

三氧化二砷对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 雌激素受体 α 的去甲基化作用

马志俊^{1,2}, 张伟杰^{1,2}, 赵培荣², 王留兴^{1,2}

Demethylation of Estrogen Receptor- α in Breast Cancer Cells MDA-MB-231 after Treated by Arsenic Trioxide

MA Zhi-jun^{1,2}, ZHANG Wei-jie^{1,2}, ZHAO Pei-rong², WANG Liu-xing^{1,2}

1. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Tumor Center, Zhengzhou University

Corresponding Author: Wang Liu-xing, E-mail: wlx2246@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To study the expression of Estrogen receptor- α (ER α) after treatment with different concentration of arsenic trioxide in breast cancer cells MDA-MB-231, and explore its mechanism. **Methods** ER α negative human breast cancer cells MDA-MB-231 were treated by arsenic trioxide, methylation-specific PCR (MSP) was used to detect the methylation status of CpG island of the promoter of ER α gene, reverse transcriptase PCR (RT-PCR) was used to detect the expression level of ER α mRNA. The ER α -positive human breast cancer cells MCF-7 was used as the positive control. **Results** The CpG island of the promoter of ER α was hypermethylation in MDA-MB-231 cells, CpG island was demethylated and ER α mRNA expression was restored after treatment by As₂O₃. **Conclusion** Certain concentration of As₂O₃ can demethylate the CpG island of the promoter of ER α in breast cancer cells MDA-MB-231 and restores its mRNA expression.

Key words: Breast cancer; Estrogen receptor- α (ER α); Arsenic trioxide(As₂O₃); Methylation; Demethylation

摘要:目的 研究三氧化二砷(As₂O₃)作用于乳腺癌细胞 MDA-MB-231 后,对雌激素受体 α (ER α)表达的影响,并初步探讨其机制。**方法** 用 As₂O₃ 处理 ER α 阴性的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231,甲基化特异性 PCR(MSP)检测 ER α 启动子 CpG 岛的甲基化状态,反转录 PCR(RT-PCR)检测 ER α mRNA 表达水平的变化。以雌激素受体 α 阳性的人乳腺癌细胞 MCF-7 为阳性对照。**结果** MDA-MB-231 细胞 ER α 启动子 CpG 岛存在高甲基化,经过 As₂O₃ 处理后,CpG 岛高甲基化水平降低,ER α mRNA 恢复表达。**结论** 一定浓度的 As₂O₃ 能够使人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 ER α 启动子中的 CpG 岛发生去甲基化,重新恢复 mRNA 的表达。

关键词: 乳腺癌; 雌激素受体; 三氧化二砷(As₂O₃); 甲基化; 去甲基化

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)07-0749-03

0 引言

乳腺癌是全世界妇女发病率最高的恶性肿瘤之一,根据 ER α 表型差异,将乳腺癌分为两类,ER α 阳性和 ER α 阴性乳腺癌。其中 ER α 阴性乳腺癌约占 1/3,其恶性程度更高,预后更差,对内分泌治疗不敏感。ER α 失表达的机制目前并不很清楚,研究发现,ER α 阴性乳腺癌 ER α 基因表达沉默与基因重排、突变、缺失等无关,而可能与其启动子区 CpG 岛

异常甲基化有关^[1-2]。As₂O₃ 作为已被证实有确切去甲基化作用的传统中药,本身具有抑瘤作用。本实验初步探讨了具有我国特色抗肿瘤药物 As₂O₃ 对 MDA-MB-231 细胞系雌激素受体基因 CpG 岛去甲基化的作用^[3]。

1 材料和方法

1.1 材料

IL-15、EDTA、胎牛血清、胰蛋白酶及 RPMI1640 培养液购自 GIBCO 公司,As₂O₃ 购自哈尔滨伊达药业公司,DNA、RNA 提取试剂盒及甲基化修饰试剂盒均购自 EPIGENTEK 公司,反转录试剂盒购自 MBI(Fermentas)公司,ER α 阴性人乳腺癌

收稿日期:2010-11-22;修回日期:2011-03-31

作者单位:1. 450052 郑州,郑州大学第一附属医院肿瘤科;2. 郑州大学肿瘤中心

通信作者:王留兴, E-mail: wlx2246@yahoo.com.cn

作者简介:马志俊(1981-),男,硕士,住院医师,主要从事肿瘤内科化疗工作

细胞株 MDA-MB-231 及 ER α 阳性人乳腺癌细胞株 MCF-7 均购于中科院北京细胞库。

1.2 细胞培养和药物处理

MCF-7 乳腺癌细胞用含 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养液在 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度下进行常规培养;MDA-MB-231 乳腺癌细胞用含 10% 胎牛血清 IL-15 培养液在 37℃ 恒温箱中培养。MDA-MB-231 细胞根据 As₂O₃ 作用的浓度分为 0、0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ 5 组, MCF-7 细胞为阳性对照。

1.3 甲基化特异性 PCR(MSP)

按照试剂盒说明书,从各组细胞中提取 DNA,经甲基化修饰后扩增。甲基化特异性的 ER α 基因引物序列 ER α (M)扩增修饰后甲基化 DNA;去甲基化特异性的 ER α 基因引物序列 ER α (U)扩增修饰后去甲基化 DNA^[4],见表 1。

按照 PCR 总反应体系为 50 μl ,含有 10 $\times$ GC 缓冲液 5 μl ,4 mmol/L dNTP Mixture 2 μl 、上下游引物(10 mmol/L)各 2 μl ,已修饰的模板 DNA 2 μl ,Taq 酶 0.5 μl ,双蒸水 36.5 μl ,以此反应体系置于 PCR 扩增仪器中进行 35 个循环,退火温度:引物 ER α (M)55℃,引物 ER α (U)53℃。扩增片段用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.4 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)

每组细胞均用 As₂O₃ 作用 72 h。所用引物为 ER α 特异性引物和内参 β -actin 的引物序列、大小及目的基因片段长度如表 2 所示。

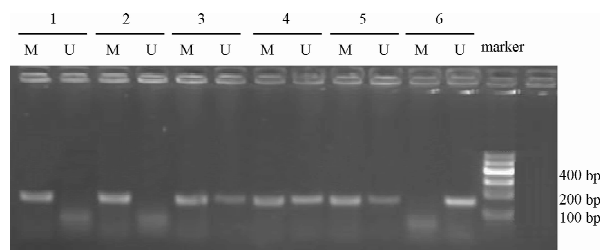
按照试剂盒说明书,从各组细胞中提取总 RNA,先反转录合成单链 cDNA,再以此反转录产物为模板进行 PCR 反应扩增目的基因条带。反应

体系同 MSP,退火温度 55℃,扩增片段经含 EB 的 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2 结果

2.1 甲基化特异性 PCR(MSP)

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳显示:当 As₂O₃ 浓度是 0 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,只出现甲基化条带,在 As₂O₃ 浓度为 1、2 及 4 $\mu\text{mol/L}$ 时,出现去甲基化改变,其中在 As₂O₃ 浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时,去甲基化作用最为明显,但较阳性对照细胞弱,见图 1。



M(methylation):151 bp ;U(demethylation):158 bp ;1~5: the concentration of As₂O₃:0,0.5,1.0,2.0 and 4.0 $\mu\text{mol/L}$;6:MCF-7

图 1 不同浓度 As₂O₃ 处理后的 MDA-MB-231 细胞 ER α 甲基化状态

Figure 1 The methylation status of ER α after treatment with different concentration of As₂O₃

2.2 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)

RT-PCR 反应产物经琼脂糖凝胶电泳显示:在 As₂O₃ 浓度为 0 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,未出现扩增的目的基因片段,而在 As₂O₃ 浓度为 1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 时,可以出现扩增的目的基因条带,说明 ER α mRNA 恢复表达,但其表达作用强弱不同,在 2 $\mu\text{mol/L}$ 最强,但比阳性对照细胞 MCF-7 弱,见图 2。

表 1 MS-PCR 引物和产物片段长度

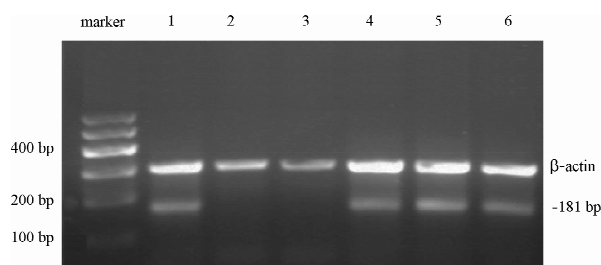
Table 1 The primers and the length of products in MS-PCR

Genes	Primers sequence 5'-3'	PCR products(bp)
ER α (M)F	5'-CGAGTTGGAGTTTTTGAATCGTTC-3'	151
ER α (M)R	5'-CTACGCGTTAACGACGACCG-3'	
ER α (U)F	5'-ATGAGTTGGAGTTTTTGAATGTGTTT-3'	158
ER α (U)R	5'-ATAAACCTACACATTAACAACAACCA-3'	

表 2 RT-PCR 引物和产物长度

Table 2 The primers and the length of products in RT-PCR

Genes	Primers sequence 5'-3'	PCR products(bp)
ER α (F)	5'-GTCTGGTCCCTGTG-3'	181
ER α (R)	5'-CGTATCCACCTTICATC-3'	
β -actin(F)	5'-GGCCAACCGCGAGAAGATG3'	301
β -actin(R)	5'-GTCCAGGGCGACGTAGcACGA'	



1: MCF-7; 2: negative control; 3~6: the concentration of As_2O_3 : 0, 5, 1, 0, 2, 0 and 4. 0 $\mu\text{mol/L}$

图 2 不同浓度 As_2O_3 作用于 MDA-MB-231 细胞后 $\text{ER}\alpha$ mRNA 的表达

Figure 2 The expression of $\text{ER}\alpha$ after treatment by different concentration of As_2O_3

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 根据 $\text{ER}\alpha$ 基因是否表达可分为激素依赖型和非激素依赖型。激素依赖型乳腺癌患者用内分泌治疗效果较好, 而非激素依赖型乳腺癌患者对内分泌治疗效果较差。近年来 Kawai 等^[6]研究证实, 基因表达沉默主要为基因启动子区 CpG 岛高甲基化所致, 用药物诱导使基因去甲基化可引起 $\text{ER}\alpha$ 再表达, 从而使乳腺癌细胞恢复对内分泌治疗的敏感度。唐波等^[7]已经验证 $\text{ER}\alpha$ 阴性人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 用胍苯哒嗪后能诱导 $\text{ER}\alpha$ mRNA 重新表达, 联合 TAM 能协同抑制 $\text{ER}\alpha$ 阴性乳腺癌细胞生长, 从而为 $\text{ER}\alpha$ 阴性乳腺癌开辟内分泌治疗途径提供新的实验依据。本实验用传统中药 As_2O_3 对 $\text{ER}\alpha$ 表达阴性的 MDA-MB-231 细胞进行干预, 结果显示: 其能使 MDA-MB-231 细胞 $\text{ER}\alpha$ mRNA 重新恢复表达, 从本实验的 MSP 和 RT-PCR 结果中可以验证, 这与文献报道一致^[5,7]。

As_2O_3 作为我国传统中药, 在急性早幼粒细胞白血病的治疗取得了显著的疗效, 但是关于 As_2O_3 对实体瘤的治疗报道甚少。 As_2O_3 通过以下作用可以诱导高甲基化水平细胞产生去甲基化: (1) 砷剂进入人体后的代谢所需的甲基来自 S-腺苷蛋氨酸, 而 DNA 甲基化也需要 S-腺苷蛋氨酸作为甲基供体^[8], 形成了竞争抑制作用。 (2) As_2O_3 是公认的巯基酶抑制剂, 可直接抑制 DNA 甲基化转移酶 (DNMT) 3A 和 3B 活性进而抑制 DNA 甲基化过程^[9]。 (3) As_2O_3 代谢还产生 S-腺苷同型半胱氨酸, 而 S-腺苷同型半胱氨酸是 DNMT 的抑制物^[9], 并且

DNA 甲基化是由 DNMT 催化完成的, 故 As_2O_3 可进一步抑制 DNA 甲基化过程。

本实验设计正是通过 As_2O_3 的以上作用, 给予雌激素受体阴性人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 不同浓度的 As_2O_3 诱导, 通过上述作用导致 $\text{ER}\alpha$ 基因组低甲基化, 从而使因高甲基化沉默的 $\text{ER}\alpha$ 基因重新表达。在实验中, 通过给 MDA-MB-231 细胞不同浓度的 As_2O_3 处理, 可以发现浓度为 2. 0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 去甲基化作用最强, 可以得出: 在一定浓度范围内的 As_2O_3 去甲基化作用增强, 但超过一定的浓度其去甲基化作用反而减弱。这在王瑞等^[4]免疫组织化学和去甲基化测序图谱中已经得到证实。我实验室已经建立 MDA-MB-231 细胞荷瘤裸鼠模型, 本实验的后续动物体内研究正在进一步进行。

参考文献:

- [1] Hayashi SI, Eguchi H, Tanimoto K, et al. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2003, 10(2): 193-202.
- [2] Roger P, Sahla ME, Sari Mäkelä S, et al. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(6): 2537-2541.
- [3] 王冰, 王锦绣, 王留兴, 等. 三氧化二砷体外诱导雌激素受体 α 表达的初步研究[J]. *肿瘤基础与临床*, 2006, 19(3): 183-184.
- [4] 王瑞, 李林蔚, 王留兴, 等. 人乳腺癌细胞雌激素受体基因的去甲基化及其表达[J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(12): 894-897.
- [5] Cui X, Wakai T, Shirai Y, et al. Arsenic trioxide inhibits DNA methyltransferase and restores methylation-silenced genes in human liver cancer cells[J]. *Hum Pathol*, 2006, 37(3): 298 - 311.
- [6] Kawai H, Li H, Avraham S, et al. Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha[J]. *Int J Cancer*, 2003, 107(3): 353-358.
- [7] 唐波, 彭志红, 姜军, 等. 胍苯哒嗪与三苯氧胺协同抗雌激素受体 α 阴性乳腺癌的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(5): 538-540.
- [8] Seol J G, Park WH, Kim ES, et al. Effect of arsenic trioxide on cell cycle arrest in head and neck cancer cell line PCI-I[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 265(2): 400-404.
- [9] Ishitsuka K, Hanada S, Uozumi K, et al. Arsenic trioxide and the growth of human T-cell leukemia virus type I infected T-cell lines[J]. *Leuk Lymphoma*, 2000, 37(5-6): 649-655.

[编辑: 刘红武; 校对: 贺文]