

DLC-1 基因在 MCF-7 人乳腺癌细胞系中低表达的机制探究*

马小娟 覃君慧 信 波 王雪莹 李 颖 闫庆国 师建国 王瑞安[△]

(第四军医大学西京医院病理科 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探究 DLC-1 基因在 MCF-7 人乳腺癌细胞系中低表达的机制。方法 应用甲基化特异性 PCR(MSP)检测人乳腺癌细胞 MCF-7 的 DLC-1 基因甲基化状态,不同浓度的 5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶(5-Aza-CdR)处理人乳腺癌细胞 MCF-7, RT-PCR 及 Real-time PCR 定量检测用药前后细胞中 DLC-1 基因 mRNA 表达水平变化。结果 DLC-1 基因启动子区 CpG 岛呈甲基化状态,经过 5-Aza-CdR 处理后, DLC-1 基因启动子区呈去甲基化状态,并且其 mRNA 恢复表达。结论 抑癌基因 DLC-1 CpG 岛甲基化是导致该基因低表达的原因之一, 5-Aza-CdR 能逆转 DLC-1 基因甲基化状态。

关键词 DLC-1 ;启动子甲基化 ;乳腺癌

中图分类号 R 737.9 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2011)07-1231-04

Study on Mechanism of Low Expression of Tumor Suppressor Gene
DLC-1 in Human Breast Cancer Cell Line*MA Xiao-juan, QIN Jun-hui, XIN Bo, WANG Xue-ying, LI Ying, YAN Qing-guo, SHI Jian-guo, WANG Rui-an[△]

(Department of Pathology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of low expression of tumor suppressor gene dlc-1 in human breast cancer cell line. **Methods:** Methylation-specific PCP (MSP) was used to examine the methylation status of DLC-1 promoter. MCF-7 cells were treated by different concentrations of 5-Aza-CdR. DLC-1 mRNA levels were examined by RT-PCR and Real-time PCR before and after treatment with 5-Aza-CdR. **Results:** There was methylation in DLC-1 promoter. The expression of DLC-1 mRNA in MCF-7 increased after treated by 5-Aza-CdR. **Conclusion:** Methylation of DLC-1 promoter might be the main reason of the low expression of DLC-1 in MCF-7 human breast cancer cells, and the 5-Aza-CdR can inhibit this methylation.

Key words: DLC-1; Promoter methylation; Breast cancer

Chinese Library Classification(CLC): R737.9 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)07-1231-04

前言

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一,资料显示其发病率以惊人的速度上升。尽管在乳腺癌的早期诊断和治疗等方面取得了进展,但全球每年仍有约 50 万妇女死于乳腺癌,乳腺癌发病率位居女性恶性肿瘤首位^[1]。在我国乳腺癌的发病率也呈逐年上升趋势。Yuan BZ 等发现定位于人类染色体 8p21.3-22 的 DLC-1 基因,在多种恶性肿瘤组织中常低表达或表达缺失,如肝癌、乳腺癌、结直肠癌等^[2-4]。有研究认为 DLC-1 可能作为抑癌基因,起到抑制细胞增殖和抗肿瘤作用,它的失活将引起生物过程的变化并导致恶性表型^[5]。一些研究证实,DLC-1 的低表达与其启动子的高甲基化有关。启动子区域的 CpG 岛甲基化可能是基因表达下调或缺失的重要机制^[6]。

本实验通过甲基化特异性 PCR(MSP)法检测在乳腺癌细胞 MCF-7 中是否存在 DLC-1 基因启动子的甲基化,RT-PCR 定量分析系统检测 DLC-1 基因的低表达是否能被甲基转移酶

抑制剂 5-Aza-CdR 逆转。

1 材料与方法

1.1 试剂

5-Aza-CdR (Sigma 公司产品);二甲基亚砜 DMSO(Amersco 公司产品);DMEM (Gibco 公司产品);标准胎牛血清(杭州四季青公司);RNA 提取试剂 Trizol(Invitrogen 公司);逆转录试剂盒 (TaRaKa 公司);SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒 (TaRaKa 公司);Ultra-Sep[®] Gel Extraction Kit 试剂盒 (Omega 公司);寡核苷酸引物由北京奥科公司合成

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞株 MCF-7 第四军医大学病理与病理生理学教研室保存。用含 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养,每 2~3 天换液传代一次。实验用细胞为对数生长期细胞。

1.3 试验方法

* 基金项目 国家自然科学基金(30870923)国家自然科学基金(30971535)

作者简介:马小娟(1982-),女,硕士研究生,从事肿瘤发病机制方面研究

Tel 029-84774541-119 E-mail :ashley0126@163.com

[△]通讯作者:王瑞安,男,教授,从事肿瘤发病机制及分子病理诊断方面研究

E-mail :wangra@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2010-12-21 接受日期 2011-01-15)

1.3.1 甲基化特异性 PCR(MSP)分析 DLC-1 基因启动子甲基化状态 取对数生长期 MCF-7 细胞进行 5-Aza-CdR 处理, 5-Aza-CdR 浓度分为 3 组:0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组)、5 $\mu\text{mol/L}$ 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 组,每组设 3 孔。分别采用含 5-Aza-CdR 的 DMEM 培养液培养细胞,24 h 后换新的含相同药物浓度培养液。药物作用 3 天后,收集细胞,提取基因组 DNA。DNA 亚硫酸氢钠修饰参照文献^[7],纯化步骤应用 OMEGA 公司 Ultra-Sep® Gel Extraction Kit 试剂盒进行。PCR 选择 TaRaKa 反应体系,引物序列:Unmethylated reactions(U from-56 to+122) 5'-AAACCCAA-CAAAAAACCCAACTAACA-3' (sense) 5'-TTTTTTAAAGATTGAAATGAGGGAGTG-3'(antisense) ;Methylated reactions (M from-53 to+119) 5'-CCCAACGAAAAAACCCGACTAACG-3' (sense) 5'-TTTAAAGATCGAAACGAGGGAGCG-3'(antisense)^[8]。扩增产物用 1.5 %的琼脂糖进行电泳鉴定。

1.3.2 RT-PCR 检测 MCF-7 细胞 DLC-1mRNA 表达 取 0、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-Aza-CdR 处理各组细胞,提取总 RNA。RT-PCR 反应按试剂盒说明进行,根据 Genebank 登录号 AF035119 设计引物序列 DLC-1: 5'-TTGAAGCCAAGGAAGCTTGT-3'(sense), 5'-TTCATCACCGCACATTTGTT-3' (antisense) β -actin 5'-AGCAAGAGAGGCATCCTCAC-3'(sense) 5'-AGCTCGTAGCTCTTCTTCAG-3'(antisense)。PCR 条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。扩增产物用 1.5 %的琼脂糖进行电泳鉴定。

1.3.3 Real-time PCR 检测 MCF-7 细胞 DLC-1mRNA 表达定量 Real-time PCR 采用 TaRaKa 的 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix,该 Mix 里含有 SYBR® Green I,可用于未标记引物的掺入法 Real time 定量 PCR。引物序列:DLC-1 5'-AAGTG-GCAATTGGTTTGTCT3'(sense) 5'-AGGAAATTGGAGTGCAG-TGT-3' (antisense);18S 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' (sense) 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'(antisense)。反应体系 (25 μL) :Primer 1 0.5 μL , Primer 2 0.5 μL , cDNA 3.0 μL , SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 12.5 μL , ddH₂O 8.5 μL 。混匀离心后在 Bio-Rad 公司的 iQ5 Real-time PCR Detection System 上进行反应:94.0 $^{\circ}\text{C}$ 03:00 1 个循环;94.0 $^{\circ}\text{C}$ 00:30,58.0 $^{\circ}\text{C}$ 00:30,72.0 $^{\circ}\text{C}$ 00:30 45 个循环;72.0 $^{\circ}\text{C}$ 07:00。

1.3.4 Real-time PCR 相对量计算及数据分析 用 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法计算目的基因的相对表达量。相对定量方法是比较经过处理的样品和未经处理的样品目标转录本之间的表达差异。2- $\Delta\Delta\text{CT}$ 方法是实时定量 PCR 实验中分析基因表达相对变化的方法,CT 值是通过 PCR 信号的对数值和循环数来确定,计算出 DLC-1 和 18S 的平均 CT 值以及 ΔCT 值,通过 cDNA 浓度梯度的 log 值对 ΔCT 值作图,如果所得直线斜率绝对值接近于 0,说明目标基因和内标基因的扩增效率相同,就可以通过 $\Delta\Delta\text{CT}$ 方法进行相对定量,Relative Quantity(dR)=2- $\Delta\Delta\text{CT}$ ^[9]。

2 结果

2.1 DLC-1 基因启动子甲基化状态

甲基化特异性 PCR(MSP)扩增产物用 1.5 %的琼脂糖进行电泳,可见 U 泳道未见阳性条带,M 泳道可见明显阳性条带,且与甲基化阳性对照产物条带大小一致,说明通过 MSP 法验

证了 DLC-1 基因在人乳腺癌细胞株 MCF-7 中确实存在启动子区甲基化(图 1)。

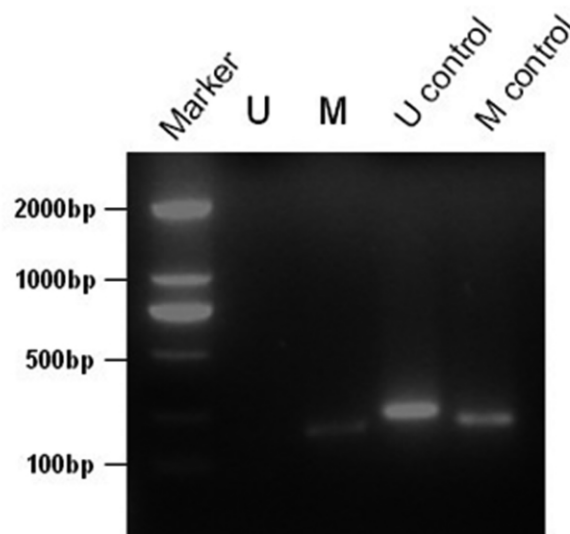


图1 MSP 分析 DLC-1 基因启动子甲基化状态。M:MCF-7 的 DLC-1 基因的启动子出现甲基化修饰。U:非甲基化产物(178bp) ;M:甲基化产物(172 bp) ;U Control 及 M Control 分别为非甲基化和甲基化的阳性对照。

Fig.1 Methylation status of DLC-1 from genomic of MCF-7 cells was determined by methylation-specific polymerase chain reaction(MSP).

M:The methylation levels of DLC-1 gene were detected by MSP. U, Unmethylated PCR production(178bp) ;M, Methylated PCR production (172 bp); U Control&M Control:Positive control of unmethylated and methylated.

2.2 5-Aza-CdR 对 MCF-7 细胞 DLC-1mRNA 表达的影响

5-Aza-CdR 处理前人乳腺癌细胞株 MCF-7 中检测到 DLC-1 基因 mRNA 低表达,经 5 $\mu\text{mol/L}$,10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-Aza-CdR 处理后,DLC-1 的 mRNA 表达量明显提高,并随剂量的增加表达增强(图 2)。通过 Gen Genius 全自动数码凝胶图像分析系统对各个条带分析光密度,以 β -actin 的表达量为对照,计算并比较各组 5-Aza-CdR 处理后的 MCF-7 中 DLC-1 mRNA 的相对表达量,以 5-Aza-CdR 处理前的 MCF-7 中 DLC-1 基因 mRNA 表达条带强度与相应的 β -actin 的 mRNA 表达条带强度的比值作为标准值,5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 用药处理组相应的比值分别为 1.85 和 2.96,分析显示 5-Aza-CdR 处理后 DLC-1 的 mRNA 表达量明显提高,并呈一定的浓度依赖性。Real-time PCR 的结果同样支持上述结论,5-Aza-CdR 作用于 MCF-7 乳腺癌细胞株 72 h 以后,MCF-7 细胞的 DLC-1 基因 mRNA 由低表达转为高表达(图 3)

3 讨论

DLC-1 基因的失活不仅在肝癌^[10]、肺癌^[11]等恶性肿瘤中存在,而且也有文献报道在胃癌、乳腺癌、前列腺癌的恶性肿瘤中的低表达或表达缺失,致使其恶性表型^[12-14],这说明了 DLC-1 基因确实发挥着抑癌基因的功能。抑癌基因 DLC-1 与肿瘤的发生、发展以及肿瘤细胞的侵袭及转移密切相关,在恶性肿瘤

的发展过程中起重要作用。DLC-1 蛋白主要包含 SAM(sterile alpha motif)、RhoGAP (RhoGTP activating protein) 和 START (steroidogenic acute regulatory -related lipid transfer) 三个功能域。大量的研究表明,参与调节细胞增殖和转移的生物学活性是通过调控 Rho 蛋白的活性而发挥作用的^[15-17]。已知 Rho 蛋白最重要的功能就是通过影响肌动蛋白聚合、肌球蛋白收缩、细胞粘附和微管动力学来调控细胞形态、极性和运动,从而影响细胞的迁移,诱导肿瘤细胞转移。在几乎所有已研究的肿瘤细胞中,RhoGAP 结构域在 DLC-1 的肿瘤抑制功能中发挥重要作用

用^[18]。有 RhoGAP 结构域的参与 DLC-1 才会引起细胞形状改变,黏着斑蛋白去磷酸化,并导致应力纤维和黏着斑的解聚,这一过程提示 DLC-1 可能会干扰细胞骨架的形成。因此,RhoGAP 起着 Rho 家族蛋白负调控因子的作用。另有研究证实,SAM 结构域能稳定 RhoGAP 的作用并与其共同参与 Rho 蛋白活性的调控,从而参与细胞内多种信号的传导与调控^[19]。Rho 家族信号通路的改变,如 DLC-1 基因失活可使 Rho 蛋白过度表达,从而向细胞内持续传递生长信号,这可能是肿瘤发病的主要机制之一。

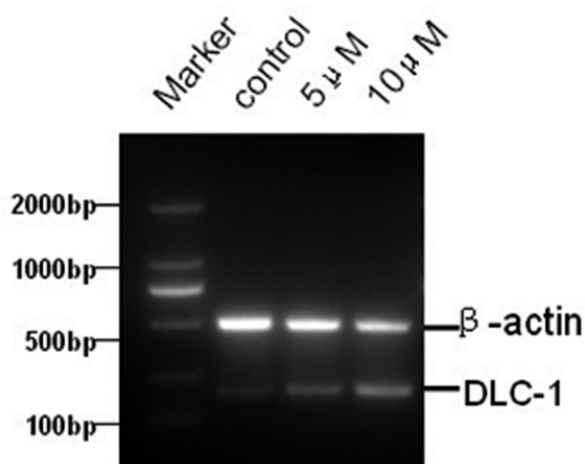


图2 不同浓度 5-Aza-CdR 处理乳腺癌细胞株 MCF-7 RT-PCR 检测 MCF-7 细胞 DLC-1mRNA 表达量。DLC-1mRNA 的表达比未经药物处理的 MCF-7 细胞明显增强。Control:0μ mol/L,5μ M:5μ mol/L 5-Aza-CdR 组,10μ M:10μ mol/L 5-Aza-CdR 组。
Fig.2 MCF-7 cells were treated with 5-Aza-CdR and the expression of DLC-1 was detected by RT-PCR. The expression of DLC-1 mRNA was significantly up-regulated by treatment with 5-Aza-CdR. Control: 0μ mol/L,5μ M:5μ mol/L 5-Aza-CdR,10μ M:10μ mol/L 5-Aza-CdR.

甲基化是表遗传学研究的重要内容,甲基化与基因的表达调控、细胞增殖及分化等方面的联系十分密切,在肿瘤的发生、发展中起着重要的作用^[20]。目前的研究认为,某些抑癌基因的失活大多是由于启动子区域高甲基化所致^[21]。这种失活不是基因序列发生缺失或突变,而只是部分碱基发生甲基化修饰。DLC-1 在多种肿瘤细胞中常呈低表达或不表达,本实验通过 MSP 法验证了在乳腺癌细胞系 MCF-7 中确实存在 DLC-1 基因启动子的甲基化,这可能是 DLC-1 基因 mRNA 的表达下调的原因之一。随后我们并选用去甲基化药物 5-Aza-CdR 处理乳腺癌细胞 MCF-7,5-Aza-CdR 可抑制 DNA 甲基转移酶 (DNMT) 的活性从而起到去甲基化的作用,应用 RT-PCR 和 Real-time PCR 方法检测 DLC-1mRNA 的表达量,实验表明应用去甲基化药物组的细胞比未经药物处理的 MCF-7 细胞 DLC-1mRNA 的表达量明显增强,且 10μ mol/L 剂量组的表达强度最高。

DLC-1 做为抑癌基因,其与肿瘤的发生、发展以及肿瘤细胞的侵袭及转移密切相关,在恶性肿瘤的发展过程中起重要作用。DLC-1 在多种肿瘤细胞中常呈低表达或不表达,本实验证

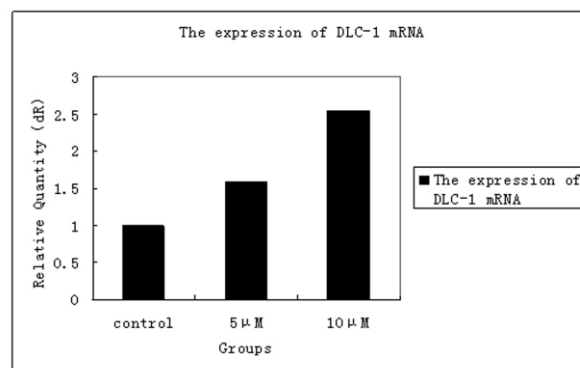


图3 不同浓度 5-Aza-CdR 处理乳腺癌细胞株 MCF-7 Real-time PCR 检测 MCF-7 细胞 DLC-1mRNA 表达量。DLC-1mRNA 的表达比未经药物处理的 MCF-7 细胞明显增强。Control:0μ mol/L,5μ M:5μ mol/L 5-Aza-CdR 组,10μ M:10μ mol/L 5-Aza-CdR 组。
Fig.3 MCF-7 cells were treated with 5-Aza-CdR and the expression of DLC-1 was detected by real-time polymerase chain reaction(Real-Time PCR).The expression of DLC-1 mRNA was significantly up-regulated by treatment with 5-Aza-CdR. Control:0μ mol/L,5μ M:5μ mol/L 5-Aza-CdR,10μ M:10μ mol/L 5-Aza-CdR.

实了在人乳腺癌细胞株 MCF-7 中存在启动子甲基化,但是否存在其他致使其低表达的机理,如某些蛋白磷酸化 DLC-1 致使其失活、miRNA 的异常调节等,以及 DLC-1 在肿瘤发生、发展及复发转移中的作用及其涉及的信号转导通路尚未完全明了,值得进一步深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Sasco AJ. Breast cancer and the environment [J]. Horm Res, 2003, 60 (suppl 3):50-50 DOI: 10.1159/000074500
- [2] Yuan BZ, Zhou X, Durkin ME, et al. DLC-1 gene inhibits human breast cancer cell growth and in vivo tumorigenicity [J]. Oncogene, 2003, 22: 445-450
- [3] Yuan BZ, Miller MJ, Keck CL, et al. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP[J]. Cancer Res, 1998, 58: 2196-2199
- [4] Ullmannova V, Popescu NC. Expression profile of the tumor suppressor genes DLC-1 and DLC-2 in solid tumors [J]. Int J Oncol. 2006;29 (5):1127-1132

- [5] Durkin ME, Yuan BZ, Thorgeirsson SS, et al. Gene structure, tissue expression, and linkage mapping of the mouse DLC-1 gene (Arhgap 7) [J]. *Gene*, 2002, 288 (1-2) : 119-127
- [6] Seng TJ, Low JS, Li H, et al. The major 8p22 tumor suppressor DLC-1 is frequently silenced by methylation in both endemic and sporadic nasopharyngeal, esophageal, and cervical carcinomas, and inhibits tumor cell colony formation [J]. *Oncogene*, 2007, 26 (6): 934-944
- [7] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation - specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9821- 9826
- [8] Kim TY, Jong HS, Song SH, et al. Transcriptional silencing of the DLC-1 tumor suppressor gene by epigenetic mechanism in gastric cancer cells[J]. *Oncogene*, 2003, 19;22(25):3943-3951
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} (T) Method[J]. *Methods*. 2001;25(4):402-408
- [10] Zhou X, Thorgeirsson SS, Popescu NC. Restoration of DLC-1 gene expression induces apoptosis and inhibits both cell growth and tumorigenicity in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2004 12;23(6):1308-1313
- [11] Yuan BZ, Jefferson AM, Baldwin KT, et al. DLC-1 operates as a tumor suppressor gene in human non-small cell lung carcinomas [J]. *Oncogene*, 2004, 23:1405-1411
- [12] Zhou XL, Zimonjic DB, Park SW, et al. DLC1 suppresses distant dissemination of human hepatocellular carcinoma cells in nude mice through reduction of RhoA GTPase activity, actin cytoskeletal disruption and down-regulation of genes involved in metastasis [J]. *Int J Oncol*, 2008, 32(6):1285-1291
- [13] Plaumann M, Seitz S, Frege R, et al. Analysis of DLC-1 expression in human breast cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, 129:349-354
- [14] Yuan BZ, Jefferson AM, Millecchia L, et al. Morphological changes and nuclear translocation of DLC1 tumor suppressor protein precede apoptosis in human non-small cell lung carcinoma cells [J]. *Exp Cell Res*. 2007 1;313(18):3868-3880.
- [15] Kim TY, Lee JW, Kim HP, et al. DLC-1, a GTPase-activating protein for Rho, is associated with cell proliferation, morphology, and migration in human hepatocellular carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355(1):72-77
- [16] Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(2):133-42
- [17] Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology [J]. *Nature*. 2002 12;420(6916):629-35
- [18] Aurelia L, Alan H. DLC1: a significant GAP in the cancer Genome [J]. *Genes Development*, 2008, 22(13):1724-1730
- [19] Tai YK, Kevin DH, Channing JD, et al. Effects of Structure of Rho GTPase-activating Protein DLC-1 on Cell Morphology and Migration [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(47): 32762-32770
- [20] Jarmalaite S, Jankevicius F, Kurgonaite K, et al. Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes shows association with stage, grade and invasiveness of bladder cancer [J]. *Oncology*, 2008, 75 (324) :145-151
- [21] Guan M, Zhou X, Soultzis N, et al. Aberrant methylation and deacetylation of deleted in liver cancer-1 gene in prostate cancer: potential clinical applications [J]. *Clin Cancer Res*. 2006;12 (5): 1412-1419