

## DNA 去甲基化对马立克氏病病毒(MDV)基因表达的影响

任晓明<sup>1</sup> 古市雅哉<sup>2</sup> 林正信<sup>2</sup>

(1. 北京农学院 动物科学技术系,北京 102206; 2. 北海道大学 兽医学部,札幌 060,日本)

**摘要** 以鸡马立克氏病脾脏淋巴瘤继代细胞系 MDCC-MB1 (MSB1) 为研究对象,用 southern 和 northern 斑点分子杂交放射自显影等方法,证明了 5-氮胞苷可以阻断 MSB1 细胞 DNA 的甲基化,且去甲基化的 DNA 转录区和部分非转录区有特异增幅的转录产物 mRNA,说明这些区基因转录活性上升。用 5-氮胞苷处理 MSB1 细胞使其去甲基化后,该细胞 DNA 的内切酶 *Bam*H 区域对 DNaseI 敏感性增高,该片段区的基因表达活性也增高。以上结果提示,DNA 的去甲基化可以提高 MDV 的基因表达,进一步说明 MDV DNA 的甲基化在抑制 MDV 基因表达,维持 MDV 在淋巴瘤细胞株中潜伏感染状态可能起着重要作用。

**关键词** 淋巴瘤细胞; MDV DNA; 甲基化; mRNA; 5-氮胞苷

中图分类号 Q 783.1

文章编号 1007-4333(2004)06-0001-05

文献标识码 A

### Effect of DNA demethylation on gene expression from Marek's disease virus

Ren Xiaoming<sup>1</sup>, Furuichi Tatsuya<sup>2</sup>, Hayashi Masanobu<sup>2</sup>

(1. Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China; 2. Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

**Abstract** A variety of Marek's disease virus (MDV) lymphoblastoid cell lines have been established. The MDV lymphoblastoid cell line, MDCC-MB1 (MSB1) were treated with 5-azacytidine (5-AZC) and resulted in demethylation of MDV DNA and the increase in mRNA from certain portions of the MDV DNA. When MDV DNA was digested with DnaseI, new bands appeared and the increases in mRNA from these portions of the MDV DNA were detected by using southern and northern blotting hybridization. These results suggest MDV DNA transcriptional activity was increased by demethylation, and the methylation of MDV DNA appears to be one of the factors associated with the repression of transcription of MDV DNA in the lymphoblastoid cell line, MSB1.

**Key words** lymphoblastoid cell; MDV DNA; demethylation; mRNA synthesis; 5-AZC

鸡马立克病(Marek's disease, MD)是由马立克氏病病毒(Marek's disease herpesvirus, MDV)引起的一种以恶性淋巴瘤为特征的鸡传染病<sup>[1]</sup>,也是迄今为止所有物种中唯一可以利用病毒疫苗(型疫苗是用火鸡疱疹病毒制作的)进行有效控制的病毒性肿瘤疾病。作为研究病毒性肿瘤疾病的理想模型,MDV 在医学界、兽医学界都得到了广泛重视<sup>[2]</sup>。

细胞 DNA 的甲基化是在甲基化酶的作用下,在核酸碱基胞嘧啶的六元杂环化合物 5 位的 —H 由 —CH<sub>3</sub> 基取代,形成 5-甲基胞嘧啶。DNA 甲基化部位多在核酸碱基序列 5'-CCGG-3' 的第 2 个 C 进行。

高等生物 DNA 的甲基化多发生在幼稚细胞,如胚胎早期细胞等。在某些癌细胞中 DNA 也见有 DNA 和 RNA 的甲基化现象。甲基化的基因区多为基因表达的抑制区<sup>[3]</sup>。由此可见,基因特定区域的甲基化现象与抑制基因表达有关。

细胞的 DNA 特定部位存在着甲基化现象,同时也存在着脱甲基化的可能<sup>[4]</sup>。5-氮胞苷(5-AZC)是一种常用的 DNA 甲基化阻断剂。5-AZC 的分子结构与胞嘧啶相似,只是胞嘧啶杂环 5 位的碳原子被氮原子取代,而取代后氮原子不能与 —CH<sub>3</sub> 基结合,故甲基化不能发生。

MD 的肿瘤状态实际上是一种 MDV 潜伏感染

收稿日期: 2004-06-15

作者简介: 任晓明,副教授,博士,主要从事动物疾病基因调控研究, Tel: 010-80799146。

状态<sup>[3]</sup>。这种潜伏感染状态的维持是否与 MDV DNA 特定区域甲基化有关是值得探讨的问题。如果基因特定区域的甲基化抑制了基因表达,阻断基因特定区的甲基化应该提高该区的基因表达频率。本实验以鸡马立克氏病脾脏淋巴瘤继代细胞系 MDCC-MB1 (MSB1) 为主要研究对象,用 southern 和 northern 斑点分子杂交放射自显影等方法为主要手段,研究 DNA 去甲基化对 MDV 基因表达的影响,探讨提高基因表达频率的途径。同时,进一步阐明甲基化在维持潜伏感染状态、维持病毒性肿瘤状态上的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

主要使用了鸡马立克病脾脏淋巴瘤细胞株 MDCC-MSB-1 下称 MSB1<sup>[1]</sup>。将 MSB 用 RPMI-1640 培养基培养,在 100 mL 该培养基中加入 10 mL 犊牛血清和 50 000 U · L<sup>-1</sup> 的青霉素,体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub>,37 °C 条件下培养,参照 Hitchner 等人的方法<sup>[5]</sup>。

### 1.2 细胞的 5-AZC 处理

在细胞对数生长期的培养基内加入 5-AZC 30 μg · mL<sup>-1</sup>,处理 3 d 后将细胞用 PBS 液洗涤,去除 5-AZC,加入新的培养基继续培养 2 d 后供试验用。

### 1.3 southern 及 northern 斑点转移及分子杂交放射自显影

操作依照 southern<sup>[6]</sup>方法进行。

### 1.4 细胞 RNA 的制备

将约 5 × 10<sup>8</sup> 个细胞 3 000 r · min<sup>-1</sup> 5 min 离心沉淀,然后把沉淀的细胞用 PBS 液洗涤,将细胞用含有质量分数为 0.5% 的 NP-40 的 TN 液 10 mL 悬浊,在冰中静止 5 min 将细胞破坏。然后在 10 000 r · min<sup>-1</sup>,4 °C 条件下离心 10 min,收集上清液,在 10 mL 上清液中加入质量分数为 10% 的 SDS 1 mL 及 10 mg · mL<sup>-1</sup> 蛋白酶 100 μL,55 °C 反应 30 min。加入等量酚氯仿异戊醇剧烈振荡后,10 000 r · min<sup>-1</sup> 4 °C 离心 10 min。如此抽提重返 2 次。加入 1/10 容量的 3 mol · L<sup>-1</sup> 醋酸钠和 2.5 倍容量的乙醇,-70 °C 放置 30 min。10 000 r · min<sup>-1</sup>,4 °C 离心 10 min,沉淀,RNA 供试。

### 1.5 Poly(A)<sup>+</sup> RNA 的制备

依照 Aviv H. et al.<sup>[7]</sup>方法进行。

### 1.6 cDNA 探针的合成

将 5 μg Poly(A)<sup>+</sup> RNA 溶于蒸馏水中。加入 0.01 μg Oligo dT 和 5 μL 1 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCL,90 °C 加热 50 min,42 °C 静置 2 h,使 Poly(A)<sup>+</sup> 和 Oligo dT 结合。将 5 μL dXTP 混合液(4 mmol · L<sup>-1</sup> dTTP, dATP, dGTP 和 0.4 mmol · L<sup>-1</sup> dCTP)、2 μL 0.1 mmol · L<sup>-1</sup> DTT、5 μL [-32P]dCTP 和 60 U 的反转录酶一起 42 °C 加热 2 h 合成 cDNA。将其作为探针供试。

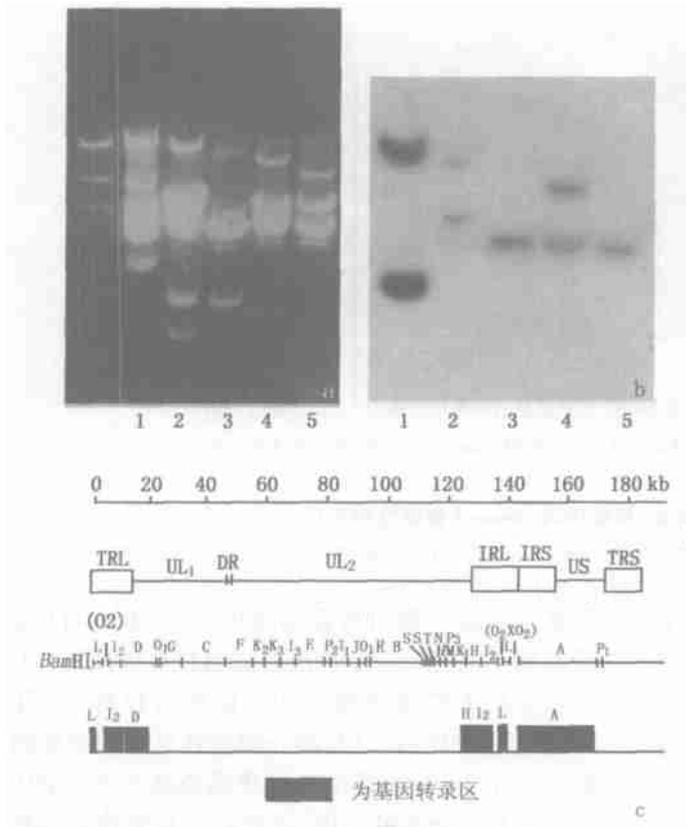
## 2 结果

### 2.1 用 5-AZC 处理后潜伏状态 MDV 基因转录活性的变化

由于淋巴瘤细胞(如 MSB1)中潜伏状态的 MDV 基因存在着高度甲基化现象,用甲基化阻断剂处理淋巴瘤细胞后,MDV 基因转录活性应该有变化。为此,从未做任何处理的 MSB1 及用 5-AZC 处理的 MSB1 中抽提出 Poly(A)<sup>+</sup> RNA,并合成了 cDNA。将其作为探针对 MDV-*Bam*H 区域的所有片段进行分子杂交放射自显影。如图 1 所示,MSB1 基因转录区 *Bam*H -A,-D,-H,-I<sub>2</sub> 和-L 增加了转录活性;非转录区 *Bam*H -B,-G,-I<sub>1</sub> 也表现出了转录活性。并且斑点的分子杂交强度增强。表明用甲基化阻断剂 5-AZC 处理后,去甲基化的 DNA 的转录区和部分非转录区基因转录活性上升。

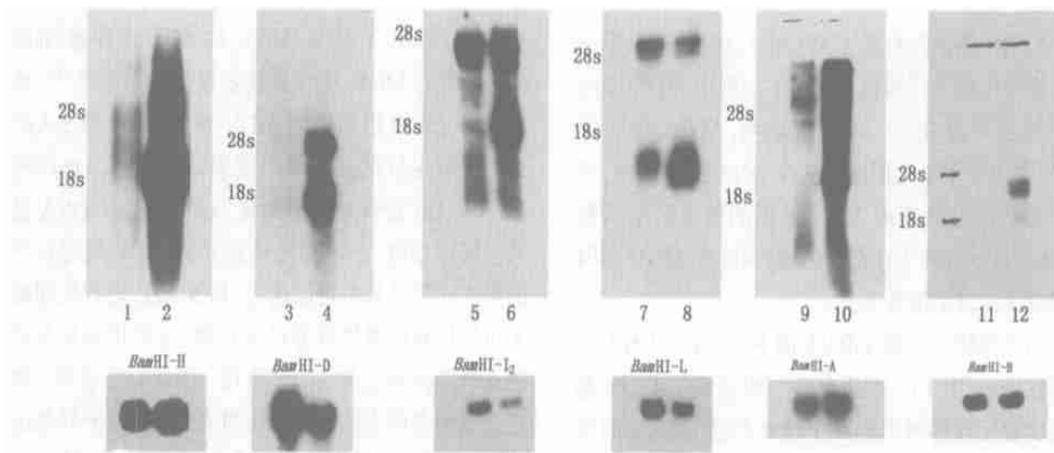
### 2.2 用 5-AZC 处理 MSB1 后 MDV 基因转录产物 mRNA 的变化

5-AZC 处理 MSB1 后基因转录活性上升区域转录产物是否真的增加?对此用 northern 斑点分子杂交放射自显影方法进行了探讨(图 2)。用 5-AZC 处理后,增加了转录活性的转录区 *Bam*H -A,-D,-H,-I<sub>2</sub>,-L 区域及增加了转录活性的非转录区的 *Bam*H-B 区域的转录产物都有所增加,尤其在 *Bam*H-B,-D,-H 区域转录产物增加显著。然而在转录活性上升的非转录区 *Bam*H-G,-I<sub>1</sub> 区域未检出转录产物。在 *Bam*H -A 领域的 2.5 kb 转录产物、*Bam*H -H 领域的 1.8 kb 转录产物及 *Bam*H -I<sub>2</sub> 领域的 1.8 kb 转录产物增幅十分明显。在图 2 中的 1,3,5,7,9 和 11 带为从没做任何处理的 MSB1 抽提的 Poly(A)<sup>+</sup> RNA;2,4,6,8,10 和 12 带为从用 5-AZC 处理的 MSB1 抽提的 Poly(A)<sup>+</sup> RNA,两者等量电泳后,用 cDNA 做探针进行分子杂交放射自显影。



a 为将 MDV DNA 用 *Bam*H 切断后电泳分离的所有片段;b 为从 5-AZC 处理的 MSB1 中抽提出 Poly(A)<sup>+</sup> RNA,并合成了 cDNA 作为探针,对 MSB1 *Bam*H 区域所有片段进行分子杂交放射自显影;c 为 MDV DNA *Bam*H 区域结构及内切酶位点图。  
图 1 用 5-AZC 处理 MSB1 后 MDV 基因转录活性的变化

Fig. 1 Southern blotting analysis of 5-AZC MDV with cDNA as probe



1,3,5,7,9,11 带:从没做任何处理 MSB1 中抽提的 Poly(A)<sup>+</sup> RNA 5 μg 电泳; 2,4,6,8,10,12 带:从用 5-AZC 处理 MSB1 中抽提的 Poly(A)<sup>+</sup> RNA 5 μg 电泳。用 *Bam*H -A,-B,-D,-H,-I<sub>2</sub>-L 片段作为探针进行分子杂交放射自显影。下段的 2 个斑点是在同一滤膜杂交后,用作为内标记的 肌动蛋白 cDNA 为探针进行再杂交放射自显影

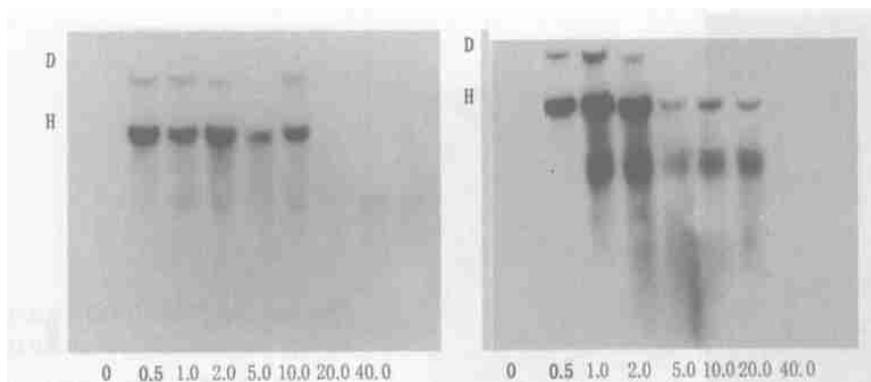
图 2 用 5-AZC 处理 MSB1 后 MDV 基因由来的转录产物的变化

Fig. 2 Northern blotting analysis of 5-AZC MDV DNA with *Bam*H sequence as probe

### 2.3 用 5-AZC 处理后 MSB1 细胞核对 DNase I 敏感性的改变

对用 5-AZC 处理后 MSB1 细胞核对 DNase I 敏感性的改变进行了探讨,结果如图 3 所示。从未加处理的 MSB1 细胞和用 5-AZC 处理的 MSB1 细

胞中抽提的细胞核分别加入 DNase I 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 和 40.0 μg · mL<sup>-1</sup> 进行处理,然后抽提出 DNA,再用内切酶 *Bam*H -H 片段做探针进行分子杂交放射自显影,在未加处理的 MSB1 细胞核, DNase I 的作用从 10 μg · mL<sup>-1</sup> 开始明显,来



对未加处理的 MSB1 细胞和用 5-AZC 处理 MSB1 细胞抽提的细胞核分别加入 DNase I 0 ~ 40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  进行处理,然后抽提出 DNA,用 *Bam*H Ⅰ 切断,再用 *Bam*H Ⅰ 片段做探针进行分子杂交放射自显影

图 3 用 5-AZC 处理后 MSB1 细胞核对 DNase I 敏感性的变化

Fig. 3 Results of 5-AZC MSB1 cells treated with DNase I

源于 *Bam*H Ⅰ-H 片段的斑点 (5.4 kb) 和来源于与 H 片段含有相同碱基的 D 片段的斑点 (11.4 kb) 几乎消失。在 5-AZC 处理的 MSB1 的细胞, DNase I 质量浓度在 0.5 ~ 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  之间出现了 2 条新的斑点 (2.5 和 2.9 kb)。

### 3 讨论

1) 用甲基化阻断剂 5-AZC 进行处理, 可以使鸡马立克淋巴瘤继代细胞系 MSB1 细胞中 MDV 基因部分地去甲基化<sup>[3]</sup>。本研究证明, MSB1 细胞中 MDV 基因去甲基化同时, MDV DNA 部分区域, 即处于潜伏感染状态的 MDV 基因的转录区全区域 (在倒置反复排列中存在的区域) 和部分 MDV 基因非转录区的转录活性上升。

2) 作为转录产物 mRNA 的 Poly(A)<sup>+</sup> RNA 的量明显增加 (图 1)。本研究进一步证实了 MDV 基因组倒置反复排列中能产生转录产物 mRNA 的报道<sup>[8]</sup>。由于 5-AZC 的作用, 基因倒置反复排列区的转录活性上升。这说明, 在马立克淋巴瘤细胞基因表达的领域由于甲基化的作用, 部分基因的表达受到了抑制。由 northern 斑点分子杂交的结果可见, 从 MDV 基因倒置反复排列区转录的 mRNA 斑点强度及斑点形式都发生了变化 (图 2)。上述这些结果显示, 基因去甲基化使马立克淋巴瘤细胞中 MDV 基因表达的 mRNA 转录量增大。

3) 由于 5-AZC 的作用, 在 MDV 基因非转录区的 *Bam*H Ⅰ-B, -G 及 I<sub>1</sub> 区域转录活性都有所增加 (图 1)。然而, 在 northern 斑点分子杂交放射自显

影验证转录产物的实验结果中, 只在 *Bam*H Ⅰ-B 区域发现了转录产物, 其他 *Bam*H Ⅰ-G 和 *Bam*H Ⅰ-I<sub>1</sub> 区域未见有转录产物产生。由此可以推论, 用 5-AZC 进行处理后, 只有部分增加转录活性的区域实际发生了表达, 这是由于潜伏感染状态的 MDV 基因组没有完全去甲基化, 或是还有其他转录抑制因素参与了基因表达的抑制。笔者以前的研究工作已经证实, 在人工感染 MDV 的鸡胚成纤维细胞 (CEF) 中的 MDV 基因多数表现出转录活性<sup>[4]</sup>; 然而在马立克淋巴瘤细胞 MDV 基因, 即使经 5-AZC 进行处理也依然存在着不能表达的区域。由此可见, 用 5-AZC 进行处理后确实使一部分 MDV DNA 提高了转录活性, 然而尚未达到复制 MDV 病毒粒子的程度。不过依然可以认为, 用 5-AZC 进行处理确实可以特异地增加部分转录产物, 说明甲基化与抑制这些基因表达关系十分密切。因此有必要对控制这些遗传基因表达的甲基化和去甲基化进行详细的研究。另外, 在淋巴瘤细胞株 MDV DNA 中还存在着没有甲基化的序列, 对这部分序列的存在意义和作用有必要深入探讨。DNA 甲基化抑制基因表达的分子机理目前尚不十分明了, 但是甲基化影响 DNA 高级构造可能是重要的因素之一。在基因表达活跃区域 DNA 未甲基化, 核酸以活化染色体构造方式存在; 而表达抑制区域 DNA 被甲基化, 通过特定的蛋白质媒介使核酸凝集形成不活化染色体构造, 使 RNA 合成酶等与转录有关的因子不能与 DNA 结合, 对 DNase I 等酶的敏感性方面, 活化染色体构造也高于不活化染色体构造, 在转录活性区域,

特别是调控基因表达的部位对 DNaseI 的敏感性很高<sup>[9]</sup>。

4) 从图 3 可见,用 5-AZC 处理 MSB1 后,其 MDV DNA *Bam*H -H 区域出现 2.5 和 2.9 kb 2 条斑点,这 2 条斑点相加为 5.4 kb,恰好与 *Bam*H -H 片段大小相同。5-AZC 使 MSB1 DNA 去甲基化,同时 MDV DNA 的 *Bam*H -H 区域高级构造变为转录活性更高的染色体构造,并出现对 DNaseI 高敏感性的位点。由于染色体构造的变化,转录促进因子更容易作用于 MDV 基因。这可能是 MDV 转录活性增高的一个原因。

5) 处于复制阶段向潜伏状态移行的 MDV 基因受到甲基化的修饰,其分子机理尚不明了。因此,MDV 基因是由于甲基化使基因表达受到抑制,还是抑制了基因表达后产生甲基化尚不清楚;MDV 基因的甲基化以及与此相伴的 MDV 高级构造的变化是抑制 MDV 基因表达的直接原因,还是甲基化是保持基因安定状态的间接因子,目前尚难判断。总之,本研究的结果表明,甲基化与处于潜伏感染状态的鸡马立克淋巴瘤继代细胞 MDV 基因表达的抑制机制密切相关。

### 参 考 文 献

- [1] Marek J. Multiple nervenentzündung bei hühnern (polyneuritis of chicken). Dtsch Tierarztl [J]. Wschr, 1907, 15: 417 ~ 421
- [2] 卢春,吴建平,张训海,等. 马立克病疱疹病毒致瘤株基因组 IRL 区 *Bam*HI12 和 L 片段内一特异性 cDNA 的分离与鉴定 [J]. 南京医科大学学报, 1999, 19(6): 447 ~ 449
- [3] Masanobu H, Kazuko I, Tatsuya F, et al. Changes in the nucleosomal structure of the Marek's disease virus genome in lymphoblastoid cell line, MDCC-MSB1 induced by 5-azacytidine [J]. J Vet Med Sci, 1995, 57: 157 ~ 160
- [4] 任晓明,古市雅哉,林正信. 马立克氏病毒 DNA 转录区和非转录区甲基化及脱甲基化的探讨 [J]. 北京农学院学报, 2004, 19(3): 13 ~ 19
- [5] Hitchner S, Domermuth C, Purchase H, et al. Cell-culture Methods. Isolation and identification of avian pathogens [M]. NY: Arrol Printing Co. Ltd, Ithaca, 1975. 291 ~ 311
- [6] Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis [J]. J Mol Boil, 1975, 98: 503 ~ 517
- [7] Aviv H, Leder P. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose [J]. Proc Natl Acad Sci, 1972, 69: 1408 ~ 1412
- [8] Susaya K, Bradley G, Nonoyama M, et al. Latent transcripts of Marek's disease virus are clustered in the short and long repeat regions [J]. J Virol, 1990, 64: 5773 ~ 5782
- [9] Cedar H. DNA methylation and gene activity [J]. Cell, 1998(3): 3 ~ 4