

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00588

5-氮-2'-脱氧胞苷对人肺癌 A549 细胞株增殖和凋亡的影响

5-aza-dC influences proliferation and apoptosis of human lung cancer cell line A549

尹慧君^{1△}, 顾红军^{1△}, 徐岷², 武宁¹, 李强^{1*}

1. 第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433

2. 江苏大学附属医院消化内科, 镇江 212001

[摘要] **目的:**通过体外实验观察 DNA 甲基化转移酶抑制剂 5-氮-2'脱氧胞苷(5-aza-2'deoxyctidine, 5-aza-dC)对人肺腺癌细胞增殖、凋亡及相关基因表达的影响,初步探讨其在治疗肺部肿瘤的作用及可能机制。**方法:**分别以 0.5、2.0、10.0 μmol/L 的 5-aza-dC 处理人肺腺癌 A549 细胞,用 MTT 法测定药物干预 72 h 后的光密度值,计算抑制率,流式细胞仪检测 5-aza-dC 对肺癌细胞株细胞周期及凋亡的影响,实时定量 PCR 检测相关基因 p21、Cyclin D1、Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达。**结果:**5-aza-dC 能抑制人肺腺癌细胞株 A549 的增殖,且呈浓度依赖性;G₀/G₁ 期细胞比例下降,S 期及 G₂/M 期细胞比例明显高于对照组,出现 G₂/M 细胞周期阻滞;同时,5-aza-dC 能诱导 A549 细胞凋亡;与对照组比较,各药物干预组 p21 mRNA 表达升高(均 $P < 0.01$),而 Cyclin D1 mRNA 表达无明显变化($P > 0.05$);与对照组比较,各药物干预组 Bax、Bcl-2 mRNA 表达均明显降低(均 $P < 0.01$),且 Bax/Bcl-2 增高。**结论:**5-aza-dC 能抑制肺癌细胞株的增殖、引起 G₂/M 细胞周期阻滞,并促进凋亡,其机制可能与 p21 基因的上调及 Bax/Bcl-2 比值改变有关。

[关键词] DNA 甲基化;5-氮-2'-脱氧胞苷;肺肿瘤

[中图分类号] R 734.2

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2009)05-0588-03

近年来,肺癌的发病率及病死率都呈明显的上升趋势。在过去的研究中,大多数学者认为表观遗传学(epigenetics)发生改变是肿瘤发生的重要机制,表观遗传现象包括 DNA 甲基化及组蛋白去乙酰化等^[1-3]。DNA 甲基化最重要的调控因素是 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)。在哺乳动物细胞中,已经发现 4 种 DNMT:DNMT1、DNMT2、DNMT3a 和 DNMT3b。DNMT1 主要起维持甲基化酶的作用,其在 S 期不同阶段的调控作用是 DNA 复制异常的重要因素之一,也是恶性肿瘤发生的重要环节^[4]。DNA 甲基化转移酶抑制剂(DNA methyltransferases inhibitors, DNMTi)被证明对多种肿瘤具有治疗作用。5-氮-2'-脱氧胞苷(5-aza-dC)是一种甲基化转移酶抑制剂,它可以诱导细胞分化,促进凋亡,抑制细胞增殖。目前对于这类药物在肺癌治疗方面的研究尚少,相关抑制肿瘤的详细机制仍未明确。本研究通过 5-aza-dC 干预肺癌细胞株 A549,观察其对细胞增殖、细胞周期及凋亡的影响,同时检测细胞周期及凋亡相关基因的表达,初步探讨 5-aza-dC 在治疗肺癌方面的作用及可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和 5-aza-dC 干预 人肺腺癌 A549 细胞株购自中国科学院上海生命科学院细胞所。胎牛血清、双抗及 RPMI 1640 培养液购自 Hyclone 公司。A549 细胞常规培养

于含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 ng/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,于 37℃、5%CO₂ 的湿润无菌环境中培养。实验分为 4 组:对照组、5-aza-dC 0.5 μmol/L 组、5-aza-dC 2.0 μmol/L 组和 5-aza-dC 10.0 μmol/L 组。在细胞接种的 72 h 中,各组每 24 h 更换含有 5-aza-dC(Sigma 公司)的培养液,对照组的 DMEM 培养液中加入等量的二甲基亚砷溶剂(DMSO,上海增建生物公司)。

1.2 MTT 法测定细胞存活率 收集对数生长期的 A549 细胞,按 5×10³个/孔接种于 96 孔培养板,每组设 6 个复孔。5-aza-dC 干预 72 h 后,每孔加入 10 μl 浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液(Sigma 公司),再继续培养 4 h,小心吸弃孔内培养液,每孔加 150 μl DMSO,避光轻微震荡 5 min 使结晶充分溶解,酶联免疫检测仪测定光密度(D)值,检测波长 570 nm。

1.3 流式细胞术检测细胞周期 收集处于对数生长期的 A549 细胞,按 3×10⁵个/孔接种于 6 孔培养板,每组设 3 个复孔。5-aza-dC 干预 72 h 后,收集各组细胞,预冷 PBS 洗涤 2 次,加入预冷 70%乙醇固定,4℃过夜。加入浓度为 100 μg/ml 的 RNase 10 μl,浓度为 50 μg/ml 的碘化丙啶(PI,Sigma 公司)缓冲液 300 μl,4℃避光孵育 30 min,上流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)检测细胞周期。

1.4 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡 收集处于对数生长期的 A549 细胞,按 3×10⁵个/孔接种于 6 孔培养板,每组设 3 个复孔。常规培养,5-aza-dC 干预 72 h 后,收集细胞,

[收稿日期] 2008-10-29 **[接受日期]** 2009-02-10

[作者简介] 尹慧君,第二军医大学临床医学专业七年制 2002 级学员. E-mail:yhj8401@163.com;顾红军,博士生. E-mail:guspider@163.com
△共同第一作者(Co-first authors). * 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81873231, E-mail:liqressh@yahoo.com.cn

PBS 洗涤后制成细胞悬液,加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l 20 μ g/ml 的 PI(Annexin V-FITC 流式细胞凋亡检测试剂盒,购自南京凯基生物科技发展有限公司),常温避光孵育 30 min 后,流式细胞仪检测。

1.5 Real-time PCR 检测 5-aza-dC 对相关基因 mRNA 表达水平的影响 5-aza-dC 干预 72 h 后,TRIzol(美国 Invitrogen 公司)法提取各组细胞的总 RNA。将抽取的 RNA 溶于去 RNA 酶水,紫外分光光度法检测 RNA 浓度和纯度。取 500 ng RNA 按试剂盒说明书反转录成 cDNA 后,以 cDNA 产物为模板,用 Real-time PCR 法检测 p21、Cyclin D1、Bax 及 Bcl-2 mRNA 表达情况,以 GAPDH 为内参照。引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。PCR 仪为 Applied Biosystems 7500 型(美国 Applied Biosystems 公司)。反转录试剂盒及 SYBR real-time 试剂盒均购自 TaKaRa 公司。p21 引物:上游 5'-TTA GCA GCG GAA CAA GGA GT-3',下游 5'-AGA AAC GGG AAC CAG GAC AC-3';产物长度 252 bp,退火温度 58 $^{\circ}$ C。Cyclin D1 引物:上游 5'-GAA CAC GGC TCA CGC TTA CC-3',下游 5'-GCC CAG ACC CTC AGA CTT GC-3';产物长度 204 bp,退火温度 61 $^{\circ}$ C。Bax 引物:上游 5'-TGT CTG TCT TGT CCC CTT CC -3',下游 5'-ACC TTG AGC ACC AGT TTG CT-3';产物长度 301 bp,退火温度 60 $^{\circ}$ C。Bcl-2 引物:上游 5'-TCC ATG TCT TTG AAC CA-3',下游 5'-CTC CAC CAG TGT TCC CAT CT-3';产物长度 203 bp,退火温度 60 $^{\circ}$ C。GAPDH 引物:上游 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3',下游 5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GT-3';产物长度 142 bp,退火温度 60 $^{\circ}$ C。Real-time PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。实验重复 3 次。以 Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 分析结果,目的基因的相对表达量(RQ) = $2^{-\Delta\Delta CT}$,以对照组目的基因 mRNA 的均数为 1,计算其他各组 mRNA 的相对表达量。

1.6 统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理,多组比较采用单因素方差分析,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 5-aza-dC 对 A549 细胞增殖的影响 5-aza-dC 10.0 μ mol/L 组的细胞存活率[(55.68 \pm 7.77)%]低于对照组(100%)和 5-aza-dC 0.5 μ mol/L 组[(96.08 \pm 5.19)%]及 2.0 μ mol/L 组[(93.77 \pm 3.42)%], $P < 0.01$,5-aza-dC 0.5 μ mol/L 组与 2.0 μ mol/L 组两组间比较无统计学差异,表明高浓度 5-aza-dC 对 A549 细胞增殖有明显抑制作用。

2.2 5-aza-dC 对 A549 细胞周期的影响 5-aza-dC 干预 A549 细胞 72 h 后检测细胞周期,5-aza-dC 0.5、2.0 及 10.0 μ mol/L 组 G_0/G_1 期比例明显低于对照组 ($P < 0.01$); G_2/M 期比例明显高于对照组 ($P < 0.01$);S 期比例高于对照组 ($P < 0.05$);5-aza-dC 10.0 μ mol/L 组 G_2/M 期比例明显高于其他各组(表 1),说明细胞周期阻滞于 G_2/M 期。

2.3 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡结果 经过 0.5、2.0 及 10.0 μ mol/L 5-aza-dC 处理 72 h 后,A549 细胞凋亡率增

高且呈浓度依赖性,与对照组相比具有统计学差异 ($P < 0.01$),但 0.5 μ mol/L 与 2.0 μ mol/L 5-aza-dC 处理组相比,凋亡率无统计学差异 ($P > 0.05$)。

表 1 5-aza-dC 干预 A549 细胞 72 h 后对细胞周期细胞比例的影响

分组	$(n=6, \bar{x} \pm s, \%)$		
	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	70.65 \pm 1.31	22.45 \pm 0.57	6.90 \pm 1.10
5-aza-dC $C_{IB}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			
0.5	52.22 \pm 1.79**	29.03 \pm 0.76*	18.75 \pm 1.11**
2.0	52.87 \pm 2.14**	26.61 \pm 1.43*	20.53 \pm 2.01**
10.0	30.34 \pm 3.68**	28.86 \pm 3.69*	40.79 \pm 1.87**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与对照组比较

2.4 5-aza-dC 对 p21、Cyclin D1、Bax 及 Bcl-2 基因表达的影响 5-aza-dC 干预 A549 细胞 72 h 后,与对照组比较,p21 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$);而 Cyclin D1 mRNA 表达则略降低,但无统计学差异。与对照组比较,Bax 及 Bcl-2 mRNA 表达各组均显著降低 ($P < 0.01$,表 2)。

3 讨论

近年的研究发现,表观遗传学是通过 DNA 自身化学修饰方式从转录水平影响基因表达,但不存在 DNA 序列变更的遗传改变。表观遗传修饰包括组蛋白乙酰化修饰、DNA 甲基化等。现已发现在某些肿瘤中原本未发生甲基化的一些抑癌基因部分或全部发生了甲基化,从而导致抑癌基因在 mRNA 水平及蛋白水平的表达缺失或减少。DNA 甲基化是由 DNA 甲基转移酶催化完成的,有人认为 5-aza-dC 和胞苷结构类似,能与甲基转移酶共价结合,降低该酶生物活性而导致低甲基化的 DNA 合成,从而消除肿瘤中抑癌基因的异常甲基化状态,打破抑癌基因的沉默^[5-7]。

细胞周期是由细胞周期素(cyclin)、细胞周期依赖性激酶(CDK)等序贯性激活和失活所调控。p21 是一种周期依赖激酶的抑制剂,在 DNA 损伤时由 p53 诱导产生,可以与 CDK 结合使之失活,导致 Rb、p107、p130 的低磷酸化而影响细胞周期。许多实验均表明 5-aza-dC 可以再活化因甲基化失活的 p21 基因表达,从而抑制肿瘤细胞生长,这种改变是可遗传的^[1]。本研究结果发现,5-aza-dC 可抑制肺癌 A549 细胞株的增殖,出现 G_2/M 细胞周期阻滞并导致细胞生长阻滞,与此同时,与细胞周期密切相关的 p21 基因也明显上调。与文献中报道的 5-aza-dC 可能通过激活 p53/p21 途径以抑制肿瘤细胞增殖结果一致^[8]。

细胞凋亡是不同于细胞坏死的另一种细胞死亡形式,其过程受一系列相关基因的调控,其中 Bcl-2 家族在凋亡调控基因中处于重要地位。Bcl-2 蛋白的主要生理功能是抑制细胞凋亡、延长细胞寿命;Bax 蛋白是 Bcl-2 的同源蛋白,具有促进细胞凋亡的作用,并抑制 Bcl-2 的效应。研究发现^[9],Bcl-2/Bax 比值的高低可能决定细胞在受到凋亡信号刺激后是趋向于存活还是凋亡。若 Bax 高表达,Bax/Bcl-2 比值高,

细胞凋亡率随之增高;反之,Bcl-2 高表达,Bax/Bcl-2 比值相对较低,细胞凋亡率有所下降。本研究发现,5-aza-dC干预细胞后 Bax 及 Bcl-2 基因的 mRNA 表达均降低,但 Bax/Bcl-2 比值增高,提示细胞凋亡增加,与流式细胞术检测的结果一致。这一结果提示,5-aza-dC 可引起人肺腺癌 A549 细胞内

的凋亡调控系统失衡,从而促进细胞凋亡。5-aza-dC 作用于 A549 细胞产生凋亡的分子调节机制可能是:不通过 Bax 与 Bcl-2 形成同源的蛋白二聚体来发挥促凋亡作用;虽然 Bax 与 Bcl-2 总量均降低,但 Bax/Bcl-2 的比值仍较高,从而使细胞凋亡率增高。

表 2 5-aza-dC 对各基因 mRNA 表达的影响

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

分组	p21 Ct 值	p21 RQ 值	Cyclin D1 Ct 值	Cyclin D1 RQ 值	Bax Ct 值	Bax RQ 值	Bcl-2 Ct 值	Bcl-2 RQ 值
对照组	27.134± 0.066	1.000± 0.034	29.022± 0.037	1.000± 0.037	29.931± 0.159	1.002± 0.099	29.133± 0.018	0.999± 0.001
5-aza-dC $c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$								
0.5	21.308± 0.039	6.775± 0.128**	25.173± 0.204	1.178± 0.219	28.327± 0.358	0.367± 0.074**	27.855± 0.048	0.290± 0.016**
2.0	20.866± 0.022	8.382± 0.431**	25.859± 0.378	0.986± 0.221	28.629± 0.283	0.272± 0.062**	29.858± 0.119	0.017± 0.001**
10.0	19.974± 0.063	27.054± 0.597**	25.780± 0.376	1.814± 0.430	29.567± 0.186	0.245± 0.037**	32.599± 0.060	0.003± 0.000**

** P<0.01 与对照组比较

5-aza-dC 与传统的细胞毒性药物治疗机制完全不同,它通过解除 DNA 甲基化状态在体内发挥较大的抗肿瘤作用。由于此类药物是通过降低基因异常高甲基化而重新激活错误关闭的基因,因此副作用相对小,目前这类药物临床上已用于白血病的治疗^[10-11],但在其他肿瘤的治疗方面仍受到许多限制^[12],如何开发其他 DNA 甲基化特异性调节物用于逆转癌细胞的恶性表型是有待深入研究的问题。

[参考文献]

[1] Momparler R L. Cancer epigenetics[J]. *Oncogene*, 2003, 22: 6479-6483.
 [2] Esteller M, Fraga M F, Paz M F, Campo E, Colomer D, Novo F J, et al. Cancer epigenetics and methylation[J]. *Science*, 2002, 297:1807-1808.
 [3] Miremadi A, Oestergaard M Z, Pharoah P D, Caldas C. Cancer genetics of epigenetic genes[J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16: R28-R49.
 [4] Arai E, Kanai Y, Ushijima S, Fujimoto H, Mukai K, Hirohashi S. Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding nontumorous renal tissues[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119:288-296.
 [5] Lemaire M, Chabot G G, Raynal N J, Momparler L F, Hurtubise A, Bernstein M L, et al. Importance of dose-schedule of 5-aza-2'-deoxycytidine for epigenetic therapy of cancer[J]. *BMC Cancer*, 2008, 8:128.

[6] Daskalakis M, Nguyen T T, Nguyen C, Guldberg P, Köhler G, Wijermans P, et al. Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment[J]. *Blood*, 2002, 100:2957-2964.
 [7] Venturelli S, Armeanu S, Pathil A, Hsieh C J, Weiss T S, Vonthien R, et al. Epigenetic combination therapy as a tumor-selective treatment approach for hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2007, 109:2132-2141.
 [8] Zhu W G, Hileman T, Ke Y, Wang P, Lu S, Duan W, et al. 5-aza-2'-deoxycytidine activates the p53/p21Waf1/Cip1 pathway to inhibit cell proliferation[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:15161-15166.
 [9] Nakamura M, Raghupathi R, Merry D E, Scherbel U, Saatman K E, McIntosh T K. Overexpression of Bcl-2 is neuroprotective after experimental brain injury in transgenic mice[J]. *J Comp Neurol*, 1999, 412:681-692.
 [10] Claus R, Lubbert M. Epigenetic targets in hematopoietic malignancies[J]. *Oncogene*, 2003, 22:6489-6496.
 [11] Rosenfeld C S. Clinical development of decitabine as a prototype for an epigenetic drug program[J]. *Semin Oncol*, 2005, 32:465-472.
 [12] Santini V, Gozzini A, Ferrari G. Histone deacetylase inhibitors: molecular and biological activity as a premise to clinical application[J]. *Curr Drug Metab*, 2007, 8:383-393.

[本文编辑] 尹 茶