

· 论 著 ·

5-氮-2'-脱氧胞苷对人膀胱癌细胞系 T₂₄ 细胞及其 Apaf-1、APC 基因甲基化状况的影响*

王文卫¹, 潘俊², 陈凌武³, 林焕懿¹, 曾令友¹

(1. 中山大学附属第一医院黄埔院区泌尿外科, 广东广州 510700;

2. 广东省中医院, 广东广州 510120; 3. 中山大学附属第一医院泌尿外科, 广东广州 510080)

摘要:目的 观察 5-氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)对人膀胱癌 T₂₄ 细胞增殖、凋亡的影响及其对凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)、结肠腺瘤性息肉病(APC)基因甲基化表达状况的影响。方法 应用不同浓度的 5-Aza-CdR 处理人膀胱癌 T₂₄ 细胞, 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞生长抑制率; 流式细胞术(FCM)检测细胞周期和凋亡的变化情况; 以甲基化特异性 PCR 方法(MSP 法)检测膀胱癌 T₂₄ 细胞株中 Apaf-1 及 APC 基因的甲基化状态。结果 膀胱癌 T₂₄ 细胞中 Apaf-1、APC 基因分别呈半甲基化及高甲基化, 5-Aza-CdR 作用后 T₂₄ 细胞中 Apaf-1 及 APC 基因启动子区域均呈去甲基化状态; T₂₄ 细胞的生长受到明显抑制, 0.50、1.00、2.50、5.00 μmol/L 5-Aza-CdR 作用 T₂₄ 细胞 72 h 后, 细胞生长抑制率分别为 0.50%、5.40%、20.40%、23.00%, 组间比较差异有统计学意义(P<0.05), 呈剂量和时间依赖关系。72 h 后 G₀/G₁ 期的比例增加, S 期比例明显减少, 细胞凋亡率明显增加, 5.00 μmol/L 5-Aza-CdR 组凋亡率为(40.35±3.63)%, 对照组为(8.17±1.52)%, 组间比较差异有统计学意义(P<0.01)。结论 5-Aza-CdR 能逆转膀胱癌 T₂₄ 细胞中的 Apaf-1 及 APC 基因甲基化, 恢复该基因的表达, 诱导膀胱癌 T₂₄ 细胞凋亡。

关键词:膀胱肿瘤; DNA 甲基化; 癌基因; 5-氮-2'-脱氧胞苷

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.13.006

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)13-1457-03

Effects of 5-Aza-CdR on proliferation and apoptosis of human bladder cancer T₂₄ cells and expression of promoter methylation status of suppressor genes Apaf-1 and APC*

Wang Wenwei¹, Pan Jun², Chen Lingwu³, Lin Huanyi¹, Zeng Lingyou¹

(1. Department of Urology, Huangpu Hospital, First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510700, China; 2. Department of Urology, Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 3. Department of Urology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: Objective To explore the effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine(5-Aza-CdR) on the growth of T₂₄ human bladder cancer cells and the expression of the promoter methylation status of the suppressor genes Apaf-1 and APC. **Methods** The methylation status of the promoter of Apaf-1 and APC gene in T₂₄ cells were detected by the methylation-specific PCR(MSP). Cultured T₂₄ cells were treated with 5-Aza-CdR. MTT was used to detect the proliferation of T₂₄ cells. Cell cycles and apoptosis changes were examined by means of flow cytometry(FCM). **Results** The Apaf-1 and APC gene were semi-methylated or hypermethylated in T₂₄ cells. 5-Aza-CdR significantly inhibited the proliferation of bladder cancer cell in a time-and dose-dependent manner. Cultured T₂₄ cells were treated with 0.50, 1.00, 2.50, 5.00 μmol/L 5-Aza-CdR respectively. The inhibition was 0.50%, 5.40%, 20.40% and 23.00% respectively, which showing statistically significant difference(P<0.05). The cells in G₁ phase and the proportion of apoptotic cells were significantly increased at 72 h after treatment with 5-Aza-CdR, while the cells in S phase were reduced. The proportion of apoptotic cells treated with 5.00 μmol/L 5-Aza-CdR was(40.35±3.63)%, and the control group was(8.17±1.52)%, with statistically significant difference(P<0.01). **Conclusion** 5-Aza-CdR may effectively induce the apoptosis of T₂₄ cell through inhibiting the methylation of Apaf-1 and APC gene.

Key words: urinary bladder neoplasms; DNA methylation; oncogenes; 5-Aza-CdR

有研究发现, 在膀胱癌组织中人凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)及结肠腺瘤性息肉病(APC)基因的启动子区域存在高频率的异常甲基化, 为进一步揭示 Apaf-1 及 APC 基因与膀胱癌的关系, 本研究采用 DNA 甲基转移酶的抑制剂 5-氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)对膀胱癌细胞株 T₂₄ 进行处理, 检测其 Apaf-1 及 APC 基因的甲基化表达, 并分析肿瘤细胞的生物学行为改变, 以探讨膀胱癌的发生机制并寻求新的治疗靶点。

1 材料与与方法

1.1 材料 T₂₄ 人膀胱癌细胞系购于中国科学院上海生物细胞研究所, 5-Aza-CdR 为 Sigma 产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 T₂₄ 人膀胱癌细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 mg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基。在 37 ℃、5%CO₂ 饱和湿度条件下生长传代, 实验时取对数生长期的细胞。

1.2.2 药物处理及分组 5-Aza-CdR 按说明书配置溶液。实验分组: (1) 阴性对照组; (2) 实验组再分成 4 个组, 即实验 1 组、实验 2 组、实验 3 组、实验 4 组, 待细胞接种 24 h 后, 分别加入 0.50、1.00、2.50、5.00 μmol/L 的 5-Aza-CdR。

1.2.3 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法测定 5-Aza-CdR 对细

* 基金项目: 广东省科技计划基金资助项目(2009B060700044); 广东省医学科研基金资助项目(A2005205); 广州市黄埔区科技计划基金资助项目(330300409300403)。作者简介: 王文卫(1968~), 副主任医师, 博士研究生, 主要从事泌尿系肿瘤的诊治研究。

胞系增殖活性的影响 取对数生长期,台盼蓝检测活力大于 95.00%的 T₂₄细胞,以 10⁴/孔密度接种于 96 孔细胞培养板,每孔体积 200 μL,细胞贴壁后以无血清培养基静置 24 h,各组均设 3 个复孔。置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱内培养,于 72 h 进行处理,每孔加入 MTT 20 μL,37 °C、5%CO₂ 继续孵育 4 h,小心吸弃上清液,每孔加入二甲亚砜(DMSO) 150 μL,充分混匀,于 Bio-Tek 酶标仪分析 490 nm 处吸光度(OD)值。计算抑制率的公式为:抑制率(%)=(1-实验组 OD 值÷对照组 OD 值)×100%。

1.2.4 流式细胞术(FCM)检测 T₂₄细胞周期及凋亡 细胞同期培养 72 h 后用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰蛋白酶收集处理后的细胞,800 r/min 离心 10 min,沉淀采用 300 μL 磷酸盐缓冲溶液(PBS)重悬,逐滴加入 700 μL 预冷的无水乙醇中,乙醇终浓度为 70.00%,4 °C 避光固定过夜。离心去上清液。PBS 洗涤 2 次。重悬细胞于 500 μL 含 100 unit/mL 的 RNaseA 的 PBS 中,避光,37 °C 孵育 30 min。加 2.00 mg/mL 碘化丙啶(PI)至终浓度 50.00 μg/mL,避光孵育 30 min。FCM 检测细胞周期和凋亡率。

1.2.5 引物设计 Apaf-1 的甲基化引物:5'-AGG AAA TTT AAA TTT TCG GGC-3'(F),5'-CGC GAA CGA AAC GTA ACT A-3'(R);非甲基化引物:5'-GAG GAA ATT TAA ATT TTT GGG T-3'(F),5'-CCA CAA ACA AAA CAT AAC TA-3'(R)。APC 的甲基化的引物:5'-TGT TTT ATT GCG GAG TGC-3'(F),5'-AAC CAC ATA TCG ATC ACG TAC-3'(R);非甲基化引物:5'-TTG TGT TTT ATT GTG GAG TGT-3'(F),5'-AAC CAC ATA TCA ATC ACA TAC ACC-3'(R)。引物设计采用 Primer premier 5.0 引物设计专门软件,由 Invitrogen 公司鉴定合成。

1.2.6 甲基化特异性 PCR 方法(MSP 法)检测膀胱癌 T₂₄细胞株中 Apaf-1 及 APC 基因的甲基化状态 取对数生长期的 T₂₄细胞,用 0.25%胰酶消化处理,用 TIANamp Genomic DNA Kit 试剂盒按说明提取基因组 DNA,提取的总 DNA 经紫外分光光度计检验 DNA 的浓度和纯度。将 2.00 μg DNA 加入 1.50 mL EP 管中并用 DDW 稀释至 50 μL,加 5.50 μL 新鲜配制的 3.00 mmol/L NaOH,42 °C 水浴 30 min 使 DNA 变性;加入新鲜配制的 10.00 mmol/L 氢醌 30 μL 及 3.60 mol/L 亚硫酸氢钠 520 μL;50 °C 避光水浴 16 h。DNA 经甲基化修饰处理后纯化、回收,-20 °C 保存。反应体系包括 10×PCR 缓冲液 2.50 mL,dNTP 0.50 μL,上、下游引物各 1.00 μL,DNA 1.00 μL 及 2.50 U/μL 的 TaqHS 聚合酶 0.40 μL,加入 ddH₂O 至终体积 25.00 μL。反应条件如下:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s、57 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增产物进行 2.50%琼脂糖凝胶电泳。结果判断标准:仅出现甲基化条带为高甲基化,同时出现甲基化和非甲基化条带为半甲基化,仅出现非甲基化条带为非甲基化,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 所有数据均由 SPSS13.0 统计软件处理,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-Aza-CdR 对细胞增殖的影响 MTT 实验可见 5-Aza-CdR 对 T₂₄细胞生长、增殖活性具有明显的抑制作用。0.50、1.00、2.50、5.00 μmol/L 5-Aza-CdR 作用 T₂₄细胞 72 h 后,细胞生长抑制率分别为 0.50%、5.40%、20.40% 和 23.00%,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),且呈明显的剂量依赖关系。

2.2 5-Aza-CdR 对细胞周期及凋亡的影响 与对照组比较,

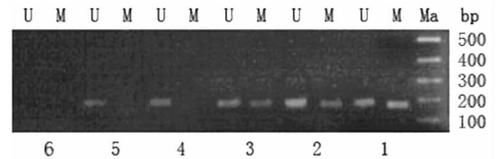
在 1.00、2.50、5.00 μmol/L 5-Aza-CdR 作用下 T₂₄细胞 G₀/G₁期的细胞比例明显增加,S 期细胞比例减少($P < 0.05$),且随 5-Aza-CdR 浓度的增加,阻滞效果更为明显。实验组 T₂₄细胞凋亡增加,5.00 μmol/L 5-Aza-CdR 组凋亡率为(40.35 ± 3.63)%,与对照组(8.17 ± 1.52)%比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 5-Aza-CdR 对膀胱癌 T₂₄细胞周期和细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞周期(%)			凋亡率(%)
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
阴性对照组	71.30 ± 1.15	25.53 ± 0.25	3.13 ± 1.36	8.17 ± 1.52
实验 1 组	67.13 ± 0.74*	23.87 ± 1.54	9.00 ± 2.29*	15.70 ± 2.72*
实验 2 组	71.60 ± 1.40	19.40 ± 1.32*	9.00 ± 0.44*	24.83 ± 3.14*
实验 3 组	73.80 ± 1.50*	18.13 ± 1.05*	8.03 ± 0.40*	37.17 ± 1.71*
实验 4 组	77.43 ± 0.80*	15.20 ± 0.61*	7.33 ± 0.51*	40.35 ± 3.63*

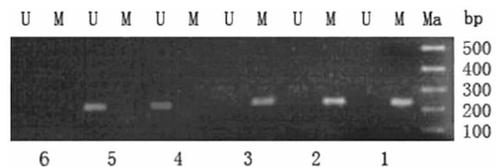
*: $P < 0.05$,与阴性对照组比较。

2.3 膀胱癌 T₂₄细胞系中 Apaf-1 及 APC 基因甲基化状态 MSP 结果显示对照组细胞 Apaf-1 基因呈半甲基化状态,同时出现甲基化和非甲基化条带,APC 基因仅出现甲基化条带,且呈高甲基化状态;而经 5.00 μmol/L 5-Aza-CdR 处理后的 Apaf-1 及 APC 基因均呈去甲基化状态,见图 1、2。



Ma: 标记物;M: 甲基化;U: 非甲基化;1: 阴性对照组;2: 实验 1 组;3: 实验 2 组;4: 实验 3 组;5: 实验 4 组;6: 空白对照。

图 1 不同浓度 5-Aza-CdR 处理 T₂₄细胞后 Apaf-1 基因甲基化检测结果



Ma: 标记物;M: 甲基化;U: 非甲基化;1: 阴性对照组;2: 实验 1 组;3: 实验 2 组;4: 实验 3 组;5: 实验 4 组;6: 空白对照。

图 2 不同浓度 5-Aza-CdR 处理 T₂₄细胞后 APC 基因甲基化检测结果

3 讨论

近年来研究发现,以 DNA 甲基化为代表的表观遗传学改变在肿瘤的发生过程中起着重要作用,基因启动子区 CpG 岛高甲基化是导致许多基因去表达和基因印迹的重要途径^[1-2]。Apaf-1 及 APC 基因是近年来发现的重要的多重抑癌基因,Apaf-1 是 c-myc 诱导肿瘤细胞凋亡中 P53 的下游成分,它参与线粒体介导的凋亡途径,细胞色素 c/Apaf-1/caspase-9 途径的激活依赖于 Apaf-1^[3]。有研究表明,在多种恶性肿瘤中 Apaf-1 基因转录和翻译水平下调,而启动子甲基化是引起该基因“静默”的主要原因^[4-6]。APC 是 Wnt 信号的下游抑制因子,APC 失活后则会导致 β-catenin 突变而与之解离,细胞质 β-catenin 转移到细胞核与 Tcf-4 结合,活化靶基因刺激肿瘤生长^[7]。本课题的前期研究已证实 Apaf-1、APC 基因启动子区 CpG 岛高甲基化在膀胱癌发生、发展过程中所起的重要作用^[8-9]。

本实验应用不同浓度的 5-Aza-CdR 作用于 T₂₄细胞系后

检测细胞的增殖与凋亡,结果显示 5-Aza-CdR 可以明显抑制细胞增殖,诱导细胞周期阻滞和凋亡,细胞凋亡率明显提高。0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-Aza-CdR 对 T₂₄ 细胞生长已有抑制作用,且随着药物浓度的增加,抑制作用逐渐增强,5.0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 作用 T₂₄ 细胞 72 h 后,细胞的生长抑制率达到 23.0%。FCM 检测结果显示 5-Aza-CdR 处理的 T₂₄ 细胞 G₀/G₁ 期细胞明显增加,S 期细胞减少,凋亡率达到 (40.35 \pm 3.63)%。细胞凋亡受众多凋亡相关基因调控,具有两条独立的途径:死亡受体途径和线粒体介导的凋亡途径,抑癌基因的表达状况是癌细胞凋亡的重要调节因素。本研究发现在人膀胱癌 T₂₄ 细胞系中 Apaf-1 呈半甲基化状态,APC 基因的启动子呈高甲基化状态,而 5-Aza-CdR 作用后的 Apaf-1 及 APC 基因均呈去甲基化状态。基因启动子高甲基化或半甲基化可导致基因表达沉默或降低,是肿瘤发生的早期事件,而 DNA 甲基化是由 DNA 甲基转移酶催化的,5-Aza-CdR 抑制肿瘤细胞生长、诱导其凋亡的作用机制并非其本身的药物毒性直接所致,而是其去甲基化的间接作用^[10]。5-Aza-CdR 通过与 DNA 甲基转移酶共价结合,降低 DNA 甲基转移酶的生物活性,在 DNA 复制过程中可逆转基因 CpG 岛甲基化,调节基因表达,从而降低甲基化水平,因而被作为去甲基化制剂^[11-12]。已经证实 5-Aza-CdR 在多种肿瘤中具有抑制细胞增殖和促凋亡作用^[13-15]。本实验中发现,5-Aza-CdR 能成功逆转两基因启动子的甲基化状态,使因甲基化失活的 Apaf-1 及 APC 基因去甲基化而重新表达的同时,膀胱癌细胞出现增殖受限,凋亡明显增加,这进一步说明了 Apaf-1、APC 基因表达上调可能是 5-Aza-CdR 诱导 T₂₄ 细胞凋亡和抑制细胞生长的重要机制之一。

通过本实验证实,5-Aza-CdR 可在体外诱导膀胱癌细胞凋亡和抑制细胞增殖,提示表观遗传学调控可能成为膀胱癌治疗新的靶点。恶性肿瘤中因基因突变、缺失等遗传学改变导致的基因失活难以逆转,而启动子甲基化所致的基因沉默是可逆的,可通过相应药物逆转表观遗传学的改变,恢复抑癌基因的功能,促进肿瘤细胞凋亡,达到治疗肿瘤的目的。目前,5-Aza-CdR 已经用于白血病、骨髓增生异常综合征的临床治疗。因此,如能将 5-Aza-CdR 与其他干预药物联合用药,可能为膀胱癌的治疗提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Esteller M. Epigenetics in cancer[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(11):1148-1159.
- [2] Cabello MJ, Grau L, Franco N, et al. Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes in bladder cancer[J]. *J Mol Diagn*, 2011, 13(1):29-40.
- [3] Christoph F, Kempkensteffen C, Weikert S, et al. Frequent epigenetic inactivation of p53 target genes in seminomatous and nonseminomatous germ cell tumors[J]. *Cancer Lett*, 2007, 247(1):137-142.
- [4] Christoph F, Hinz S, Weikert S, et al. Comparative promoter methylation analysis of p53 target genes in urogenital cancers[J]. *Urol Int*, 2008, 80(4):398-404.
- [5] Ahmad ST, Arjumand W, Seth A, et al. Methylation of the APAF-1 and DAPK-1 promoter region correlates with progression of renal cell carcinoma in North Indian population[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(2):395-402.
- [6] Christoph F, Kempkensteffen C, Weikert S, et al. Methylation of tumour suppressor genes APAF-1 and DAPK-1 and in vitro effects of demethylating agents in bladder and kidney cancer[J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(12):1701-1707.
- [7] Iacopetta B, Grief F, Li W, et al. APC gene methylation is inversely correlated with features of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(10):2272-2278.
- [8] 王文卫,陈凌武,徐盈斌,等. 凋亡蛋白酶活化因子-1 基因及结肠腺瘤样息肉病易感基因启动子甲基化状态在膀胱癌组织中的表达[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26(2):229-231.
- [9] 王文卫,陈俊星,潘俊,等. 曲古抑菌素 A 对膀胱癌 T₂₄ 细胞增殖及 Apaf-1 和 APC 基因表达的影响[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2010, 31(4):552-556.
- [10] 崔军,于秀月,刘勇,等. 5-氮-2'-脱氧胞苷对 T₂₄ 膀胱癌细胞 RUNX3 基因去甲基化的转录调节作用[J]. *山西医药杂志*, 2009, 38(1):16-18.
- [11] Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, et al. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia[J]. *Blood*, 2007, 109(1):52-57.
- [12] Chuang JC, Warner SL, Vollmer D, et al. S110, a 5-Aza-2'-deoxycytidine-containing dinucleotide, is an effective DNA methylation inhibitor in vivo and can reduce tumor growth[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(5):1443-1450.
- [13] 孟春风,彭过,戴冬秋,等. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷诱导胃癌细胞系中 p16 和 MGMT 基因去甲基化并激活其表达[J]. *中国医科大学学报*, 2008, 37(4):519-521.
- [14] Issa JJ. DNA methylation as a therapeutic target in Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(6):1634-1637.
- [15] Momparler RL. Epigenetic therapy of Cancer with 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) [J]. *Semin Oncol*, 2005, 32(5):443-451.

(收稿日期:2012-09-08 修回日期:2012-12-22)

(上接第 1456 页)

- [9] Kabacoff RI. R in action[M]. New York: Manning Publications Co, 2009.
- [10] Richardson WC, Avondolio D, Schrage S, et al. Professional Java JDK[M]. 6 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.
- [11] 张俐,张维玺. 改进的 JDBC 框架在数据持久层的应用[J]. *计算机工程与设计*, 2010, 31(8):1746-1749.
- [12] 李贤华,彭真. 基于 JDBC-ODBC 的数据库访问方法的设计与实现[J]. *计算机与现代化*, 2008(5):28-31.
- [13] 胡海峰,鲍福廷,魏瀚,等. 固体火箭发动机试验数据分析[J]. *弹箭与制导学报*, 2011, 31(1):131-134.
- [14] 陈甫,余朋,李力. 成都双流机场历年主导能见度数据的统计分析及其 R 实现[J]. *电脑知识与技术*, 2012, 8(27):6428-6433.

(收稿日期:2012-09-18 修回日期:2013-01-26)