

5-Aza-CdR对膀胱癌细胞生长及hsa-miR-203表达的影响

申 健 张 越 肖伟凡 陈景亮 马 纪 孙奋勇*
(暨南大学生命科学技术学院生物工程研究所, 广州 510632)

摘要 许多研究表明, miRNAs在肿瘤中失活与特定的遗传和表观遗传机制改变有关, hsa-miR-203在膀胱癌组织和细胞中表达下调并扮演着抑癌基因的角色。为了验证hsa-miR-203在膀胱癌细胞中是否受DNA甲基化抑制, 采用去甲基化抑制剂5-Aza-CdR(5-氮-2'-脱氧胞苷)处理5637和BIU-87膀胱癌细胞, MSP和RT-PCR检测表明, hsa-miR-203的启动子在5637和BIU-87细胞中存在完全的甲基化, 而5-Aza-CdR能逆转hsa-miR-203启动子的甲基化状态, 恢复hsa-miR-203的表达。MTT法测定显示, 5-Aza-CdR使5637和BIU-87膀胱癌细胞增殖受到明显抑制, 并呈时间和剂量依赖性。同时, 流式细胞仪检测显示, 5-Aza-CdR使5637和BIU-87膀胱癌细胞周期阻滞于G₀/G₁期。因此, 5-Aza-CdR能抑制膀胱癌细胞5637和BIU-87增殖并干扰其细胞周期。hsa-miR-203启动子异常甲基化是其在膀胱癌细胞中低表达的重要机制, 5-Aza-CdR能逆转hsa-miR-203基因的甲基化, 恢复 hsa-miR-203的表达, 为hsa-miR-203作为膀胱癌去甲基化治疗的靶标提供了科学依据。

关键词 5-Aza-CdR; hsa-miR-203; 膀胱癌; DNA甲基化

膀胱癌在我国占恶性肿瘤的第八位, 是一种常见的发病率高、危害严重的泌尿系统肿瘤^[1]。膀胱癌的发生是多因素、多步骤的复杂病理变化过程, 既有内在的遗传因素, 又有外在的环境因素, 但确切的病因还有待于进一步证实^[2]。近几年来, miRNA与人类肿瘤的关系已成为关注的热点, 研究表明, miRNA的表达水平在许多肿瘤细胞、组织中发生异常, 它们可能起到原癌基因和抑癌基因的作用^[3]。表观遗传修饰重要方式之一——DNA甲基化也是引起miRNA表达水平异常的重要机制^[4]。国内外研究发现, 在多种人类肿瘤中hsa-miR-203通常扮演着抑癌基因的角色且异常低表达, 而hsa-miR-203启动子序列发生超甲基化可能是导致其表达下调的主要因素。我们首次在膀胱癌细胞株5637和BIU-87中通过检测hsa-miR-203的甲基化状态以及在改变其甲基化状态后的hsa-miR-203表达与细胞生长状态的改变, 探讨在膀胱癌细胞株中该miRNA的表达与其甲基化状态的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 膀胱癌细胞株5637和BIU-87, 由

本实验室保存。细胞培养于含10%小牛血清的MEM培养基(Gibco公司)中。

1.1.2 主要试剂 5-Aza-CdR和MTT为Sigma公司产品; 总RNA抽提试剂TRIZOL购自Invitrogen公司; RT-PCR试剂盒和DNA抽提试剂盒购自TaKaRa公司; EZ-DNA-Methylation-Gold Kit购自美国ZYMO RESEARCH。

1.1.3 引物序列 hsa-miR-203甲基化检测引物序列, 甲基化引物: 5'-GGG TCG TGG AGG ATT AGT C-3'(正向引物), 5'-AAA CGA CTA AAC TCC GAA CG-3'(反向引物); 非甲基化引物: 5'-GGG TTG TGG AGG ATT AGT T-3'(正向引物), 5'-AAA CAA CTA AAC TCC AAA CA-3'(反向引物); hsa-miR-203 RT-PCR引物序列: 5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGCAAT TCA GTT GAG CTA GTG GT-3'(RT引物), 5'-ACA CTC CAG CTG GGG TGA AAT GTT TAG GAC CA-3'(正向引物), 5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA-3'(反向引物); U6 RT-PCR引物: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CAT-3'

收稿日期: 2011-02-21 接受日期: 2011-04-19

国家自然科学基金(No.81071524)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-66300588, E-mail: sunfenyong@263.net

(正向引物), 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'
(反向引物)。引物由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 5-Aza-CdR配制 将5-Aza-CdR按10 mmol/L浓度溶于pH7.4 PBS溶液后, 分装成100 μ L/管, 储存于-70 $^{\circ}$ C备用。

1.2.2 MTT法测定5-Aza-CdR对膀胱癌细胞增殖活性的影响 取处理前的对数生长期的膀胱癌5637和BIU-87细胞, 消化后计数, 调整细胞浓度为 1×10^4 个/mL, 按每孔 10^3 个细胞接种于96孔培养板。共接种6块板, 每组5个孔, 接种24 h后去上清, 加入含5-Aza-CdR的培养液, 使其终浓度分别为0 μ mol/L、0.5 μ mol/L、2.5 μ mol/L、5.0 μ mol/L和10.0 μ mol/L, 继续放入37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养箱培养, 每天更换含5-Aza-CdR的新鲜培养基。然后在第1天、第2天、第3天、第4天和第5天各时间点分别取一板, 每孔加入MTT溶液(5 g/L) 20 μ L, 继续孵育4 h, 终止培养, 弃去培养液, 每孔加入150 μ L二甲亚砜, 震荡10 min, 选择490 nm 波长, 在酶标仪上测定各孔的吸光度值。

1.2.3 流式细胞仪(FCM)检测5-Aza-CdR对膀胱癌细胞周期的影响 在6孔培养板已传代培养24 h后的膀胱癌5637和BIU-87细胞中, 分别加入0 μ mol/L、0.5 μ mol/L、2.5 μ mol/L、5.0 μ mol/L和10.0 μ mol/L的5-Aza-CdR, 每天更换含5-Aza-CdR的新鲜培养基, 待72 h后分别回收细胞, 以胰酶消化并2 000 r/min离心5 min收集细胞, PBS洗涤细胞3次, 75%乙醇固定, 用RNase A(终浓度为0.1 g/L)消化30 min, 加入0.05 g/L 碘化丙锭(PI)250 μ L, 室温避光染色30 min后上机检测, 测定细胞周期, 每组实验重复3次。

1.2.4 MSP方法检测膀胱癌细胞中的甲基化状态 收集经0 μ mol/L和5.0 μ mol/L和10.0 μ mol/L 5-Aza-CdR处理72 h的5637和BIU-87细胞, 按DNA抽提试剂盒(TaKaRa公司)步骤抽提基因组DNA。分别取500 ng DNA按EZ Methyl-ation-Gold Kit的操作步骤进行重亚硫酸盐处理, 纯化回收DNA用于甲基化特异PCR分析。甲基化特异性PCR引物设计选择位于hsa-miR-203前体序列上游富含CpG位点区域。PCR反应循环条件: 94 $^{\circ}$ C变性45 s, 61 $^{\circ}$ C退火90 s, 72 $^{\circ}$ C延伸60 s, 共38个循环。甲基化引物扩增长度为142 bp, 非甲基化引物扩增长度为140 bp。

1.2.5 RT-PCR分析5-Aza-CdR处理膀胱癌细胞中hsa-miR-203的表达 收集不同浓度5-Aza-CdR处

理的5637和BIU-87细胞, TRIZOL试剂提取各组细胞总RNA。用DNase(Roche公司)消化RNA中痕量的DNA, 再取2 μ g总RNA, 利用Promega公司的Reverse Transcription System将RNA逆转录成为cDNA。取2 μ L cDNA为模板进行PCR反应, 根据TaKaRa公司说明书配制Real-time PCR体系(20 μ L/体系), 应用Light-cycler310定量PCR仪(Roche公司)行定量PCR检测, 每个样品3个复孔, PCR两步法条件: 95 $^{\circ}$ C 10 s预变性; 然后95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 共40个循环, 各样品采用U6作为内参。应用Light cycler software 4105进行结果分析, 各样品hsa-miR-203相对表达率采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算。

1.3 统计学处理

实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示, 多个样本均数比较采用单因素方差分析, 两组均数比较采用 t 检验, 所有数据均由SPSS 12.0统计软件进行处理, $P < 0.05$ 为统计学上差异显著性。

2 结果

2.1 5-Aza-CdR对膀胱癌细胞增殖的影响

经0 μ mol/L、0.5 μ mol/L、2.5 μ mol/L、5.0 μ mol/L和10.0 μ mol/L 5个不同浓度5-Aza-CdR处理膀胱癌5637和BIU-87细胞1~5天后, 除了0.5 μ mol/L 5-Aza-CdR处理5637和BIU-87细胞1天后未见细胞生长明显抑制, 其他作用浓度和时间, 随着5-Aza-CdR浓度增加, 抑制5637和BIU-87细胞生长的作用明显增强, 呈现明显的时间和剂量依赖性(图1)。

2.2 5-Aza-CdR对膀胱癌细胞周期的影响

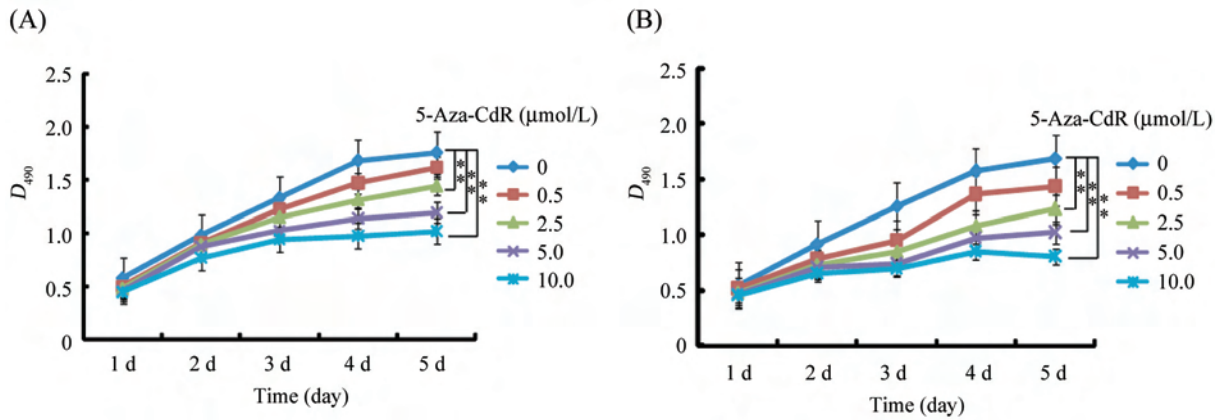
膀胱癌5637和BIU-87细胞经不同浓度5-Aza-CdR处理72 h后, 流式细胞仪分析显示, 5637和BIU-87细胞均在2.5 μ mol/L、5.0 μ mol/L和10.0 μ mol/L 5-Aza-CdR处理后G₀/G₁期的细胞数量明显增加, S期和G₂/M期的细胞数目明显下降($P < 0.05$), 细胞阻滞在G₀/G₁期(图2)。

2.3 5-Aza-CdR对膀胱癌细胞中hsa-miR-203甲基化的影响

hsa-miR-203基因启动子序列在膀胱癌5637和BIU-87细胞中为完全甲基化状态, 而在经过10.0 μ mol/L 5-Aza-CdR处理72 h后, 则表现为不完全甲基化状态, 即该基因甲基化得到部分逆转(图3)。

2.4 恢复人膀胱癌细胞中hsa-miR-203的表达

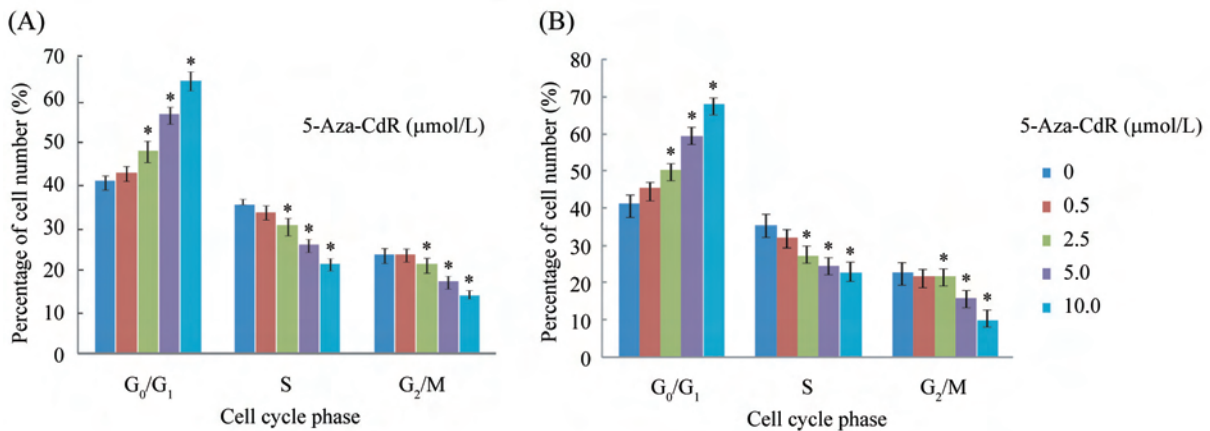
经不同浓度5-Aza-CdR处理人膀胱癌细胞株5637和BIU-87细胞72 h后, RT-PCR检测 hsa-miR-203表达



不同浓度5-Aza-CdR处理人膀胱癌5637和BIU-87细胞1~5天。MTT法分别于第一天、第二天、第三天、第四天和第五天检测细胞的增殖能力。A: 5637细胞; B: BIU-87细胞。各5-Aza-CdR浓度组与0 μmol/L 5-Aza-CdR对照组相比, **P*<0.05。

Bladder cancer 5637 and BIU-87 cells were treated by various concentration 5-Aza-CdR for 1~5day. The proliferation of cells was detected by MTT assay on 1st day, 2nd day, 3rd day, 4th day, 5th day. A: 5637 cell; B: BIU-87 cell. **P*<0.05 vs control group.

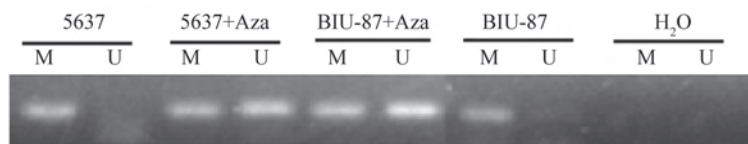
图1 5-Aza-CdR处理5637和BIU-87细胞对细胞增殖的影响
Fig.1 The effect of 5-Aza-CdR on 5637 and BIU-87 cell growth



5-Aza-CdR处理膀胱癌5637和BIU-87细胞72 h后流式细胞术检测细胞周期变化情况。A: 5637 细胞; B: BIU-87细胞。各5-Aza-CdR浓度组与0 μmol/L 5-Aza-CdR对照组相比, **P*<0.05。

Bladder cancer 5637 and BIU-87 cells were treated by 5-Aza-CdR for 72 h. Cell cycle phase distribution was analysed by flow cytometry (FCM). A: 5637 cell; B: BIU-87 cell. **P*<0.05 vs control group.

图2 5-Aza-CdR对膀胱癌细胞周期的影响
Fig.2 The effect of 5-Aza-CdR on bladder cancer cell cycle



10 μmol/L 5-Aza-CdR处理膀胱癌5637和BIU-87细胞72小时后, 甲基化特异PCR实验(MSP)检测hsa-miR-203启动子序列甲基化情况。M: 甲基化引物扩增产物; U: 非甲基化引物扩增产物; H₂O为阴性对照组。

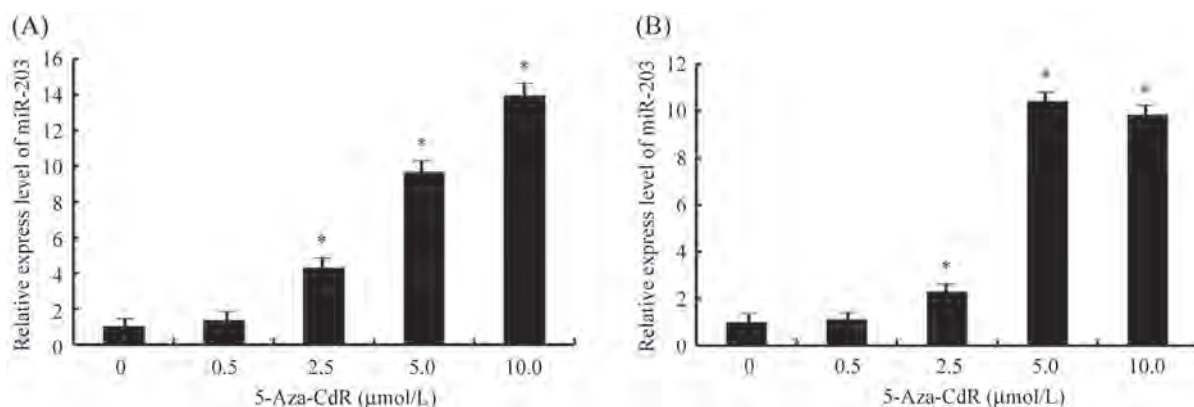
DNA from the indicated bladder cancer 5637 and BIU-87 cell was bisulfate-modified and analyzed for methylation of the hsa-miR-203 promoter by methylation-specific PCR analysis. The presence of a PCR product in lane U indicates unmethylated hsa-miR-203. The presence of a PCR product in lane M indicates the methylated hsa-miR-203, H₂O indicates negative control. 5637 and BIU-87 cells were treated by 10 μmol/L 5-Aza-CdR for 72 h.

图3 MSP检测膀胱癌5637和BIU-87细胞中hsa-miR-203甲基化状态

Fig.3 Hsa-miR-203 methylation status analysis in bladder cancer 5637 and BIU-87 cell by methylation-specific PCR

结果显示, 5637和BIU-87细胞经2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 和10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的5-Aza-CdR处理后恢复了hsa-miR-203

的表达, hsa-miR-203的表达水平与用药剂量有一定量效关系(图4)。



不同浓度5-Aza-CdR(0 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 和10.0 $\mu\text{mol/L}$)处理膀胱癌5637和BIU-87细胞后对hsa-miR-203表达的影响。A: 5637 细胞; B: BIU-87细胞; 各5-Aza-CdR浓度组与0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Hsa-miR-203 relative express level in cell treated by different doses of 5-Aza-CdR (0 $\mu\text{mol/L}$, 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 2.5 $\mu\text{mol/L}$, 5.0 $\mu\text{mol/L}$, 10.0 $\mu\text{mol/L}$). A: 5637 cell; B: BIU-87 cell. * $P < 0.05$ vs control group.

图4 人膀胱癌细胞中5-Aza-CdR诱导hsa-miR-203表达

Fig.4 5-Aza-CdR induced the expression of hsa-miR-203 in bladder cancer cell

3 讨论

miRNA是一类约为18~25个核苷酸(nt)的非编码单链小分子RNA, 广泛参与机体生长发育、免疫调节和肿瘤发生等生命活动过程^[5]。大多数miRNA基因与蛋白编码基因具有相似的启动子结构, 由RNA多聚酶 II 启动转录, 因此miRNA的表达调控也受经典的表观遗传机制如DNA甲基化调控^[6], DNA甲基化是指生物体在DNA甲基化转移酶(DNA methyltransferase, Dnmts)的催化下, 以S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体, 将甲基转移到5-胞嘧啶位上, 形成5-甲基胞嘧啶的过程。5-甲基胞嘧啶是真核细胞DNA中唯一天然存在的修饰碱基, 其甲基化位点90%存在于二核苷酸 CpG序列中, 该类调控模式的主要机制是调节细胞内一些关键基因表达^[7]。肿瘤中DNA甲基化表现为全基因组水平低甲基化, CpG岛高甲基化, 基因组不稳定, 部分抑癌基因表达被抑制^[8]。许多miRNA定位于CpG岛周围或位于其中, 在癌细胞中一些具有肿瘤抑制功能的miRNA通常被DNA过度甲基化所沉默, 表明miRNA甲基化与肿瘤发生发展密切相关^[9]。

DNA甲基化导致基因沉默可由DNA去甲基化试剂加以逆转。5-Aza-CdR是一种DNA甲基化酶抑

制剂, 已通过FDA认证用于选择性治疗脊髓发育不良综合征^[10]。5-Aza-CdR可嵌入DNA双链中与DNA甲基化酶形成稳定共价复合物, 从而导致甲基化酶活性下降, 使基因组甲基化相应降低, 重新激活肿瘤抑制基因的表达, 恢复其功能^[11]。

本研究证实5-Aza-CdR对人膀胱癌5637和BIU-87细胞系有显著的增殖抑制作用, 并呈浓度和时间依赖性。同时, 随着5-Aza-CdR浓度的增加, G_0/G_1 期的细胞数量明显增加, S期和 G_2/M 期的细胞数目明显下降, 出现 G_0/G_1 期阻滞。因此, 5-Aza-CdR 抑制人膀胱癌细胞增殖可能是由于甲基化沉默的基因重新表达干扰细胞周期所致。

hsa-miR-203位于人14号染色体, 在同一区域同时拥有约12%已发现的miRNA基因, 该区域也是染色体上的不稳定区域。目前研究表明, hsa-miR-203在膀胱癌、食道癌和T细胞淋巴瘤中都异常低表达, 充当抑癌基因的角色^[12-14]。Bo等^[15]在膀胱癌中证实hsa-miR-203异常低表达且为抑癌基因。Bueno等^[16]在T细胞淋巴瘤中则证实了hsa-miR-203启动子发生高甲基化。在肝癌中低表达的hsa-miR-203也受DNA甲基化的调控^[17]。我们研究考察了启动子甲基化对hsa-miR-203表达的影响, 甲基化特异性PCR检测证

实hsa-miR-203启动子在膀胱癌5637和BIU-87细胞中存在完全甲基化,同时发现,5-Aza-CdR能够逆转hsa-miR-203启动子甲基化状态,使hsa-miR-203得以重新表达,并且与药物作用浓度存在一定的相关性。由此证明,5-Aza-CdR能够使膀胱癌5637和BIU-87细胞中hsa-miR-203去甲基化,使hsa-miR-203恢复其转录活性,从而能够发挥hsa-miR-203的肿瘤抑制作用。此外,也证明了hsa-miR-203启动子甲基化是其在膀胱癌细胞中表达缺失的重要机制。

总之,5-Aza-CdR抑制膀胱癌细胞增殖可能与干扰细胞周期、提高hsa-miR-203的表达有关,在膀胱癌中hsa-miR-203的低表达与其启动子的异常甲基化修饰相关,5-Aza-CdR能逆转hsa-miR-203的甲基化,恢复hsa-miR-203的表达,为hsa-miR-203作为膀胱癌去甲基化治疗的靶标提供科学依据。

参考文献 (References)

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- Dyrskjot L, Zieger K, Kruhoffer M, Thykjaer T, Jensen JL, Primdahl H, *et al.* A molecular signature in superficial bladder carcinoma predicts clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2005; 11(11): 4029-36.
- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- Smith SS, Kaplan BE, Sowers LC, Newman EM. Mechanism of human methyl-directed DNA methyltransferase and the fidelity of cytosine methylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(10): 4744-8.
- Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 2006; 22(3): 165-73.
- Yang N, Coukos G, Zhang L. MicroRNA epigenetic alterations in human cancer: One step forward in diagnosis and treatment. *Int J Cancer* 2008; 122(5): 963-8.
- Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Muller M, Romermann D, Langer F, *et al.* Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol* 2008; 214(1): 17-24.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429(6990): 457-63.
- Tao L, Wang W, Li L, Kramer PK, Pereira MA. DNA hypomethylation induced by drinking water disinfection by-products in mouse and rat kidney. *Toxicol Sci* 2005; 87(2): 344-52.
- Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res* 2007; 61(5 Pt 2): 24R-9R.
- Mack GS. Epigenetic cancer therapy makes headway. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(20): 1443-4.
- Bhagwat AS, Roberts RJ. Genetic analysis of the 5-azacytidine sensitivity of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1987; 169(4): 1537-46.
- Feber A, Xi L, Luketich JD, Pennathur A, Landreneau RJ, Wu M, *et al.* MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135(2): 255-60.
- Gottardo F, Liu CG, Ferracin M, Calin GA, Fassan M, Bassi P, *et al.* Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol* 2007; 25(5): 387-92.
- Bo J, Yang G, Huo K, Jiang H, Zhang L, Liu D, *et al.* microRNA-203 suppresses bladder cancer development by repressing bcl-w expression. *FEBS J* 2011; 278(5): 786-92.
- Bueno MJ, de Perez CI, de Gomez CM, Santos J, Calin GA, Cigudosa JC, *et al.* Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* 2008; 13(6): 496-506.
- Furuta M, Kozaki KI, Tanaka S, Arai S, Imoto I, Inazawa J. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2010; 31(5): 766-76.

Effects of 5-Aza-deoxycytidine on Proliferation of Bladder Cancer Cell Lines and Abnormal Methylation of hsa-miR-203

Shen Jian, Zhang Yue, Xiao Weifan, Chen Jingliang, Ma Ji, Sun Fenyong*

(Institute of Genetic Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract The inactivation of miRNAs in tumors is related to specific genetic or epigenetic alterations according to the studies recently. hsa-miR-203, as a tumor suppressor gene, is down-regulated in bladder cancer tissues and bladder tumor cells. In order to study whether miR-203 is downregulated by DNA hypermethylation, bladder cancer cell lines 5637 and BIU-87 were treated by methylase inhibitor 5-Aza-2-deoxycytidine (5-Aza-CdR). By using MSP and RT-PCR, it indicated that the promoter of hsa-miR-203 is hypermethylated in 5637 and BIU-87. However, 5-Aza-CdR can reverse the aberrant hypermethylation of hsa-miR-203's promoter and induce hsa-miR-203 expression. Moreover, 5-Aza-CdR displayed a growth inhibitory effect on 5637 and BIU-87 cells in a dose- and time-dependent manner after exposure to 5-Aza-CdR at different concentrations for different time. FCM analysis showed that cell cycles of 5637 and BIU-87 cells were blocked at G₀/G₁ phase after 5-Aza-CdR treatment for 72 hours. Taken together, bladder cancer cell lines 5637 and BIU-87 cell growth could be inhibited and cell cycles could be blocked by 5-Aza-CdR. Hypermethylation of hsa-miR-203 promoter is an important mechanism of hsa-miR-203 down regulation in bladder cancer cell lines. Methylation could be reversed and hsa-miR-203 expression could be induced by 5-Aza-CdR. All of the above implies that hsa-miR-203 may serve as a demethylation therapeutic target in bladder cancer.

Key words 5-Aza-CdR; hsa-miR-203 gene; bladder cancer ; DNA methylation

Received: February 21, 2011 Accepted: April 19, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81071524)

*Corresponding author. Tel: 86-21-66300588, E- mail: sunfenyong@263.net