

5-Aza-CdR 对子宫内膜癌中 *RASSF1A* 基因甲基化的作用^{*}

黄丽萍¹, 陈晨², 王雪萍², 刘辉^{2△}

1. 山东省德州市市立医院 妇产科 (德州 253012); 2. 四川大学华西第二医院 妇产科 (成都 610041)

【摘要】目的 探讨去甲基化药物 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-CdR) 对子宫内膜癌中 Ras 相关区域家族 1A (*RASSF1A*) 基因甲基化的作用。**方法** 取子宫内膜癌细胞株 HEC-1-B 细胞随机分组, 用不同浓度 (1.0×10^{-6} , 3.0×10^{-6} , 10.0×10^{-6} mol/L) 的去甲基化药物 5-Aza-CdR 处理后, 采用甲基化特异性 PCR、实时定量 PCR、Western blot、TUNEL 等技术, 分析空白对照组及实验各组子宫内膜癌细胞株 HEC-1-B 中 *RASSF1A* 基因启动子区域甲基化情况、mRNA 表达水平、蛋白表达和细胞凋亡的情况。**结果** 人子宫内膜癌细胞株 HEC-1-B 细胞中 *RASSF1A* 基因启动子区存在高甲基化, mRNA、蛋白低表达, 以及细胞凋亡失控。不同浓度的 5-Aza-CdR 可逆转 *RASSF1A* 基因高甲基化状态, 恢复 mRNA、蛋白表达量, 并可抑制 HEC-1-B 细胞的生长及诱导凋亡。**结论** 子宫内膜癌异常甲基化 *RASSF1A* 基因作为治疗靶点, 去甲基化药物 5-Aza-CdR 是基因治疗的有效途径。

【关键词】 *RASSF1A* 基因 甲基化 子宫内膜癌

The Role of 5-Aza-CdR on Methylation of Promoter in *RASSF1A* Gene in Endometrial Carcinoma HUANG Li-ping¹, CHEN Chen², WANG Xue-ping², LIU Hui^{2△}. 1. Department of Obstetrics and Gynecology, Dezhou City Municipal Hospital, Dezhou 253012, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: lh666888@163.com

【Abstract】Objective To explore the effect of demethylating drug 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on methylation status of the Ras-association domain family 1A gene (*RASSF1A*) in human endometrial carcinoma.

Methods Randomly assign the human endometrial carcinoma cell line HEC-1-B into groups and use demethylating drug 5-Aza-CdR of different concentration to treat them. Then Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP), real-time PCR, Western blot, TUNEL technology were used to analyze methylation status of *RASSF1A* promoter CpG islands, *RASSF1A* mRNA expression, *RASSF1A* protein expression and apoptosis of HEC-1-B cell.

Results High DNA methylation in *RASSF1A* gene promoter region, low *RASSF1A* mRNA level and protein expression and out of control of human endometrial carcinoma cell HEC-1-B apoptosis were observed. 5-Aza-CdR of different concentration could reverse *RASSF1A* gene's methylation status, recover the expression of mRNA and protein, and control the growth of HEC-1-B by inducing apoptosis. **Conclusion** Aberrant methylation of *RASSF1A* in endometrial cancer as a therapeutic target, demethylating agent 5-Aza-CdR could be an effective way of gene therapy.

【Key words】 *RASSF1A* gene Methylation Endometrial cancer

Ras 相关区域家族 1A 基因 (Ras-association domain family 1A gene, *RASSF1A*) 是 2000 年 Dammann 等^[1] 从人 3 号染色体短臂克隆出来的一种新型肿瘤抑癌基因, 该基因作为 Ras 激活信号传导通路中的负向调节基因, 编码 *RASSF1A* 蛋白, 可能通过阻断细胞周期, 促进细胞凋亡及抗微管解聚等发挥抑癌作用^[2]。现发现其在肺癌、乳腺癌^[3]、肝细胞癌^[4]、结肠癌、前列腺癌、膀胱癌^[5] 等多种肿瘤中存在着启动子区异常甲基化, 这些异常的甲基

化可引起抑癌基因的不稳定和表达缺失, 与肿瘤的发生和发展密切相关^[6]。但是 DNA 甲基化是一个可逆的表观遗传学修饰过程, 使用具有去甲基化作用的药物可逆转甲基化, 使抑癌基因正常表达。目前去甲基化药物主要是指 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 抑制剂, 它通过抑制 DNMT 来恢复抑癌基因的功能, 从而达到治疗肿瘤的目的^[7,8]。现关于子宫内膜癌中 DNMT 抑制剂处理 *RASSF1A* 基因甲基化的研究国内外均较少, 本研究即旨在探讨去甲基化药物 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-CdR) 对 *RASSF1A* 基因甲基化状态的作用。

* 四川省科技厅科技支撑计划项目 (No. 2010SZ0107) 资助

△ 通讯作者, E-mail: lh666888@163.com

1 材料和方法

1.1 主要试剂和细胞

5-Aza-CdR (AZA)、亚硫酸氢钠、氢醌购自 Sigma 公司; Anti-RASSF1A 购自 BIOSS 公司; PCR 试剂盒 Premix Taq Version 2.0 (Loading dye Mix)、Trizol 购自大连宝生物; PVDF 膜 MILLIP 购自 ORE 公司; TUNEL 试剂盒购自 PROMEGA 公司。HEC-1-B 人子宫内膜癌细胞株, 为中分化子宫内膜腺癌细胞株, 引种于中科院上海细胞库。

1.2 实验分组及处理

于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中用 MEM 培养基(含 10% 特级胎牛血清)培养 HEC-1-B 内膜癌细胞, 并取对数期生长细胞, 随机分为对照组和实验组, 用不同浓度的 AZA 进行处理: A 组(空白对照组, AZA 0 mol/L), B 组(AZA 1.0×10⁻⁶ mol/L), C 组(AZA 3.0×10⁻⁶ mol/L), D 组(AZA 10×10⁻⁶ mol/L)。后期因处理分析方法不同, 对药物作用时间的要求也有所不同: 甲基化特异性 PCR(MSP)和实时定量 PCR 实验中药物处理 24 h, Western blot 实验处理 48 h, TUNEL 实验处理 72 h。

1.3 MSP 检测 RASSF1A 基因启动子区域甲基化情况

有机溶剂抽提获取各组细胞基因组 DNA 后, 用亚硫酸氢钠进行甲基化处理, 再用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒对修饰后 DNA 进行纯化回收, 最后 PCR 扩增(目的产物 169 bp)。RASSF1A 基因 DNA 序列查询于 NCBI 人类基因组数据库, 引物参考文献^[9], 由 Invitrogen 公司合成。用于检测 RASSF1A 非甲基化的引物为: 上游 5'-GGT TTTG TGAGAGTGTGTTTAG-3'; 下游 5'-CACTAACA AACACAAACCAAAC-3'; 用于检测 RASSF1A 甲基化的引物为: 上游 5'-GGGTTTGTGCGAGAGCG CG-3'; 下游 5'-GCTAACAAACGCGAACCG-3'。PCR 反应条件: 95 °C 起始变性 3 min 后, 95 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环后, 72 °C 继续延伸 10 min, 4 °C 维持后结束。

1.4 荧光定量 PCR 检测 RASSF1A mRNA 的表达水平

RASSF1A 基因 RNA 序列查询于 NCBI 人类基因组数据库, 引物采用 Primer Premier 5 软件设计, 由 Invitrogen 公司合成。使用 Trizol 法提取 RNA 后, 进行 PCR 扩增(目的产物 100 bp)。引物如下: RASSF1A, F, 5'-GCCCTGCTGCGAAAGTT

CT-3', R, 5'-CCAACAGCTTCCGCAAGTACA-3'。

4 组样本和内对照(β -actin)分别在独立的反应孔中进行扩增。每个样本和内对照使用 3 个重复反应孔进行扩增, 以消除 PCR 本身和样本本身的误差。荧光定量 PCR 用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法得到相对定量。

1.5 Western blot 检测 RASSF1A 蛋白的表达

胰酶消化各组细胞, 离心洗涤、加入蛋白酶抑制剂(PMSF)后分别用 RIPA 裂解液、超声波裂解。蛋白定量, 加入与上清液等体积的 2×SDS 凝胶加样缓冲液, 于沸水中煮样 3~5 min 后即可进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳。用 120 g/L SDS-PAGE 跑胶, 80 V 至分界面, 120 V 跑至底端。100 V 下转膜, 1 h。

含 5%(W/V)脱脂奶粉的 PBST 37 °C 封闭 1 h。4 °C 一抗孵育过夜(稀释比率为 1:400); PBST 洗涤两次后, 37 °C 二抗孵育 1 h(稀释比率为 1:4000); PBST 洗涤两次后曝光。Western blot 采用 Quantity one 4.62 凝胶定量图像分析系统分析面积积分光密度(OD)值。

1.6 TUNEL 法检测细胞凋亡

取各组细胞爬片 4 °C 固定 25 min, PBS 洗涤两次后置于 0.2% TritonX-100 溶液中浸润 5 min, PBS、平衡液再次洗涤浸泡后于 50 μ L TdT incubation buffer 37 °C 湿育 60 min, 最后将细胞爬片置于 2×SCC 中终止反应, 并在倒置荧光显微镜下观察。结果判定: 在高倍镜视野($\times 200$)下, 选择 5 个视野, 计数 200 个细胞, 计算凋亡指数。凋亡指数(%) = 凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.7 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HEC-1-B 细胞 RASSF1A 基因 DNA 甲基化状态

由图 1 可见, 未经药物处理的 A 组仅有甲基化产物, 而无非甲基化产物; 经不同 AZA 浓度处理 24 h 后的 B、C、D 组均显示甲基化条带及非甲基化条带, 且随着药物浓度的增加甲基化产物表达越来越少, 非甲基化产物表达原来越多。

2.2 HEC-1-B 细胞 RASSF1A mRNA 表达情况

药物作用 24 h, 实时定量 PCR 结果(附表)显

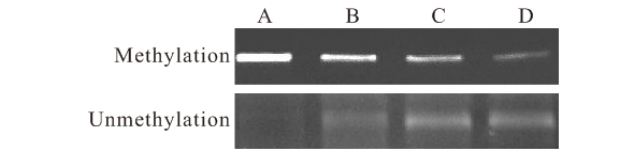


图 1 5-Aza-CdR 对 HEC-1-B 细胞 RASSF1A 甲基化状态的影响
Fig 1 The effect of 5-Aza-CdR on methylation status of RASSF1A in HEC-1-B cells

A: Blank control group; B: 1.0×10^{-6} mol/L AZA group; C: 3.0×10^{-6} mol/L AZA group; D: 10.0×10^{-6} mol/L AZA group

示,与 A 组比较,B 组差异无统计学意义($P > 0.05$);RASSF1A mRNA 表达增加($P < 0.01$);随着实验组药物浓度的增加,RASSF1A mRNA 表达亦逐渐增加,除 B、C 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)外,其余各浓度组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 HEC-1-B 细胞 RASSF1A 蛋白表达情况

药物作用 48 h,Western blot 结果显示(附表,

图 2),各实验组 RASSF1A 蛋白表达均较 A 组增加(P 均 < 0.01);随着实验组药物浓度的增加,RASSF1A 蛋白表达亦逐渐增加(P 均 < 0.01)。

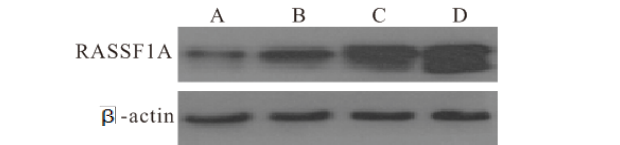


图 2 5-Aza-CdR 对 HEC-1-B 细胞 RASSF1A 蛋白表达的影响
Fig 2 The effect of 5-Aza-CdR on protein expression of RASSF1A in HEC-1-B cells

A, B, C, D note the same as fig 1

2.4 HEC-1-B 细胞凋亡情况

TUNEL 染色法显示(附表,图 3),HEC-1-B 细胞经药物作用 72 h,各实验组细胞凋亡指数均较 A 组增加(P 均 < 0.01);随着实验组药物浓度的增加,细胞凋亡指数亦逐渐增加(P 均 < 0.01)。

附表 各组 HEC-1-B 细胞在 RASSF1A mRNA、蛋白以及细胞凋亡各水平的表达				
Table RASSF1A mRNA expression, RASSF1A protein expression and apoptosis of HEC-1-B cell in four groups				
Group	n	mRNA expression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	Protein expression (IOD)	Apoptotic index
A	9	$0.004\ 378 \pm 0.000\ 260$	0.692 ± 0.069	$4.00\% \pm 0.83\%$
B	9	$0.005\ 102 \pm 0.000\ 070^\#$	$1.431 \pm 0.152^*$	$16.00\% \pm 1.30\%^*$
C	9	$0.005\ 461 \pm 0.000\ 270^{* \cdot \#}$	$2.344 \pm 0.038^{* \cdot \triangle}$	$33.00\% \pm 1.88\%^{* \cdot \triangle}$
D	9	$0.006\ 942 \pm 0.000\ 400^*$	$3.081 \pm 0.130^{* \cdot \triangle}$	$46.00\% \pm 1.92\%^{* \cdot \triangle}$

* $P < 0.01$, vs. A group; # $P < 0.05$, vs. D group; $\triangle$ $P < 0.01$, vs. former concentration group. A, B, C, D note the same as fig 1

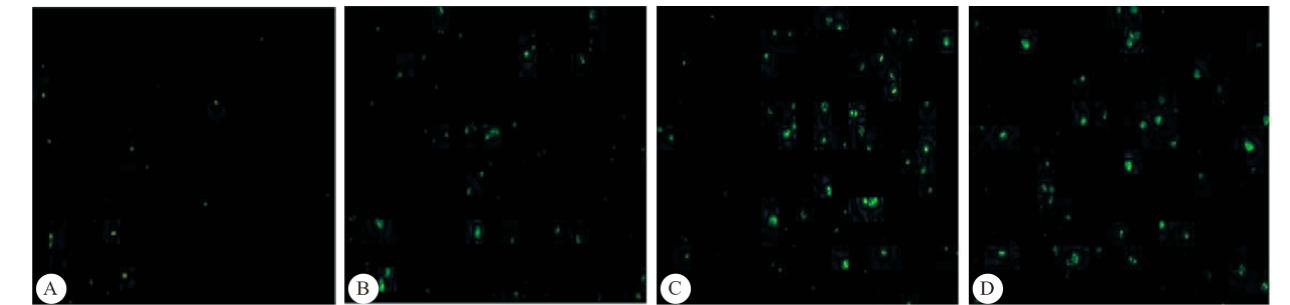


图 3 5-Aza-CdR 对 HEC-1-B 细胞的凋亡诱导作用
Fig 3 Induced apoptosis by 5-Aza-CdR in HEC-1-B cells

A, B, C, D note the same as fig 1

3 讨论

基因表观遗传学和遗传学改变共同作用,最终导致肿瘤发生,子宫内膜癌中 RASSF1A 基因启动子区 DNA 的甲基化影响肿瘤的发生发展^[10-12]。有研究者曾对比检测子宫内膜癌及对照组患者阴道分泌物中 RASSF1A、SOCS2 等 5 个基因 DNA 甲基化的情况^[13],提示甲基化 RASSF1A 基因或可作

为标志物诊断子宫内膜癌。2006 年 Jo 等^[14]报道 70 例子宫内膜癌患者中 51%(36/70)有 RASSF1A 异常甲基化,且在淋巴转移的晚期病例中更为普遍,发生甲基化及无甲基化的患者 5 年生存率分别为 77.8%和 97.0%。RASSF1A 基因的甲基化影响肿瘤的发生发展、转归以及预后,那通过逆转基因的甲基化对肿瘤是否有治疗性作用?

本研究结果显示,子宫内膜癌 HEC-1-B 细胞

MSP 结果几乎全部为甲基化产物,经不断增高浓度的去甲基化药物处理后,甲基化产物减少,非甲基化产物增多,提示 AZA 处理后启动子区的高甲基化状态逐渐被逆转。

荧光定量 PCR 及免疫印迹结果显示:子宫内膜癌细胞 RASSF1A 基因经 AZA 处理后 mRNA、蛋白表达得到不同程度的恢复,提示甲基化 RASSF1A 基因表达降低,去甲基化后 RASSF1A 基因表达可恢复,从而发挥抑癌作用。药物作用的浓度不同,表达恢复的程度也有差异。在 mRNA 表达方面,当药物浓度为 1.0×10^{-6} mol/L 时, RASSF1A 基因在处理前后 mRNA 表达无明显差异,在 3.0×10^{-6} mol/L、 10.0×10^{-6} mol/L 时 mRNA 表达明显增加,提示使 mRNA 表达产生差异的最低有效药物浓度为 3.0×10^{-6} mol/L。而在蛋白表达方面,当药物浓度为 1.0×10^{-6} mol/L 时, RASSF1A 蛋白表达较空白对照组已明显增加,随着药物浓度的增高蛋白表达增加越明显,提示药物最低有效浓度为 1.0×10^{-6} mol/L。两个最低有效浓度不同,我们猜测可能与 mRNA 及蛋白表达研究中药物作用时间不同有关。荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达时,去甲基化药物作用 24 h,而免疫印迹检测蛋白表达时药物作用 48 h,这可能是最低药物有效浓度前者高于后者的原因之一。故我们推断 AZA 药物作用不仅呈浓度依赖性,还可能呈时间依赖性。

TUNEL 法检测 HEC-1-B 细胞凋亡的结果显示:不同浓度药物处理后,细胞凋亡指数均较空白对照组细胞明显增加。进一步验证 RASSF1A 基因启动子区域高甲基化使肿瘤细胞凋亡明显减少,去甲基化后细胞凋亡逐渐升高,去甲基化药物 AZA 的逆转作用在细胞凋亡层面得到进一步验证。

综上,本研究发现人子宫内膜癌细胞株 HEC-1-B 中 RASSF1A 基因启动子区域的高甲基化状态可通过药物逆转,使其在 mRNA 及蛋白质水平恢复表达,促进肿瘤细胞凋亡,从而恢复正常的抑癌功能。该研究期望为以子宫内膜癌异常甲基化 RASSF1A 基因为治疗靶点的基因治疗的研究提供更多实验和理论依据。

参 考 文 献

1 Dammann R, Li C, Yoon JH, *et al.* Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour

suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet*,2000;25(3):315-319.

2 Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF proteins in cancer: from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochim Biophys Acta*, 2009; 1796 (2): 114-128.

3 Ha YS, Jeong P, Kim JS, *et al.* Tumorigenic and prognostic significance of RASSF1A expression in low-grade (WHO Grade 1 and Grade 2) nonmuscle-invasive bladder cancer. *Urology*, 2012;79(6):1411-1416.

4 Hu L, Chen G, Yu HP, *et al.* Clinicopathological significance of RASS1A reduced expression and hypermethylation in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int*,2010;4(1):423-432.

5 Hagrass HA, Pasha HF, Shaheen MA, *et al.* Methylation status and protein expression of RASSF1A in breast cancer patients. *Mol Biol Rep*,2014;41(1):57-65.

6 Nilsson TK, Löf-Öhlin ZM, Sun XF. DNA methylation of the p14(ARF), RASSF1A and APC1A genes as an independent prognostic factor in colorectal cancer patients. *Int J Oncol*, 2013;42(1):127-133.

7 Egger G, Liang G, Aparicio A, *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*,2004;429 (6990):457-463.

8 于月成, 吴维光, 曹透琴. 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. *重庆医科大学学报*,2012;37(6):525-527.

9 Zhang YQ, Mao XY. Methylation of promoter in RASSF1A gene and its mRNA expression in human endometrial carcinoma cell line HEC-1-B. *Med J Co*,2010;24(1):10-12.

10 Yamaguchi S, Asanoma K, Takao T, *et al.* Homeobox gene HOPX is epigenetically silenced in human uterine endometrial cancer and suppresses estrogen-stimulated proliferation of cancer cells by inhibiting serum response factor. *Int J Cancer*, 2009;124(11):2577-2588.

11 Ignatov A, Bischoff J, Schwarzenau C, *et al.* P16 alterations increase the metastatic potential of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*,2008;111(2):365-371.

12 Arafa M, Kridelka F, Mathias V, *et al.* High frequency of RASSF1A and RARb2 gene promoter methylation in morphologically normal endometrium adjacent to endometrioid adenocarcinoma. *Histopathology*,2008;53(5):525-532.

13 Fiegl H, Gatttringer C, Widschwendter A, *et al.* Methylated DNA collected by tampons—a new tool to detect endometrial cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004; 13 (5): 882-888.

14 Jo H, Kim JW, Kang GH, *et al.* Association of promoter hypermethylation of the RASSF1A gene with prognostic parameters in endometrial cancer. *Oncol Res*,2006;16(4):205-209.

(2014-06-18 收稿,2014-11-25 修回)

编辑 余 琳