

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.10.006

文章编号: 1005-8982(2017)10-0030-05

抑制 *DBC2* 基因启动子甲基化促进 乳腺癌细胞凋亡的研究

樊艳

(河南省中医院 乳腺科,河南 郑州 450002)

摘要: **目的** 研究抑癌基因 *DBC2* 在乳腺癌的表达与甲基化状态之间的联系, 及其对乳腺癌细胞系 T-47D 细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 体外培养 3 种乳腺癌细胞株(T-47D、MCF-7、MDA-MB-23)和正常乳腺细胞株(MCF-10), 检测 4 种细胞中 *DBC2* 基因的表达及其启动子区甲基化状况;5-Aza-CdR 处理 T-47D 细胞后,检测 5-Aza-CdR 对 T-47D 细胞 *DBC2* 启动子甲基化状态和其表达的影响,并通过 MTT 和 Annexin-V/PI 双染法分别检测处理前后 T-47D 细胞增殖和凋亡的变化。**结果** *DBC2* 在 T-47D 细胞表达缺失, 乳腺癌细胞 *DBC2* 启动子发生甲基化;5-Aza-CdR 成功逆转了 T-47D 细胞 *DBC2* 的甲基化状态, 并使 *DBC2* mRNA 表达恢复($P < 0.05$);不同浓度的 5-Aza-CdR 处理 T-47D 细胞后,T-47D 细胞增殖下降($P < 0.05$),凋亡率增加($P < 0.05$)。**结论** *DBC2* 启动子甲基化导致 T-47D 细胞 *DBC2* 表达沉默,激活 *DBC2* 表达可抑制 T-47D 细胞增殖并促进其凋亡。

关键词: 乳腺癌;*DBC2*;甲基化;5-Aza-CdR

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Expression of *DBC2* gene in breast cancer cells and its effect on cell proliferation and apoptosis

Yan Fan

(Department of Galactophore, Henan Provincial Hospital of TCM,
Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: Objective To study the association between expression of *DBC2* gene and its promoter methylation, and the effect of *DBC2* on the proliferation and apoptosis of breast cancer T-47D cells. **Methods** Three breast cancer cell lines (T-47D, MCF-7 and MDA-MB-23) and normal breast cell line (MCF-10) were cultured *in vitro*, the expression and promoter methylation status of *DBC2* in the four cell lines were measured. T-47D cells were treated by 5-Aza-CdR, and the effect of 5-Aza-CdR on the *DBC2* mRNA level and promoter methylation status were detected. T-47D cell proliferation and apoptosis were determined by MTT and Annexin-V/PI respectively. **Results** *DBC2* gene expression was not observed, whereas *DBC2* promoter methylation was found in T-47D cells. 5-Aza-CdR reversed the methylation of *DBC2* promoter and activated the expression of *DBC2* ($P < 0.05$). The cell proliferation was significantly inhibited and the apoptosis was promoted in T-47D cells after treatment with 5-Aza-CdR ($P < 0.05$). **Conclusions** The methylation of *DBC2* promoter induces the silence of *DBC2* mRNA. The activation of *DBC2* gene expression can inhibit the cell proliferation and promote apoptosis of T-47D cell.

Keywords: breast cancer; *DBC2*; methylation; 5-Aza-CdR

随着近年来对肿瘤分子生物学和表观遗传学的研究发现, 抑癌基因的失活是肿瘤发生早期的重要

事件, 而抑癌基因启动子区高甲基化是抑癌基因失活的一种重要机制。乳腺癌缺失基因 2 (deleted in

breast cancer 2, *DBC2*), 又称 *RhoBTB2* (*rho*-related BTB domain-containing 2), 是位于人类染色体 8p21 上的一种抑癌基因, 该基因在约 60% 的乳腺癌患者体内表达缺失, 与散发性乳腺癌的发生发展有着密切的关系^[1]。研究发现 *DBC2* 常在肿瘤组织中表达缺失, 而 *DBC2* 基因的重新表达可抑制肿瘤细胞的生长, 迁移和侵袭^[2-3]。因此 *DBC2* 在乳腺癌的发生和发展过程中具有十分重要的作用。目前国内外关于 *DBC2* 基因甲基化与乳腺癌的研究不多, 本研究旨在研究乳腺癌中 *DBC2* 的甲基化状态及其对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响。通过体外培养 3 种不同的乳腺癌细胞株 (T-47D、MCF-7、MDA-MB-23) 和正常乳腺细胞株 (MCF-10), 研究乳腺癌 *DBC2* 基因甲基化状态与其表达水平的关系, 并初步探索甲基化抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对 *DBC2* 基因表达与甲基化状态及 T-47D 细胞增殖和凋亡的影响, 期为乳腺癌的发病机制提供新的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料及主要试剂

RPMI1640 (Gibco), 胎牛血清 (Gibco), 5-Aza-CdR (Sigma 公司), RNA 提取试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒 (TaKaRa), DNA 提取试剂盒 (Axygen), DNA 甲基化试剂盒 (ZymoResearch), DNA 纯化试剂盒 (Promega), 细胞凋亡检测试剂盒 (KeyGEN)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养及处理 将 T-47D、MCF-7、MDA-MB-231 乳腺癌细胞系及人类正常乳腺细胞系 (MCF-10) (ATTC) 4 种细胞分别接种于含 10% 胎牛血清的 RPM 1 640 培养液中, 于 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养, 待细胞长满培养瓶壁 85% 左右后, 按 1:4 传代, 取对数生长期细胞用于下一步实验。

取 T-47D 细胞进行培养, 24 h 后用 5-Aza-CdR 进行处理, 5-Aza-CdR 浓度分为 3 组: 0 mol/L (对照组)、5 mol/L 组和 10 mol/L 组, 每组设 3 孔, 分别采用含不同浓度 5-Aza-CdR 的 RPM1640 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 d 后, 收集细胞。

1.2.2 RT-PCR 检测 *DBC2* mRNA 表达水平 用总 RNA 提取试剂盒提取细胞中总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测和酶标仪检测 RNA 的完整性和浓

度后, 用逆转录试剂盒对提取的 RNA 进行逆转录, 酶标仪测定 cDNA 浓度, 保存于 -20℃ 待测。

Primer5 软件设计 *DBC2* mRNA (GenBank 登录号: AY009093) 引物序列, 正向引物: 5'-ACCATGTG GTACCCAGAAATC-3'; 反向引物: 5'-GTGGGACTTC CAGAACTGCA-3'。产物片段长度 303 bp。内参 GAPDH 正向引物序列: 5'-ACCACAGTCCATGCCAT CAC-3'; 反向引物: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。产物片段长度 452 bp。RT-PCR 反应体系为 10 μl。主要反应条件为 94℃ 预热 5 min; 94℃ 变性 45 s, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min 共 35 个循环后, 72℃ 延伸 10 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖进行电泳鉴定。

1.2.3 甲基化特异性 PCR (MSP) 分析 *DBC2* 基因启动子甲基化状态 提取的 DNA 经质检后进行亚硫酸氢盐处理。取 2 μg DNA 溶于 50 μl 水中, 加入 5 μl 氢氧化钠溶液 (3 mol/L) 孵育 15 min, 然后加入 30 μl 对苯二酚 (10 mmol/L) 和 520 μl 亚硫酸氢钠 (3 mol/L), 混匀后 50℃ 水浴 16 h, 脱盐、脱硫、乙醇沉淀纯化回收 DNA, 回收的 DNA 溶于 20 μl TE 缓冲液中, -20℃ 储存备用。

根据 *DBC2* 基因序列 (GenBank 登录号: AF315385) 用 Methyl Primer Express v1.0 进行引物设计, 甲基化正向引物序列: 5'-GCGAGTTGGTATGT TATGTC-3'; 反向引物序列: 5'-TAATCTTACCCAC GACGTTA-3'。非甲基化正向引物序列: 5'-GGTGAG TTGGTATGTTATGTT-3'; 反向引物序列: 5'-CTAA TCTTACCCACAACATTA-3'。修饰的 DNA 用甲基化特异性 PCR (MSP) 试剂盒按照使用说明书进行操作。反应条件: 94℃ 预热 5 min, 94℃ 45 s, 56℃ 45 s, 72℃ 1 min 共 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。扩增产物于 2.5% 的凝胶电泳检测。

1.2.4 MTT 法检测 5-Aza-CdR 处理后 T-47D 细胞增殖 取对数期细胞接种于 96 孔板, 用分别含 0、5 和 10 mol/L 5-Aza-CdR 的 RPM 1 640 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 72 h 后, 每孔加入 20 μl 5 mg/ml MTT 后继续培养 4 h, 弃上清液并在每孔加入 200 μl DMSO, 振荡 10 min 使其充分溶解后, 酶标仪上测定在 570 nm 处各孔的吸光值。

1.2.5 流式细胞仪检测 5-Aza-CdR 处理后 T-47D 细胞凋亡 细胞凋亡的检测参照细胞凋亡试剂盒说明书进行。收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞, 加入 500 μl 结合缓冲液悬浮细胞, 分别加 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI, 混匀后室温避光反应

15 min 后,上流式细胞仪进行检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,结果采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

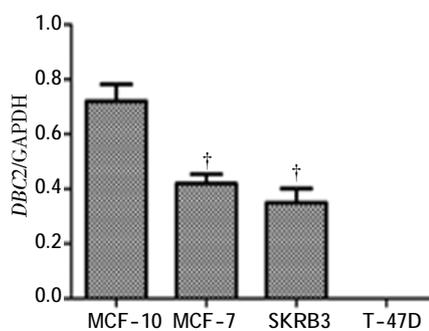
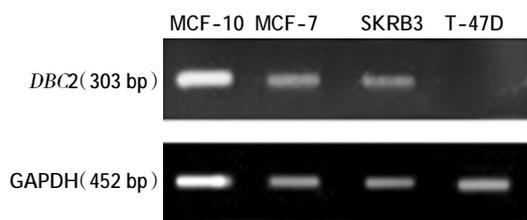
2.1 乳腺癌细胞中 DBC2 mRNA 表达水平

DBC2 mRNA 在 T-47D 细胞中未检测到,而在 MCF-7、MDA-MB-231 乳腺癌细胞和正常乳腺细胞均有表达(图 1A),在检测到 DBC2 表达的 MCF-7 与 MDA-MB-231 乳腺癌细胞,其 DBC mRNA 表达水平均低于正常乳腺细胞组(表 1、图 1B)。表明乳腺癌细胞中 DBC2 mRNA 的表达受到了抑制,且在 T-47D 细胞系中表达缺失。

表 1 RT-qPCR 检测 DBC2 mRNA 表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	相对表达量
MCF-10	0.72 ± 0.062
MCF-7	0.42 ± 0.04 [†]
SKBR3	0.35 ± 0.051 [†]
T-47D	-
F 值	143.606
P 值	0.000

注:†与 MCF-10 比较, $P < 0.05$



†与 MCF-10 比较, $P < 0.05$

A: 琼脂糖凝胶电泳检测 DBC2 mRNA 表达; B: RT-qPCR 检测 DBC2 mRNA 表达

图 1 DBC2 在乳腺癌细胞株和正常乳腺细胞中的表达

2.2 乳腺癌细胞中 DBC2 基因启动子甲基化状态

对 DBC2 启动子 CpG 岛甲基化状况的检测结果显示,乳腺癌细胞 T-47D 仅甲基化引物扩增出特异性条带, MCF-7、MDA-MB-231 组甲基化与非甲基化引物均扩增出特异性条带, 而 MCF-10 组仅非甲基化引物扩增出特异性条带(见图 2), 表明仅乳腺癌细胞 DBC2 基因启动子发生了甲基化, 而正常乳腺细胞 DBC2 基因未发生甲基化。

2.3 T-47D 细胞经 5-Aza-CdR 处理后 DBC2 基因启动子甲基化状态的比较

T-47D 细胞经不同浓度的去甲基化药物 5-Aza-CdR 处理后非甲基化引物扩增出特异性条带, 且随浓度的增加, 非甲基化引物条带变宽, 而对对照组仅甲基化引物扩增出特异性条带, 说明乳腺癌细胞株 T-47D 在 5-Aza-CdR 的作用下 DBC2 发生了去甲基化。见图 3。

2.4 T-47D 细胞经 5-Aza-CdR 处理后 DBC2 mRNA 表达水平的比较

0 mol/L 5-Aza-CdR DBC2 mRNA 表达缺失, 而在 5 mol/L 组和 10 mol/L 组均检测到了不同表达水

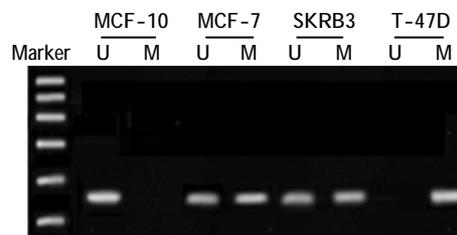


图 2 乳腺癌细胞株和正常乳腺细胞 DBC2 启动子区甲基化分析

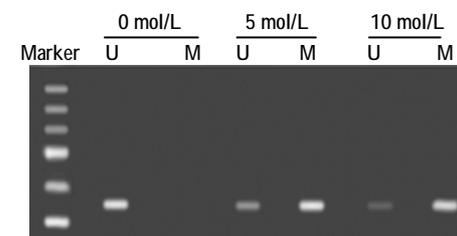


图 3 不同浓度 5-Aza-CdR 处理后 T-47D 细胞 DBC2 基因启动子甲基化状态

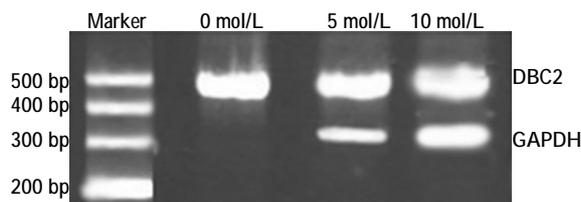


图 4 不同浓度 5-Aza-CdR 处理 T-47D 细胞后 DBC2 的表达

平的 *DBC2* mRNA(见图 4)。表明在去甲基化药物的作用下,乳腺癌细胞株 T-47D *DBC2* mRNA 的表达水平也提高了。

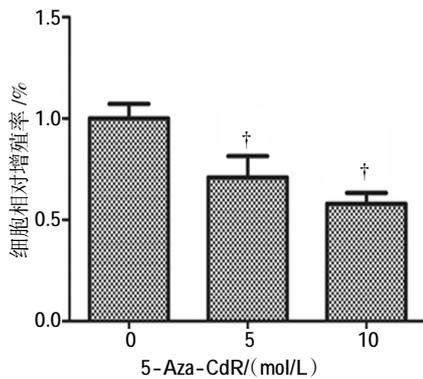
2.5 T-47D 细胞经 5-Aza-CdR 处理后细胞增殖的比较

T-47D 细胞经 5-Aza-CdR 处理后,5 mol/L 组

表 2 T-47D 细胞经 5-Aza-CdR 处理后细胞相对增殖率

5-Aza-CdR 浓度	相对增殖率 I/(%, $\bar{x} \pm s$)
0/(mol/L)	1.00 ± 0.072
5/(mol/L)	0.71 ± 0.105 [†]
10/(mol/L)	0.58 ± 0.053 [†]
F 值	21.338
P 值	0.002

注:†与 0 mol/L 5-Aza-CdR 组比较, $P < 0.05$



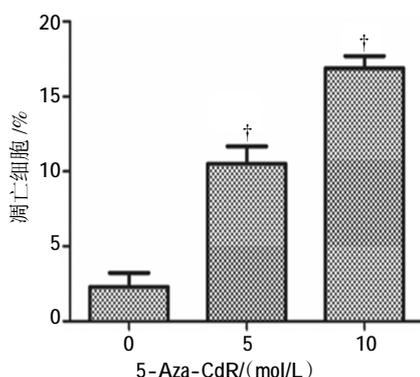
†与 0 mol/L 5-Aza-CdR 组比较, $P < 0.05$

图 5 不同浓度 5-Aza-CdR 对 T-47D 细胞增殖的影响

表 3 不同浓度 5-Aza-CdR 处理后细胞凋亡率

5-Aza-CdR 浓度	细胞凋亡率 I/(%, $\bar{x} \pm s$)
0/(mol/L)	2.32 ± 0.931
5/(mol/L)	10.53 ± 1.173 [†]
10/(mol/L)	16.90 ± 0.815 [†]
F 值	166.802
P 值	0.000

注:†与 0 mol/L 5-Aza-CdR 组比较, $P < 0.05$



†与 0 mol/L 5-Aza-CdR 组比较, $P < 0.05$

图 6 不同浓度 5-Aza-CdR 对 T-47D 细胞凋亡的影响

和 10 mol/L 组细胞增殖率低于对照组(71% vs 85%; 58% vs 85%),且随 5-Aza-CdR 浓度增加,T-47D 细胞增殖呈下降趋势(见表 2、图 5)。

2.6 T-47D 细胞经 5-Aza-CdR 处理后细胞凋亡率的比较

经流式细胞仪检测发现,5 和 10 mol/L 5-Aza-CdR 均可提高乳腺癌细胞株 T-47D 的细胞凋亡率 ($P < 0.05$)(见表 3、图 6)。

3 讨论

抑癌基因在乳腺癌中的表达是研究者们对乳腺癌诊断和治疗研究的主要方向。HAN 等^[6]在研究中发现乳腺癌、肺癌^[6],骨肉瘤^[6]以及甲状腺癌^[6]等肿瘤中均存在 *DBC2* 基因表达降低或缺失的现象。由 *DBC2* 基因编码的 RhoBTB2 蛋白一种非典型的 Rho GTP 酶,可通过招募蛋白到 Cul3 泛素连接酶复合物来使肿瘤变性^[7],因此 *DBC2* 蛋白的失活可能是细胞癌化过程中至关重要的一步。MAO^[8]等体外研究发现, *RhoBTB2* 基因在卵巢癌、宫颈癌、胃癌以及乳腺癌细胞株 MCF-7 和 SKBR3 中均有表达,而在乳腺癌细胞株 T-47D 中表达缺失,这与本研究结果类似。表明 *DBC2* 作为乳腺癌的抑癌因子,其表达的失活可能也是乳腺癌发生的原因之一。另一方面, *DBC2* 基因的表达也具有细胞特异性。

越来越多的研究表明,抑癌基因启动子区甲基化对乳腺癌的发病机制具有十分重要的作用^[8-9]。MIRZAEI 等^[10]对 50 例乳腺癌患者的临床试验发现乳腺癌患者 *DBC2* 启动子区高甲基化频率高于正常乳腺组织。在本实验中, *DBC2* 表达沉默的 T-47D 细胞也检测出了 *DBC2* 启动子区的高甲基化状态,预示着 *DBC2* 基因的表达与其启动子区甲基化状态之间具有一定的联系。HAN^[6]对 87 例乳腺癌组织的研究中发现,有 49 例 *DBC2* mRNA 缺失,并进一步分析发现,乳腺癌组织 *DBC2* 表达水平低于正常组织,且乳腺癌组织 *DBC2* 启动子区发生甲基化的频率也高于对照组,表明 *DBC2* 表达沉默可能是其启动子区甲基化的结果。SHI 等^[11]在膀胱癌的研究也发现癌症组织中 *DBC2* 启动子区甲基化的频率显著高于正常组织,并且 *DBC2* 启动子区的高甲基化状态与其基因的失活具有一定的相关性。王红岩等^[12]在胃癌中亚发现 *DBC2* 表达水平在癌组织中的表达下调,伴随着其启动子区的高甲基化。为进一步加强这个结论,本研究利用 5-Aza-CdR 成功逆转 *DBC2* 基

因启动子区的甲基化状态,并通过RT-PCR实验发现启动子区处于甲基化的对照组*DBC2*基因表达缺失,而实验组*DBC2*基因得到了表达。由此推测高甲基化导致的*DBC2*失活可能是乳腺细胞癌变进程中至关重要的一步。

*DBC2*参与各种各样的细胞功能如蛋白的运输、细胞骨架的调节、细胞凋亡和细胞周期的调节^[2]。本研究发现通过逆转*DBC2*基因启动子区甲基化状态,抑制了T-47D细胞的增殖。这种抑制作用主要是通过将细胞周期阻滞在G₁期来实现的^[13],其分子机制可能有以下2个方面:①*DBC2*通过对细胞周期蛋白D1的负调控,下调cyclinD1 mRNA的表达^[14];②*DBC2*是E2F1转录因子的靶基因,而转录因子E2F1家族主要负责激活基因翻译和细胞周期过程中必需的DNA复制^[5]。在cyclinD1和E2F1转录因子的双重作用下,使乳腺癌细胞无法从G₁期进入S期,从而表现为G₁期滞留的现象,进而抑制乳腺癌细胞的增殖。本研究中5-Aza-CdR处理使*DBC2*基因表达被激活后,乳腺癌细胞T-47D细胞凋亡率也提高了。WANG等^[9]指出*DBC2*通过线粒体凋亡信号通路诱导甲状腺癌细胞凋亡。另一方面,*DBC2*不仅是E2F1作用于有丝分裂的靶基因,同时也是E2F1作用于细胞凋亡的靶基因^[15],因此,*DBC2* mRNA表达增加而促进乳腺癌细胞凋亡的机制可能是一种依赖E2F1并作用于线粒体凋亡途径的机制。

综上所述,本研究表明乳腺癌细胞株T-47D存在*DBC2*基因甲基化异常以及表达缺失现象,并且*DBC2*基因在乳腺癌的表达对乳腺癌细胞的增殖和凋亡均具有一定的作用。总之,肿瘤抑制基因*DBC2*的失活是乳腺癌的发生发展进程中一个重要的事件,而*DBC2*的表达与其启动子区的甲基化状态密切相关。但本研究对于*DBC2*影响乳腺癌细胞增殖和凋亡的机制尚未进行研究,下一步应着重对*DBC2*影响乳腺癌细胞增殖和凋亡的具体机制进行深层次的研究。本研究将有助于更清楚地阐明乳腺癌的病理学机制,为乳腺癌的临床诊断和治疗提供新的思路和方向。

参 考 文 献:

- [1] MAO H, QU X, YANG Y, et al. A novel tumor suppressor gene RhoBTB2 (DBC2): frequent loss of expression in sporadic breast cancer[J]. Mol Carcinog, 2010, 49(3): 283-289.
- [2] MAO H, ZHANG L, YANG Y, et al. RhoBTB2(DBC2) functions as tumor suppressor via inhibiting proliferation, preventing colony formation and inducing apoptosis in breast cancer cells [J]. Gene, 2011, 486 (1/2): 74-80.
- [3] WANG C J, YANG D, LUO Y W, et al. RhoBTB2 (DBC2) functions as a multifunctional tumor suppressor in thyroid cancer cells via mitochondrial apoptotic pathway[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(4): 5954-5958.
- [4] HAN L, HOU L, SONG J, et al. Decreased expression of the DBC2 gene and its clinicopathological significance in breast cancer: correlation with aberrant DNA methylation[J]. Biotechnol Lett, 2013, 35(8): 1175-1181.
- [5] DONG W, MENG L, SHEN H C, et al. Loss of DBC2 expression is an early and progressive event in the development of lung adenocarcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(5): 2021-2023.
- [6] JIN Z, HAN Y X, HAN X R, et al. Downregulated RhoBTB2 expression contributes to poor outcome in osteosarcoma patients[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2013, 28(10): 709-716.
- [7] WILKINS A, CARPENTER C L. Regulation of RhoBTB2 by the Cul3 ubiquitin ligase complex[J]. Methods Enzymol, 2008(439): 103-109.
- [8] AVRAHAM A, CHO S S, UHIMANN R, et al. Tissue specific DNA methylation in normal human breast epithelium and in breast cancer[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91805.
- [9] MURRIA R, PALANCA S, JUAN I D, et al. Methylation of tumor suppressor genes is related with copy number aberrations in breast cancer [J]. American Journal of Cancer Research, 2015, 5 (1): 375.
- [10] MIRZAEI M H, NORUZINIA M, KARBASSIAN H, et al. Evaluation of methylation status in the 5'UTR promoter region of the DBC2 gene as a biomarker in sporadic breast cancer [J]. Cell J, 2012, 14(1): 19-24.
- [11] SHI Y, CHEN J Y, YANG J, et al. DBC2 gene is silenced by promoter methylation in bladder cancer[J]. Urol Oncol, 2008, 26 (5): 465-469.
- [12] 王红岩,刘峥嵘,赵丹凤,等. DBC2在胃癌中的甲基化[J]. 中国医科大学学报, 2015, 44(2): 132-135.
- [13] 张波,王国斌,陈道达,等. DBC2基因诱导乳腺癌细胞周期G₁期阻滞的机制[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2008, 37(1): 48-54.
- [14] YOSHIHARA T, COLLADO D, HAMAGUCHI M, et al. Cyclin D1 down-regulation is essential for DBC2's tumor suppressor function [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 358 (4): 1076-1079.
- [15] FREEMAN S, MA Y W. RhoBTB2 (DBC2) is a mitotic E2F1 target gene with a novel role in apoptosis [J]. J Biol Chem, 2008, 283(4): 2353-2362.

(张西倩 编辑)