

· 论著 ·

5-氮杂-2'-脱氧胞苷酸对人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及 Runt 相关转录因子 3 基因表达的影响

白和平 代志军 康华峰 陆王锋 刘小旭 马小斌 刁岩 王西京

【摘要】 目的 探讨 5-氮杂-2'-脱氧胞苷酸(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR) 诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及对人类 Runt 相关转录因子 3(Runt-related transcription factor 3, RUNX3) 基因表达的影响。**方法** 以 0.4、1.6、6.4、25.6、102.4 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-Aza-CdR 分别处理 MCF-7 细胞,以同体积培养液处理 MCF-7 细胞作为对照组。MTT 法测定不同浓度、不同时间对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用,流式细胞仪检测细胞凋亡,RT-PCR 和 Western blot 法分别检测 RUNX3 基因 mRNA 和蛋白的表达,计量资料采用方差分析 SNK 检验。**结果** 5-Aza-CdR 可抑制 MCF-7 细胞的生长,其抑制率与药物浓度、作用时间呈依赖关系;5-Aza-CdR 作用 48 h 后,流式细胞仪检测 0.4 ~ 102.4 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 实验组细胞凋亡率分别为 15.33%、25.35%、27.95%、32.39%、39.27%,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 组除外);RT-PCR 和 Western-blot 检测可见 RUNX3 mRNA 及 RUNX3 蛋白表达均增加。**结论** 5-Aza-CdR 诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡,可能与 5-Aza-CdR 去甲基化,促进 RUNX3 基因及蛋白表达有关。

【关键词】 乳腺肿瘤;细胞凋亡;5-Aza-CdR;RUNX3;MCF-7 细胞

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on apoptosis and Runt-related transcription factor 3 expression in breast cancer MCF-7 cell line BAI He-ping, DAI Zhi-jun, KANG Hua-feng, LU Wang-feng, LIU Xiao-xu, MA Xiao-bin, DIAO Yan, WANG Xi-jing. Department of Oncology, Second Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

Corresponding author: WANG Xi-jing, E-mail: wangxijing@21cn.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on apoptosis and expression of Runt-related transcription factor 3 (RUNX3) in breast cancer MCF-7 cell line. **Methods** MCF-7 cells were cultured with different concentrations (0.4、1.6、6.4、25.6、102.4 $\mu\text{mol/L}$) of 5-Aza-CdR *in vitro*. MCF-7 cells cultured with no 5-Aza-cdR served as control. MTT assay was used for analyzing the growth inhibitory effect of 5-Aza-CdR in MCF-7 cells. The apoptosis rate was detected by flow cytometric analysis. The RUNX3 mRNA and protein levels were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis. Data were analyzed with Student Newman Keuls (SNK) test of one-way analysis of variance (ANOVA) using SPSS 13.0 software. **Results** 5-Aza-CdR effectively inhibited MCF-7 cells in a dose- and time-dependent manner. Flow cytometric analysis showed that the apoptosis ratio was 15.33%, 25.35%, 27.95%, 32.39%, 39.27% in the experimental groups with different concentrations of 0.4 ~ 102.4 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR respectively after 48 h treatment. Except 0.4 $\mu\text{mol/L}$ group, the apoptosis ratio in other experiment groups was higher than that in control group ($P < 0.05$). RT-PCR and Western-blot results showed that the expressions of RUNX3 on both mRNA and protein levels were increased. **Conclusion** 5-Aza-CdR can induce the apoptosis of breast cancer MCF-7 cells, which may be due to that 5-Aza-CdR can promote

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2013.01.006

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金;陕西省科技攻关项目(2011K13-03-08);西安市科技计划项目(HM1117)

作者单位:710004 西安,西安交通大学医学院第二附属医院肿瘤科(白和平、代志军、康华峰、陆王锋、刘小旭、马小斌、刁岩、王西京);719000 陕西 榆林,榆林市第二医院(白和平)

代志军为共同第一作者

通信作者:王西京, E-mail: wangxijing@21cn.com

the demethylation and the expressions of RUNX3 mRNA and protein.

【Key words】 breast neoplasms; apoptosis; 5-Aza-CdR; RUNX3; MCF-7 cells

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,据统计乳腺癌的发病率占癌症发病总数的 23%,病死率占癌症死亡的 14%,已成为严重威胁女性健康的疾病之一^[1]。近年来,随着乳腺癌分子生物学研究的不断深入,学者们对乳腺癌发病分子机制及相关治疗有了全新的认识,以基因为靶点的分子靶向治疗已作为一种全新的治疗手段广泛应用于临床。人类 Runt 相关转录因子-3(Runt-related transcription factor 3, RUNX3) 是 RUNX 基因家族进化中高度保守的一个亚型,位于人类染色体 1p36,其转录产物是转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 信号通路中的主要效应物质之一,参与癌症的发生、侵袭及转移^[2]。研究表明早期乳腺癌的发生与 RUNX3 基因启动子甲基化的失活和蛋白错位表达密切相关^[3]。而 5-氮杂-2'-脱氧胞苷酸(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR) 作为一种特异性 DNA 甲基化转移酶抑制剂,可有效逆转 DNA 甲基化,促进相关基因的表达,目前主要应用于骨髓增生异常综合征和白血病的治疗,在实体肿瘤治疗中的研究尚不多见。笔者通过研究 5-Aza-CdR 对乳腺癌 MCF-7 细胞的影响,进一步探讨 5-Aza-CdR 与乳腺癌 RUNX3 基因表达的关系及内在机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

人乳腺癌 MCF-7 细胞株购自第四军医大学实验中心,新生牛血清(Gibco, USA), RPMI1640 培养基(Gibco, USA), 碘化丙啶(propidium iodide, PI, Sigma, USA), MTT(Sigma, USA), 5-Aza-CdR(Sigma, USA), Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(珠海健康元生物医药公司), PCR Mix(陕西润德生物公司), Cocktail 蛋白酶抑制剂(Roche 公司), 丙烯酰胺(Acrylamide)、双丙烯酰胺(Bisacrylamide)、溴酚蓝、Tris 碱、四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulphate, SDS)、腺苷酰硫酸(adenosine phosphosulfate, APS)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT, Amresco 公司), 鼠抗人 RUNX3 单克隆抗体(美国 ABCAM 公司), 鼠抗人

β -actin 单克隆抗体(Santa Cruz 公司), 过氧化酶标山羊抗鼠二抗(PIONEER 公司), Enlight™ Western 特异发光检测试剂盒(北京英格恩生物公司)。

1.2 细胞培养和传代

人乳腺癌细胞株 MCF-7 用含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养液,放置于 37 ℃、5% CO₂ 的饱和湿度孵箱中培养。当细胞生长至 80% ~ 90% 汇合时,胰酶消化,以 1:2 的比例传代,4~5 d 传代一次。

1.3 MTT 检测细胞增殖抑制率

取对数生长期的 MCF-7 细胞,经胰酶消化后,调整细胞数为每孔 5×10^3 个(每孔 100 μ l),接种于 96 孔培养板内,置于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中培养。待细胞贴壁后,将细胞进行同步化处理并分组,实验组分别加入终浓度为 0.4、1.6、6.4、25.6、102.4 μ mol/L 5-Aza-CdR,对照组加入同体积的培养液,每组 5 个复孔。将其放置于培养箱中培养 24、48、72 h,于培养结束前 4 h,取出培养板,每孔加入 MTT 20 μ l(5 mg/ml),继续培养 4 h 后弃培养液,加入 150 μ l DMSO,在平板摇床摇 10 min,用酶标仪测 490 nm 波长处每孔的吸光度(D 值)。细胞生长抑制率(%) = (1 - 实验组 D 值/对照组 D 值) × 100%。

1.4 AnnexinV-FITC/PI 双标记染色检测细胞凋亡

取对数生长期细胞,经消化后制成单细胞悬液,按 1×10^5 个/ml 细胞浓度接种于 6 孔板中,细胞贴壁后分别加入含有终浓度为 0.4、1.6、6.4、25.6、102.4 μ mol/L 的 5-Aza-CdR 培养液,培养 48 h 后离心收集细胞。按 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测说明书进行操作,收集细胞,离心后加入 500 μ l 的 1×连接缓冲液,再依次加入 5 μ l Annexin V-FITC、10 μ l PI 染色液,轻轻混匀,室温(20~25 ℃)避光孵育 10 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.5 RT-PCR 检测 RUNX3 mRNA 表达

收集对照组和实验组(5-Aza-CdR 浓度分别为 0.4、1.6、6.4、25.6、102.4 μ mol/L)处理 72 h 后的 MCF-7 细胞,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,并进行纯度检测和定量。按 Fermentas 反转录试

剂盒说明书操作合成 cDNA。依次加入引物等放置于 PCR 仪中进行扩增,反应条件:94 ℃ 5 min, 预变性;94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 35 个循环;72 ℃ 5 min 后结束扩增反应。以 β -actin 作为内参照。各引物序列分别为:RUNX3:5'-GGTACGCTGGTGAAGTGTGATGG-3';5'-CTTGATGGCTCGGTGGTAGGT C-3', 扩增产物为 204 bp; β -actin:5'-ATCGTGCCTGACATTAAGGAGAAG -3';5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3', 扩增产物为 179 bp。扩增产物用 2% 的琼脂凝胶电泳, 自动凝胶成像系统拍照。

1.6 Western blot 检测 RUNX3 蛋白的表达

收集不同浓度 5-Aza-CdR 处理 48 h 后的实验组与对照组细胞, 分别加入 200 μ l 放射免疫沉淀测定 (radioimmune precipitation assay, RIPA) 裂解液, 30 μ l 蛋白酶抑制剂, 置于冰上裂解 30 min。离心后提取总蛋白并进行浓度和纯度鉴定, 加入 1/4 体积的 5 \times 蛋白上样缓冲液, 混匀后煮沸 5 min, 即得所需的蛋白样品。配制 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 电泳分离蛋白, 用半干转法转膜后封闭 2 h; 再用含一抗的封闭液进行孵育, 4 ℃ 过夜; 洗膜后用含二抗的封闭液室温孵育 2 h; 再次洗膜, 用 EnLight™ Western 特异发光试剂显色, 曝光显影。

1.7 统计分析

应用 SPSS 13.0 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行方差分析 SNK 检验, 显著性检验水平为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 MTT 法检测结果

不同浓度的 5-Aza-CdR 分别作用 MCF-7 细胞 24、48、72 h 后, 0.4 μ mol/L 组、1.6 μ mol/L 组、6.4 μ mol/L 组、25.6 μ mol/L 组和 102.4 μ mol/L 组对乳腺癌 MCF-7 细胞均有不同程度的抑制作用。与对照组相比, 各浓度药物处理组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 且随着药物作用时间的延长而增强, 呈现剂量-时效关系 (图 1), 其中作用 72 h 后, 6.4 μ mol/L 组、25.6 μ mol/L 组和 102.4 μ mol/L 组差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 细胞凋亡检测结果

处理 48 h 后, 经流式细胞仪检测 0.4 μ mol/L 组、1.6 μ mol/L 组、6.4 μ mol/L 组、25.6 μ mol/L 组和 102.4 μ mol/L 组的凋亡率分别为 15.33%、

25.35%、27.95%、32.39%、39.27%, 与对照组 (11.22%) 相比, 除 0.4 μ mol/L 组外, 其他实验组细胞凋亡率差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。

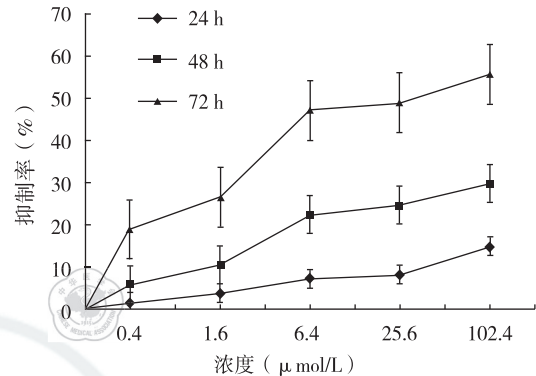
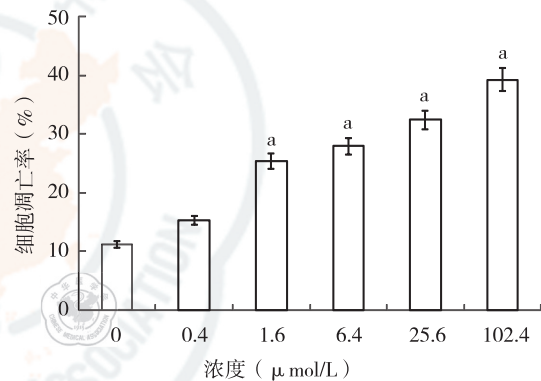


图 1 不同浓度 5-Aza-CdR 对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用

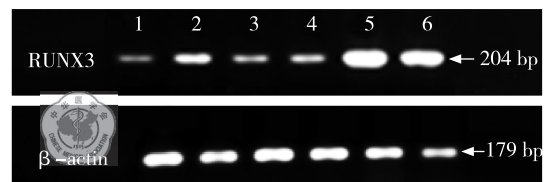


a: $P < 0.05$, 与对照组相比, 差异有统计学意义

图 2 流式细胞仪检测 5-Aza-CdR 作用 48 h 后 MCF-7 细胞凋亡

2.3 RT-PCR 检测结果

收集不同浓度药物处理 72 h 后的 MCF-7 细胞, PCR 扩增结果显示: 5-Aza-CdR 作用的各实验组均有 RUNX3 基因 mRNA 的表达, 其表达水平随着药物浓度的提高而增加, 并呈药物浓度依赖性。与对照组相比, 不同浓度 5-Aza-CdR 实验组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 3)。

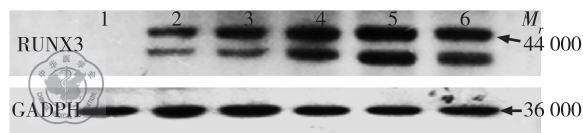


1: 对照组; 2: 0.4 μ mol/L 组; 3: 1.6 μ mol/L 组; 4: 6.4 μ mol/L 组; 5: 25.6 μ mol/L 组; 6: 102.4 μ mol/L 组

图 3 RT-PCR 检测 5-Aza-CdR 诱导 MCF-7 细胞 RUNX3 mRNA 表达情况

2.4 Western blot 检测结果

各实验组的内参照 GADPH 表达一致,实验组各组 RUNX3 蛋白的表达随 5-Aza-CdR 浓度的增高而升高,其中 102.4 $\mu\text{mol/L}$ 组 RUNX3 蛋白表达最强,与对照组相比,不同浓度 5-Aza-CdR 实验组差异具有统计学意义($P < 0.05$),而各组间差异无统计学意义($P > 0.05$,图 4)。



1:对照组; 2:0.4 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3:1.6 $\mu\text{mol/L}$ 组; 4:6.4 $\mu\text{mol/L}$ 组; 5:25.6 $\mu\text{mol/L}$ 组; 6:102.4 $\mu\text{mol/L}$ 组

图 4 5-Aza-CdR 对 RUNX3 蛋白表达的影响

3 讨论

肿瘤的发生是一个涉及多基因之间调控失衡、异常表达的过程。目前研究发现,遗传缺陷或表观遗传学改变导致某些基因的结构和功能异常是肿瘤发生的主要机制^[4]。RUNX3 基因是一种肿瘤抑制基因,其活性状态及表达与肿瘤的发生密切相关。在多种肿瘤发生过程中,RUNX3 基因表达呈缺失状态,而甲基化的 RUNX3 或定位错误的 RUNX3 蛋白以表观失活的形式广泛存在于上皮性癌及癌前病变^[5]和间叶肿瘤组织中^[6]。Lau 等^[7]发现在乳腺原发肿瘤和乳腺癌细胞系中 RUNX3 基因通常以甲基化的 RUNX3 或定位错误的 RUNX3 蛋白的形式表达于细胞中,而这种频繁的蛋白质错误定位和甲基化使 RUNX3 基因作为早期乳腺癌风险评估的重要指标。同时,在乳腺导管原位癌和浸润性导管癌的研究中发现乳腺导管上皮柱状细胞恶变可能与 RUNX3 基因启动子区域的甲基化和蛋白的错误表达有关^[8]。

5-Aza-CdR 作为一种天然核苷 2-脱氧胞嘧啶类似物,可抑制 DNA 甲基化转移酶活性,逆转基因 CpG 岛甲基化,激活肿瘤细胞沉默失活的抑癌基因,恢复其表达及功能,进而抑制肿瘤细胞的生长。在乳腺癌的治疗方面,5-Aza-CdR 的研究大多集中在实验研究阶段,唐波等^[9]通过 5-Aza-CdR 作用于体外培养 MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 细胞,结果发现 5-Aza-CdR 能诱导其细胞表达 ER α mRNA,恢复 MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 细胞对他莫西芬的敏感性,提示 5-Aza-CdR 可与他莫西芬联合治疗三阴性乳腺癌。还有研究发现 5-Aza-CdR 可以去除 Ras 相关结构域蛋白家族 1A (Ras association domain protein family 1A, RASSF1A) 启动子甲基化状态,恢复 RASSF1A 的表达,从而抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖,促进其凋亡^[10]。这些研究表明 5-Aza-CdR 对乳腺癌细胞株具有明显的去甲基化、逆转相关基因表达的作用,为 5-Aza-CdR 进一步用于乳腺癌的临床治疗提供了实验依据。

本实验通过甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的作用,探索 5-Aza-CdR 对 RUNX3 基因在乳腺癌 MCF-7 细胞中表达的影响。结果显示,5-Aza-CdR 对乳腺癌 MCF-7 细胞具有明显的增殖抑制作用,RUNX3 基因在未处理组 MCF-7 细胞中仅有少量的 mRNA 表达,但未检测到 RUNX3 蛋白表达,这说明 RUNX3 蛋白的表达缺失可能是转录后抑制性修饰的结果,进而抑制了 RUNX3 蛋白在细胞中的表达。而与对照组相比,不同浓度 5-Aza-CdR 处理的 MCF-7 细胞中均有 RUNX3 基因的 mRNA 及蛋白表达,其表达量与药物浓度在一定范围内具有相关性,这表明 5-Aza-CdR 可恢复抑癌基因 RUNX3 的功能,激活 RUNX3 基因的 mRNA 和蛋白表达,从而有效逆转 RUNX3 基因在修饰过程中的表达缺失,促进抑癌基因 RUNX3 的表达,发挥抗肿瘤活性。Huang 等^[11]研究发现在乳腺癌细胞系、乳腺癌组织中 RUNX3 的表达与 ER α 的表达呈负相关,可以通过降低 ER α 的表达稳定性抑制 ER α 依赖的基因转录,进而调控 ER α 的表达水平,因此,RUNX3 可作为一种新的抑癌基因用于乳腺癌的治疗。

综上所述,5-Aza-CdR 甲基转移酶抑制剂有望成为一种有效的基因治疗手段,在激活 RUNX3 抑癌基因表达、发挥抗肿瘤活性方面具有广阔的应用前景,可应用于包括乳腺癌在内的多种肿瘤的治疗,但其相关机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Li QL, Ito K, Sakakura C, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer [J]. Cell, 2002, 109(1): 113-124.
- [3] Subramaniam MM, Chan JY, Soong R, et al. RUNX3 inactivation by frequent promoter hypermethylation and protein

- mislocalization constitute an early event in breast cancer progression [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 113(1):113-121.
- [4] Munot K, Bell SM, Lane S, et al. Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer [J]. *Hum Pathol*, 2006, 37(8):989-999.
- [5] Suzuki M, Shigematsu H, Shames DS, et al. DNA methylation-associated inactivation of TGF beta-related genes DRM/Gremlin, RUNX3, and HPP1 in human cancers[J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(9):1029-1037.
- [6] Ito K, Lim AC, Salto-Tellez M, et al. RUNX3 attenuates beta-catenin/T cell factors in intestinal tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(3):226-237.
- [7] Lau QC, Raja E, Salto-Tellez M, et al. RUNX3 is frequently inactivated by dual mechanisms of protein mislocalization and promoter hypermethylation in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(13):6512-6520.
- [8] Subramaniam MM, Chan JY, Omar MF, et al. Lack of RUNX3 inactivation in columnar cell lesions of breast [J]. *Histopathology*, 2010, 57(4):555-563.
- [9] 唐波,彭志红,姜军. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷与三苯氧胺协同抗雌激素受体 α 阴性乳腺癌的体外实验研究[J]. *中华外科杂志*, 2005, 43(23):1545-1549.
- [10] 胡志立,李汉贤,刘亮. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对 MCF-7 乳腺癌细胞生物学行为影响的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 12(6):415-418.
- [11] Huang B, Qu Z, Ong CW, et al. RUNX3 acts as a tumor suppressor in breast cancer by targeting estrogen receptor α [J]. *Oncogene*, 2012, 31(4):527-534.
- (收稿日期:2012-05-24)
(本文编辑:刘军兰)

白和平,代志军,康华峰,等. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷酸对人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及 Runt 相关转录因子 3 基因表达的影响[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2013, 7(1):25-29.

