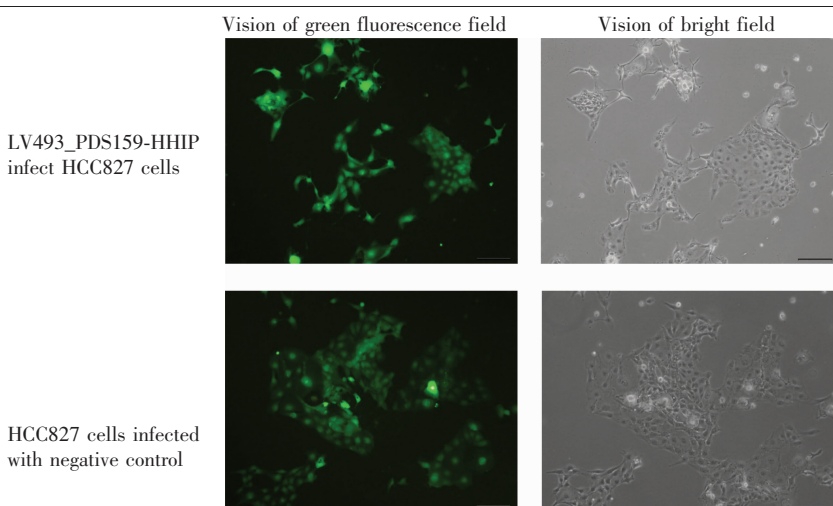


Figure 1 Fluorescence observation of HCC827 target cells transfected by HHIP lentivirus

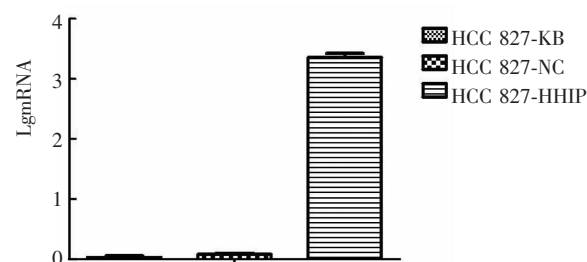


Figure 2 HHIP mRNA in three groups of cells after transfection

3 组细胞的 HHIP mRNA ($F=295.91, P<0.01$) 及 Hedgehog 信号通路下游基因 SHH mRNA ($F=84.42, P<0.01$) 及 PTCH mRNA ($F=530.64, P<0.01$) 均存在组内差异。经过 5-Az-CdR 去甲基化或过表达质粒转

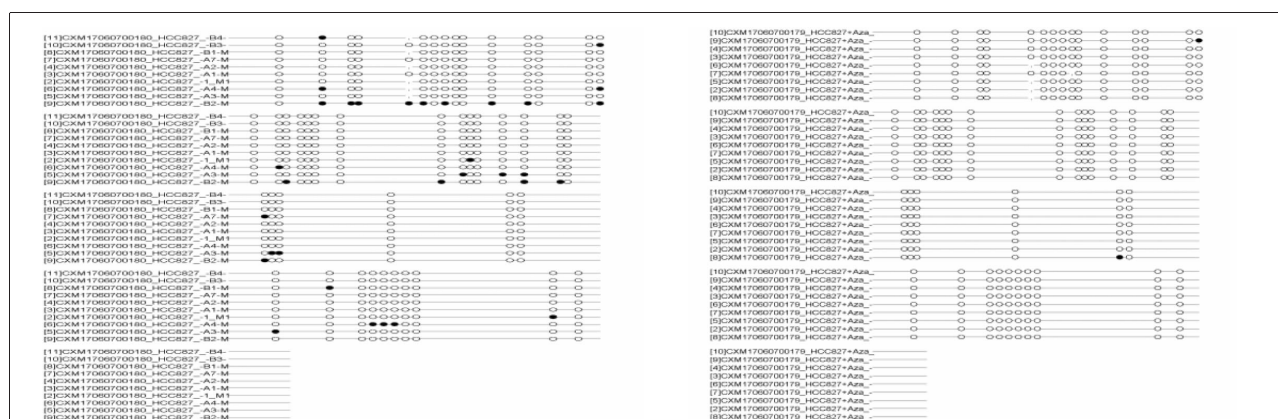


Figure 3 HCC827 cells pretreated with $5\mu\text{M}$ 5-Az-CdR

After 72 hours of treatment with $5\mu\text{M}$ 5-Az-CdR, CpG islands in the promoter region of HHIP gene in HCC827 cells are significantly demethylated

Figure 4 HCC827 treated with $5\mu\text{M}$ 5-Az-CdR after 72h

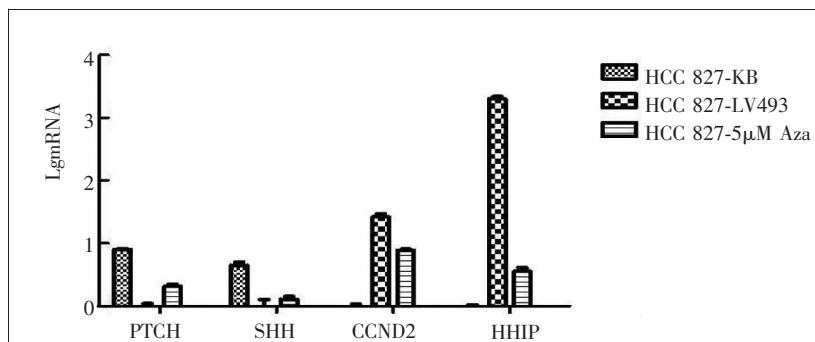
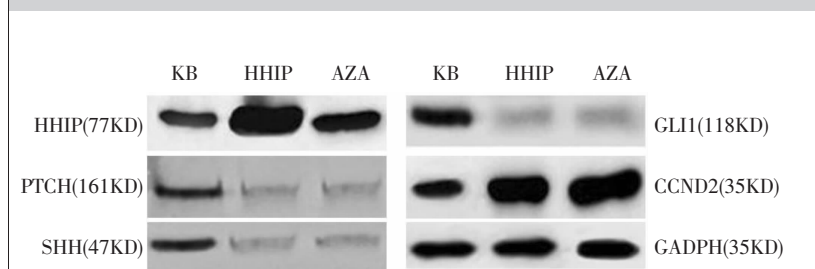


Figure 5 The mRNA expression of HHIP,PTCH,SHH and CCND2 in HCC827 cells after 5-Az-CdR demethylation (HCC827 5μM Aza) or over-expression plasmid transfection (HCC827 LV493)



KB group: HCC827 cell line, HHIP group: HCC827 cell group after overexpression plasmid transfection, Aza group: HCC827 cell line after Aza treated

Figure 6 Western Blot results

Table 2 OD values of three groups at 24,48 and 72 hours

Group	OD value			
	0	24h	48h	72h
KB group	0.159±0.004	0.301±0.107	0.566±0.014	0.762±0.014
KB+Aza group	0.156±0.007	0.250±0.102*	0.424±0.011*	0.568±0.234*
HHIP LV493 group	0.154±0.011	0.218±0.045*	0.337±0.078*	0.410±0.005*
F	0.309	65.990	304.480	359.259
P	0.745	<0.001	<0.001	<0.001

* There was significant difference when compared to the other two groups($P<0.01$)

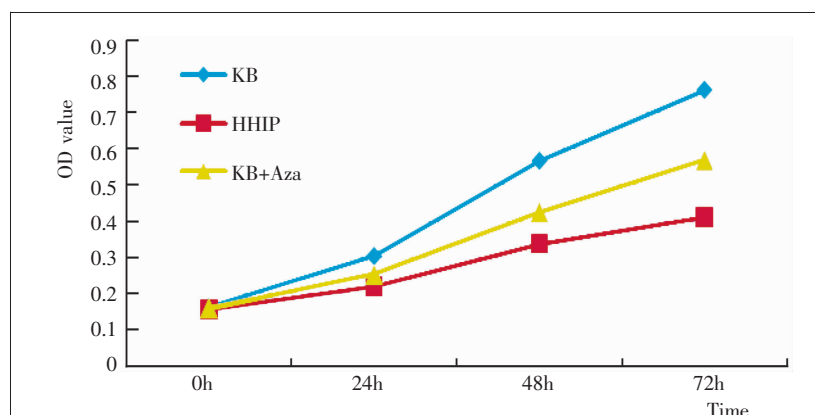


Figure 7 Changes in OD values at 24,48 and 72 hours after 5-Az-CdR treatment

染后,HCC827 细胞 HHIP mRNA 表达均高于空白对照组($P<0.01$),两组细胞 Hedgehog 信号通路下游基因 SHH 及 PTCH 基因表达均较空白对照组明显下调($P<0.01$),三组细胞的细胞周期素 D2(CCND2)mRNA 表达存在组间差异($F=139.48, P<0.01$),5-Az-CdR 去甲基化或过表达质粒转染后,HCC827 细胞的 mRNA 表达均明显升高($P<0.01$)(Figure 5)。

2.4 HH 通路基因表达变化

经 5-Az-CdR 去甲基化 (Aza)或过表达质粒转染(HHIP)后,Hedgehog 信号通路中的 PTCH,SHH,GLI1 基因表达均较对照组 HCC827 细胞(KB)下调,CCND2 基因表达上调(Figure 6)。

2.5 细胞增殖变化

HCC827 细胞经过 5-Az-CdR 去甲基化或过表达质粒转染后,分别于 24h、48h、72h 分别使用 CCK8 检测细胞 OD 值,结果发现 3 组间在 24h、48h、72h 的 OD 值均有差异。对照组(KB)、5-Az-CdR (KB+Aza)处理组及过表达质粒转染组 (HHIP LV493)3 个时间点的 OD 值存在组间差异(P 均 <0.01);进一步组间比较发现,过表达质粒转染组及 5-Az-CdR 去甲基化组的 OD 值在 3 个时间点均小于对照组($P<0.01$),提示去甲基化或过表达 HHIP 后,HCC827 细胞增殖能力出现下降(Table 2,Figure 7)。

3 讨论

研究表明 Hedgehog 通路持续或异常激活与多种肿瘤的发生发展密切相关,曾有学者推测有 2/3 肿瘤与 Hedgehog 通路的异常激活密切相关^[7]。甲基化是 DNA 表观遗传修饰的一种方式,是指在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases,DNMTs)介导下,

在胞嘧啶(C)5位碳原子上加入甲基基团,使之变成5-甲基胞嘧啶(5-mC)的化学反应,这种反应主要发生在CpG二核苷酸的胞嘧啶上。哺乳类动物基因组中约5%~10%基因存在CpG,其中70%~80%为mCpG。CpG二核苷酸的聚集称CpG岛(CpG island),CpG岛大部分位于异染色质区内,呈高度甲基化,其余则散布在基因组中,基因组中有近一半的基因调控区存在CpG岛^[8-9]。

去甲基化药物通过抑制DNMT活性,可使因高甲基化转录失活的抑癌基因发生去甲基化,恢复基因表达,从而逆转肿瘤细胞生物学特性,成为一条新的治疗途径^[10]。研究表明去甲基化药物对结肠癌细胞的生长有抑制作用^[11]。经典的甲基化抑制剂5-Az-CdR是目前国内外用于抑制甲基化最常用且作用最强的药物,5-Az-CdR是一种嘧啶核苷类似物,可以与DNMT结合形成一种共价复合物,特异性抑制DNMT的活性,逆转基因CpG岛甲基化,重新激活由于高甲基化而失活的抑癌基因,恢复抑癌基因的功能,抑制肿瘤细胞生长,且异常甲基化所致失活的基因对DNA甲基转移酶抑制剂非常敏感,易重新活化^[6,12]。

本研究对肺腺癌HCC827细胞株进行培养传代后,结果发现HCC827细胞的HHIP基因启动子区出现部分位点甲基化,甲基化后的HHIP基因表达量,而Hedgehog通路中的其他基因如SHH及PTCH则明显表达,与对照组比较后发现HCC827细胞株的Hedgehog通路则明显活化,予甲基化转移酶抑制剂5-Az-CdR处理后发现原先甲基化的HHIP基因启动子区明显去甲基化,进一步通过采用RT-qPCR及Western-blot方法对HHIP基因及Hedgehog通路下游因子PTCH、SHH、GLI1等基因进行检测,同时设置过表达HHIP基因质粒转染组作为对照,结果显示,肺癌HCC827细胞HHIP基因去甲基化后,其HHIP基因及细胞周期素D2(CC-ND2)mRNA及蛋白表达水平明显较对照组肺癌HCC827细胞表达升高,同时其Hedgehog通路下游基因表达明显下降,肺癌HCC827细胞的增殖能力出现下调,提示去甲基化可重新激活肺癌HCC827细胞中HHIP基因的表达,可能与其基因启动子区域去甲基化后,恢复其基因表达功能有关,促进肿瘤细胞的负调控机制,其抑癌基因作用得到一定程度的激活,导致肺癌HCC827细胞其异常活化的Hedgehog通路得到抑制,从而抑制肿瘤增殖及发展。

研究表明在多种恶性肿瘤中明显甲基化的抑癌基因如Rb、VH-L、p16、p15等去甲基化可使抑癌基因重新表达,导致恶性肿瘤的表型出现逆转^[13]。有报道应用5-Az-CdR可使得脑胶质瘤生长得到抑制^[14]。本研究也证实去甲基化后的HHIP基因重新表达。逆转抑癌基因的甲基化可能是一条有希望的肿瘤治疗途径,但肿瘤发生是一个多因素、多阶段的复杂过程,DNA甲基化如何与其他致癌因素协同作用促进肿瘤发生发展,以及DNA异常甲基化在肿瘤发生中涉及多种蛋白因子有待更深入研究。

参考文献:

- [1] Yoo YA, Kang MH, Lee HJ, et al. Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer[J]. *Cancer Research*, 2011, 71(22):7061-7070.
- [2] Datta S, Datta MW. Sonic hedgehog signaling in advanced prostate cancer [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(4):435-448.
- [3] Yang L, Xie G, Fan Q, et al. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications[J]. *Oncogene*, 2010, 29(4):469-481.
- [4] Ok CY, Singh RR, Vega F. Aberrant activation of the hedgehog signaling pathway in malignant hematological neoplasms[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(1):2-11.
- [5] Xie J. Hedgehog signaling pathway: development of antagonists for cancer therapy[J]. *Curr Oncol Rep*, 2008, 10(2):107-113.
- [6] Wang Y, Wang X, Li R, et al. A DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-2'-deoxyxycytidine, exacerbates neurotoxicity and upregulates Parkinson's disease-related genes in dopaminergic neurons[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2013, 19(3):183-190.
- [7] Gorjankina T. Hedgehog signaling pathway: a novel model and molecular mechanisms of signal transduction[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(7):1317-1332.
- [8] Savio AJ, Lemire M, Mrkonjic M, et al. MLH1 region polymorphisms show a significant association with CpG island shore methylation in a large cohort of healthy individuals[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e51531.
- [9] Lu L, Zhu G, Zhang C, et al. Association of large noncoding RNA HOTAIR expression and its downstream intergenic CpG island methylation with survival in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 136(3):875-883.
- [10] Hou ST, Jiang SX, Aylsworth A, et al. Collapsin response mediator protein 3 deacetylates histone H4 to mediate nuclear condensation and neuronal death[J]. *Sci Rep*, 2013, 3:1350.
- [11] Agrawal K, Das V, Táborská N, et al. Differential regulation of methylation-regulating enzymes by senescent stromal cells drives colorectal cancer cell response to DNA-demethylating epi-drugs[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 12:6013728.
- [12] Wu CJ, Yang CY, Chen YH, et al. The DNA methylation inhibitor 5-azacytidine increases regulatory T cells and alleviates airway inflammation in ovalbumin-sensitized mice[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2012, 160(4):356-364.
- [13] Jin Q, Liu C, Yan C, et al. 5-Aza-CdR induces the demethylation of Syk promoter in nasopharyngeal carcinoma cell[J]. *Gene*, 2012, 511(2):224-226.
- [14] Yamashita AS, da Costa Rosa M, Borodovsky A, et al. Demethylation and epigenetic modification with 5-azacytidine reduces IDH1 mutant glioma growth in combination with temozolomide [J]. *Neuro Oncol*, 2018, Sep 3.[Epub ahead of print]