

5-氮杂-2'-脱氧胞苷对非小细胞肺癌体外生长及侵袭能力和TFPI-2基因mRNA表达的影响



梁江水^{1,2}, 董永强¹, 张晓明¹, 殷桂林^{1,2}, 朱水波¹, 纪涛¹
Effect of 5-Aza-CdR on Growth and Invasion Ability of Non-small Cell Lung Cancer A549 and Expression of TFPI-2 Gene mRNA *in vitro*

LIANG Jiangshui^{1,2}, DONG Yongqiang¹, ZHANG Xiaoming¹, YIN Guilin^{1,2}, ZHU Shuibo¹, JI Tao¹

1.Department of Thoracic Cardiovascular Surgery, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China; 2. Southern Medical University Affiliated Clinical College of Wuhan

Corresponding Author: ZHANG Xiaoming, E-mail: whzyyzxm@sina.com

Abstract: Objective To explore the effect of 5-aza-2-deoxycytidine(5-Aza-CdR) on the proliferation of non-small cell lung cancer cell line A549 and the expression of tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI-2) gene mRNA, and to explore whether 5-Aza-CdR could inhibit the invasion capacity of NSCLC A549 cell via TFPI-2 gene. **Methods** A549 cells were treated with 5-Aza-CdR at different concentrations. The proliferation of A549 cells was detected by MTT assay after treatment for 24 h, 48 h and 72 h, respectively. Cell cycle of A549 cells were analyzed by flow cytometer(FCM) after treatment for 72 h. The expression of TFPI-2 gene mRNA was detected by real time polymerase chain reaction(real-time PCR) after treatment for 72 h, and invasion capacity of A549 cells was detected by Transwell assay after treatment for 24 h. **Results** MTT showed that A549 cell growth had been restrained after treatment at different concentrations for 24 h, 48 h and 72 h, respectively, in an obvious dose- and time-dependence manner. FCM and real-time PCR showed that after treatment at the concentration of 0, 1, 5, 10 μ M for 72 h respectively, proliferation indexes of A549 cells were (30.43 $\pm$ 0.99)%, (23.89 $\pm$ 0.83)%, (16.19 $\pm$ 0.34)%, (6.49 $\pm$ 0.55)%($P<0.05$), and relative mRNA expression levels of TFPI-2 gene were (1 $\pm$ 0), (1.49 $\pm$ 0.14), (1.86 $\pm$ 0.09), (5.80 $\pm$ 0.15)($P<0.05$), and TFPI-2 gene mRNA expression had increased along with the increasing concentration of 5-Aza-CdR. Transwell small chamber assay showed that the average numbers of cells passed the membrane was (316.15 $\pm$ 18.7), (84.15 $\pm$ 12.14), (28.85 $\pm$ 7.13) and (14.35 $\pm$ 3.33) at the concentration of 0, 1, 5, 10 μ M respectively($P<0.05$). **Conclusion** 5-Aza-CdR could restore TFPI-2 gene expression in NSCLC cell line A549 cells and restrain the proliferation and invasion capacity of A549 cells by reducing TFPI-2 gene methylation.

Key words: Non-small cell lung cancer; 5-aza-2-deoxycytidine(5-Aza-CdR); Tissue factor pathway inhibitor 2; Methylation

摘 要:目的 探讨5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)干预对非小细胞肺癌(non-small cell non cancer, NSCLC)细胞株A549生长增殖及其组织因子途径抑制物2(tissue factor pathway inhibitor-2, TFPI-2)基因表达的影响,同时探讨5-Aza-CdR能否通过恢复TFPI-2基因表达抑制非小细胞肺癌A549细胞侵袭能力。**方法** 用不同浓度的5-Aza-CdR处理A549细胞株,MTT法检测药物处理24、48、72 h后的细胞增殖活性,流式细胞仪(flow cytometry, FCM)法检测药物处理72 h后细胞周期分布,Real-time PCR技术检测药物处理72h后A549细胞TFPI-2基因mRNA的表达,Transwell小室法测定药物处理24h后A549细胞体外侵袭能力的变化。**结果** MTT检测显示不同浓度5-Aza-CdR处理A549细胞

24、48、72h后,细胞的生长受到抑制,且抑制作用呈明显的剂量和时间依赖性。FCM检测分析显示0、1、5、10 μ M 5-Aza-CdR处理A549细胞72 h 后,细胞增殖指数逐渐降低,分别为(30.43 $\pm$ 0.99)%、(23.89 $\pm$ 0.83)%、(16.19 $\pm$ 0.34)%、(6.49 $\pm$ 0.55)%($P<0.05$)。Real-time

收稿日期: 2013-02-17; 修回日期: 2013-07-05
基金项目: 武汉市青年科技晨光计划项目(201050231090)
作者单位: 1.430070 武汉, 广州军区武汉总医院心胸外科; 2.南方医科大学附属武汉临床学院
通信作者: 张晓明, E-mail: whzyyzxm@sina.com
作者简介: 梁江水 (1986-), 男, 硕士在读, 主要从事肺癌防治的基础及临床研究

PCR检测显示0、1、5、10 μM的5-Aza-CdR处理A549细胞72 h后，相对mRNA表达水平分别为（1±0）、（1.49±0.14）、（1.86±0.09）、（5.80±0.15）（*P*<0.05），TFPI-2 基因mRNA表达呈明显的上升趋势，且随着药物浓度增加而增加。Transwell小室法检测显示每一高倍镜下平均穿膜细胞数分别为（316.15±18.7）、（84.15±12.14）、（28.85±7.13）、（14.35±3.33），均明显低于对照细胞（*P*<0.05）。**结论** 5-Aza-CdR能通过降低TFPI-2基因的甲基化而恢复其在非小细胞肺癌细胞株A549细胞中的表达，并抑制A549细胞的增殖和侵袭。

关键词：非小细胞肺癌；5-氮杂-2'-脱氧胞苷；组织因子途径抑制物2；甲基化

中图分类号：R734.2 **文献标识码：**A

0 引言

组织因子途径抑制物2(TFPI-2)属于Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制物超家族蛋白，是近年来发现的一种广谱的丝氨酸蛋白酶抑制物，可以抑制多种恶性肿瘤的生长、血管生成、浸润及转移。近年来研究发现在常见的恶性肿瘤包括肺癌，TFPI-2基因启动子区甲基化使TFPI-2表达下降或者缺失，这与肿瘤的生长、浸润及转移有关^[1-4]。5-Aza-CdR可通过抑制基因启动区的高度甲基化而恢复多种基因活性，逆转肿瘤的恶性表型^[5-6]。本研究通过5-Aza-CdR干预非小细胞肺癌细胞系A549细胞后，检测TFPI-2 mRNA的表达，并观察5-Aza-CdR处理后A549细胞的增殖、侵袭，以验证5-Aza-CdR能通过去甲基化而恢复TFPI-2 mRNA在非小细胞肺癌细胞株A549细胞中的表达，抑制A549细胞的生长增殖和侵袭。

1 材料与方法

1.1 材料

A549细胞株购自武汉大学中国典型培养物保藏中心；RPMI 1640培养液购自美国Hyclone 公司；5-Aza-CdR、DMSO、MTT液及碘化丙啶均购自美国Sigma公司；流式细胞仪购自美国BD公司；Trizol Reagent购自美国Invitrogen公司；定量PCR试剂盒购自日本TOYOBO公司；荧光定量PCR仪购自上海宏石医疗科技有限公司；Transwell小室购自美国Corning公司。

1.2 细胞培养及实验分组

非小细胞肺癌细胞株A549细胞贴壁培养生长于RPMI 1640培养液，内含10%的胎牛血清、100 u/ml青霉素和100 μg/ml链霉素，置于37℃、5%CO₂的恒温闭式培养箱内培养，细胞呈贴壁生长，将对数期细胞以0.1%胰蛋白酶消化，传代。按不同浓

度的5-Aza-CdR分组：对照组：未加5-Aza-CdR干预，加入等量普通培养液组。实验组：（1）加入1 μM的5-Aza-CdR干预组。（2）加入5 μM的5-Aza-CdR干预组。（3）加入10 μM的5-Aza-CdR干预组。

1.3 MTT法检测5-Aza-CdR处理后24、48、72 h的细胞增殖活性

取处理前的对数生长期的细胞，按每孔接种1×10⁴个细胞接种于96孔细胞培养板，每块培养板共接种4组，每组3孔，接种后等细胞贴壁（24 h）后去上清液，实验组加入含不同浓度（1、5、10 μM）的5-Aza-CdR培养液，对照组加入等量培养液，继续置于37℃、5%CO₂的恒温闭式培养箱内培养，处理24、48、72 h后，每孔加入MTT溶液（10 mg/L）20 μl，孵育4 h，去除孔内上清液，每孔加入150 μl二甲基亚砷（DMSO），置振荡器振荡10 min，使结晶物充分溶解。采用酶标仪于490 nm波长处检测吸光度值（OD值），5-Aza-CdR对细胞增殖活性的影响用细胞抑制率来表示，细胞增殖抑制率=（对照组OD值-实验组OD值）/对照组OD值×100%，绘制细胞增殖曲线。实验重复3次。

1.4 FCM法检测药物处理72 h后的细胞周期分布

已传代的非小细胞肺癌A549细胞株在6孔培养板培养24 h后，去除培养液，实验组加入含不同浓度（1、5、10 μM）的5-Aza-CdR培养液，对照组加入等量普通培养液，将培养板继续置于37℃、5%CO₂的恒温闭式培养箱内培养，72 h后回收细胞，以0.1%胰蛋白酶消化并收集于4℃离心机离心（1500 r/min，5 min），磷酸盐缓冲液（PBS）清洗3次，70%冰乙醇固定，用RNaseA（终浓度为0.1 g/L）消化30 min，加入0.05 g/L碘化丙啶（PI）250 μl，室温避光染色30 min后上机检测。以增殖指数（proliferation index,PI）衡量细胞分裂活动，PI=(S+G₂/M)/(G₀/G₁+S+G₂/M)。

1.5 Real-time PCR检测用药后细胞的TFPI-2 mRNA表达变化

收集5-Aza-CdR作用72 h后各组A549细胞，用Trizol试剂提取各组细胞总RNA。用反转录酶和Oliga(dT)20引物合成cDNA。TFPI-2 mRNA及内标基因mRNA的引物序列，见表1。反应体系均为25 μl，PCR反应条件为：95℃预变性1 min，94℃变性15 s，58℃退火20 s，72℃延伸20 s，共进行40个循环，72℃延伸5 min。溶解曲线：72℃→95℃，每20 s升温1℃。结果处理：ΔCt=Ct_{TFPI-2}-Ct_{β-actin}，ΔΔCt=ΔCt_{实验组}-ΔCt_{对照组}，相对mRNA表达倍数=2^{-ΔΔCt}。实验重复三次。

表1 TFPI-2 mRNA及内标基因mRNA的real-time PCR引物序列

Table1 Real-time PCR primer of TFPI-2 mRNA and internal standard gene mRNA

Primer	Sequence	Tm	Product
TFPI-2-F	5'-TTCTCCGTTACTACTAC- GACAGG-3'	58℃	124 bp
TFPI-2-R	5'-TCTATCCTCCAG- CAAGCATCGT-3'	58℃	124 bp
β-actin-F	5'-GTCCACCGCAAAT- GCTTCTA-3'	59℃	190 bp
β-actin-R	5'-TGCTGTCACCTTCACC- GTTC-3'	59℃	190 bp

Notes:F:forward primer;R:reverse primer

1.6 体外侵袭实验检测药物处理后A549细胞的侵袭能力

于穿膜小室的下室内加入含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液，上室加入经不同浓度5-Aza-CdR处理后的细胞悬液，每组设3个滤膜，置于培养箱中作用24 h，将小室取出，用PBS洗去培养液，结晶紫染色10 min；自来水将表面的结晶紫洗除干净，用棉签将上室中的细胞擦除干净，于倒置显微镜下(×200)对非细胞接种侧拍照,以穿膜细胞数的多少表示细胞侵袭能力的大小。

1.7 统计学方法

计量数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。应用SPSS 13.0统计软件分析，采用Levene法进行方差齐性检验，若方差齐，数据采用方差分析(ANOVA)检验，组间比较用LSD检验；若方差不齐，用Games-Howell法进行分析。

2 结果

2.1 5-Aza-CdR处理24、48、72 h后的A549细胞生长抑制率

5-Aza-CdR对A549细胞生长的抑制作用呈明显的剂量和时间依赖性。当作用时间相同时，A549细胞的生长抑制率随着5-Aza-CdR浓度的增加而逐渐增高，差异有统计学意义($P<0.05$)；当5-Aza-CdR浓度相同时，A549细胞的生长抑制率随着作用时间的延长也逐渐增高，差异也有统计学意义($P<0.05$)，见图1。

2.2 5-Aza-CdR处理72 h后A549细胞周期分布

流式细胞仪检测显示，0、1、5、10 μM 5-Aza-CdR作用72 h后，随着其浓度的增加，G₀/G₁期的细胞数量逐渐增加，S期细胞数逐渐下降，细胞增殖指数减低，与对照组相比， $P<0.05$ ，差异有统计学意义，见表2。

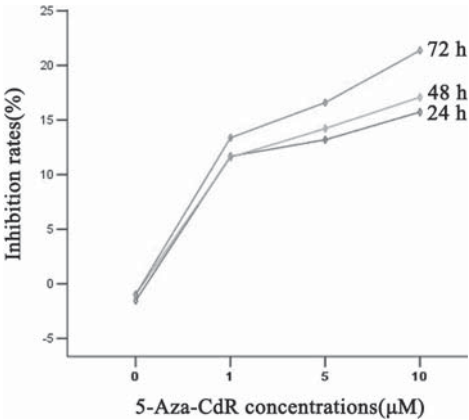


图1 不同浓度5-Aza-CdR作用不同时间后A549细胞的生长抑制率曲线

Figure1 Growth curve of A549 cells treated with different concentration of 5-Aza-CdR for different time

表2 不同浓度5-Aza-CdR处理A549细胞72 h后细胞周期的变化($\bar{x}\pm s$, %)

Table2 Cell cycle change of A549 cells treated with different concentrations of 5-Aza-CdR for 72 h ($\bar{x}\pm s$, %)

5-Aza-CdR concentration (μM)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	PI
0	69.57±0.99	29.77±0.43	0.67±0.59	30.43±0.99
1	76.11±0.83*	23.65±0.96*	0.23±0.34	23.89±0.83*
5	83.80±0.35*	15.67±0.75*	0.52±0.50	16.19±0.34*
10	95.51±0.55*	1.73±0.45*	4.75±0.11*	6.49±0.55*

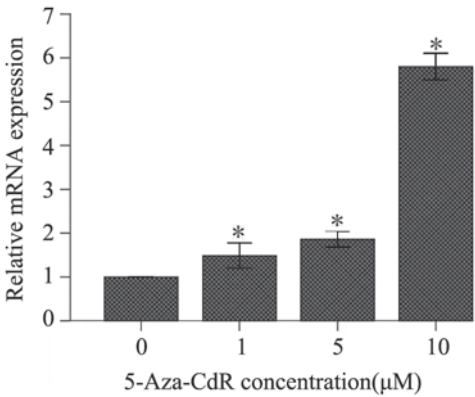
Notes: *: $P<0.05$ vs. control group (0 μM)

2.3 5-Aza-CdR处理A549细胞72 h后TFPI-2 mRNA的表达

经5-Aza-CdR处理72 h后，TFPI-2 mRNA重新表达，与对照组相比，各实验组TFPI-2 mRNA表达呈明显的上升趋势，5-Aza-CdR浓度为0、1、5、10 μM时，相对mRNA水平分别为(1±0)、(1.49±0.14)、(1.86±0.09)、(5.80±0.15) ($P<0.05$)，见图2。

2.4 5-Aza-CdR处理24 h后对A549细胞侵袭能力的影响

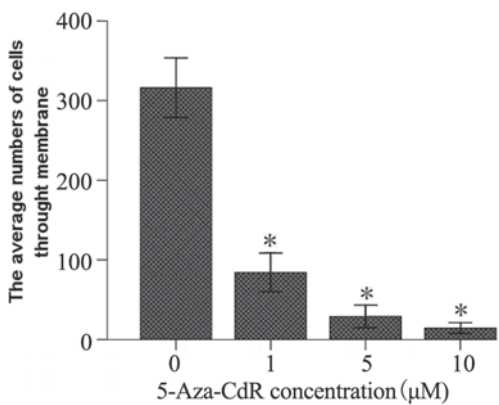
Transwell小室上室细胞穿过matrigel到膜的下室面，其细胞数量反映了细胞侵袭能力的大小。收集5-Aza-CdR处理24 h后的A549细胞，采用Transwell小室模型检测A549细胞侵袭情况。5-Aza-CdR浓度为0、1、5、10 μM时，每一高倍镜下平均穿膜细胞数(316.15±18.7)、(84.15±12.14)、(28.85±7.13)、(14.35±3.33)，与对照组比较，实验组穿过滤膜的癌细胞数明显下降，且与浓度相关($P<0.05$)，见图3、4。



*: $P < 0.05$ vs. control group (0 μM)

图2 不同浓度5-Aza-CdR处理A549细胞72 h后TFPI-2 mRNA的表达情况

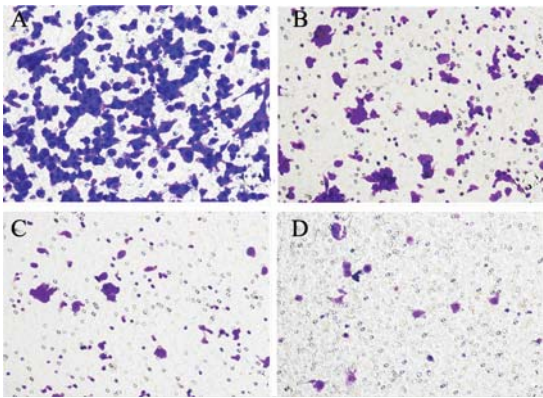
Figure2 Relative TFPI-2 mRNA expression after A549 cells treated with different concentration of 5-Aza-CdR for 72 h



*: $P < 0.05$ vs. control group (0 μM)

图4 Transwell小室模型检测不同浓度5-Aza-CdR处理24 h后A549细胞平均穿膜细胞数

Figure4 Average cells transmembrane number of A549 cells treated with different concentration of 5-Aza-CdR for 24 h detected by Transwell assay



A: control group (0 μM); B: 1 μM group; C: 5 μM group; D: 10 μM group

图3 不同浓度的5-Aza-CdR处理A549细胞24 h后高倍显微镜下细胞穿膜结果(结晶紫染色 ×200)

Figure3 Cells transmembrane results of A549 cells treated with different concentration of 5-Aza-CdR for 24 h under high-power microscope (crystal violet staining ×200)

3 讨论

随着后基因组时代的到来，表观遗传学 (epigenetics) 研究越来越受到重视，DNA甲基化为表观遗传学的研究肿瘤开辟了一个新的领域^[7-8]。研究表明，DNA甲基化与肿瘤的发生和演进密切相关，它可通过基因组总体水平甲基化程度的降低和某些启动子区域甲基化程度的增高造成基因功能的失活，从而导致肿瘤的形成，这就是我们常说的甲基化理论。启动子甲基化异常不是随机事件，而是具有基因特异性和肿瘤特异性，启动子甲基化在肿瘤的早期阶段、癌前阶段已存在，可能是肿瘤发生的主要因素。迄今已发现许多恶性肿瘤存在一个或多个肿瘤抑制基因启动子甲

基化，这些相关的肿瘤抑制基因失活涉及多个环节，如细胞周期调控、DNA修复、细胞凋亡、肿瘤浸润等，从而导致恶性肿瘤的发生和进展^[9-10]。近年来研究发现在常见的恶性肿瘤（包括肺癌），TFPI-2基因启动子区甲基化使TFPI-2表达下降或者缺失，这与肿瘤的生长、浸润及转移有关^[1-4]。Rollin等^[4]研究发现TFPI-2基因甲基化失活能明显增加非小细胞肺癌的侵袭作用。进一步研究发现，TFPI-2基因启动子甲基化状态对于研究肿瘤的发生、发展、预后具有重要意义。研究发现，5-氮杂-2'-脱氧胞苷嘧啶能与DNA甲基化酶共价结合，抑制该酶的甲基转移活性，逆转肿瘤细胞的基因甲基化，恢复mRNA转录活性和蛋白表达，目前主要用于白血病等恶性血液病治疗，并取得了一定的疗效^[11]。

本研究将不同浓度的5-Aza-CdR作用于A549细胞，MTT检测显示不同浓度的5-Aza-CdR处理的A549细胞24、48、72 h后，细胞的生长受到抑制，且抑制作用呈明显的剂量和时间依赖性。FCM检测分析显示G₀/G₁期细胞逐渐增加，出现G₀/G₁阻滞，细胞增殖指数逐渐降低，随着5-Aza-CdR浓度增加，细胞增殖指数逐渐降低。Real-time PCR检测显示TFPI-2基因mRNA表达呈明显的上升趋势，且随着药物浓度增加而增加。本研究结果表明，5-Aza-CdR可通过抑制TFPI-2基因启动子区的高度甲基化而恢复其转录活性，从而发挥TFPI-2的抑制肿瘤生长及转移等作用。

侵袭和转移是恶性肿瘤最重要的特征之一，

也是肿瘤治疗失败的主要原因。本研究结果显示用不同浓度的5-Aza-CdR处理A549细胞后，其侵袭能力逐渐降低，且随着5-Aza-CdR浓度的升高和TFPI-2 mRNA表达水平的增高而下降，表明5-Aza-CdR可能通过TFPI-2基因表达的恢复而抑制非小细胞肺癌细胞的侵袭能力。

综上所述，5-Aza-CdR可抑制非小细胞肺癌细胞的生长增殖并降低癌细胞的侵袭能力，其机制可能与其干扰细胞周期并通过去甲基化作用提高其TFPI-2基因的表达有关。因此，5-Aza-CdR有可能成为非小细胞肺癌去甲基化治疗的新药物，TFPI-2可能是5-Aza-CdR治疗非小细胞肺癌有效的分子标志物之一。

参考文献：

[1] Vaitkienė P, Skiriutė D, Skauminas K,*et al.* Associations between TFPI-2 methylation and poor prognosis in glioblastomas[J]. Medicina (Kaunas),2012, 48(7):345-9.

[2] Zheng H,Tang ZG. Effect of 5-Aza-dC on expression and mathylation of TFPI-2 gene in Panc-1 pancreatic cancer[J].Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu,2012, 39(2):150-3. [郑浩, 汤志刚. 5-Aza-dC对胰腺癌细胞系Panc-1中TFPI-2基因甲基化水平及表达的影响[J].肿瘤防治研究, 2012, 39(2):150-3.]

[3] Wang S, Xiao X, Zhou X,*et al.* TFPI-2 is a putative tumor suppressor gene frequently inactivated by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma[J]. BMC Cancer, 2010, 10:617-21.

[4] Rollin J, Iochmann S, Ble'chet C, *et al.* Expression and methylation status of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in non-small-cell lung cancer[J].Br J Cancer,2005,92(4):775-83.

[5] Xiong Hh, Zhuang L,Xiong H,*et al.* Effects of 5-Aza-CdR on proliferation and apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cells and the expression of Apaf-1 gene[J].Zhonghua Shi Yan Wai Ke Za Zhi, 2009,26(3):324-6.[熊慧华,庄亮,熊华,等. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对人肺腺癌A549细胞增殖及Apaf-1基因表达的影响[J].中华实验外科杂志,2009,26(3):324-6.]

[6] Dong SW, Ma L, Xu N, *et al.* Research on the reactivation of Syk expression caused by the inhibition of DNA promoter methylation in the lung cancer[J]. Neoplasma, 2011,58(1):89-95.

[7] Lomberk G, Mathison AJ, Grzenda A, *et al.* The sunset of somatic genetics and the dawn of epigenetics: a new frontier in pancreatic cancer research[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2008, 24: 597-602.

[8] Brune K, Hong SM, Li A, *et al.* Genetic and epigenetic alterations of familial pancreatic cancers[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008,17: 3536-42.

[9] Chan AO, Rashid A. CpG island methylation in precursors of gastrointestinal malignancies [J]. Curr Mol Med, 2006, 6(4): 401-8.

[10] Fischer JR, Ohnmacht U, Rieger N, *et al.* Promoter methylation of RASSF1A, RARBeta and DAPK predict poor prognosis of patient, with malignant mesothelioma [J]. Lung Cancer, 2006, 54(1): 109-16.

[11] Kwong J, Lo KW, To KF,*et al.* Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(1): 131-7.

[编辑:黄国玲; 校对: 刘红武]