

• 论著 •

5-Aza-CdR 诱导抑癌基因 PTEN 重新表达对乳腺癌细胞的影响及机制

姚春 任德发 郜朝霞 邵力伟 刘锦修 伍龙

【摘要】 目的 观察 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR) 对人乳腺癌细胞系 MCF-7 增殖、凋亡及体外侵袭能力的影响并初步探讨其机制。**方法** 体外培养 MCF-7 细胞, 采用不同浓度的 5-Aza-CdR (1×10^{-6} 、 2×10^{-6} 、 5×10^{-6} 和 1×10^{-5} mol/L) 分别作用 24 h、48 h 和 72 h, 分别采用 MTT 法检测细胞增殖抑制率、流式细胞仪检测细胞凋亡、Transwell 法检测细胞侵袭能力、Western-blot 检测 PTEN 和 VEGF-C 蛋白表达的变化。**结果** 经不同浓度的 5-Aza-CdR 作用后, MCF-7 细胞的增殖受到不同程度的抑制并发生凋亡, 细胞侵袭能力也发生不同程度的降低, 且其作用随浓度增加和时间延长而增强 ($P < 0.05$)。在 5-Aza-CdR 作用后, MCF-7 细胞 PTEN 的表达逐渐增强, 而 VEGF-C 的表达逐渐减弱。**结论** 5-Aza-CdR 可抑制乳腺癌细胞增殖、诱导其发生凋亡、降低其体外侵袭能力, 其可能是通过去甲基化作用使抑癌基因 PTEN 重新表达并下调 VEGF-C 的表达而发挥作用的。

【关键词】 乳腺肿瘤; PTEN; 增殖; 凋亡

【中图法分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A

Anti-oncogene PTEN reactivation induced by 5-Aza-CdR and its effects on breast cancer cells YAO Chun, REN De-fa, GAO Zhao-xia, SHAO Li-wei, LIU Jin-xiu, WU Long. Guangci Hospital of Wuhan University, Wuhan 430050, China

Corresponding author: LIU Jin-xiu, E-mail: ljx1210@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To observe the effects of 5-Aza-CdR on the proliferation, apoptosis and invasive ability in vitro of human breast cancer cells line MCF-7 and explore the mechanism. **Methods** MCF-7 cells were cultured in vitro. Different concentrations of 5-Aza-CdR (1×10^{-6} , 2×10^{-6} , 5×10^{-6} and 1×10^{-5} mol/L) were added to culture for 24 h, 48 h and 72 h. MTT assay was used to detect the inhibition rate of proliferation. Flow cytometry was used to measure the apoptosis rate. Transwell assay was used to observe the invasive ability. The protein expressions of PTEN and VEGF-C were detected by Western-blot. **Results** The proliferation was inhibited, apoptosis was induced and the invasive ability decreased when treated by the different concentrations of 5-Aza-CdR. The effects were enhanced with concentration increased and time extended ($P < 0.05$). The expression of PTEN in MCF-7 cells was increased after being treated by 5-Aza-CdR, VEGF-C decreased. **Conclusion** 5-Aza-CdR could inhibit the proliferation, induce the apoptosis and decrease the invasive ability in vitro of MCF-7 cells. It might reactivate the expression of PTEN and

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2012.05.007

基金项目:武汉市科技发展引导类计划项目——科技攻关项目(201161038348);湖北省卫生厅科研基金(JX5B23)

作者单位:430050 武汉,武汉大学广慈医院(姚春,任德发,郜朝霞,邵力伟,刘锦修);430060 武汉,武汉大学人民医院肿瘤科(伍龙)

通信作者:刘锦修, E-mail: ljx1210@yahoo.com.cn

down-regulate the expression of VEGF-C by demethylation induced by 5-Aza-CdR.

【Key words】 breast neoplasms; PTEN; proliferation; apoptosis

乳腺癌是严重危害妇女健康的恶性肿瘤之一。在中国,乳腺癌的发病率呈逐年上升之势,因此一直是近年来研究的热点^[1]。普遍认为,DNA 甲基化及组蛋白去乙酰化等表观遗传学改变是恶性肿瘤发生的重要机制。通过 DNA 甲基化可抑制体内抑癌基因的表达进而促进了肿瘤的发生与发展^[2]。研究发现,乳腺癌抑癌基因 PTEN、p16 等呈高度甲基化,并与乳腺癌的发生、发展密切相关^[3]。

DNA 甲基化转移酶是 DNA 甲基化过程中最为重要的调节因素,因此,通过使用特异性的 DNA 甲基转移酶抑制剂可能起到去甲基化的作用,使过度甲基化的抑癌基因去甲基化而重获表达,进而发挥抑癌作用^[4]。本研究采用特异性的甲基化转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR),观察其对乳腺癌细胞生物学行为的影响并初步探讨其机制,为乳腺癌的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞系 MCF-7 由武汉大学人民医院中心实验室自行传代培养;5-Aza-CdR、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、胰酶、二甲基亚砜(DMSO)等均为 Sigma 公司产品;RPMI 1640 培养基、新鲜胎牛血清为 Gibco 公司产品;一抗 PTEN、VEGF-C、 β -actin 兔抗人多克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司;二抗羊抗兔多克隆抗体为 Amersham 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:将人乳腺癌细胞系 MCF-7 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,置于 37 °C、饱和湿度、含 5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.2 MTT 检测细胞增殖抑制率:取处于对数生长期的 MCF-7 细胞,以 0.25% 的胰酶消化后重悬,调整细胞数为 5×10^4 /ml,按每孔 200 μ l 接种 96 孔板,在 37 °C、饱和湿度、含 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h;细胞换液后,加入浓度分别为 1×10^{-6} 、 2×10^{-6} 、 5×10^{-6} 和 1×10^{-5} mol/L 的 5-Aza-CdR,以未处理细胞作为对照组;继续培养 24、48 和 72 h 后,更换为含 20 μ l 浓度 5 mg/ml MTT 液和 180 μ l 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基并继续培养 4 h;去除培养液代之以每孔 150 μ l 的 DMSO 液,平板振荡器振荡 10 min 后,检测 490 nm 处的吸光度值,按照抑制率 = $1 - (X/Y) \times 100\%$ 来计算细胞增殖抑制率,X 是各实验组的吸光度,Y 是对照组的吸光度。实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡:收集经不同浓度的 5-Aza-CdR 作用 48 h 后的 MCF-7 细胞,PBS 洗 2 次,用 1 ml 冰预冷的 70% 乙醇重悬,置于 4 °C 30 min;Annexin-V FLUOS 标记液(100 μ l 的孵育液里含 2 μ l 的 Annexin-V

FLUOS 和 $2\ \mu\text{l}$ 的 PI) 室温孵育 10 ~ 15 min。随后使用流式细胞仪检测乳腺癌细胞的凋亡率。

1.2.4 Transwell 法检测细胞侵袭能力:收集经不同浓度 5-Aza-CdR 作用 48 h 后的 MCF-7 细胞,采用 Transwell 法检测 MCF-7 细胞的侵袭能力。MCF-7 细胞按 $1\times 10^5/\text{ml}$ 的细胞数培养在无血清 PRMI 1640 培养基的上室中,下室为 500 μl 的含 10% 胎牛血清的 PRMI 1640 培养基。在 $37\ ^\circ\text{C}$ 、含 5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中继续培养 24 h,用棉签轻轻去除在上室表面的细胞,迁移到下室的细胞用甲醇固定并 Giemsa 染色,显微镜下计数。实验重复 3 次。细胞侵袭率(%) = $(1 - \text{转染组侵袭细胞数} / \text{对照组侵袭细胞数}) \times 100\%$ 。

1.2.5 Western-blot 检测 PTEN 和 VEGF-C 蛋白表达:收集 $5\times 10^{-6}\ \text{mol/L}$ 的 5-Aza-CdR 作用 24 h、48 h 和 72 h 后的细胞,提取蛋白,检测蛋白浓度。取 20 μg 蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),并转到聚二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上;5% 封闭液室温封闭 1 h 后, TBST 洗 3 次,每次 5 min;加入相应的一抗, $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜;TBST 洗 3 次,每次 5 min;再加入相应的二抗, $37\ ^\circ\text{C}$ 摇床孵育 1 ~ 2 h,化学发光试剂发光并显色。

1.3 统计学分析

计量资料用均数 \pm 标准差表示,采用 SPSS 11.5 统计学软件进行统计处理。多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 LSD 法和 SNK 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 5-Aza-CdR 对 MCF-7 细胞增殖的影响

MTT 结果显示, $1\times 10^{-6}\ \text{mol/L}$ 的 5-Aza-CdR 作用后, MCF-7 细胞的生长未见显著抑制。经 2×10^{-6} 、 5×10^{-6} 和 $1\times 10^{-5}\ \text{mol/L}$ 的 5-Aza-CdR 作用后, MCF-7 细胞的生长受到不同程度的抑制,且抑制率随作用时间的延长和 5-Aza-CdR 浓度的增加而显著增加($P < 0.05$, 图 1)。

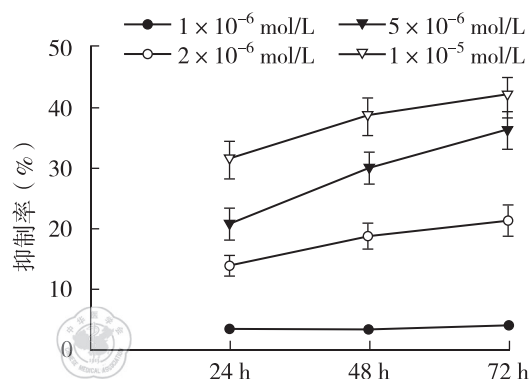
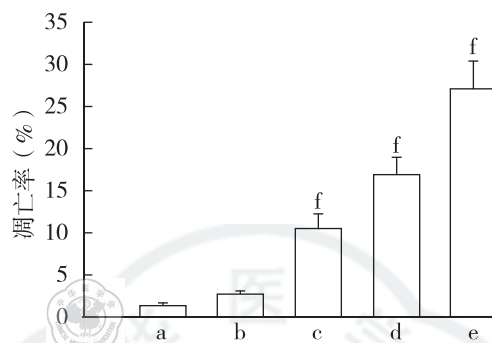


图 1 5-Aza-CdR 对 MCF-7 细胞增殖抑制率的影响

2.2 不同浓度 5-Aza-CdR 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测不同浓度的 5-Aza-CdR 对 MCF-7 细胞凋亡的影响。结果显示,5-Aza-CdR 可诱导乳腺癌细胞发生凋亡,且其凋亡率随 5-Aza-CdR 浓度的增加而升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 2)。

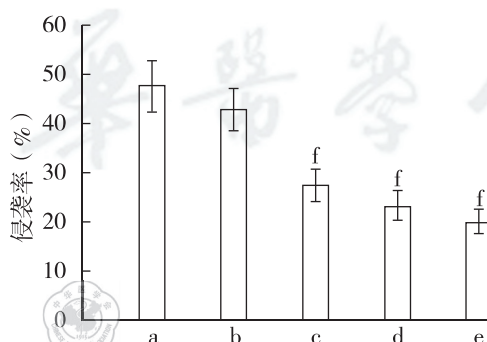


a: 对照; b: 1×10^{-6} mol/L; c: 2×10^{-6} mol/L; d: 5×10^{-6} mol/L;
e: 1×10^{-5} mol/L; f: $P < 0.05$, 与对照相比

图 2 5-Aza-CdR 对 MCF-7 细胞凋亡率的影响

2.3 不同浓度 5-Aza-CdR 对 MCF-7 细胞体外侵袭能力的影响

Transwell 检测显示不同浓度 5-Aza-CdR 均可降低 MCF-7 细胞的体外侵袭能力,其作用与 5-Aza-CdR 的浓度有关。当 5-Aza-CdR 的浓度为 1×10^{-6} mol/L 时,与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);但当其浓度 $\geq 2 \times 10^{-6}$ mol/L 时,各浓度组与对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$);随着 5-Aza-CdR 浓度的增加,其作用有所增强,但浓度组 2×10^{-6} mol/L 与 5×10^{-6} mol/L, 5×10^{-6} mol/L 和 1×10^{-5} mol/L 之间差异无统计学意义($P > 0.05$, 图 3)。



a: 对照; b: 1×10^{-6} mol/L; c: 2×10^{-6} mol/L; d: 5×10^{-6} mol/L;
e: 1×10^{-5} mol/L; f: $P < 0.05$, 与对照相比

图 3 5-Aza-CdR 对 MCF-7 细胞体外侵袭能力的影响

2.4 5-Aza-CdR 对 MCF-7 细胞中 PTEN 和 VEGF-C 蛋白表达的影响

如前述实验结果所示,在几组浓度中,当 5-Aza-CdR 浓度为 1×10^{-5} mol/L 时,其对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的抑制和诱导凋亡的作用最为显著。因此,

本实验采用 1×10^{-5} mol/L 的 5-Aza-CdR 作用于 MCF-7 细胞 24 h、48 h 和 72 h 后,采用 Western-blot 检测 PTEN 和 VEGF-C 蛋白的表达情况。结果显示, 1×10^{-5} mol/L 5-Aza-CdR 作用后 MCF-7 细胞中 PTEN 的表达显著增强,且随着作用时间延长,作用越显著;同时发现 5-Aza-CdR 作用后 MCF-7 细胞 VEGF-C 的表达显著降低,且随着作用时间的延长,其作用越显著(图 4)。

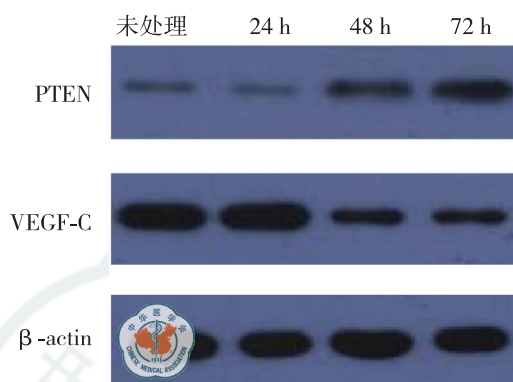


图 4 5-Aza-CdR 对 MCF-7 细胞 PTEN 和 VEGF-C 蛋白表达的影响

3 讨论

表观遗传学(epigenetics)是生命科学领域一个普遍而又十分重要的研究方向,不仅对基因表达、调控、遗传有重要作用,而且在肿瘤的发生和防治中具有重要的意义。DNA 甲基化与组蛋白乙酰化是其中最主要的两个研究内容^[5]。研究表明,抑癌基因 PTEN 具有抑制肿瘤细胞生长的作用,但其表达受到甲基化水平的影响,PTEN 的甲基化可导致 PTEN 基因失活继而导致了恶性肿瘤的发生与发展^[6]。本研究显示,未经处理的乳腺癌细胞系 MCF-7 中 PTEN 基因也呈低表达,这提示在乳腺癌细胞中抑癌基因 PTEN 可能由于 DNA 甲基化而呈失活状态。采用某种方法使 PTEN 去甲基化而重新表达,可能起到抑制肿瘤生长的作用。

Chiam 等^[7]认为,DNA 甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 可与甲基转移酶形成复合物,进而抑制其甲基转移活性而起到去甲基化的作用,消除抑癌基因的异常甲基化状态,使受甲基化抑制的抑癌基因重新表达从而发挥抗肿瘤作用。许多学者已证实 5-Aza-CdR 具有体外去甲基化作用并已应用到肿瘤研究中^[8]。笔者采用不同浓度的 5-Aza-CdR 作用于人乳腺癌细胞系 MCF-7,结果显示,经 5-Aza-CdR 作用后,MCF-7 细胞中 PTEN 基因的表达显著上调。进一步研究发现,5-Aza-CdR 可以抑制 MCF-7 细胞的增殖并诱导其凋亡,这可能与使其 PTEN 去甲基化进而重新表达有关。

PTEN 基因表达的缺失与乳腺癌淋巴结转移相关^[9],而淋巴结转移是乳腺癌的主要播散途径和治疗失败的主要原因,其机制尚不明确,迄今仍缺乏有

效的抗淋巴结转移措施。而 VEGF-C 在乳腺癌前哨淋巴结淋巴管生成中起到了关键的作用^[10]。本实验采用不同浓度 5-Aza-CdR 作用于 MCF-7 细胞,细胞的侵袭能力显著下降,同时通过 Western blot 检测显示 VEGF-C 的表达显著降低。这一结果提示,5-Aza-CdR 可能通过诱导 PTEN 基因重新表达,继而下调 VEGF-C 的表达,降低了乳腺癌细胞的侵袭能力。

总之,表观遗传机制可能在乳腺癌中发挥了重要作用。采用 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 可使乳腺癌细胞中抑癌基因 PTEN 重新表达,继而抑制其体外增殖并诱导其发生凋亡,同时通过下调 VEGF-C 的表达抑制其体外侵袭能力,达到治疗的目的,为乳腺癌的治疗提供了新的思路与依据。

参考文献

- [1] 翟保平,张斌,李文涛. DCC 基因在乳腺癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(11): 1669-1671.
- [2] Varela I, Tarpey P, Raine K, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma [J]. Nature, 2011, 469(7331):539-542.
- [3] Phuong NT, Kim SK, Lim SC, et al. Role of PTEN promoter methylation in tamoxifen-resistant breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 130(1):73-83.
- [4] Chain K, Centenera MM, Butler LM, et al. GSTP1 DNA methylation and expression status is indicative of 5-aza-2'-deoxycytidine efficacy in human prostate cancer cells [J]. PLoS One, 2011, 6(9):e25634.
- [5] Brower V. Epigenetics: Unravelling the cancer code [J]. Nature, 2011, 471(7339):S12-S13.
- [6] Jelovac D, Park BH. PTEN promoter silencing and Cowden syndrome: the role of epigenetic regulation of KILLIN [J]. JAMA, 2010, 304(24):2744-2745.
- [7] Chiam K, Centenera MM, Butler LM, et al. GSTP1 DNA methylation and expression status is indicative of 5-aza-2'-deoxycytidine efficacy in human prostate cancer cells [J]. PLoS One, 2011, 6(9):e25634.
- [8] Beyrouthy MJ, Garner KM, Hever MP, et al. High DNA methyltransferase 3B expression mediates 5-aza-deoxycytidine hypersensitivity in testicular germ cell tumors [J]. Cancer Res, 2009, 69(24):9360-9366.
- [9] Sakai A, Thieblemont C, Wellmann A, et al. PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms [J]. Blood, 1998, 92(9): 3410-3415.
- [10] Tsutsui S, Matsuyama A, Yamamoto M, et al. The Akt expression correlates with the VEGF-A and -C expression as well as the microvessel and lymphatic vessel density in breast cancer [J]. Oncol Rep, 2010, 23(3):621-630.

(收稿日期:2012-02-16)

(本文编辑:刘军兰)

姚春,任德发,郜朝霞,等. 5-Aza-CdR 诱导抑癌基因 PTEN 重新表达对乳腺癌细胞的影响[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2012, 6(5):527-532.