

RASSF1A、MGMT、DAPK、p16、RAR β 启动子甲基化和表达与肺癌A549细胞对顺铂敏感性的初步研究

董子鹤 侯玉磊 李程华 吴永昌 陈 辉*

(重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016)

摘要 有研究表明, 多个基因甲基化引起的表达改变可能是肿瘤对化疗药物敏感性的调控因素之一。为了寻找肺腺癌A549细胞对顺铂敏感性的生物标志, 该研究以肺腺癌A549细胞及对顺铂耐受的同源A549细胞(A549-DDP)为研究对象, 甲基化特异性PCR (MSP)检测五个候选基因(RASSF1A、MGMT、DAPK、p16、RAR β)的甲基化状态, RT-PCR检测候选基因在mRNA水平的表达。结果显示: 在A549细胞中, RASSF1A、MGMT、p16呈低甲基化状态和高表达; 顺铂耐受的A549-DDP细胞中, 这三个基因均以甲基化状态为主, mRNA表达明显下调; 但RAR β 仅在A549-DDP细胞中呈非甲基化和高表达, DAPK的甲基化和表达水平在两个细胞亚型间无明显差异。A549-DDP细胞经去甲基化试剂(5-aza-CdR)作用后, RT-PCR检测显示: RASSF1A、MGMT在A549-DDP细胞中的mRNA表达水平上调, 并呈明显的剂量依赖和时间依赖关系。研究结果提示, RASSF1A、MGMT、p16、RAR β 基因甲基化修饰导致的mRNA表达改变可能是调控肺腺癌A549细胞对顺铂敏感性的因素之一。RASSF1A、MGMT、p16、RAR β 甲基化谱作为肺癌对顺铂敏感性的生物标志, 值得进一步研究。

关键词 DNA甲基化; 顺铂; 甲基化PCR; 肺癌A549细胞株

肺癌是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一, 大部分肺癌患者发现时已属晚期, 以顺铂为基础的化学药物成了延长患者生存期的主要措施之一。但对顺铂的耐受是目前临床面临的难题, 临床迫切需要针对顺铂敏感性的实验室检查, 来指导肺癌患者的个体化化疗。

基因甲基化是表观修饰最主要的方式, 是几乎所有肿瘤的共同特征。来自临床的研究显示: RASSF1A (Ras association domain family 1A)、MGMT (O⁶-methylguanine DNA methyltransferase)、DAPK (death associated protein kinase)、p16、RAR β (retinoic acid receptor β)是非小细胞肺癌甲基化修饰发生频率较高的几种抑癌基因^[1], 有学者通过检测血浆或体液中RASSF1A、p16等的甲基化状态, 成功地进行了肺癌的辅助诊断和预后判断^[2-3]。药理学家Strathdee^[4]指出, 特定DNA的启动子甲基化是肿瘤对化疗药物敏感性反应的重要表观标志, 尤其是与DNA修复和凋亡相关的基因, 往往通过启动子甲基化作用, 增加或降低肿瘤细胞对化疗药物的反应。Gaspar等^[5]报道血浆中MGMT甲基化与恶性胶质瘤患者对化疗和

放射疗法的敏感性高度相关。但目前未见这些基因甲基化与非小细胞肺癌对顺铂敏感性关系的研究报道。

基于此, 本研究拟运用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific PCR, MSP)技术, 比较肺腺癌A549细胞株与其耐顺铂亚型的同源细胞株(A549-DDP)中RASSF1A、MGMT、DAPK、p16、RAR β 共5种抑癌基因的甲基化状态, 并进一步通过RT-PCR证实基因的异常甲基化导致其表达水平改变, 期望筛选出与肺癌A549细胞顺铂敏感性相关的基因甲基化谱作为潜在的实验室指标, 为进一步的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肺腺癌耐药株A549-DDP及其亲本细胞A549细胞株由重庆医科大学附属第一医院邱峰教授惠赠, 其中, A549-DDP细胞是在人肺腺癌细胞

收稿日期: 2011-08-02 接受日期: 2011-09-02

重庆市自然科学基金(No.2008BB5392)资助项目

*通讯作者。Tel: 023-89012744, E-mail: huichen@cqmu.edu.cn

系A549的基础上,以顺铂作为诱导药物,采用逐步递增浓度的方法,最终使顺铂的维持浓度达到2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。A549-DDP细胞在培养过程中加入2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的顺铂以维持其耐药性状。

1.1.2 主要试剂 顺铂购自美国Sigma公司, DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,甲基化修饰试剂盒购自Zymo公司, RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、TaqDNA聚合酶均购自TaKaRa公司, RP-MI-1640培养基与新生牛血清购自美国Gibco公司。

1.2 方法

1.2.1 MSP检测五种基因在A549及A549-DDP中的甲基化状态 (1) 基因组DNA抽提: 常规培养A549及A549-DDP细胞(加入2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的顺铂以维持

A549-DDP细胞耐药性状), 胰酶消化贴壁细胞A549和A549-DDP, 离心弃液。加入细胞裂解液与蛋白酶K, 严格按试剂盒说明抽提DNA。所得DNA溶液在紫外分光光度计中检测浓度; (2) 基因组DNA的亚硫酸氢盐处理: 按ZYMO试剂盒说明书操作, 用亚硫酸氢盐法对基因组DNA的胞嘧啶进行转化: 取基因组DNA约1 000~1 500 ng, 与CT转化剂混匀后避光条件下进行温度变性: 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 64 $^{\circ}\text{C}$ 2.5 h。反应溶液经洗涤脱硫, 用于下一步PCR反应; (3) PCR反应: 参考文献[6-9]设计*RASSF1A*、*MGMT*、*p16*、*RAR β* 、*DAPK*基因甲基化特异性PCR引物, 引物序列、退火温度及产物长度见表1。

PCR反应体系25 μL , 其中: PCR buffer (Mg^{2+}):

表1 *RASSF1A*、*MGMT*、*p16*、*RAR β* 、*DAPK*甲基化特异性PCR引物
Table 1 Methylation primers for *RASSF1A*, *MGMT*, *p16*, *RAR β* and *DAPK*

基因 Genes	引物 Primers	序列 Sequences	退火温度($^{\circ}\text{C}$) Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	产物长度(bp) Length (bp)
<i>RASSF1A</i>	M	S: 5' -GGG TTT TGC GAG AGC GCG-3' A: 5' -GCT AAC AAA CGC GAA CCG-3'	64	169
	U	S: 5' -GGT TTT GTG AGA GTG TGT TTAG-3' A: 5' -CAC TAA CAA ACA CAA ACC AAA C-3'	59	169
<i>MGMT</i>	M	S: 5' -TTT CGA CGT TCG TAG GTT TTC GC-3' A: 5' -GCA CTC TTC CGA AAA CGA AAC G-3'	61	81
	U	S: 5' -TTT GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT-3' A: 5' -AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A-3'	59	93
<i>p16</i>	M	S: 5' -TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC-3' A: 5' -GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA-3'	65	150
	U	S: 5' -TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT-3' A: 5' -CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A-3'	60	151
<i>RARβ</i>	M	S: 5' -TCG AGA ACG CGA GCG ATT CG-3' A: 5' -GAC CAA TCC AAC CGA AAC GA-3'	55	146
	U	S: 5' -TTG AGA ATG TGA GTG ATT TGA-3' A: 5' -AAC CAA TCC AAC CAA AAC AA-3'	55	146
<i>DAPK</i>	M	S: 5' -GGA TAG TCG GAT CGA GTT AAC GTC-3' A: 5' -CCC TCC CAA ACG CCG A-3'	61	98
	U	S: 5' -GGA GGA TAG TTG GAT TGA GTT AAT GTT-3' A: 5' -CAA ATC CCT CCC AAA CAC CAA-3'	60	106

注: M: 甲基化引物; U: 非甲基化引物; S: 正义链; A: 反义链。

Note: M: methylation primer; U: unmethylation primer; S: sense primer; A: antisense primer.

2.5 μL ; dNTP: 2 μL ; 引物各1 μL ; TaKaRa LA Hot start Taq: 0.15 μL ; 亚硫酸氢盐修饰后的DNA: 5 μL ; 双蒸水补足至25 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 退火50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 共35个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。产物于2%琼脂糖凝胶中电泳15 min。

1.2.2 RT-PCR检测五种基因在A549及A549-DDP中的mRNA表达 参照文献[10-13]设计引物, 其中*GAPDH*作为内参基因。引物序列、退火温度及片段长度见表2。

收集A549及A549-DDP细胞, 按TRIzol试剂盒说

表2 *RASSF1A*、*MGMT*、*p16*、*RARβ*和*DAPK*逆转录PCR引物
Table 2 Primers for amplifying *RASSF1A*, *MGMT*, *p16*, *RARβ* and *DAPK*

基因	引物序列	退火温度(°C)	产物长度(bp)
Genes	Primer sequences	Temperature (°C)	Length (bp)
<i>RASSF1A</i>	S: 5'-GAT GAA GCC TGT GTA AGA ACC GTC CT-3' A: 5'-CAG ATT GCA AGT TCA CCT GCC ACT A-3'	59	245
<i>MGMT</i>	S: 5'-GCC GGC TCT TCA CCA TCC CG-3' A: 5'-GCT GCA GAC CAC TCT GTG GCA CG-3'	58	211
<i>p16</i>	S: 5'-AGC CTT CGG CTG ACT GGC TGG-3' A: 5'-GCG CTG CCC ATC ATC ATG AC-3'	58	162
<i>RARβ</i>	S: 5'-AAT TCA GTG AAC TGG CCA CC-3' A: 5'-GGC AAA GGT GAA CAC AAG GT-3'	60	259
<i>DAPK</i>	S: 5'-CAG TTT GCG GTT GTG AAG AA-3' A: 5'-CCT GCA ACG AGT TCC AAG AT-3'	59	226
<i>GAPDH</i>	S: 5'-GTC ACC AGG GCT GCT TTT AAC-3' A: 5'-TGA TGG GAT TTC CAT TGA TGA-3'	58	172

明书提取总RNA, DEPC水溶解, -80 °C保存备用。取总RNA 500 ng逆转录后PCR, 反应条件如下: 95 °C预变性3 min, 94 °C变性30 s, 退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共30个循环。GAPDH以相同条件反应30个循环。产物在2%琼脂糖凝胶中电泳15 min。

1.2.3 去甲基化试剂对基因甲基化程度和表达水平的影响 取对数生长期A549-DDP细胞, 以10%小牛血清RPMI-1640培养基制成单细胞悬液, 2×10^5 /孔接种于6孔板, 每孔2 mL。24 h后, 分别加入浓度为0, 1, 5, 10, 20, 40 μmol/L的5-aza-CdR继续培养。分别于24,

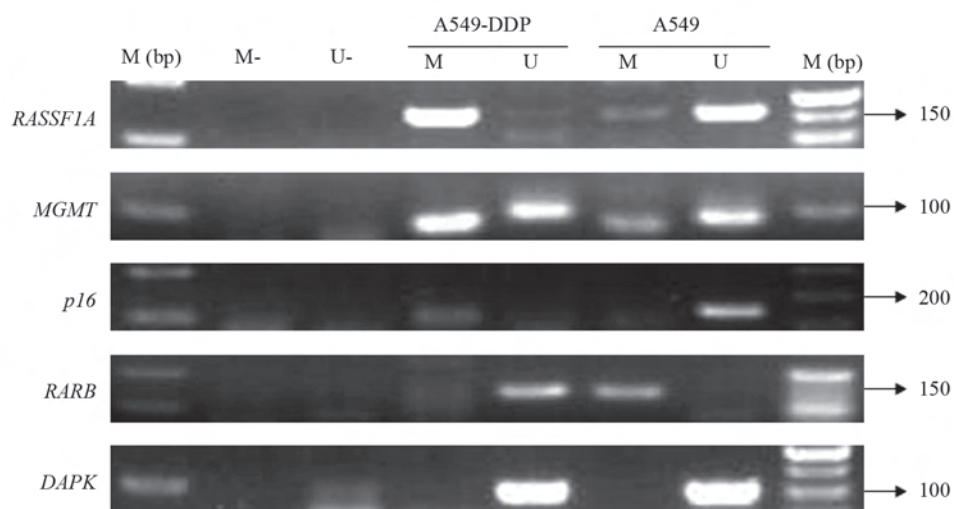
48, 72, 96 h提取细胞总RNA, RT-PCR检测5-aza-CdR对A549-DDP高甲基化基因(*RASSF1A*、*MGMT*、*p16*) mRNA表达的影响, 方法和条件同前。

2 结果

2.1 A549细胞及A549-DDP细胞中五个基因甲基化状态的比较

MSP检测A549与A549-DDP细胞中*RASSF1A*、*MGMT*、*p16*、*RARβ*、*DAPK*基因甲基化情况见图1。

MSP结果显示: A549细胞中, *RASSF1A*、*p16*及



M-: 甲基化阴性对照; U-: 非甲基化阴性对照。

M-: methylation control; U-: unmethylation control.

图1 A549和A549-DDP细胞株中*RASSF1A*、*MGMT*、*p16*、*RARβ*和*DAPK*的甲基化状态

Fig.1 Methylation status of *RASSF1A*, *MGMT*, *p16*, *RARβ* and *DAPK* in A549 and A549-DDP cell lines

*MGMT*基因主要呈未甲基化状态,而在顺铂耐受的A549-DDP细胞中,主要呈甲基化状态;但*RARβ*的情况与前面三个基因刚好相反,在A549细胞中呈甲基化状态,而在顺铂耐受的A549-DDP细胞中呈非甲基化状态;但*DAPK*基因在两个细胞亚型间均呈非甲基化状态。

2.2 A549细胞及A549-DDP细胞中五个基因mRNA表达水平的比较

RT-PCR检测A549细胞与A549-DDP细胞中*RASSF1A*、*MGMT*、*p16*、*RARβ*、*DAPK*的mRNA表达水平见图2。

RT-PCR显示: A549细胞中*RASSF1A*、*MGMT*、

*p16*基因的mRNA表达明显高于A549-DDP细胞株。而*RARβ*在A549-DDP细胞中的表达明显高于A549细胞。*DAPK*的表达在两细胞亚型间无明显差别。结果显示基因表达水平与其甲基化状态成反比关系。

2.3 去甲基化试剂对A549-DDP细胞*RASSF1A*、*MGMT*和*p16*基因表达的影响

2.3.1 不同浓度5-aza-CdR对A549-DDP细胞*RASSF1A*、*MGMT*和*p16*表达的影响

1~40 μmol/L的5-aza-CdR作用A549-DDP 48 h后, *RASSF1A*、*MGMT*和*p16*的mRNA表达情况见图3。

图3显示, 给药后*RASSF1A*和*MGMT* mRNA的表达水平有不同程度提高, 其相对表达量在一定范

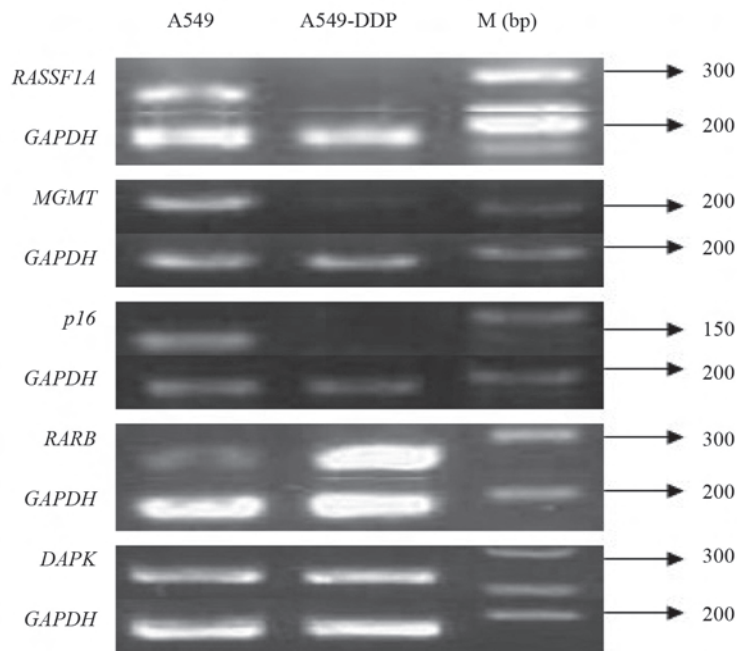
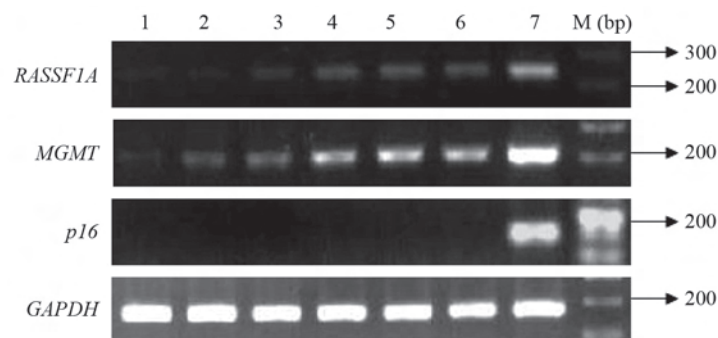


图2 A549及A549-DDP细胞株中*RASSF1A*、*MGMT*、*p16*、*RARβ*和*DAPK*基因mRNA表达
Fig.2 mRNA expression of *RASSF1A*, *MGMT*, *p16*, *RARβ* and *DAPK* in A549 and A549-DDP cell lines



1-6: 5-aza-CdR给药浓度分别为0, 1, 5, 10, 20, 40 μmol/L; 7: A549细胞株; M: DNA分子量标准。

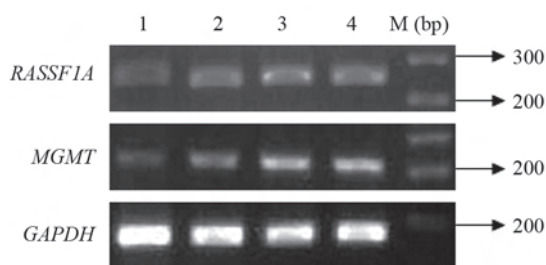
1-6: the concentrations of 5-aza-CdR were 0, 1, 5, 10, 20, 40 μmol/L; 7: A549 cell line; M: DNA marker.

图3 不同浓度5-aza-CdR作用后A549-DDP细胞株中*RASSF1A*、*MGMT*、*p16* mRNA的表达

Fig.3 mRNA expression of *RASSF1A*, *MGMT* and *p16* in A549-DDP cell line treated with different concentrations of 5-aza-CdR

围内呈剂量依赖性。但*p16*的表达几乎未见变化。

2.3.2 5-aza-CdR作用不同时间对A549-DDP细胞*RASSF1A*、*MGMT*和*p16*表达的影响 10 μmol/L的5-aza-CdR作用A549-DDP细胞24~96 h后, mRNA的表达水平见图4。提示随着去甲基化药物(5-aza-CdR)作用时间的延长, *RASSF1A*和*MGMT*逐渐恢复表达, 给药48 h后, 两基因的表达相对稳定。



1-4: 10 μmol/L的5-aza-CdR作用时间分别为24, 48, 72, 96 h。

1-4: treated with 10 μmol/L of 5-aza-CdR for 24, 48, 72, 96 h.

图4 10 μmol/L的5-aza-CdR作用不同时间后A549-DDP细胞株中*RASSF1A*与*MGMT*的表达

Fig.4 Expression of *RASSF1A* and *MGMT* in A549-DDP cell line in different time duration after treated with 10 μmol/L 5-aza-CdR

3 讨论

表观遗传学研究表明, DNA的甲基化修饰能够调控基因的转录。Teodoridis等^[14]的研究表明, 参与细胞周期调控、细胞凋亡通路及DNA修复的基因发生甲基化修饰而导致的表达沉默, 能够导致肿瘤细胞发生获得性耐药。吴俚蓉等^[15]报道: A549-DDP细胞株为hMLH1部分甲基化细胞株, 5-aza-CdR作用后可以部分逆转该细胞的耐药性状, 增强对顺铂的敏感性, 该研究提示基因甲基化可能参与了肺癌细胞对顺铂的耐药。Glasspool等^[16]认为, 以甲基化为主的表观遗传学修饰可能是获得性药物抵抗的潜在因素, 但临床化疗耐药的发生应是多个基因表达改变共同作用的结果。本研究以A549细胞株及其顺铂耐药亚型A549-DDP细胞株为研究对象, 比较与肺癌发生、发展和预后相关的五种抑癌基因的甲基化状态在两者间的差异, 本研究发现: *RASSF1A*、*MGMT*、*p16*的高甲基化和*RARβ*的非甲基化可能与A549细胞对顺铂的耐受有一定关系。

*RASSF1A*是被广泛研究的抑癌基因, 参与了肿瘤发生发展的全过程。本研究中, A549-DDP细胞是

与A549细胞同源的顺铂耐受亚型, A549-DDP细胞株中*RASSF1A*主要呈甲基化状态, 其表达水平明显低于亲本A549细胞; 而5-aza-CdR在一定程度上可逆转*RASSF1A*的甲基化, 并呈剂量依赖和时间依赖关系, 这提示*RASSF1A*甲基化修饰及表达改变可能与A549-DDP耐受顺铂有关。Koul等^[17]研究提示*RASSF1A*等基因的甲基化与生殖细胞癌对顺铂抵抗有关, 也支持我们的结论。

*MGMT*是DNA修复基因, 其异常甲基化引起的表达沉默可能是细胞癌变的机制之一。已有研究表明: *MGMT*的甲基化可作为非小细胞肺癌早期诊断的分子生物学标志^[18]。本研究发现: A549-DDP细胞中*MGMT*的甲基化水平高于其亲本细胞, *MGMT*在耐药细胞株中的表达也相应明显降低, 5-aza-CdR作用后可部分上调其表达。但Hegi等^[19]在恶性胶质瘤的研究中发现, *MGMT*的高表达是其发生烷化剂耐药的机制之一, *MGMT*的甲基化能够增加恶性胶质瘤病人烷化剂治疗的生存率, 这与我们在肺癌研究中的发现不一致, 是否与恶性肿瘤的组织来源不同有关, 值得进一步研究。

*p16*基因的编码产物P16蛋白是作用于细胞分裂周期的关键酶之一, 它直接作用于细胞周期抑制细胞增殖, 如表达缺失则致细胞永生形成肿瘤。本研究发现, 顺铂耐受的A549-DDP细胞, *p16*发生完全甲基化状态致其表达沉默, 但1~40 μmol/L的去甲基化试剂5-aza-CdR均未能逆转*p16*的mRNA表达, 我们不清楚为何5-aza-CdR不能逆转其表达, 计划在今后的实验中加大去甲基化试剂浓度和延长作用时间。

*RARβ*是重要的维甲酸受体。临床研究显示, 非小细胞肺癌组织中*RARβ*甲基化频率较高^[20]。但本研究在细胞水平发现: 耐药的A549-DDP细胞中*RARβ*呈非甲基化状态, 其表达明显高于A549细胞, 与*RASSF1A*、*MGMT*在两个细胞株的甲基化和表达情况刚好相反。Koul等^[17]对男性生殖细胞瘤的研究显示, *RARβ*的甲基化只发生在对顺铂敏感的男性生殖细胞瘤, 提示顺铂可诱导*RARβ*的去甲基化, 导致*RARβ*表达增强, 与我们的结果较吻合。可见, *RARβ*的甲基化可能是顺铂耐药的负性因素, 值得进一步研究证实。

本研究比较了肺癌A549细胞株及耐顺铂亚型A549-DDP细胞株中*RASSF1A*、*MGMT*、*DAPK*、*p16*、

*RARβ*五种抑癌基因的甲基化状态与mRNA水平,发现A549肺癌细胞对顺铂的耐受可能与*RASSF1A*、*MGMT*、*p16*的高甲基化和*RARβ*的低甲基化相关。这为进一步研究非小细胞肺癌对顺铂的耐药机制提出了可供参考的方向,至于*RASSF1A*、*MGMT*、*p16*、*RARβ*甲基化谱是否可作为肺腺癌细胞对顺铂化疗敏感性的实验室指标,值得在细胞水平和临床病例中进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Fujiwara K, Fijimoto N, Tabata M, Nishii K, Matsuo K, Hotta K, *et al.* Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(3): 1219-25.
- 2 彭再梅, 山长婷, 王惠芳. 诱导痰*RASSF1A*、*P16*和*DAPK*基因启动子区甲基化在肺癌诊断中的价值. *中南大学学报(医学版)* 2010; 35(3): 247-53.
- 3 Fischer JR, Ohnmacht U, Rieger N, Zemaitis M, Stoffregen C, Manegold C, *et al.* Prognostic significance of *RASSF1A* promoter methylation on survival of non-small cell lung cancer patients treated with gemcitabine. *Lung Cancer* 2007; 56(1): 115-23.
- 4 Strathdee G. Epigenetic markers and response to chemotherapy in cancer. *Disease Markers* 2007; 23(1/2): 43-9.
- 5 Gaspar N, Marshall L, Perryman L, Bax DA, Little SE, Viana-Pereira M, *et al.* *MGMT*-independent temozolomide resistance in pediatric glioblastoma cells associated with a PI3-Kinase-mediated HOX/stem cell gene signature. *Cancer Res* 2010; 70(22): 9243-52.
- 6 Endoh H, Yatabe Y, Shimizu S, Tajima K, Kuwano H, Takahashi T, *et al.* *RASSF1A* gene inactivation in non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Int J Cancer* 2003; 106(1): 45-51.
- 7 Kato, K Iida S, Uetake H, Takagi Y, Yamashita T, Inokuchi M, *et al.* Methylated TMS1 and DAPK genes predict prognosis and response to chemotherapy in gastric cancer. *Int J Cancer* 2008; 122(3): 603-8.
- 8 Abbaszadegan MR, Moaven O, Sima HR, Ghafarzadegan K, A'rabi A, Forghani MN, *et al.* *p16* promoter hypermethylation: A useful serum marker for early detection of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14(13): 2055-60.
- 9 Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Mori M, *et al.* Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR-β, RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63(13): 3724-8.
- 10 Narayan G, Arias-Pulido H, Koul S, Vargas H, Zhang FF, Vilella J, *et al.* Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARβ, and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: Its relationship to clinical outcome. *Mol Cancer* 2003; 2: 24-32.
- 11 Lenz G, Hutter G, Hiddemann W, Dreyling M. Promoter methylation and expression of DNA repair genes hMLH1 and MGMT in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2004; 83(10): 628-33.
- 12 Ivanova I TA, Golovina I DA, Zavalishina LE, Volgareva GM, Katargin AN, Andreeva YY, *et al.* Up-regulation of expression and lack of 5'-CpG island hypermethylation of *P16* INK4a in HPV-positive cervical carcinomas. *BMC Cancer* 2007; 7: 47-56.
- 13 Koul S, Houldsworth J, Mansukhani MM, Donadio A, McKiernan JM, Reuter VE, *et al.* Characteristic promoter hypermethylation signatures in male. *Mol Cancer* 2002; 1: 8-17
- 14 Teodoridis JM, Strathdee G, Plumb JA, Brown R. CpG-island methylation and epigenetic control of resistance to chemotherapy. *Biochem Soc Trans* 2004; 32(Pt6): 916-7.
- 15 吴俚蓉, 胡春宏. HMLH1基因甲基化与非小细胞肺癌顺铂耐药方面的研究. *中国癌症杂志* 2010; 20(7): 508-14.
- 16 Glasspool RM, Teodoridis JM, Brown R. Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance. *Brit J Cancer* 2006; 94(8): 1087-92.
- 17 Koul S, McKiernan JM, Narayan G, Houldsworth J, Bacik J, Dobrzynski DL, *et al.* Role of promoter hypermethylation in Cisplatin treatment response of male germ cell tumors. *Mol Cancer* 2004; 3: 16-23.
- 18 孔云明, 金永堂, 薛绍礼, 于在诚, 徐迎春, 陶文虎, 等. NSCLC患者血浆和MGMT基因甲基化检测及临床意义. *肿瘤* 2007; 127(9): 715-8.
- 19 Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, *et al.* Correlation of O⁶-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* 2008; 26(25): 4189-92.
- 20 张晨焯, 金永堂, 徐鹤云, 张 虎, 张伟民, 孙肖瑜, 等. *P16*、*DAPK*和*RARβ*基因启动子CpG岛甲基化与非小细胞肺癌临床特征的关系. *中华医学遗传学杂志* 2011; 28(1): 23-8.

The Relationship between the Methylation of *RASSF1A*、*MGMT*、*DAPK*、*p16*、*RARβ* and the Sensitivity to Cisplatin in A549 Cell Line

Dong Zihe, Hou Yulei, Li Chenghua, Wu Yongchang, Chen Hui*

(Clinical Laboratories, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract It was reported that the changes of multiple gene expression regulated by the methylation might be one of regulation factor in the sensitivity to chemotherapy. In order to search for the biomarker for the sensitivity to cisplatin in lung cancer, A549 cell line and its homologous cisplatin-resistant cell line (A549-DDP) were cultured. Methylation specific PCR (MSP) was used to detect the methylation status of 5 candidate gene (*RASSF1A*, *MGMT*, *DAPK*, *p16*, *RARβ*). RT-PCR was used to detect the mRNA expression of these 5 genes among the two cell lines. The results indicated, in A549 cell line, *RASSF1A*, *MGMT*, *p16* were unmethylated and high expressed, and the three genes were hypermethylated and low expressed in A549-DDP cell line, but unmethylated status and high level of mRNA expression of *RARβ* gene were found in A549-DDP only, and there was no difference in the methylation and expression of *DAPK*. Treated with demethylating agent (5-aza-CdR), the mRNA expression of those three hypermethylation gene (*RASSF1A*, *MGMT*, *p16*) in A549-DDP was upregulated, the effect was dependent on the concentration of 5-aza-CdR and the time duration. The present study indicated that the mRNA changes regulated by the methylation of *RASSF1A*, *MGMT*, *p16*, *RARβ* might be the possible reason for A549's sensitivity to cisplatin. As a potential biomarker for the sensitivity to cisplatin, the methylation panel of *RASSF1A*, *MGMT*, *p16*, *RARβ* in lung cancer is deserved to be further investigated in clinic.

Key words DNA methylation; cisplatin; methylation specific PCR; lung adenocarcinoma A549 cell line

Received: August 2, 2011 Accepted: September 2, 2011

This work was supported by the Chongqing Natural Science Foundation (No.2008BB5392)

*Corresponding author. Tel: 86-23-89012744, E-mail: huichen@cqmu.edu.cn