

· 实验研究 ·

5-Aza-CdR 对乳腺癌细胞增殖及 Maspin 基因表达的影响

张波 刘科 陈剑英 王国斌

【摘要】 目的 研究 5-氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)对乳腺癌 MDA-MB-435S 细胞增殖及抑癌基因 Maspin 表达的影响。**方法** 用特异性甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 处理乳腺癌细胞株 MDA-MB-435S 8 d 后,采用四唑盐(MTT)比色法观察细胞在药物处理前后的生长活性,应用流式细胞仪进行细胞周期的检测,RT-PCR 检测细胞处理前后 Maspin mRNA 的表达。**结果** 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 处理乳腺癌细胞株 MDA-MB-435S 8 d 后,与对照组比较能明显抑制肿瘤细胞的生长。流式细胞仪检测发现 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 作用 72 h 后可导致 MDA-MB-435S 细胞 G2/M 期阻滞,减少进入有丝分裂期的细胞百分比。RT-PCR 显示 Maspin mRNA 在 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 作用 72 h 后重新表达。**结论** 在人乳腺癌 MDA-MB-435S 细胞中,Maspin 基因可能因高甲基化而导致转录失活,经特异性甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 处理可使 Maspin 基因重新表达,后者能导致该肿瘤细胞 G2/M 期阻滞,并抑制细胞生长。

【关键词】 Maspin 基因;甲基化;5-氮-2'-脱氧胞苷;乳腺癌

【中图法分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A

Effects of 5-Aza-CdR on cell proliferation in breast cancer cell line MDA-MB-435S and expression of maspin gene ZHANG Bo, LIU Ke, CHEN Jian-ying, WANG Guo-bin. Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430022, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on the proliferation of MDA-MB-435S cells and expression of tumor suppressor gene maspin. **Methods** Human breast cancer cell line MDA-MB-435S was treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR, a specific demethylating agent for 0 to 8 days. The growth of MDA-MB-435S cells was observed by MTT assay before and after 5-Aza-CdR treatment, respectively. The expression of maspin mRNA was observed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The cell cycle of MDA-MB-435S cells was analyzed by flow cytometry. **Results** MDA-MB-435S cells treated with 5-

Aza-CdR displayed a slow growth in comparison with the control cells, and the inhibition rate increased sharply from day 5 to day 8 (35.42% to 71.29%). Flow cytometry showed that 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR could induce G2/M cell cycle arrest and decreased the percentage of mitosis cell number in this cell line. Maspin mRNA was expressed in MDA-MB-435S cells after 5-Aza-CdR treatment, but it was weakly detectable before the treatment. **Conclusions** Maspin gene might be transcriptional silencing by hypermethylation and the re-expression of maspin gene by 5-Aza-CdR can inhibit the proliferation and induce the G2/M arrest of MDA-MB-435S breast cancer cells.

【Key words】 Maspin; DNA methylation; 5-Aza-2'-deoxycytidine; Breast carcinoma

乳腺癌的发病率在逐年升高。早期诊断和早期治疗是提高无病生存率的关键。癌基因的激活和抑癌基因的失活是肿瘤形成和进展的关键机制。抑癌基因失活的主要方式有基因的突变、缺失和启动子区域的高甲基化等^[1,2]。5-氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)是一种 DNA 甲基转移酶的抑制剂。它通过去甲基化作用能使多种 CpG 岛过甲基化的抑癌基因重新表达,而恢复抑癌功能^[3]。Maspin 基因是近十年发现的抑癌基因,对乳腺癌细胞的生长具有明显的抑制作用^[4]。本研究通过 5-Aza-CdR 处理人乳腺癌细胞系 MDA-MB-435S,分析肿瘤细胞的生物学改变,以探讨乳腺癌治疗的新靶点。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养和药物处理

MDA-MB-435S 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基(Gibco 公司)。5-Aza-CdR(Sigma 公司)配制成 0.25 mg/ml (1.1 mmol/L)的储存液,在培养基中稀释成终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。

1.2 MTT 法检测细胞增殖活性

以每孔 1×10^3 个细胞接种于 96 孔板,各组设 6 个复孔。对照组细胞以常规 RPMI 1640 培养,药物处理组以含有 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 的 RPMI 1640 培养。待细胞贴壁后,每隔 24 h 测量 1 次。每孔加入质量浓度 5 g/L 的 MTT 20 μl ,置培养箱内温育 4 h,小心吸去培养基,加入 150 μl 二甲基亚砷(DMSO),37 $^{\circ}\text{C}$ 水平摇床振摇 15 min,待晶体充分溶解后,置全自动酶标仪于 490 nm 波长处读取吸光度(OD)。细胞增殖能力以平均 OD 值分析,以 OD 值为纵坐标,时间(d)为横坐标,绘制生长曲线。细胞生长抑制率% = (1 - 实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值) $\times 100\%$ 。以抑制率%为纵坐标,时间(d)为横坐标,绘制抑制率曲线。

1.3 细胞周期的检测

5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 处理的细胞及对照组细胞均以 1×10^6 个接种于 8 个 60 mm 培养皿中,每 24 h 用胰蛋白酶消化分别收集对照组和处理组细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,70% 乙醇固定。细胞检测前离心弃乙醇,置于 PI 溶液(含 1.5 mg/ml 碘化丙锭,10 mg/ml RNase A)37 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 3 h,以流式细胞仪(BD 公司)进行细胞周期检测。

1.4 RT-PCR 检测 Maspin 基因的表达

细胞总 RNA 的提取参照 RNAiso 试剂盒(Takara 公司)操作。10 μl 逆转录

反应体系含 5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L dNTPs, 10 U RNase 抑制剂, 2.5 U AMV 逆转录酶, 25 pmol 随机引物及样本 RNA。逆转录反应条件: 30 °C 10 min, 42 °C 30 min, 95 °C 5 min。50 μl PCR 反应体系含 1.25 U Taq 酶, 特异性上下游引物各 25 pmol。Maspin 基因 PCR 反应条件: 95 °C 15 min; 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min, 5 个循环; 再将退火温度降至 57 °C 进行 32 个循环。扩增产物于 2.5% 琼脂糖凝胶电泳分离。目的基因 maspin 及内对照 β-actin 的引物由 Primer 5.0 软件自行设计, 由 Invitrogen 公司合成。引物序列如下: maspin 5'-GCTTTTGCCGTTGATCTGTTC-3', 5'-GATCTGACCTTTCGTTTCTTCCA-3', 产物片段长度 369 bp。β-actin 5'-CGAAACTACCTTCAACTCCAT CA-3', 5'-CGGACTCGT-CATACTCCTGCT-3', 产物片段长度 272 bp^[5]。

1.5 统计学处理

多样本均数比较采用单因素方差分析, SPSS10.0 统计软件进行处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5 μmol/L 5-Aza-CdR 处理前后 MDA-MB-435S 细胞生长曲线和抑制率曲线

图 1 的生长曲线显示 5 μmol/L 5-Aza-CdR 处理后 4 d 内, 与对照组比较细胞生长速度无显著性差异 ($P > 0.05$), 而从第 5 天开始 5-Aza-CdR 明显抑制了细胞的生长。图 2 的细胞抑制率曲线显示第 5 ~ 8 天的抑制率分别为 35.42%、47.14%、60.53% 和 71.29% ($P < 0.05$)。

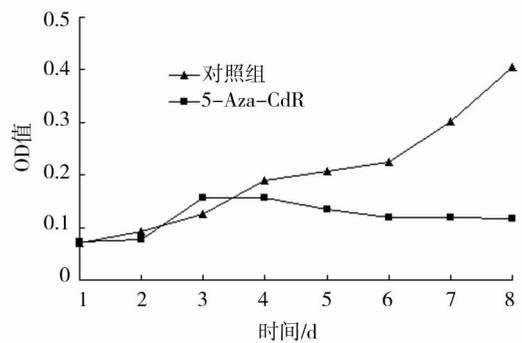


图 1 5-Aza-CdR 处理乳腺癌 MDA-MB-435S 细胞前后的生长曲线

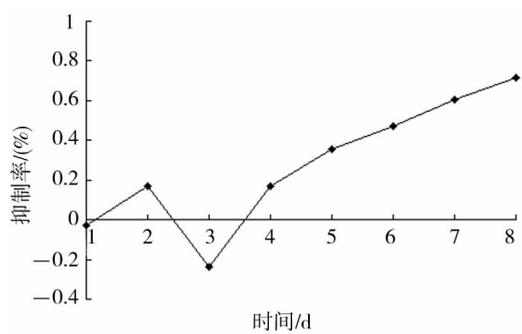


图 2 5-Aza-CdR 处理乳腺癌 MDA-MB-435S 细胞后的生长抑制率曲线

2.2 5-Aza-CdR 对 MDA-MB-435S 细胞周期的影响

5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 处理 24、32 和 72 h 后,MDA-MB-435S 细胞处于 G₀/G₁ 期的细胞百分比分别为 53.19%、50.50% 和 51.56%,对照组为 67.34%;处于 G₂/M 期的细胞百分比分别为 26.32%、36.58% 和 33.72%,对照组为 21.71%,即细胞周期出现了 G₂/M 期的阻滞(图 3)。

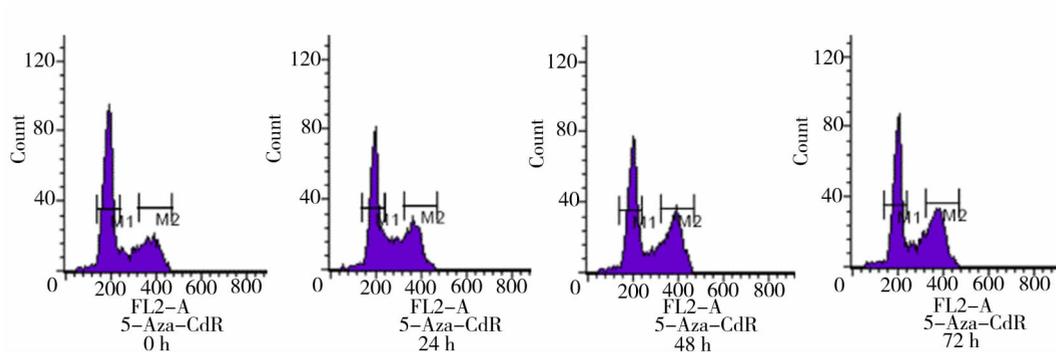
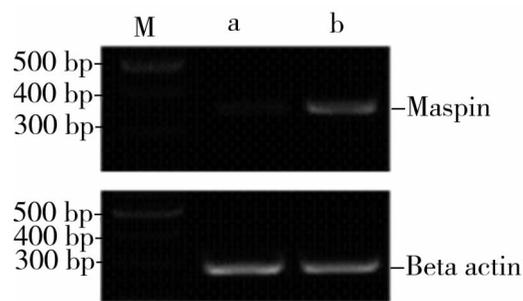


图 3 5-Aza-CdR 处理乳腺癌 MDA-MB-435S 细胞 24 ~ 72 h 后细胞周期变化

2.3 MDA-MB-435S 细胞 maspin mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果显示:对照组细胞 maspin 基因的 mRNA 表达很弱,而 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 作用 72 h 后 maspin 基因的 mRNA 表达明显增强,即 5-Aza-CdR 诱导了 maspin 基因的重新表达; β -actin 的表达水平在 5-Aza-CdR 作用前后无显著改变(图 4)。



M:标记条带;a:对照;b:5-Aza-CdR

图 4 5-Aza-CdR 处理乳腺癌 MDA-MB-435S 细胞 72 h 后 Maspin 基因的表达

3 讨论

乳腺癌和其他恶性肿瘤一样,其发生和发展是一个多基因、多步骤的过程。恶性肿瘤的生物学特征主要表现为浸润性生长和转移,其发生机制在于细胞内部基因结构和功能发生了异常改变,即由遗传基因缺陷以及表观遗传改变而引起的^[6,7]。表观遗传通过 DNA 自身化学修饰方式从转录水平影响基因表达,但不存在 DNA 序列改变的遗传改变。DNA 甲基化是表观遗传修饰的重要方面,这种

修饰反应主要发生在 CpG 二核苷酸的胞嘧啶。CpG 岛是以非甲基化形式存在的,而启动子非甲基化状态是相关基因特别是肿瘤抑制基因转录的先决条件,当这些启动子区域的 CpG 岛被异常甲基化或发生了新的甲基化时,可导致稳定遗传基因的转录沉默^[8,9]。因此,DNA 甲基化在基因表达调控、细胞增殖、分化、发育和基因组印迹等方面起着重要的作用。幸运的是,这种异常的甲基化可以通过 DNA 甲基转移酶抑制剂(5-Aza-CdR)来逆转。

Maspin 基因是一种丝氨酸家族蛋白酶抑制剂。它可以抑制乳腺癌细胞的迁徙、侵犯和转移,被认为是抑癌基因。在乳腺癌患者中 maspin 基因常常表达缺失,并表现为肿瘤细胞侵袭能力增强和转移扩散,同时研究发现该基因的表达缺失与基因重排和丢失无关,而与该基因启动子区域异常甲基化有关^[10-12]。

本研究结果显示:人乳腺癌细胞系 MDA-MB-435S 中 maspin 基因 mRNA 的表达非常微弱,而经过 5-Aza-CdR 处理后的细胞 maspin 基因 mRNA 的表达显著增强,提示在乳腺癌细胞中 maspin 的表达减弱可能是由于启动子区域的 CpG 岛高甲基化所致。5-Aza-CdR 是一种脱氧胞苷类似物,在 DNA 复制过程中与 DNA 分子相结合,并与 DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)形成共价复合物,抑制该酶的甲基转移活性,生成低甲基化子链,从而实现去甲基化功能。本研究发现,MDA-MB-435S 细胞经 5-Aza-CdR 处理后细胞的增殖明显受到抑制,其抑制率自第 5 天后从 35.42% 增至 71.29%,说明 5-Aza-CdR 有明显的抑制肿瘤细胞增殖的作用。由于 5-Aza-CdR 可通过去甲基化作用使一些因启动子区域高甲基化沉默的基因重新表达,使一些肿瘤抑制基因的功能得以恢复,因此本研究检测了一些乳腺癌相关肿瘤抑制基因。结果显示只有 maspin 基因 mRNA 的表达在药物作用前后差异明显,说明 5-Aza-CdR 抑制 MDA-MB-435S 细胞的增殖作用与 maspin 基因的功能恢复密切相关。

MDA-MB-435S 细胞是一种转移性乳腺癌建立的细胞系。其恶性程度相当高,细胞形态已失去上皮细胞特征。如果能有效的控制该细胞的生长,对于研究乳腺癌转移的机制、控制乳腺癌的转移具有重要意义。Maspin 基因的功能失活与启动子区域高甲基化相关,而 5-Aza-CdR 可以逆转高甲基化状态并恢复该基因的功能,这将为转移性乳腺癌提供新的生物学标志和治疗的靶点。值得讨论的是,maspin 基因的作用机制是否与其他癌基因和/或抑癌基因存在相互作用关系还不十分清楚,有待于进一步研究^[13,14]。

总之,抑癌基因启动子 DNA 高甲基化沉默是其功能失活的表观遗传机制。DNA 甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 能够有效的逆转 DNA 高甲基化沉默的抑癌基因重新表达。这为乳腺癌的诊断和治疗提供了新的途径^[15]。

参考文献

[1] Weinberg R A. Oncogenes and tumor suppressor genes. CA Cancer J Clin, 1994, 44:160 - 170.

- [2] Grander D. How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer? *Med Oncol*, 1998, 15:20 – 26.
- [3] Szyf M, Pakneshan P, Rabbani S A. DNA methylation and breast cancer. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68:1 187 – 1 197.
- [4] Lockett J, Yin S, Li X, *et al.* Tumor suppressive maspin and epithelial homeostasis. *J Cell Biochem*, 2006, 97:651 – 660.
- [5] Mercatali L, Valenti V, Calistri D, *et al.* RT-PCR determination of maspin and mammaglobin B in peripheral blood of healthy donors and breast cancer patients. *Ann Oncol*, 2006, 17:424 – 428.
- [6] Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist*, 2004, 9:361 – 377.
- [7] Oliveira A M, Ross J S, Fletcher J A. Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. *Am J Clin Pathol*, 2005, 124:S16 – S28.
- [8] Munot K, Bell S M, Lane S, *et al.* Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer. *Hum Pathol*, 2006, 37: 989 – 999.
- [9] Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez de Caceres I, *et al.* Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2004, 10:6189 – 6193.
- [10] Sheng S. A role of novel serpin maspin in tumor progression: the divergence revealed through efforts to converge. *J Cell Physiol*, 2006, 209:631 – 635.
- [11] Chen E I, Yates J R. Maspin and tumor metastasis. *IUBMB Life*, 2006, 58:25 – 29.
- [12] Bailey C M, Khalkhali Ellis Z, Seftor E A, *et al.* Biological functions of maspin. *J Cell Physiol*, 2006, 209:617 – 624.
- [13] Dokras A, Coffin J, Field L, *et al.* Epigenetic regulation of maspin expression in the human placenta. *Mol Hum Reprod*, 2006, 12:611 – 617.
- [14] Herranz M, Esteller M. DNA methylation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets. *Methods Mol Biol*, 2007, 361:25 – 62.
- [15] Dolle L, Depypere H T, Bracke M E. Anti-invasive/anti-metastasis strategies: new roads, new tools and new hopes. *Curr Cancer Drug Targets*, 2006, 6:729 – 751.

(收稿日期:2007-05-18)

(本文编辑:罗承丽)