

• 基础研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.17.002

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240607.1548.002\(2024-06-07\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240607.1548.002(2024-06-07))

## TET2 抑制剂衣康酸对乳腺癌细胞增殖、迁移的影响\*

曾俊杰,熊忠讯,莫绍江,张辉<sup>△</sup>

(重庆大学附属肿瘤医院,肿瘤转移与个体化诊治转化研究重庆市重点实验室,重庆 400030)

**[摘要]** **目的** 探讨甲基胞嘧啶双加氧酶 2(TET2)抑制剂衣康酸对乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 增殖、迁移的影响及机制。**方法** 人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 分别采用二甲基亚砜(DMSO)和 1,5 μmol/L 衣康酸处理 24 h,流式细胞术检测细胞凋亡确定可用的衣康酸浓度,免疫荧光实验检测衣康酸对细胞 5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)表达水平的抑制作用,细胞计数、MTS 检测衣康酸对细胞增殖和活性的影响,Transwell 实验检测衣康酸对细胞迁移能力的影响,甲基化特异性实时荧光定量 PCR(qPCR)检测衣康酸处理对细胞增殖、迁移相关基因启动子区甲基化的影响,qPCR 检测衣康酸对细胞增殖、迁移相关基因表达的影响。**结果** 5 μmol/L 衣康酸处理细胞对细胞凋亡均无明显影响,且可抑制 5hmC 表达水平( $P<0.05$ )。细胞计数和 MTS 结果表明,衣康酸促进细胞增殖(增加约 58%, $P<0.05$ ),增强细胞活性(增加约 42%, $P<0.05$ );Transwell 实验结果表明,衣康酸增强细胞迁移(增加约 55%, $P<0.05$ )。甲基化特异性 qPCR 结果表明,衣康酸处理明显促进 p21 和 PTEN 启动子甲基化( $P<0.05$ )。qPCR 结果表明,衣康酸明显抑制 p21 和 PTEN 表达水平( $P<0.05$ )。**结论** 衣康酸通过抑制 p21 和 PTEN 的 5hmC 水平降低其表达,促进 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的增殖、迁移。

**[关键词]** 乳腺癌;衣康酸;DNA 甲基化;增殖;迁移;5-羟甲基胞嘧啶

**[中图法分类号]** R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2024)17-2566-05

## Effect of TET2 inhibitor itaconate on proliferation and migration of breast cancer cells\*

ZENG Junjie, XIONG Zhongxun, MO Shaojiang, ZHANG Hui<sup>△</sup>

(Chongqing Municipal Key Laboratory of Translational Research for Cancer Metastasis and Individualized Treatment, Affiliated Tumor Hospital, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects and mechanism of TET2 inhibitor itaconate in proliferation and migration of breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods** The MDA-MB-231 cells were treated for 24 h with dimethyl sulfoxide (DMSO) and 1,5 μmol/L itaconate respectively. The cellular apoptosis was determined by flow cytometry to determine the available itaconic acid concentration. The immunofluorescence was performed to determine the inhibiting effect of itaconate on hydroxymethylcytosine (5hmC) expression level. The cell counting and MTS were performed to determine the effect of itaconate on cell proliferation and activity. The Transwell experiment was performed to determine the effect of itaconate on cell transfer ability. The methylation-specific real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was used to detect the effects of itaconic acid treatment on the methylation of promoter regions of genes related to cell proliferation and migration. qPCR was used to detect the effects of itaconate on the cellular proliferation, migration related genes expression. **Results** 5 μmol/L itaconate treating the cells had no significant effect on the cellular apoptosis, moreover could inhibit 5hmC expression level. The cell count and MTS results showed that itaconate could promote the cell proliferation (increase by about 58%,  $P<0.05$ ) and increase the cell activity (increase by 42%,  $P<0.05$ ). The Transwell experiment results showed that itaconate increased the cell migration (increase by 55%,  $P<0.05$ ). The methylation-specific qPCR showed that the itaconate treatment significantly promoted the methylation of the promoters p21 and PTEN. The qPCR results showed that itaconate significantly inhibited the expression levels of p21 and PTEN ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Itaconate promotes the proliferation and migration of MDA-MB-231 cells through inhibiting 5hmC level of p21 and PTEN and decrease its expression.

**[Key words]** breast cancer; itaconate; DNA methylation; proliferation; migration; 5hmC

乳腺癌是女性群体中最常见的肿瘤。研究指出,中国女性乳腺癌发病率及病死率呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>。同时,乳腺癌也是美国女性中最常见的恶性肿瘤,且病死率高居所有癌症的第二位<sup>[2]</sup>。遗传、激素水平异常及抽烟酗酒等不健康的生活方式是其重要的致病因素<sup>[3]</sup>。目前,临床主要通过放疗、化疗结合手术治疗乳腺癌,但仍存在治疗无效的难题<sup>[4]</sup>。进一步阐明乳腺癌发生、发展机制,找到新治疗靶点和药物,是解决上述问题的关键。

表观遗传是在不改变 DNA 序列的前提下,对 DNA 及其周围的组蛋白进行化学基团修饰,从而改变基因表达。DNA 甲基化/羟甲基化、组蛋白修饰、非编码 RNA 调控等方式会对基因表达和功能进行调控<sup>[5]</sup>,从而影响肿瘤的发生、发展。DNA 甲基化/羟甲基化作为表观遗传学修饰的主要机制之一,已成为表观遗传学修饰研究领域的热点问题。5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)是一种新兴且稳定的表观遗传学标志物<sup>[6]</sup>,它不但是 DNA 去甲基化的中间产物,也与基因表达的抑制相关,同时在很多生物学行为和个体生长发育当中发挥重要作用<sup>[7]</sup>,因此得到广大研究者的重视,并已经在肿瘤检测中得到初步应用<sup>[8]</sup>。

研究表明,表观遗传与乳腺癌发生、发展密切相关<sup>[9-10]</sup>,而 DNA 的甲基化与乳腺癌发生、发展的关系更受到广泛关注<sup>[11-12]</sup>。已知 DNA 甲基转移酶 DNMT1 主要介导 DNA 甲基化<sup>[13]</sup>,而甲基胞嘧啶双加氧酶 2(TET2)则介导其去甲基化<sup>[14]</sup>。大多数情况下,TET2 能够通过将 DNA 上的 5-甲基胞嘧啶(5mC)转化为 5hmC 从而介导 DNA 的去甲基化<sup>[15]</sup>,从而在转录水平上调控基因表达。然而,TET2 突变或被抑制而导致其丧失去甲基化活性,被认为是某些肿瘤形成的起始步骤<sup>[16]</sup>。

有关研究指出,巨噬细胞特异性代谢产物衣康酸通过与 TET2 竞争结合  $\alpha$ -酮戊二酸抑制 TET2,从而调控细胞的 DNA 甲基化、基因表达和功能<sup>[17]</sup>。体外细胞和体内动物实验表明,衣康酸可以通过抑制 TET2 的酶活性降低巨噬细胞和炎症小鼠的炎症反应<sup>[18]</sup>,从而减弱对细胞和炎症小鼠的损伤。考虑巨噬细胞是乳腺癌肿瘤微环境的重要组成部分<sup>[19]</sup>,而衣康酸对乳腺癌细胞的影响还罕有报道,因此阐明衣康酸对乳腺癌细胞的影响有可能揭示肿瘤免疫微环境促进肿瘤进展的新机制,从而为乳腺癌治疗提供新靶点<sup>[20]</sup>。已知乳腺癌中抑癌基因 p21 和 PTEN 的甲基化和表达降低与乳腺癌发生、发展有关<sup>[21-22]</sup>。因此,本研究旨在探讨 DNA 去甲基化酶 TET2 抑制剂衣康酸对乳腺癌细胞增殖和迁移的影响及相关机制,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 购自上海瑞鹿生物技术有限公司。MTS 检测试剂盒购自上海尚宝生物科技有限公司,DMEM 和胎牛血清购自美国 Gibco 公司,0.25%胰酶细胞消化液购自上海碧云天生物技术有限公司,衣康酸购自美国 MCE 公司,凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,DNA 纯化试剂盒购自中国北京天根生化科技有限公司,兔抗人 5hmC 抗体购自美国 Abcam 公司,驴抗兔免疫荧光二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司,RNA 逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR(qPCR)试剂盒购自北京全式金生物科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

DMEM 完全培养基(含 10%血清及 1%青链霉素)用于 MDA-MB-231 细胞培养,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温孵箱培养。细胞密度达到 90%以上传代,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 3 次,0.25%胰酶消化 30 s 并用完全培养基终止消化,移液枪轻轻吹打混匀后传至培养瓶。

#### 1.2.2 细胞处理及分组

待传代细胞密度达 80%后换为基础培养基,分别进行二甲基亚砜(DMSO)和衣康酸处理,加入相应试剂处理 24 h,收集细胞进行免疫荧光染色。4%多聚甲醛溶液室温固定细胞 15 min,1×PBS 洗涤细胞 3 次,-20 °C 预冷甲醇透膜处理 15 min,1×PBS 洗涤细胞 3 次,1.5 mol/L HCl 溶液变性处理 1 h 后,1×PBS 洗涤细胞 3 次,1% BSA 室温封闭 1 h。1:400 稀释 5hmC 抗体,4 °C 过夜孵育,1×PBS 洗涤细胞 3 次,1:200 稀释二抗并室温孵育 2 h。1×PBS 洗涤细胞 3 次,DAPI 封片剂封片拍照。

#### 1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

接种细胞后 24 h 向培养液添加不同浓度衣康酸,37 °C 培养 48 h 后消化细胞,取  $1 \times 10^5$  个细胞离心弃上清液,加入 1×PBS 洗涤,按照凋亡检测试剂盒说明进行染色并上机检测。

#### 1.2.4 细胞增殖计数

消化细胞后,用 DMSO 和衣康酸处理细胞,每孔接种  $2 \times 10^5$  个细胞,24 h 后消化细胞,用血球计数板在显微镜下对细胞进行计数。

#### 1.2.5 MTS 检测细胞活性

消化细胞并计数,按每孔  $5 \times 10^4$  的细胞数进行铺板和处理,37 °C 培养 48 h 并加入 20  $\mu$ L MTS 试剂,继续培养 2 h 后,酶标仪检测上清液在 490 nm 的吸光度。

#### 1.2.6 Transwell 实验检测细胞迁移

把细胞均匀接种在 6 孔板,24 h 后基础培养基饥饿细胞过夜并进行相应处理。37 °C 培养 48 h,消化细胞并离心,200  $\mu$ L 无血清 DMEM 重悬细胞。在放置

Transwell 小室的孔板中加入 500  $\mu\text{L}$  完全培养基,小室置于孔板中,将处理好的细胞以  $2 \times 10^4$  接种,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h。取出小室,1  $\times$  PBS 洗涤 3 次,4% 多聚甲醛溶液中固定 30 min,棉签去除上层残留细胞,DAPI 染色后用倒置荧光显微镜拍照计数。

### 1.2.7 细胞总 RNA 抽提及 qPCR

细胞进行相应处理后,用 1  $\times$  PBS 洗涤细胞,加入 1 mL TRIzol 试剂裂解细胞。13 000 r/min 离心 15 min,取透明层并加入等体积异丙醇沉淀 RNA。13 000 r/min 离心 5 min 后,75% 乙醇洗涤沉淀 2 次,弃上清液,风干后加入 ddH<sub>2</sub>O 重悬 RNA 并检测浓度。使用逆转录试剂盒和 qPCR 试剂进行逆转录和 qPCR 检测:GAPDH 正向 3'-GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G-5',反向 3'-ACC ACC CTG TTG CTG TAG CCA A-5';p21 正向 3'-AGG TGG ACC TGG AGA CTC TCA G-5',反向 3'-AGG TGG ACC TGG AGA CTC TCA G-5';PTEN 正向 3'-TGA GTT CCC TCA GCC GTT ACC T-5',反向 3'-GAG GTT TCC TCT GGT CCT GGT A-5'。

### 1.2.8 细胞 DNA 的重亚硫酸钠处理及 qPCR

0.2 mol/L NaOH 溶液在 37  $^{\circ}\text{C}$  处理 1  $\mu\text{g}$  基因组 DNA 8~10 min,然后加入 10 mmol/L 对苯二酚和 3

mol/L 的重亚硫酸钠(pH 5.0)并混匀,50  $^{\circ}\text{C}$  孵育 16 h,DNA 纯化试剂盒纯化所得 DNA,取 2~4  $\mu\text{L}$  DNA 进行 PCR 扩增分析。启动子甲基化引物序列:p21 正向 3'-TTG GGC GCG GAT TCG TC-5',反向 3'-CTA AAC CGC CGA CCC GA-5';PTEN 正向 3'-TTC GTT CGT CGT CGT CGT ATT T-5',反向 3'-GCC GCT TAA CTC TAA ACC GCA ACC G-5'。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS23.0 软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 5 $\mu\text{mol/L}$ 以内的衣康酸对细胞凋亡无明显影响

DMSO、1  $\mu\text{mol/L}$  衣康酸和 5  $\mu\text{mol/L}$  衣康酸处理细胞对细胞凋亡均无明显影响,见图 1。说明 5  $\mu\text{mol/L}$  衣康酸处理细胞安全,后续使用 5  $\mu\text{mol/L}$  衣康酸进行研究。

### 2.2 衣康酸可明显降低乳腺癌细胞 5hmC 水平

5  $\mu\text{mol/L}$  衣康酸处理细胞 24 h 能明显降低细胞 5hmC 水平,5  $\mu\text{mol/L}$  衣康酸荧光强度低于 DMSO,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。

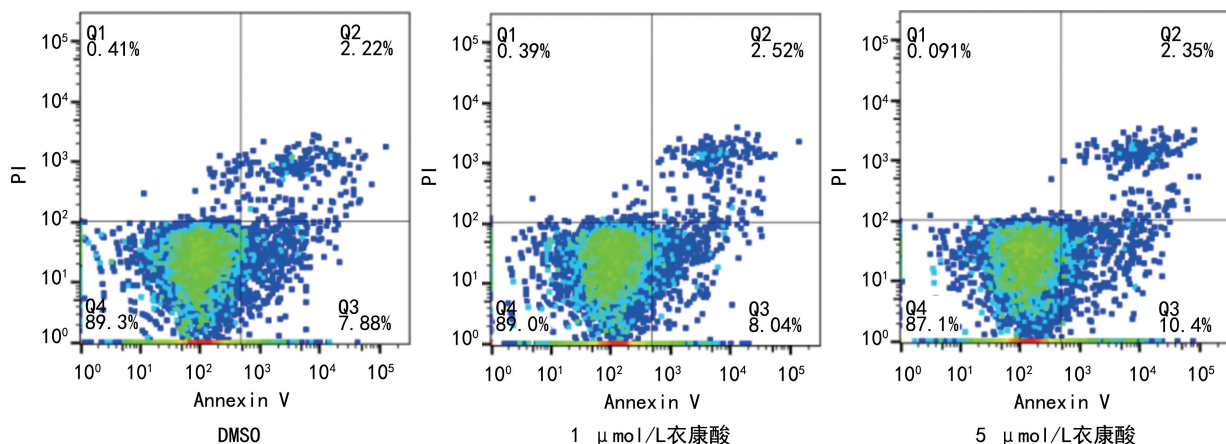
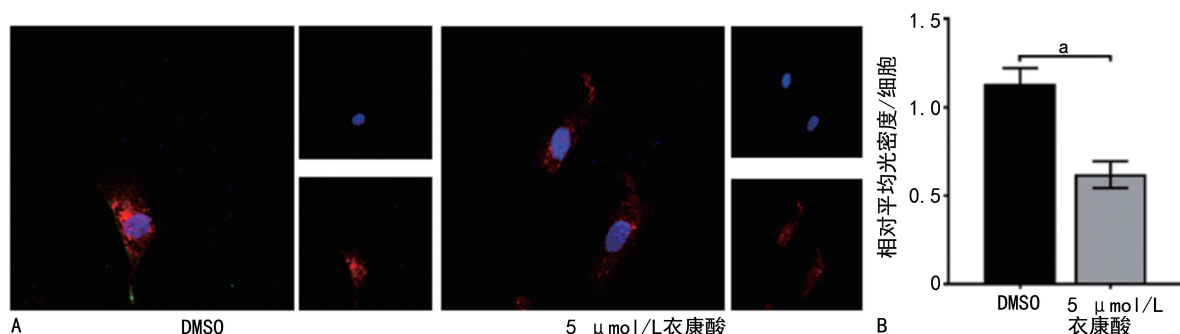


图 1 流式细胞术检测结果



A:免疫荧光检测结果(40 $\times$ );B:荧光强度比较;<sup>a</sup>: $P < 0.05$ 。

图 2 免疫荧光检测结果

### 2.3 5hmC 促进乳腺癌细胞增殖

5  $\mu\text{mol/L}$  衣康酸处理细胞后,细胞数目增加约



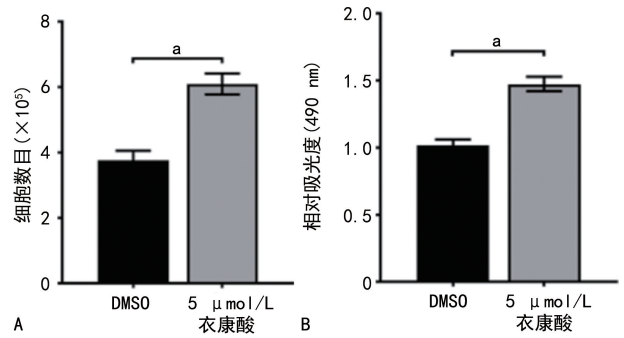
58%，细胞活性增加约 42%，二者均高于 DMSO，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，见图 3。

### 2.4 衣康酸促进乳腺癌细胞迁移

5  $\mu\text{mol/L}$  衣康酸处理细胞 48 h 后，细胞迁移率增加约 55%，高于 DMSO，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，见图 4。

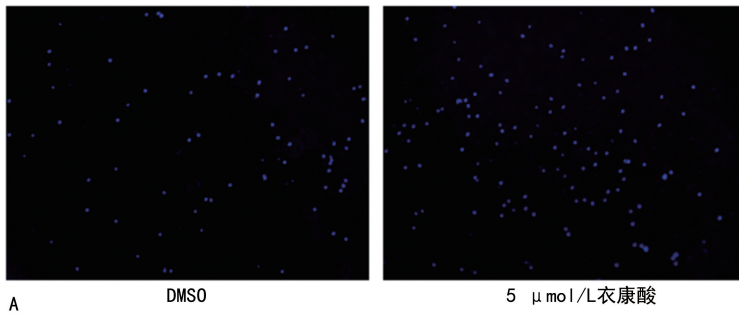
### 2.5 衣康酸抑制乳腺癌细胞 p21 和 PTEN 启动子去甲基化并抑制其表达

5  $\mu\text{mol/L}$  衣康酸明显促进抑癌基因 p21 和 PTEN 启动子甲基化，并抑制 p21 和 PTEN 表达水平，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，见图 5。



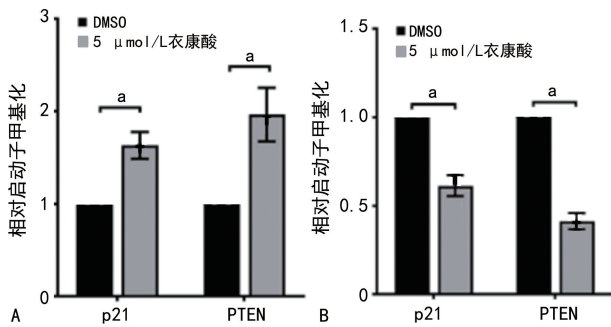
A: 细胞计数比较; B: 细胞活性比较; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ 。

图 3 细胞计数和 MTS 细胞活性检测结果



A: Transwell 实验检测结果(10 $\times$ ); B: 细胞迁移率比较; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ 。

图 4 Transwell 实验检测细胞迁移结果



A: 启动子甲基化 qPCR 结果; B: qPCR 检测结果; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ 。

图 5 qPCR 实验结果

## 3 讨论

DNA 甲基化是一类非常重要的表观遗传学修饰。通过甲基化启动子区 CpG 岛上的胞嘧啶实现抑制目的基因表达的目的，与众多生理和病理过程有关。DNA 甲基转移酶是机体催化 DNA 甲基化的主要酶类，通过将 S-腺苷-L-甲硫氨酸上的甲基基团催化转移至甲基化底物实现对 DNA 的甲基化。与 DNA 甲基转移酶作用相反，TET2 是介导 DNA 去甲基化的主要酶。通过催化甲基化胞嘧啶向羟甲基化胞嘧啶的转化，接着再进行相关转化后可实现 DNA 的去甲基化。已知 DNA 甲基化与乳腺癌发生、发展密切相关，而作为重要的 DNA 去甲基化酶，TET2 在乳腺癌中的作用已有相关报道。最近，CHEN 等<sup>[17]</sup> 研究报道了巨噬细胞的天然代谢产物衣康酸是 TET2 的天然抑制剂，而巨噬细胞又是组成乳腺癌细胞抑制性肿瘤微环境的重要细胞，因此，阐明衣康酸对乳腺

癌细胞的影响和机制，对于后续衣康酸是否影响及如何介导肿瘤微环境对乳腺癌细胞的调控具有重要意义。

为研究衣康酸对乳腺癌细胞的作用，本研究分别检测了衣康酸对乳腺癌细胞增殖和迁移的影响及其机制，并证明衣康酸可以促进乳腺癌细胞的增殖和迁移，其机制与 p21 和 PTEN 启动子甲基化增加和表达降低有关。

p21 和 PTEN 是重要的肿瘤抑制蛋白，其启动子甲基化异常与乳腺癌的发生、发展密切相关。研究指出，PSMD2(一种细胞周期网络中心的蛋白酶体亚基编码基因)直接和 p21 蛋白相互作用并使其蛋白酶体降解，从而促进乳腺癌细胞增殖<sup>[23]</sup>。PTEN 除了与乳腺癌细胞增殖、凋亡有关，还可调控其迁移<sup>[24]</sup>。本研究发现，通过靶向抑制 DNA 去甲基化酶 TET2 能明显促进 p21 和 PTEN 基因的启动子甲基化，从而抑制其表达，使肿瘤细胞增殖和迁移。考虑衣康酸是巨噬细胞的特异性代谢产物，而巨噬细胞是乳腺癌肿瘤微环境的重要细胞，因此，肿瘤微环境中的巨噬细胞可能通过分泌衣康酸促进乳腺癌进展，本研究初步验证了衣康酸通过抑制 TET2 促进肿瘤细胞增殖和迁移的现象，而探寻其中可能涉及的信号通路则是后继研究的内容。

综上所述，DNA 去甲基化酶 TET2 的抑制剂衣康酸促进肿瘤细胞的增殖和迁移，其机制是通过抑制抑癌基因 p21 和 PTEN 启动子去甲基化和表达而实现，可作为乳腺癌肿瘤微环境促进乳腺癌进展的潜在

治疗靶点。

## 参考文献

- [1] 李宜臻,郑怡,邓玉皎,等. 1990—2019 年中国女性乳腺癌疾病负担及危险因素研究[J]. 中国循证医学杂志,2021,21(8):876-881.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics,2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021,71(1):7-33.
- [3] 方燕梅,王寅欢,熊丹,等. 中国女性乳腺癌 2013—2021 年死亡变化趋势[J]. 重庆医学,2024,53(15):2343-2348.
- [4] WAKS A G, WINER E P. Breast cancer treatment:a review[J]. JAMA,2019,321(3):288-300.
- [5] ZHANG C, ZHOU W, TAN Y, et al. 5-Hydroxymethylcytosines in circulating cell-free DNA reveal a diagnostic biomarker for glioma[J]. Heliyon, 2022,8(10):e11022.
- [6] YANG Y, ZENG C, YANG K, et al. Genome-wide analysis reflects novel 5-hydroxymethylcytosines implicated in diabetic nephropathy and the biomarker potential[J]. Extracell Vesicles Circ Nucl Acids,2022,3(1):49-60.
- [7] GAO L, ZHANG Z, CUI X L, et al. Analysis of genome-wide 5-hydroxymethylation of blood samples stored in different anticoagulants: opportunities for the expansion of clinical resources for epigenetic research[J]. Epigenetics, 2023,18(1):2271692.
- [8] CHIU B C, ZHANG Z, YOU Q, et al. Prognostic implications of 5-hydroxymethylcytosines from circulating cell-free DNA in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Blood Adv,2019,3(19):2790-2799.
- [9] GARCIA-MARTINEZ L, ZHANG Y, NAKATA Y, et al. Epigenetic mechanisms in breast cancer therapy and resistance[J]. Nat Commun,2021,12(1):1786.
- [10] SHUKLA S, PENTA D, MONDAL P, et al. Epigenetics of breast cancer: clinical status of Epi-drugs and phytochemicals[J]. Adv Exp Med Biol,2019,1152:293-310.
- [11] O'BRIEN K M, SANDLER D P, XU Z, et al. Vitamin D, DNA methylation, and breast cancer[J]. Breast Cancer Res,2018,20(1):70.
- [12] LI D, ZHAO W, ZHANG X, et al. NEFM DNA methylation correlates with immune infiltration and survival in breast cancer[J]. Clin Epigenetics,2021,13(1):112.
- [13] WONG K K. DNMT1:a key drug target in triple-negative breast cancer[J]. Semin Cancer Biol,2021,72:198-213.
- [14] JEONG J J, GU X, NIE J, et al. Cytokine-regulated phosphorylation and activation of TET2 by JAK2 in hematopoiesis[J]. Cancer Discov, 2019,9(6):778-795.
- [15] SUN S J, AI Y J, DUAN K L, et al. TET2 deficiency sensitizes tumor cells to statins by reducing HMGCS1 expression[J]. Oncogene, 2022,41(50):5385-5396.
- [16] DASH B, HOGAN P G. TET2, tumor control, and CAR T cell hyperproliferation[J]. Trends Cancer,2023,9(7):521-523.
- [17] CHEN L L, MORCELLE C, CHENG Z L, et al. Itaconate inhibits TET DNA dioxygenases to dampen inflammatory responses[J]. Nat Cell Biol,2022,24(3):353-363.
- [18] LI Z, ZHENG W, KONG W, et al. Itaconate: a potent macrophage immunomodulator[J]. Inflammation,2023,46(4):1177-1191.
- [19] NALIO RAMOS R, MISSOLO-KOUSSOU Y, GERBER-FERDER Y, et al. Tissue-resident FOLR2<sup>+</sup> macrophages associate with CD8<sup>+</sup> T cell infiltration in human breast cancer[J]. Cell,2022,185(7):1189-1207.
- [20] DANENBERG E, BARDWELL H, ZANOT-EL-LI V R T, et al. Breast tumor microenvironment structures are associated with genomic features and clinical outcome[J]. Nat Genet,2022,54(5):660-669.
- [21] FAN Y, XIE G, WANG Z, et al. PTEN promoter methylation predicts 10-year prognosis in hormone receptor-positive early breast cancer patients who received adjuvant tamoxifen endocrine therapy[J]. Breast Cancer Res Treat, 2022,192(1):33-42.
- [22] LI Y, HUANG J, ZENG B, et al. PSMD2 regulates breast cancer cell proliferation and cell cycle progression by modulating p21 and p27 proteasomal degradation[J]. Cancer Lett, 2018, 430:109-122.
- [23] TRAVIS G, MCGOWAN E M, SIMPSON A M, et al. PTEN, PTENP1, microRNAs, and ceRNA networks: precision targeting in cancer therapeutics[J]. Cancers,2023,15(20):4954.
- [24] ZHANG J, ZHANG Y, LIN X, et al. The effects of the tumor suppressor gene PTEN on the proliferation and apoptosis of breast cancer cells via AKT phosphorylation[J]. Transl Cancer Res, 2023,12(7):1863-1872.