

· 论 著 ·

5-杂氮-2'-脱氧胞苷降低了乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的体外迁移能力*

沈三弟[#], 吴爱国[△], 赵 志

(南方医科大学珠江医院普外科, 广州 510282)

摘要:目的 探讨 5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)对高转移性人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞体外迁移能力的作用及可能的机制。方法 实验分为对照组与 5-Aza-CdR 处理组,分别通过 Transwell 趋化迁移及划痕实验、半定量逆转录 PCR(SqRT-PCR)、甲基化特异性 PCR(MSP)等方法检测 MDA-MB-231 细胞的体外迁移能力、乳腺癌转移抑制基因-1(BRMS1)与 CXCR4 趋化因子受体-4(CXCR4)基因表达、BRMS1 与 CXCR4 启动子区甲基化状况。结果 对照组与处理组细胞穿过 Transwell 聚碳酸酯滤膜的数量分别为 $1\,290.00 \pm 214.64$ 与 673.00 ± 44.00 ,处理组细胞穿膜数量明显减少($P < 0.05$);24、36、48 h 时间点对照组与处理组细胞划痕愈合率分别为 20.34 ± 0.69 、 59.31 ± 0.38 、 91.77 ± 0.13 与 20.19 ± 0.67 、 49.32 ± 0.24 、 69.47 ± 0.46 ,其中 36 h 与 48 h 时间点处理组愈合率明显降低($P < 0.05$);对照组与处理组 BRMS1 的相对于内参 GAPDH 的灰度值(IDV)分别为 0 与 0.39 ± 0.001 ,处理组 BRMS1 mRNA 表达明显上调($P < 0.05$),5-Aza-CdR 使 BRMS1 启动子区甲基化的 CpG 岛 B 完全去甲基化,对照组与处理组 CXCR4 的相对于内参 GAPDH 的 IDV 分别为 0.58 ± 0.003 与 0.58 ± 0.01 ,两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),CXCR4 启动子区 CpG 岛 1 的非甲基化状态亦无明显改变。结论 5-Aza-CdR 通过去甲基化机制重新激活肿瘤转移抑制基因 BRMS1 的表达,从而降低了 MDA-MB-231 细胞体外迁移能力。

关键词:5-杂氮-2'-脱氧胞苷;乳腺癌转移抑制基因-1;CXCR4 趋化因子受体-4;基因甲基化;迁移

中图分类号:R737.9;R73-37

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)10-1209-03

5-Aza-2'-deoxycytidine decreases migration ability of breast cancer MDA-MB-231 cells in vitro*

SHEN San-di[#], WU Ai-guo[△], ZHAO Zhi

(Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, South Medical University, Guangzhou 510282, China)

Abstract: Objective To investigate the migration function of 5-Aza-CdR on high metastatic human breast cancer MDA-MB-231 cell line in vitro and possible mechanisms. **Methods** MDA-MB-231 cells were treated with 5-Aza-CdR, then cell migration ability in vitro, the mRNA expressions and promotor methylation status of breast cancer metastasis suppressor-1(BRMS1) gene and C-X-C chemokine receptor-4 (CXCR4) gene were detected by Transwell chemotactic migration and wound closure assay, semi-quantitative reverse transcription-PCR(SqRT-PCR), methylation-specific polymerase chain reaction(MSP) respectively. **Results** 5-Aza-CdR decreased the number of cells passing through polycarbonate filter membrane(1290.00 ± 214.64 versus 673.00 ± 44.00 , $P < 0.05$) and the rate of wound closure(20.34 ± 0.69 , 59.31 ± 0.38 , 91.77 ± 0.13 versus 20.19 ± 0.67 , 49.32 ± 0.24 , 69.47 ± 0.46 at 24h, 36h, 48h time points respectively) at 36h, 48h time points ($P < 0.05$); upgraded the BRMS1 mRNA expression(0 versus 0.39 ± 0.001 (relative integrated density value, IDV against GAPDH), $P < 0.05$) and demethylated the methylated CpG island B in promotor, while the CXCR4 mRNA expression(0.58 ± 0.003 versus 0.58 ± 0.01 , $P > 0.05$) and the status of unmethylated CXCR4 CpG island 1 in promotor were not changed significantly. **Conclusion** 5-Aza-CdR reactivates tumor metastasis suppressor gene BRMS1 and decreases the migration ability of MDA-MB-231 cells in vitro by demethylation mechanism.

Key words:5-Aza-CdR; BRMS1; CXCR4; gene methylation, migration

肿瘤的发生除了与基因遗传学有关外,还与表观遗传学密切相关,发生在基因启动子或第 1 个外显子区 CpG 岛的超甲基化是最主要的表观遗传学改变。癌细胞基因组整体低甲基化水平与区域超甲基化水平并存,尤其是抑癌基因与肿瘤转移抑制基因启动子区常出现超甲基化^[1],这与基因表达抑制、肿瘤的发生及转移明显相关。由于 CpG 岛甲基化是一个可以逆转的表观遗传学基因修饰过程,甲基化状态的改变相对容易并且能保持稳定地遗传,所以表观遗传学治疗将成为 21 世纪较有前景的肿瘤基因治疗手段^[2-3]。DNA 甲基转移酶抑制剂能在体内、体外成功地使 DNA 去甲基化,目前最常用于临床治疗与研究的药物是 5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR),该药已于 2004 年经 FDA 批准用于骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)的治疗,但是实体肿瘤的治疗仍然处于研究阶段。乳腺癌的发生及转移同

样与 DNA 超甲基化相关^[4],由于抑制肿瘤转移的 BRMS1 与促进肿瘤转移的 CXCR4 启动子区均存 CpG 岛,故本文通过使用 5-Aza-CdR 作用于高转移性人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞来探讨基因启动子区 CpG 岛甲基化状态对 BRMS1、CXCR4 表达及体外迁移能力的影响。

1 材料与方

1.1 材料 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞源于 ATCC, L-15 培养基及胎牛血清购自 Hyclone, 5-Aza-CdR 购自 Sigma Aldrich, Transwell 小室(聚碳酸酯膜孔径为 $8\ \mu\text{m}$)购自 Corning, TRIzol, DNazol 购自 Invitrogen, RT-PCR 引物用 Primer Premier 5.0 软件设计, MSP 引物参考文献^[5-6],均由 Invitrogen 合成。M-MLV RT Kit 与 GoTaq[®] Green Master Mix 购自 Promega, EpiTect Bisulfite Kit 购自 Qiagen, Marker(100 bp DNA Ladder)购自北京全式金生物技术有限公司, PTC-200 梯度

* 基金项目:广东省科技计划项目(2008B030301345)。 # 在读博士研究生。 △ 通讯作者, Email: wagtyz@163.com。

表 1 BRMS1、CXCR4、GAPDH 的 SqRT-PCR 引物序列

基因	正义引物 5'-3'	反义引物 5'-3'	产物大小(bp)
BRMS1	AATCGGATGGACCTTGACC	AGAGGATGTGGCTTTGACTT	351
CXCR4	AAAATCTTCTGCCACC	GCCAACATAGACCACCTT	366
GAPDH	GGAAGATGGTGATGGGATT	GGATTTGGTCGTATTGGG	205

表 2 BRMS1、CXCR4 的 MSP 引物序列

基因	正义引物 5'-3'	反义引物 5'-3'	产物大小(bp)
BRMS1	(U)AGATGTTTTATGTTATTTGGTGTGT	ATTAATCTTACTCCTCCTACCCATA	130
	(M)TAGATGTTTTACGTTATTCGGTGC	ATTAATCTTACTCCTCCTACCCGTA	130
CXCR4	(U)GATTGAAGATTTGGGTTAAGTTTG	CATACCACACTATTCTAAACATT	230
	(M)GATCGAAGATTTGGGTTAAGTTC	GTACCACGCACTATTCTAAACGTT	230

U: 非甲基化启动子的引物, M: 甲基化启动子的引物。

PCR 仪由美国 MJ Research 公司生产。

1.2 实验分组 实验分两组: 处理组, 5-Aza-CdR 溶于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中, 用含 5.0 μ M 5-Aza-CdR 培养液连续处理 MDA-MB-231 细胞 4 d, 对照组加入等体积的 DMSO。

1.3 细胞培养及药物处理 MDA-MB-231 细胞用含 10% 胎牛血清的 L-15 培养液于 37 $^{\circ}$ C、无 CO₂ 孵育箱内培养, 处理组与对照组均 2 d 换 1 次培养液。

1.4 Transwell 趋化迁移实验 消化、收集两组细胞, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 1 次, 用无血清 L-15 培养基制成细胞悬液, 浓度为 5×10^5 个/mL, 在 Transwell 小室的上室加入细胞悬液 200 μ L, 下室加入 600 μ L 含 2.5% 胎牛血清的培养液, 37 $^{\circ}$ C、无 CO₂ 孵育箱内培养 24 h, 用棉签擦净膜上室面细胞, 按照结晶紫染色液说明进行染色, 在显微镜下选择中央、上、下、左、右 5 个 200 倍视野进行细胞计数, 实验重复 3 次。

1.5 细胞划痕实验 消化、收集两组细胞, 制成细胞悬液, 浓度为 5×10^4 个/mL, 加入 24 孔板中, 每孔 1 mL, 待单层细胞完全融合, 用 200 μ L 无菌枪头在中间划痕, PBS 冲洗 2 次以完全清除脱落悬浮细胞, 每 24 小时换培养液 1 次。分别于 0、24、36、48 h 时间点在倒置显微镜 40 倍视野下摄像, 用 Image Pro Plus 6.0 软件测划痕面积, 计算划痕愈合率, 划痕愈合率% = $1 - [(各时间点划痕面积/开始的划痕面积)] \times 100\%$, 愈合率代表愈合能力, 实验重复 3 次。

1.6 SqRT-PCR 用 TRIzol 分别提取两组细胞总 RNA, 然后用 M-MLV RT Kit 与 GoTaq[®] Green Master Mix 进行 RT-PCR 反应, 操作过程遵照说明书, 引物见表 1。扩增反应条件: (1)95 $^{\circ}$ C 2 min; (2)95 $^{\circ}$ C 30 s, 57.4 / 52.8 / 51.7 $^{\circ}$ C (BRMS1 / CXCR4 / GAPDH) 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; (3)72 $^{\circ}$ C 5 min。2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 染色, 紫外透射仪上观察并摄像, 用 Quantity One 软件测条带的 IDV 并计算出相对于内参 GAPDH 的 IDV, 实验重复 3 次。

1.7 MSP 用 DNazol 分别提取两组细胞基因组 DNA, 然后用 EpiTect Bisulfite Kit 对基因组 DNA 进行重亚硫酸钠处理并净化回收, 以上操作过程均遵照说明书, MSP 引物见表 2。扩增反应条件: (1) 94 $^{\circ}$ C 5 min; (2) 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50/52.8/51.7 / 51.7 $^{\circ}$ C [BRMS1(u)/BRMS1(m)/CXCR4(u)/CXCR4(m)] 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 共 35 个循环; (3) 72 $^{\circ}$ C 7min。2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外透射仪上观察并摄像。

1.8 统计学方法 应用 SPSS13.0 软件包进行统计学分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验(双侧)分析, *P*

<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-Aza-CdR 对 MDA-MB-231 细胞体外迁移能力的影响

对照组与处理组 MDA-MB-231 细胞穿过 Transwell 小室膜的细胞数分别为 1290.00 ± 214.64 与 673.00 ± 44.00 , 处理组穿过 Transwell 小室膜的细胞数较对照组明显减少 ($P < 0.05$), 见图 1a、b、c。

对照组与处理组 MDA-MB-231 细胞在 24、36、48 h 时间点划痕愈合率分别为 20.34 ± 0.69 、 59.31 ± 0.38 、 91.77 ± 0.13 与 20.19 ± 0.67 、 49.32 ± 0.24 、 69.47 ± 0.46 , 在 24 h 时间点两组愈合率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但是在 36、48 h 时间点处理组划痕愈合率明显低于对照组 ($P < 0.05$), 见图 2。故 5-Aza-CdR 降低了 MDA-MB-231 细胞体外迁移能力。

2.2 5-Aza-CdR 对 BRMS1 mRNA、CXCR4 mRNA 表达的影响 对照组与处理组 BRMS1 RT-PCR 产物条带相对 IDV 分别为 0 与 0.39 ± 0.001 , 处理组相对 IDV 明显升高 ($P < 0.05$); 对照组与处理组 CXCR4 RT-PCR 产物条带相对 IDV 分别为 0.58 ± 0.003 与 0.58 ± 0.01 , 两组相对 IDV 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3a、b。故 5-Aza-CdR 上调了 BRMS1 mRNA 表达, 而对 CXCR4 mRNA 表达无明显影响。

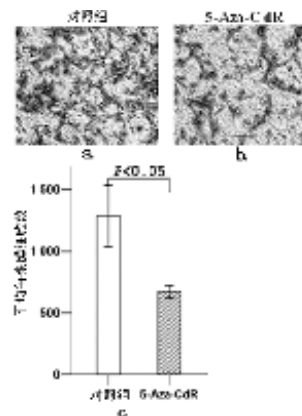


图 1 两组细胞穿过 Transwell 小室膜数量的比较

2.3 BRMS1、CXCR4 基因启动子甲基化状态 对照组 BRMS1 启动子区 CpG 岛 B 非甲基化扩增产物条带不可见, 而甲基化的扩增产物条带较明显; CXCR4 启动子区 CpG 岛 1 非甲基化扩增产物条带较明显, 而甲基化扩增产物条带不可见; 处理组 BRMS1 启动子区 CpG 岛 B 扩增产物结果与对照组相反, 而 CXCR4 启动子区 CpG 岛 1 扩增产物结果与对照组无明显差别, 见图 4a、b。故 5-Aza-CdR 使甲基化的 BRMS1 基因启动子区去甲基化, 而对非甲基化的 CXCR4 基因启动子区无明显影响。

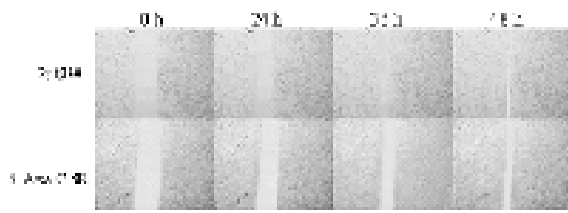


图 2 两组细胞在各时间点划痕愈合率的比较

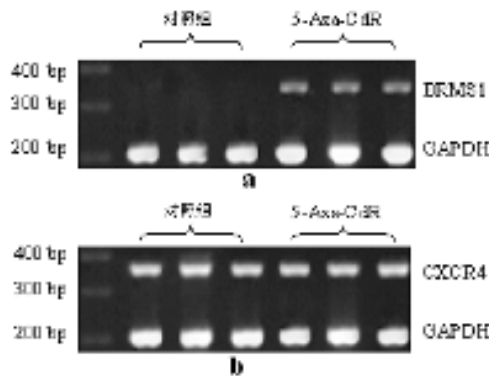


图 3 5-Aza-CdR 对 MDA-MB-231 细胞 BRMS1 mRNA 与 CXCR4 mRNA 表达的影响

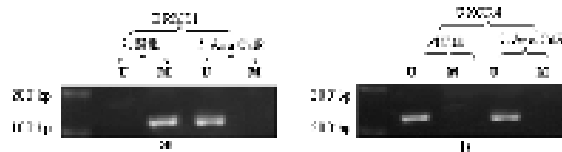


图 4 对照组与 5-Aza-CdR 处理组 MDA-MB-231 细胞的 BRMS1 与 CXCR4 基因启动子甲基化状态

3 讨论

DNA 甲基化是指基因序列中胞嘧啶的第 5 位碳原子上加入一个甲基,即形成 5'-甲基胞嘧啶(5^mC),是真核生物遗传物质化学修饰的一种方式。真核生物中 DNA 甲基化多数位于基因 5'端启动子区的 CpG 岛,通过使 CpG 岛超甲基化方式抑制基因表达。5-Aza-CdR 能与甲基转移酶以共价键形式结合,形成一个稳定的复合物,甲基转移酶因而失活,细胞在复制过程中不能将 S-腺苷-L-甲硫氨酸上的甲基基团转移至胞嘧啶上,从而使因超甲基化失活的基因去甲基化而重新激活。由于目前发现多种抑癌基因的失活与其启动子区 CpG 岛超甲基化有关^[4],故 5-Aza-CdR 成为癌症治疗比较有前景的药物。但是 5-Aza-CdR 在激活抑癌基因或肿瘤转移抑制基因的同时也会激活癌基因,最终作用效果仍在研究当中。

BRMS1 是 2000 年发现的一种新的肿瘤转移抑制基因,对体内乳腺癌细胞系的转移有明显抑制作用。BRMS1 抑制肿瘤转移机制目前仍然不太明确,可能通过增加同型间隙连接与异型间隙连接的比值,降低 NF-κB 活性从而减少骨桥蛋白表达^[7],增加癌细胞运行过程中的死亡、失巢凋亡的易感性以及抑制定植等几个环节抑制乳腺癌转移^[8]。BRMS1 的启动子区有两个 CpG 岛:离转录起始位点(transcription initiation site, TIS)较远的 CpG 岛 B 在不同的乳腺癌细胞系中存在不同程度甲基化^[9]。本研究发现,MDA-MB-231 细胞 CpG 岛 B 处于甲基化状态,且 BRMS1 mRNA 表达处于抑制状态。经过 5-Aza-CdR 处理后,CpG 岛 B 完全去甲基化,且 BRMS1 mRNA 表达量明显增加,MDA-MB-231 细胞迁移能力也比对照组明显降低。从而表明 BRMS1 启动子区 CpG 岛 B 的甲基化对其表达

有抑制作用。

CXCR4 是基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)的受体,通过信号转导调节肌动蛋白聚合与伪足形成,诱导趋化性与浸润性反应,促进迁徙与转移。CXCR4 表达在多种肿瘤细胞表面,在肿瘤转移过程中起了主要作用^[9]。CXCR4 基因启动子区有 4 个 CpG 岛,存在不同程度的甲基化,其中离 TIS 较远的 CpG 岛 1 甲基化程度的改变与 CXCR4 表达密切相关^[6]。本文检测到对照组 MDA-MB-231 细胞 CXCR4 的 CpG 岛 1 处于非甲基化状态,且 CXCR4 mRNA 表达量较高,而 5-Aza-CdR 处理后,CpG 岛 1 非甲基化状态及 CXCR4 mRNA 表达量无明显改变,故表明 5-Aza-CdR 对启动子非甲基化状态的 CXCR4 表达及非甲基化状态无明显影响。

NF-κB 可以上调 CXCR4、uPA 表达,促进肿瘤转移^[10],而 BRMS1 则能降低 NF-κB 活性抑制转移。由于该研究中 MDA-MB-231 细胞经 5-Aza-CdR 处理后,BRMS1 重新激活,表达明显上调,而 CXCR4 表达却无明显改变,因此最终表现为 5-Aza-CdR 通过重新激活 BRMS1 表达,使人高转移性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞体外迁移能力降低。

参考文献:

- [1] Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little[J]. *Oncogene*, 2002, 21(35): 5400.
- [2] Mulero-Navarro S, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008, 68(1): 1.
- [3] Abreu PA, Dellamora-Ortiz G, Leao-Ferreira LR, et al. DNA methylation: a promising target for the twenty-first century[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12(8): 1035.
- [4] Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA methylation and breast cancer[J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(6): 1187.
- [5] Metge BJ, Frost AR, King JA, et al. Epigenetic silencing contributes to the loss of BRMS1 expression in breast cancer[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25(7): 753.
- [6] Bogani C, Ponziani V, Guglielmelli P, et al. Hypermethylation of CXCR4 promoter in CD34⁺ cells from patients with primary myelofibrosis[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(8): 1920.
- [7] Samant RS, Clark DW, Fillmore RA, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) inhibits osteopontin transcription by abrogating NF-kappaB activation[J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 6.
- [8] Phadke PA, Vaidya KS, Nash KT, et al. BRMS1 suppresses breast cancer experimental metastasis to multiple organs by inhibiting several steps of the metastatic process[J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(3): 809.
- [9] Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 50.
- [10] Helbig G, Christopherson KN, Bhat-Nakshatri P, et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(24): 21631.