

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.06.014

5-氮杂-2'-脱氧胞苷调控 *RASSF1A* 基因表达对
子宫内膜癌 HEC-1-B 细胞增殖及凋亡的影响于月成¹, 吴维光², 曹秀琴²

(1. 第四军医大学附属西京医院妇产科, 西安 710032; 2. 武警医学院附属医院妇产科, 天津 300162)

【关键词】目的:探讨甲基化转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)对人子宫内膜癌(Human endometrial cancer, HEC)-1-B 细胞增殖和凋亡的作用及其可能机制。方法:应用不同浓度的 5-Aza-CdR 处理 HEC-1-B 细胞, 甲基化特异 PCR(Methylation-specific polymerase chain reaction, MSP)法检测处理前后 RAS 相关域家族 1A(RAS association domain family 1A, *RASSF1A*)基因甲基化状态, 应用 RT-PCR 方法检测 *RASSF1A* 基因 mRNA 表达, MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡率。结果:HEC-1-B 细胞 *RASSF1A* 基因启动子区呈高甲基化状态, 经过 5-Aza-CdR 处理后, *RASSF1A* 基因启动子区呈去甲基化状态, 其 mRNA 重新表达, 细胞生长受到抑制, 细胞凋亡增加。结论:5-Aza-CdR 能够逆转 *RASSF1A* 基因甲基化状态, 调控 *RASSF1A* 基因表达, 并能有效地抑制 HEC-1-B 细胞的增殖和诱导细胞凋亡。

【关键词】子宫内膜癌; 5-氮杂-2'-脱氧胞苷; *RASSF1A* 基因; 甲基化

【中国图书分类法分类号】R656.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-01-05

Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine on proliferation and apoptosis
by modulating *RASSF1A* gene expression in human endometrial
carcinoma cell line HEC-1-BYU Yuecheng¹, WU Weiguang², CAO Xiuqin²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Affiliated Hospital, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of 5-aza-2'-deoxycytidine(5-Aza-CdR) on the proliferation and apoptosis in human endometrial cancer(HEC) HEC-1-B cells and the possible mechanism. Methods: HEC-1-B cells were treated with different concentrations of DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-CdR. Methylation-specific polymerase chain reaction(MSP) was used to detect promoter methylation status of RAS association domain family 1A(*RASSF1A*) gene and RT-PCR was used to detect re-expression of mRNA. Furthermore, cell growth was estimated by MTT assay and cell apoptosis rate was estimated by flow cytometry. Results: Promoter hypermethylation of the *RASSF1A* gene was detected in HEC-1-B cells. After treatment with 5-Aza-CdR, the promoter region of the *RASSF1A* gene exhibited a demethylation status, and *RASSF1A* gene was re-expressed. Meanwhile, the cellular growth activity decreased and cell apoptosis increased. Conclusions: The 5-Aza-CdR could reverse methylation of *RASSF1A* gene to regulate the expression of *RASSF1A* gene, and could effectively inhibit the cellular proliferation and induce apoptosis of endometrial carcinoma cells.

【Key words】endometrial carcinoma; 5-Aza-2'-deoxycytidine; *RASSF1A* gene; methylation

子宫内膜癌是一种妇科常见的恶性肿瘤, 其发生与多种抑癌基因的失活及癌基因的激活有关^[1]。抑癌基因参与调节细胞生长、分化, 其功能失活造成肿瘤生长抑制丧失和基因损伤增加, 在肿瘤的发生和发展中起重要作用。研究表明, 基因突变、杂合子丢失、基因启动子区甲基化是导致抑癌基因失活的主要机制^[2]。基因启动子区甲基化与细胞内 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMTs)高表达相关。RAS 相关域家族 1A(Ras association domain family 1A, *RASSF1A*)基因是从 3 号染色体短

臂克隆出来的新型抑癌基因, 其在子宫内膜癌中表达缺失, 其启动子区高甲基化。本研究应用特异的甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)作用于人子宫内膜癌(Human endometrial cancer, HEC)-1-B 细胞, 探讨 *RASSF1A* 基因启动子区去甲基化对 HEC-1-B 细胞增殖及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

HEC-1-B 细胞(武汉典型生物保藏中心), 5-Aza-CdR、亚硫酸氢钠、MTT 试剂盒(Sigma 公司), Trizol、FITC-annexin V

作者介绍: 于月成(1964-), 男, 副教授,

研究方向: 妇科恶性肿瘤综合治疗。

通信作者: 吴维光, 男, 副教授, Email: weiguangwu02@163.com。

凋亡试剂盒(Invitrogen 公司),RT-PCR 试剂盒(Takara 公司),RPMI1640 培养基(Gibco 公司),Wizard DNA Clean-up System 试剂盒(Promega 公司),寡核苷酸引物(上海生工生物工程技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 HEC-1-B 细胞在含 100 mg/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,37℃、50 ml/L CO₂、饱和湿度条件下培养。实验分为 4 组:空白对照组、5-Aza-CdR 低剂量组(低剂量组)、5-Aza-CdR 中剂量组(中剂量组)和 5-Aza-CdR 高剂量组(高剂量组)。5-Aza-CdR 低剂量组、中剂量组和高剂量组,于细胞培养瓶中分别加入 5-Aza-CdR,终浓度分别为 1.25×10^{-6} 、 2.5×10^{-6} mol/L 和 5.0×10^{-6} mol/L,细胞在 37℃、50 ml/L CO₂、饱和湿度条件下培养 72 h 后,收集细胞。

1.2.2 甲基化特异 PCR(Methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) 检测 *RASSF1A* 基因启动子区甲基化酚-氯仿-异丙醇法常规提取基因组 DNA,亚硫酸氢钠修饰,应用 Wizard DNA Clean-up System 纯化 DNA,以修饰后 DNA 为模板进行 PCR 扩增。*RASSF1A* 基因甲基化特异引物,上游:5'-GAGTTAACGCGTTGCGTATC-3',下游:5'-AACCCCGCGAACTAAAAACGA-3';*RASSF1A* 基因未甲基化引物,上游:5'-TTTGCTTGAGTGTGTTAATGTG-3',下游:5'-CAAACCC-CACAACTAAAAACAA-3'。PCR 反应条件:95℃变性 5 min,然后 95℃ 40 s,60℃ 40 s,72℃ 40 s,共 35 个循环,再 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳,UV 凝胶成像系统进行扫描分析。

1.2.3 RT-PCR 法检测 *RASSF1A* 基因 mRNA 表达 应用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA,以 oligo dT 为引物逆转录合成 cDNA 第 1 链。以 2 μl 的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,β-Actin 为内参照。*RASSF1A* 基因引物序列,上游:5'-GCTGAGATTGAG-CAGAAGAT-3',下游:5'-GGGCAGGTAAGG-AAGT-3',扩增片断为 154 bp。β-Actin 引物序列,上游:5'-CTCCATCCTGGCTCGCTGT-3',下游:5'-GCTGTCACTTC-ACCGTTC-3',扩增片断为 268 bp。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min,然后 95℃ 40 s,60℃ 40 s,72℃ 40 s,28 个循环后再 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳,UV 凝胶成像系统进行扫描,以特异扩增条带与内参条带光密度之比作半定量分析,实验重复 3 次。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖能力 取各组细胞,调整细胞浓度为 5×10^5 个/ml,接种于 96 孔培养板中,每组细胞设 3 个平行孔。细胞贴壁后,加入无血清培养液 12 h,使细胞同步化。更换含 100 mg/L 胎牛血清(FBS)的培养液,37℃、50 ml/L CO₂ 条件下培养 72 h。每孔加入浓度为 5 mg/ml 的四甲基偶氮唑蓝(MTT)液 20 μl,继续培养 4 h,弃培养液,加入 150 μl 的二甲基亚砷(DMSO),酶标仪测定各孔 490 nm 处的吸光度(A 值)。细胞增殖率=(实验组平均 A 值)/(对照组平均 A 值)×100%。实验重复 3 次。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率 操作按 FITC-annexin V 凋亡试剂盒说明书进行。收获各组细胞,用 4℃ 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,250 μl 结合缓冲液重悬细胞,调整浓度为 5×10^6 个/ml。取 100 μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中,加入 5 μl FITC-annexin V,室温下避光孵育 15 min,离心弃上清,加入 300 μl 结合缓冲液,流式细胞仪检测凋亡率,计数 10^4 个细胞。实验重复 3 次。

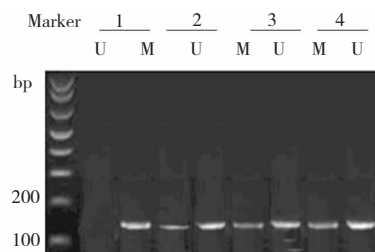
1.3 统计学方法

结果采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计方法采用 SPSS 13.0 统计软件中的单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 子宫内膜癌 HEC-1-B 细胞 *RASSF1A* 基因启动子甲基化状态

RASSF1A 基因在宫颈癌 HeLa 细胞中启动子区呈甲基化状态,经 5-Aza-CdR 处理 72 h 后,*RASSF1A* 基因出现非甲基化条带,呈部分甲基化阳性,见图 1。



1. 空白对照组;2. 低剂量组;3. 中剂量组;4. 高剂量组;
U. 非甲基化;M. 甲基化

图 1 各组细胞 *RASSF1A* 基因甲基化状态

Fig.1 Promoter methylation status of *RASSF1A* gene

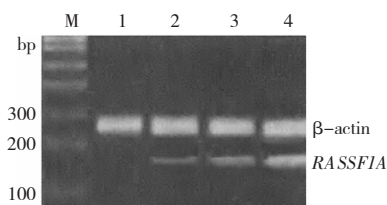
2.2 *RASSF1A* 基因 mRNA 表达检测结果

细胞 *RASSF1A* 基因 mRNA 检测表达结果见表 1 和图 2。对照组细胞 *RASSF1A* 基因 mRNA 表达缺失,经方差分析,差异有统计学意义($F=35.567, P=0.000$)。HEC-1-B 细胞经不同浓度 5-Aza-CdR 处理 72 h 后,*RASSF1A* 基因 mRNA 表达随 5-Aza-CdR 剂量增加,表达增强,差异有统计学意义($P<0.05$),呈剂量依赖性。

表 1 各组细胞 *RASSF1A* 基因 mRNA、细胞增殖率及凋亡率检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Results of *RASSF1A* mRNA, proliferation rate, and apoptosis rate in HEC-1-B cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>RASSF1A</i> mRNA	增殖率(%)	凋亡率(%)
空白对照组	0	7.84 ± 0.66	5.28 ± 1.46
低剂量组	0.21 ± 0.07	4.25 ± 0.59	8.62 ± 1.52
中剂量组	0.43 ± 0.09	2.16 ± 0.54	15.47 ± 1.61
高剂量组	0.54 ± 0.08	0.91 ± 0.57	23.63 ± 1.57



M. marker; 1. 空白对照组;2. 低剂量组;3. 中剂量组;4. 高剂量组

图 2 各组细胞 *RASSF1A* 基因 mRNA 表达

Fig.2 mRNA expression of *RASSF1A* gene

2.3 HEC-1-B 细胞增殖能力检测结果

各组细胞增殖率检测结果见表 1,经方差分析,差异有统计学意义($F=78.747, P=0.000$)。HEC-1-B 细胞经不同浓度 5-Aza-CdR 处理 72 h 后,随 5-Aza-CdR 剂量增加,细胞增殖率降低,差异有统计学意义($P<0.05$),呈剂量依赖性。

2.4 HEC-1-B 细胞凋亡率检测结果

各组细胞增殖率检测结果见表 1, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=83.222, P=0.000$)。HEC-1-B 细胞经不同浓度 5-Aza-CdR 处理 72 h 后, 随 5-Aza-CdR 剂量增加, 细胞凋亡率增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 呈剂量依赖性。

3 讨论

近年研究表明, 表观遗传学的改变也是肿瘤形成的重要机制^[3]。DNA 甲基化是真核生物 DNA 最普遍的复制后修饰方式, 在 DNA 甲基转移酶介导下, CpG 二核苷酸胞嘧啶 5' 端碳原子共价结合一个甲基基团, 甲基化后, 核苷酸的顺序没有发生改变, 而基因转录受到抑制, 抑制基因表达。肿瘤抑癌基因启动子 CpG 岛高甲基化导致的抑癌基因失活和转录后抑制是肿瘤发生的重要机制之一^[4]。RASSF1A 基因作为抑癌基因全长 1 873 bp, 含有 2 个启动子和 6 个外显子, 其启动子区域内存在 16 个 CpG 位点, 表达产物有与 RAS 蛋白结构相关的区域, 包含一个 RAS 结合区和一个 ATM 磷酸化位点。RASSF1A 基因作用机制主要有以下两方面^[5]: (1) 通过对 Rb 族细胞周期检测点起作用, 而诱导细胞周期停滞。细胞周期蛋白 Cyclin D1 的积累可以形成一个旁路, 使细胞绕过 1 个 G₁-S 期检查点, 而促进细胞增殖。RASSF1A 在翻译水平上抑制了 Cyclin D1 的聚集, 阻断了其介导的细胞增殖旁路, 阻止细胞从 G₁ 期到 S 期的转变, 使细胞周期停滞; (2) RAS 基因具有促进细胞凋亡和衰老功能, 而 RASSF1A 可能是 RAS 下游信号转导中的一个效应物, 以三磷酸鸟苷酸依赖的形式与 RAS 相互作用, 促进细胞凋亡和衰老。在多种肿瘤组织中存在 RASSF1A 基因启动子区异常甲基化和表达缺失^[6], 在子宫内膜癌组织中也存在 RASSF1A 基因启动子区高甲基化, RASSF1A 基因表达缺失, 被认为与子宫内膜癌的发生发展密切相关^[7-10]。

恶性肿瘤 DNA 甲基化具有鲜明的特征: 肿瘤特异性、基因和组织特异性以及可逆性。因此 DNA 甲基化的可逆性特征为临床肿瘤治疗提供了一种新途径。DNA 甲基化转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 能与甲基化转移酶共价结合, 降低该酶的生物活性而导致低甲基化的 DNA 合成, 从而消除肿瘤抑癌基因的异常甲基化状态, 打破抑癌基因的沉默, 调控抑癌基因的再表达, 抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞分化^[11]。5-Aza-CdR 作为去甲基化药物, 临床上已用于复发性和顽固性急性白血病的治疗, 取得了一定的疗效^[12], 但对实体肿瘤的治疗作用还不清楚。

本研究结果显示, HEC-1-B 细胞中存在 RASSF1A 基因启动子高甲基化, RASSF1A 基因表

达缺失。应用 1.25×10^{-6} 、 2.5×10^{-6} mol/L 和 5.0×10^{-6} mol/L 的 5-Aza-CdR 作用于 HEC-1-B 细胞, RASSF1A 基因启动子呈部分去甲基化状态, RASSF1A 基因恢复表达, RASSF1A 基因 mRNA 表达随 5-Aza-CdR 浓度增加而增加, 呈一定的剂量依赖性。同时 HEC-1-B 细胞增殖能力下降, 凋亡增加。结果说明 5-Aza-CdR 在体外具有抗子宫内膜癌效应, 机制可能是通过 RASSF1A 基因启动子区的去甲基化, 恢复抑癌基因 RASSF1A 的表达。

综上所述, 5-Aza-CdR 可通过抑制 DNA 甲基化转移酶的活性, 逆转抑癌基因如 RASSF1A 基因的启动子高甲基化状态, 恢复抑癌基因的表达而发挥抗子宫内膜癌的作用。相信对去甲基药物作用机制的深入研究, 将会对子宫内膜癌的治疗展示很好的前景。

参 考 文 献

- [1] Saghir F S, Rose I M, Dali A Z, et al. Gene expression profiling and cancer-related pathways in type I endometrial carcinoma[J]. Int J Gynecol Cancer, 2010, 20(5):724-731.
- [2] Di Cristofano A, Ellenson L H. Endometrial carcinoma[J]. Annu Rev Pathol, 2007, 2:57-85.
- [3] Laird P W. Cancer epigenetics[J]. Hum Mol Genet, 2005, 14(s1): 65-76.
- [4] Park S Y, Kim B H, Kim J H, et al. Methylation profiles of CpG island loci in major types of human cancers[J]. J Korean Med Sci, 2007, 22(2):311-317.
- [5] Doruninger H, Vos M D, Clark C J. The RASSF1A tumor suppressor[J]. J Cell Sci, 2007, 120(Pt 18):3167-3172.
- [6] Pfeifer G P, Yoon J H, Liu L, et al. Methylation of the RASSF1A gene in human cancers[J]. Biol Chem, 2002, 383(6):907-914.
- [7] Kang S, Lee J M, Joon E S, et al. RASSF1A hypermethylation and its inverse correlation with BRAF and/or KRAS mutations in MSI-associated endometrial carcinoma[J]. Int J Cancer, 2006, 119(6):1316-1321.
- [8] Pijnenborg J M, Dam-de Veen G C, Kisters N, et al. RASSF1A methylation and K-ras and B-raf mutation and recurrent endometrial cancer[J]. Ann Oncol, 2007, 18(3):491-497.
- [9] Fiegl H, Gatteringer C, Widschwendter A, et al. Methylated DNA collected by tampons; a new tool to detect endometrial cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004, 13(5):882-888.
- [10] Jo H, Kim J W, Kang C H, et al. Association of promoter hypermethylation of the RASSF1A gene with prognostic parameters in endometrial cancer[J]. Oncol Res, 2006, 16(4):205-209.
- [11] Ding L, Qiu L, Zhang J, et al. Camptothecin-induced cell proliferation inhibition and apoptosis enhanced by DNA methyltransferase inhibitor, 5-aza-2'-deoxycytidine[J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(6):1105-1108.
- [12] Raynal N J, Charbonneau M, Momparler L F, et al. Synergistic effect of 5-Aza-2'-deoxytidine and genistein in combination against leukemia[J]. Oncol Res, 2008, 17(5):223-230.

(责任编辑:唐秋姝)