

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00256

## 5-杂氮-2'-脱氧胞苷对前列腺癌 PC3 细胞系生长以及抑癌基因 GSTP1、RASSF1A 转录的影响

翁文浩<sup>1</sup>, 郑军华<sup>2</sup>, 冷俊<sup>1</sup>, 李智<sup>1\*</sup>, 李晶华<sup>1</sup>

1. 同济大学附属第十人民医院检验科, 上海 200072

2. 同济大学附属第十人民医院泌尿外科, 上海 200072

**[摘要]** **目的:**观察 DNA 去甲基化药物 5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-aza-CdR)对前列腺癌细胞株 PC3 抑癌基因 GSTP1 和 RASSF1A 转录改变以及细胞增殖活性的影响。**方法:**用不同浓度 5-aza-CdR(2、5、10  $\mu\text{mol/L}$ )处理前列腺癌细胞株 PC3,利用甲基化特异性 PCR (MSP)法检测用药前 PC3 细胞株 GSTP1、RASSF1A 启动子甲基化状态;采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测用药过程中 GSTP1 和 RASSF1A mRNA 转录改变;用 MTT 法和流式细胞术检测用药前后 PC3 肿瘤细胞增殖活性改变。**结果:**GSTP1、RASSF1A 启动子区域出现甲基化现象。与对照组相比,药物组培养 24 h 后 GSTP1 和 RASSF1A mRNA 表达未发生明显改变;培养 48 h 后 5、10  $\mu\text{mol/L}$  药物组 GSTP1 和 RASSF1A mRNA 表达出现上调;72 h 后各浓度药物组均检测出两基因 mRNA 表达升高( $P<0.05$ )。药物组培养 24 和 48 h 未出现明显的细胞增殖抑制现象和细胞周期改变;培养 72 h 后,药物组细胞增殖抑制显著( $P<0.05$ ),细胞周期改变明显( $P<0.05$ ),阻滞于  $G_0/G_1$  期。**结论:**GSTP1 和 RASSF1A 基因在 PC3 前列腺癌细胞系中的失表达可能与其启动子 CpG 岛高甲基化有关;5-aza-CdR 能在一定程度上抑制 PC3 细胞增殖,干扰细胞周期,提高 GSTP1 和 RASSF1A 的转录水平。

**[关键词]** 5-杂氮-2'-脱氧胞苷;GSTP1 基因;RASSF1A 基因;DNA 甲基化;前列腺肿瘤;细胞增殖;细胞凋亡

**[中图分类号]** R 737.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)03-0256-04

## Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on proliferation of prostate cancer cell line PC3 and transcriptional regulation of tumor suppressor gene GSTP1 and RASSF1A

WENG Wen-hao<sup>1</sup>, ZHENG Jun-hua<sup>2</sup>, LENG Jun<sup>1</sup>, LI Zhi<sup>1\*</sup>, LI Jing-hua<sup>1</sup>

1. Department of Clinical Laboratory, the 10<sup>th</sup> People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

2. Department of Urology Surgery, the 10<sup>th</sup> People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072

**[ABSTRACT]** **Objective:**To observe the effects of 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-CdR) on the proliferation and transcription of tumor suppressor gene GSTP1 and RASSF1A in prostate cancer cell line PC3. **Methods:** The status of 5' CpG island methylation of RASSF1A and GSTP1 genes in PC3 was analyzed by methylation specific PCR (MSP) before treatment with 5-aza-CdR. RASSF1A and GSTP1 mRNA were quantified by real-time PCR during the demethylation process by 5-aza-CdR. MTT assay and flow cytometry were used to examine the proliferative activity of PC3 cells before and after 5-aza-CdR treatment. **Results:** The 5' CpG island methylation of RASSF1A and GSTP1 genes were detected in human prostate cancer cell line PC3. Compared with control group, RASSF1A and GSTP1 mRNA expression had no significant change 24 h after culture with 5-aza-CdR; their expression was up-regulated 48 h after cultured with 5-aza-CdR, with significant difference found between 5  $\mu\text{mol/L}$  and 10  $\mu\text{mol/L}$  5-aza-CdR groups. Compared with control group, the expression of RASSF1A and GSTP1 mRNA was significantly increased 72 h after cultured with all concentrations of 5-aza-CdR. MTT assay and cell cycle examination indicated that exposure to 5-aza-CdR for 24 h and 48 h resulted in no obvious growth inhibition and cell cycle change; exposure to 5-aza-CdR for 72 h induced significant growth inhibition ( $P<0.05$ ) and cell cycle change ( $P<0.05$ ); and cells were arrested at  $G_0/G_1$  phase. **Conclusion:** The 5' CpG island methylation of RASSF1A and GSTP1 genes is probably responsible for RASSF1A and GSTP1 silencing in PC3 cells. 5-aza-CdR can inhibit the proliferation of PC3 cells, disturb the cell cycle, and elevate transcription of GSTP1 and RASSF1A.

**[KEY WORDS]** 5-aza-2'-deoxycytidine; GSTP1 gene; RASSF1A gene; DNA methylation; prostatic neoplasms; cell proliferation; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(3):256-259]

**[收稿日期]** 2008-06-23 **[接受日期]** 2008-07-29

**[基金项目]** 上海市卫生局科研课题[200646(85)]. Supported by medical research project of Shanghai Municipal Health Bureau(200646[85]).

**[作者简介]** 翁文浩, 硕士生. E-mail: wengcatcat@163.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-66303254, E-mail: lizhsh2001@yahoo.com.cn

前列腺癌的发生与其他恶性肿瘤一样是多基因、多阶段变异累积形成的病理过程。近年来在前列腺癌中发现多个由于 DNA 过甲基化造成失活的抑癌基因。谷胱甘肽 S-转移酶 P1(GSTP1)基因和 RAS 相关区域家族 1 基因(RASSF1A)启动子区甲基化改变在前列腺癌中最为频繁。Yamanaka 等<sup>[1]</sup>报道 88%的前列腺癌(109 例)和 30%的前列腺上皮瘤(20 例)样本中 GSTP1 发生甲基化改变,而在正常前列腺和前列腺增生组织(BPH)中很少发生。Kawamoto 等<sup>[2]</sup>在前列腺癌组织中检出 RASSF1A 基因甲基化率高达 74%,并且甲基化水平与临床分期和肿瘤分级显著相关。

胞苷类似物 5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-aza-CdR)是目前表观遗传学研究中用最广泛的一类 DNA 去甲基化药物,关于该药对 PC3 前列腺癌细胞株中抑癌基因 GSTP1、RASSF1A 可逆作用的研究报道较少。本研究运用甲基化特异性 PCR 法(MSP)检测前列腺癌细胞株 PC3 抑癌基因 GSTP1 和 RASSF1A 启动子甲基化状态,使用 5-aza-CdR 对前列腺癌细胞株 PC3 进行处理,观察用药前后 GSTP1、RASSF1A 转录改变及 PC3 细胞生物学特性改变,探讨 5-aza-CdR 对前列腺肿瘤细胞 PC3 抑癌基因 GSTP1 和 RASSF1A 表达及细胞增殖的影响,从而为前列腺的靶向治疗提供一定依据。

## 1 材料和方法

1.1 细胞培养 PC3 细胞株由同济大学医学院组织胚胎学教研室惠赠。细胞贴壁生长于 RPMI 1640 培养液(美国 Gibco 公司)中,内含 10%小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);青、链霉素 100 U/ml,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、100%饱和湿度的孵箱内培养。每 3~4 d 用 0.25%胰酶消化传代 1 次。

1.2 MSP 检测 取对数生长期的 PC3 细胞,用 0.25%胰酶消化处理,按 Promega Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒说明抽提 DNA。MSP 测定按 CpGenome<sup>TM</sup>DNA modification Kit(Chemicon 公司)说明书进行。GSTP1 的甲基化引物<sup>[3]</sup>:5'-TTC GGG GTG TAG CGG TCG TC-3'(上游),5'-GCC CAA TAC TAA ATC ACG ACG-3'(下游),扩增产物 91 bp;未甲基化引物:5'-GAT GTT TGG GGT GTA GTG GTT GTT-3'(上游),5'-CCA CCC CAA TAC TAA ATC ACA ACA-3'(下游),扩增产物 97 bp。RASSF1A 的甲基化引物<sup>[4]</sup>:5'-GTG TTA ACG CGT TGC GTA TC-3'(上游),5'-AAC CCC GCG AAC TAA AAA CGA-5'(下游),扩增产物 93 bp;未甲基化

引物:5'-TTT GGT TGG AGT GTG TTA ATG TG-5'(上游),5'-CAA ACC CCA CAA ACT AAA AAC AA-3'(下游),扩增产物 105 bp。反应条件:预变性 94℃ 3 min;94℃ 30 s,59℃(RASSF1A 为 55℃) 30 s,72℃ 1 min,共 35 个循环;最后 72℃延伸 5 min。取 5 μl 扩增产物于 2.5%琼脂糖凝胶电泳,在凝胶图像成像仪下观察结果。

1.3 药物作用观察 新鲜传代的 PC3 细胞株,用 RMPI 1640 调整细胞密度至  $5 \times 10^5$ /ml,加入细胞培养板内。实验组分别加入终浓度为 2.5、5、10 μmol/L 的 5-aza-CdR(Sigma 公司)混合培养液。对照组加入等量 PBS。将培养板放入 CO<sub>2</sub> 孵箱,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 下继续培养,于 24、48 和 72 h 各时间点收集细胞,用于各项检测。

1.3.1 实时定量 RT-PCR 检测 用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)抽提细胞总 RNA。按 TaKaRa 公司的 SYBR PrimeScript RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录和实时荧光 PCR。(1)逆转录反应:30 μl 反应体系含 5×PrimeScript<sup>TM</sup>缓冲液 6 μl、1.5 μl PrimeScript<sup>TM</sup> 逆转录酶混合液、1.5 μl Oligo(dT)引物(50 μmol/L)、1.5 μl 随机引物(100 μmol/L)、1.5 μl RNA 模板、18 μl 去 RNase 蒸馏水;逆转录反应 37℃ 15 min,逆转录酶失活 85℃ 5 min。(2)实时荧光 PCR:引物设计通过 Primer Premier 5.0 软件完成。GSTP1 (NM\_000852):5'-AAC TAT GAG GCG GGC AAG G-3'(上游),5'-TGG TCT CCC ACA ATG AAG GTC-3'(下游)。RASSF1A (NM\_007182):5'-GCA CTT CCT TTT ACC TGC CCA A-3'(上游),5'-ATC CAC CAC CAA GAA CTT TCG C-3'(下游)。β-actin (NM\_001101):5'-GTG AAG GTG ACA GCA GTC GGT T-3'(上游),5'-AGA AGT GGG GTG GCT TTT AGG A-3'(下游)。20 μl 反应体系含 10 μl SYBR Premix EX Taq<sup>TM</sup>(2×)、1 μl 引物(4 μmol/L)、2 μl cDNA、7 μl 重蒸水。反应条件为 95℃ 10 s 预变性,95℃ 5 s,55℃ 15 s,72℃ 10 s 共 40 个循环。扩增完毕后进行熔解曲线分析。全自动荧光定量 PCR 仪为 Roche 公司产品。相对定量结果用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示实验组目的基因相对对照组原始模板浓度的倍数差异。

1.3.2 MTT 法测定细胞存活率 在 24、48 和 72 h 各时间点分别取培养的 PC3 细胞进行检测。检测时,加入 5 mg/ml 的 MTT (Sigma 公司)20 μl/孔,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 4 h,弃原培养液,加入 DMSO 150 μl/孔,置振荡器上振荡 10 min,立即于酶标仪在 490 nm 波长处读取各孔光密度(D)值。细胞存活率=实验组平均 D 值/对照组平均 D

值,细胞抑制率=(1-细胞存活率)×100%。

1.3.3 细胞周期检测 于24、48和72 h各时间点回收细胞,制成单细胞悬液,碘化丙啶(PI)染色,用Becton-Dickinson公司的FACS Calibur型流式细胞仪检测,计数15 000个细胞,用Modifit LT for Mac V 3.0软件统计细胞周期各时相的百分率。按下列公式计算增殖指数(proliferation index, PI):PI=(S+G<sub>2</sub>/M)/(G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>+S+G<sub>2</sub>/M)。

1.4 统计学处理 应用SPSS 12.0软件包对实验数据进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

## 2 结果

2.1 PC3细胞株 RASSF1A 和 GSTP1 基因启动子区甲基化状态分析 用 RASSF1A 和 GSTP1 甲基化特异性引物扩增出现预期条带,扩增产物大小分别为93、91 bp,而未甲基化引物未扩增出相应条带(图1)。

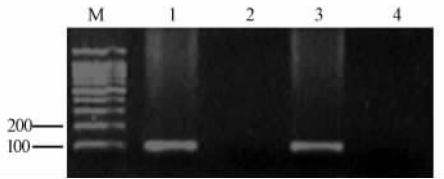


图1 PC3细胞株 RASSF1A 和 GSTP1 基因启动子区甲基化状态分析

Fig 1 Status of 5' CpG island methylation of RASSF1A and GSTP1 genes in PC3 cell line

M: Marker; 1: Presence of methylated RASSF1A gene; 2: Absence of unmethylated RASSF1A gene; 3: Presence of methylated GSTP1 gene; 4: Absence of unmethylated GSTP1 gene

2.2 5-aza-CdR 对 RASSF1A 和 GSTP1 转录变化的影响 细胞培养24 h后两者 mRNA 无显著性变化,循环域值(Ct 值)都>31,表明两基因发生转录沉默。RASSF1A 和 GSTP1 mRNA 在药物处理48 h后即开始明显升高,其中5、10 μmol/L 药物组与对照组相比有显著差异(P<0.05),各浓度药物处理72 h后,两者 mRNA 都显著上调,为对照组的6~7倍(P<0.05,图2)。

2.3 5-aza-CdR 对 PC3 细胞增殖的影响 药物处理24和48 h后,药物组与对照组相比细胞增殖无明显变化。药物处理72 h后,2.5、5和10 μmol/L 组 D 值明显低于对照组,细胞抑制明显(P<0.05,表1)。

2.4 细胞周期检测 细胞经5-aza-CdR作用24和48 h未出现明显的细胞周期改变;但作用72 h后发生了明显的细胞周期改变,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞明显增多,增殖指数也明显下降(P<0.05,表2)。

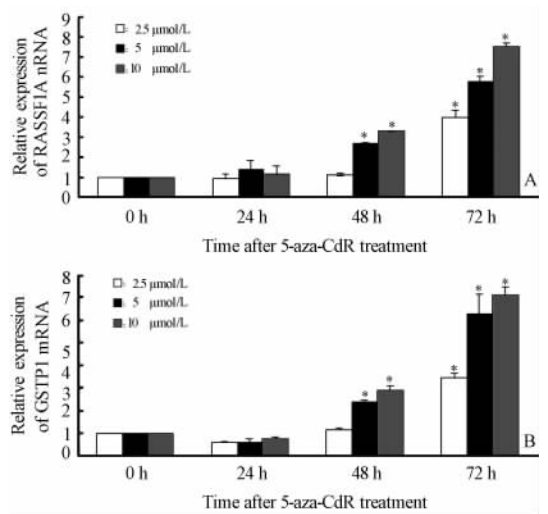


图2 不同药物浓度下 RASSF1A mRNA(A) 和 GSTP1 mRNA(B) 随时间的改变

Fig 2 RASSF1A(A) and GSTP1(B) mRNA levels at different time points after exposure to 2.5, 5, and 10 μmol/L of 5-aza-CdR

\* P<0.05 vs control group (0 h); n=3,  $\bar{x} \pm s$

表1 不同浓度5-aza-CdR作用72 h后对 PC3 前列腺癌细胞株增殖的影响

Tab 1 Inhibitory effect of different concentrations of 5-aza-CdR on prostate cancer cell line PC3 72 h after treatment

Concentration of 5-aza-CdR $C_B/\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$	D ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )	Growth inhibitory rate/%
0(Control)	0.903±0.099	—
2.5	0.755±0.067*	17
5	0.713±0.046*	21
10	0.668±0.093*	26

\* P<0.05 vs control group

## 3 讨论

我们在前期研究<sup>[5-8]</sup>中发现膀胱癌、肾癌组织中存在 RASSF1A、E-caderin、BLU 和 hMLH1 抑癌基因 DNA 过甲基化现象。本次研究我们探讨 DNA 去甲基化药物 5-aza-CdR 对 PC3 前列腺癌细胞株抑癌基因 GSTP1、RASSF1A 的可逆作用以及对细胞增殖的影响,旨在为前列腺癌的分子治疗提供一定帮助。

GSTP1 基因定位于染色体的 11q13,基因全长 3 kb,包括 6 个内含子和 7 个外显子,是 GSTs 超基因家族中 π 家族成员。GSTP1 的主要作用是参与解毒反应,阻止环境中致癌因子对细胞的毒性作用,其失活能使 DNA 更容易发生嘌呤突变。最近有文献<sup>[10-11]</sup>报道前列腺患者外周血和尿液中 GSTP1 启动子甲基化明显高于对照组,提示该基因甲基化极可能成为肿瘤早期诊断的有效指标。

表 2 不同浓度 5-aza-CdR 作用 72 h 后对 PC3 细胞周期的影响

Tab 2 Effect of different concentrations of 5-aza-CdR on cell cycle of prostate cancer cell line PC3 72 h after treatment

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

Concentration of 5-aza-CdR $c_B/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Distribution of cell cycle			Proliferation index
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	
0(Control)	49.53±1.46	17.18±2.87	32.10±3.61	49.88±1.08
2.5	54.29±1.67*	12.61±0.60*	30.03±1.80*	43.97±2.12*
5	56.54±0.53*	12.15±1.94*	29.63±1.69*	42.49±0.41*
10	58.92±1.49*	11.33±1.16*	27.75±0.23*	39.87±1.21*

\* P&lt;0.05 vs control group

RASSF1A 位于 3p21.3, 基因全长 120 kb, 其产物能直接参与细胞周期调控, 在体内和体外抑制细胞生长。已经发现 RASSF1A 在前列腺癌组织和患者血液中甲基化率显著升高, 并与前列腺癌发展、演进关系甚为密切<sup>[11-12]</sup>。

本研究证实 PC3 前列腺癌细胞株中存在抑癌基因 GSTP1 和 RASSF1A 启动子区 CpG 岛甲基化现象, 发现未用药对照组细胞 GSTP1 和 RASSF1A 都发生转录沉默现象, 说明在 PC3 前列腺癌细胞中抑癌基因 GSTP1、RASSF1A 5' 核心启动子甲基化很可能是导致其转录沉默的主要原因。

5-aza-CdR 能够与 DNA 甲基转移酶共价结合, 降低 DNA 甲基转移酶的生物活性, 从而实现逆转 DNA 甲基化效应, 包括防止甲基化 CpG 岛的突变, 重新激活因甲基化而失表达的基因。最新研究<sup>[13]</sup>发现 5-aza-CdR 还能增强组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (TSA) 对组蛋白 H3-K9 的乙酰化作用, 促进基因转录。本实验利用较为敏感的实时荧光定量 PCR 法监测用药过程中抑癌基因 GSTP1 和 RASSF1A 的转录改变, 发现该药能不同程度地逆转 GSTP1 和 RASSF1A 的转录水平, 在药物处理细胞 48 h 后, 5、10  $\mu\text{mol/L}$  药物浓度有差异, GSTP1 和 RASSF1A mRNA 开始出现表达上调, 72 h 后各药物浓度组都出现了转录升高。细胞增殖抑制实验和细胞周期实验发现药物作用 72 h 后细胞生长抑制率显著升高, 细胞周期明显改变, 出现 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞。同时我们也发现随着 5-aza-CdR 药物浓度的提高, 该药物对细胞抑制作用和 GSTP1、RASSF1A 转录上调作用也更加显著。

## [参考文献]

[1] Yamanaka M, Watanabe M, Yamada Y, Takagi A, Murata T, Takahashi H, et al. Altered methylation of multiple genes in carcinogenesis of the prostate[J]. Int J Cancer 2003, 106: 382-387.

[2] Kawamoto K, Okino S T, Place R F, Urakami S, Hirata H, Kikuno N, et al. Epigenetic modifications of RASSF1A gene through chromatin remodeling in prostate cancer[J]. Clin

Cancer Res, 2007, 13: 2541-2548.

- [3] Esteller M, Corn P G, Urena J M, Gabrielson E, Baylin S B, Herman J G. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia[J]. Cancer Res, 1998, 58:4515-4518.
- [4] Lo K W, Kwong J, Hui A B, Chan S Y, To K F, Chan A S, et al. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma [J]. Cancer Res, 2001, 61: 77-3881.
- [5] 张剑英, 李智, 于永春, 段建敏. 膀胱癌和肾癌组织中 RASSF1A 基因的甲基化改变[J]. 中华泌尿外科杂志, 2006, S1:29-32.
- [6] 赵敏, 李智, 于永春, 段建敏, 许云飞. 膀胱肿瘤中错配修复基因 hMLH1 启动子甲基化状态的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28: 736-738.
- [7] 赵敏, 李智, 于永春, 段建敏, 李晶华. 膀胱癌组织中上皮细胞钙依赖粘蛋白基因启动子区 CpG 岛甲基化状态的分析[J]. 检验医学, 2005, 20: 55-58.
- [8] 段建敏, 李智, 赵敏, 张剑英, 彭波, 黄建华. 肾癌组织中 RASSF1A 和 BLU 基因的异常甲基化[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28:1068-1071.
- Duan J M, Li Z, Zhao M, Zhang J Y, Peng B, Huang J H. Abnormal methylation of RASSF1A and BLU genes in renal carcinoma[J]. Di-er Junyi Daxue Xuebao(Acad J Sec Mil Med Univ), 2007, 28 :1068-1071.
- [9] Altamari A, Grigioni A D, Benedettini E, Gabusi E, Schiavina R, Martinelli A, et al. Diagnostic role of circulating free plasma DNA detection in patients with localized prostate cancer [J]. Am J Clin Pathol, 2008, 129:756-762.
- [10] Woodson K, O'Reilly K J, Hanson J C, Nelson D, Walk E L, Tangrea J A. The usefulness of the detection of GSTP1 methylation in urine as a biomarker in the diagnosis of prostate cancer[J]. J Urol, 2008, 179:508-512.
- [11] Rouprêt M, Hupertan V, Catto J W, Yates D R, Rehman I, Proctor L M, et al. Promoter hypermethylation in circulating blood cells identifies prostate cancer progression [J]. Int J Cancer, 2008, 122:952-956.
- [12] Aitchison A, Warren A, Neal D, Rabbitts P. RASSF1A promoter methylation is frequently detected in both pre-malignant and non-malignant microdissected prostatic epithelial tissues [J]. Prostate, 2007, 67:638-644.
- [13] Liu Y, Hong Y, Zhao Y, Ismail T M, Wong Y, Eu K W. Histone H3 (lys-9) deacetylation is associated with transcriptional silencing of E-cadherin in colorectal cancer cell lines[J]. Cancer Invest, 2008, 26:575-582.

[本文编辑] 孙岩