

# 叶酸对 DNMT1 和 MeCP2 在宫颈癌细胞中表达调节的实验研究

王金桃 吴婷婷 白兰 丁玲 郝敏 王云

**【摘要】 目的** 探讨宫颈癌细胞中叶酸对 DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 和甲基化 CpG 岛结合蛋白 2 (MeCP2) 表达的调节作用。**方法** 采用体外实验研究方法, 对宫颈癌细胞 Caski (HPV16 阳性) 和 C33A (HPV 阴性) 进行不同浓度 (10、50、100、500、750、1000  $\mu\text{g/ml}$ ) 叶酸干预, 分别采用 Western blot 和 real-time PCR 方法检测两种细胞中 DNMT1 和 MeCP2 蛋白的表达量和 mRNA 水平。**结果** 随着叶酸水平的升高, 两种细胞的生长抑制率 (C33A:  $r=0.984, P<0.001$ ; Caski:  $r=0.978, P=0.002$ ) 和凋亡率 (C33A:  $r=0.989, P<0.001$ ; Caski:  $r=0.994, P<0.001$ ) 均逐渐上升, DNMT1 蛋白表达 (C33A:  $r=-0.914, P<0.001$ ; Caski:  $r=-0.859, P=0.003$ ) 及 MeCP2 蛋白表达 (C33A:  $r=-0.830, P=0.005$ ; Caski:  $r=-0.981, P<0.001$ ) 均呈逐渐降低趋势, 而 DNMT1 和 MeCP2 mRNA 的 Ct 比值在两种细胞中的变化均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。相同叶酸浓度下, DNMT1 蛋白和 mRNA 表达水平在 Caski 细胞均较 C33A 细胞为高, 而 MeCP2 蛋白和 mRNA 表达水平则在 C33A 细胞较 Caski 细胞普遍为高。**结论** 补充叶酸可有效抑制宫颈癌细胞的增殖, 促进凋亡, 逆转 DNMT1 和 MeCP2 蛋白的异常表达; HPV16 感染与 DNMT1 功能异常对宫颈癌的发生可能有协同效应。

**【关键词】** 叶酸; 宫颈癌细胞; DNA 甲基转移酶 1; 甲基化 CpG 岛结合蛋白 2

**Effect of folate in modulating the expression of DNA methyltransferase 1 and methyl-CpG-binding protein 2 in cervical cancer cell lines** WANG Jin-tao<sup>1</sup>, WU Ting-ting<sup>1</sup>, BAI Lan<sup>1</sup>, DING Ling<sup>1</sup>, HAO Min<sup>2</sup>, WANG Yun<sup>3</sup>. 1 Department of Epidemiology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2 Department of Obstetrics and Gynecology, Second Hospital of Shanxi Medical University; 3 Department of Obstetrics and Gynecology, Chinese People's Liberation Army 264th Hospital

Corresponding author: WANG Jin-tao, Email: wjtxw@yahoo.com.cn

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30872166, No. 81273157) and the Natural Science Foundation of Shanxi Province (No. 2008011075-1).

**【Abstract】 Objective** To explore the effects of folate on the expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) in cervical cancer cell lines. **Methods** Experimental study was carried out *in vitro*. Human cervical cancer cell lines, including C33A cell with HPV negative and Caski cell with HPV16 positive, were treated with different concentration of folate. The expression of DNMT1 and MeCP2 protein (by Western blot) and mRNA (by real-time PCR) were then detected in the two cell lines. **Results** It was found that supplement of folate was able to reduce the cell proliferation in C33A cell ( $r=0.984, P<0.001$ ) and Caski cell ( $r=0.978, P=0.002$ ), as well as induced the cell apoptosis (C33A:  $r=0.989, P<0.001$ ; Caski:  $r=0.994, P<0.001$ ). Results showed that the expression levels of DNMT1 protein (C33A:  $r=-0.914, P<0.001$ ; Caski:  $r=-0.859, P=0.003$ ) and MeCP2 protein (C33A:  $r=-0.830, P=0.005$ ; Caski:  $r=-0.981, P<0.001$ ) decreased gradually with the increase of folate concentrations, but the expression of DNMT1 and MeCP2 mRNA was not observed in Caski or C33A cell. When at the same levels of folate, the expression of DNMT1 protein or mRNA was higher in Caski cell than in C33A cell. However, the expression of MeCP2 protein or mRNA was higher in C33A cell than in Caski cell.

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.02.016

基金项目: 国家自然科学基金 (30872166, 81273157); 山西省自然科学基金 (2008011075-1)

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学公共卫生学院流行病学教研室 (王金桃、吴婷婷、白兰、丁玲), 附属第二医院妇产科 (郝敏); 解放军第 264 医院妇产科 (王云)

通信作者: 王金桃, Email: wjtxw@yahoo.com.cn

**Conclusion** Our finding indicated that adequate foleta could effectively inhibit the proliferation of cervical cancer cells and facilitate their apoptosis in vitro, thus would reverse the aberration protein expression of DNMT1 and MeCP2. That there might be a synergistic action between HPV16 infection and parafunction of DNMT1 in cervical cancer, being noticed.

**【Key words】** Folate; Cervical cancer cell lines; DNA methyltransferase 1 (DNMT1); Methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2)

表观遗传改变是肿瘤形成的关键早期事件。DNA 甲基化作为表观遗传的核心内容,是哺乳动物细胞 DNA 最普遍的修饰方式,参与基因突变与表达调控,细胞增殖与分化等生物学机制,在多种肿瘤的发生发展中扮演着重要角色<sup>[1]</sup>。DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 作为 DNMT 的主要成员,对维持和调节肿瘤细胞全基因组和局部区域甲基化起着核心作用。DNMT1 功能紊乱,可引起基因 DNA 的甲基化异常,特别是抑癌基因的高甲基化,继而造成相关基因表达沉默,导致细胞的恶性生长<sup>[2]</sup>。研究显示, DNMT1 活性升高是癌细胞一个特征性的早期分子改变<sup>[3]</sup>,因而成为 DNA 去甲基化恢复抑癌基因功能的热点靶分子<sup>[4]</sup>。基因的转录一方面受到甲基化程度的影响,另一方面与 DNA 甲基化 CpG 岛结合蛋白家族 (MBD) 关系密切,甲基化 CpG 岛结合蛋白 2 (MeCP2) 为 MBD 的主要成员,可与甲基化的 DNA 特异性结合,在 DNA 甲基化和组蛋白修饰之间起着桥梁作用<sup>[5]</sup>,在肿瘤形成的过程中起着至关重要的作用<sup>[6]</sup>。但目前 MeCP2 与宫颈癌关系的研究国内外未见相关报道。叶酸具有参与和调节 DNA 甲基化的生物学功能<sup>[7]</sup>。本研究前期基于人群的研究显示,叶酸缺乏和 DNMT1 表达异常在宫颈癌变中均有重要作用<sup>[8]</sup>,但其机制尚不清楚。为此提出叶酸可通过调控 DNMT1 和 MeCP2 的转录或蛋白表达对宫颈癌变发生作用的假设,并通过体外细胞实验,探讨叶酸对 DNMT1 和 MeCP2 在宫颈癌细胞中表达的影响,以及叶酸缺乏-DNA 甲基化在宫颈癌变中可能的表观遗传机制。

### 材料与方 法

1. 细胞系的选择:选择人乳头瘤病毒 16 型 (HPV16) 阳性宫颈癌细胞 Caski 和 HPV 阴性宫颈癌细胞 C33A 为研究对象(均购自中国医学科学院基础研究所),分别置 RPMI-1640 和 MEM-EBSS 培养基中进行培养、传代。

2. 叶酸干预:取对数生长期的 Caski 和 C33A 细胞培养 24 h 后,转入不同浓度叶酸培养基中进行分组培养。依据 MTT 法在获得细胞生长相对抑制率的基础上计算细胞的半抑制浓度 (IC<sub>50</sub>),以此确定叶

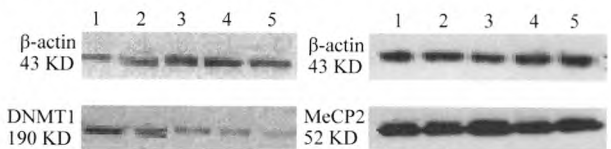
酸 (Sigma 公司产品) 干预的 6 个浓度 (10、50、100、500、750、1000 μg/ml),同时以 0.1 μg/ml 为叶酸缺乏组、1.0 μg/ml 为对照组,进行不同叶酸浓度下 DNMT1 和 MeCP2 转录和表达水平的检测。

### 3. 实验方法:

(1) 细胞活性和功能测定:采用常规 MTT 法,获得不同叶酸浓度下的细胞生长抑制率。

(2) 细胞凋亡检测:收集不同叶酸浓度下的宫颈癌细胞,采用流式细胞仪,严格按照 FCM 操作步骤检测两种细胞的细胞周期时相变化和凋亡情况。

(3) Western blot 法检测宫颈癌细胞中 DNMT1 和 MeCP2 蛋白的表达:用超声细胞破碎仪破碎宫颈癌细胞 (1 × 10<sup>6</sup>/ml),离心,取上清 30 μl (约含蛋白质 30 μg),参照本组建立的方法<sup>[8]</sup>,在 43、190 和 52 KD 处分别获得内参蛋白 β-actin 及 DNMT1 和 MeCP2 特异性抗体结合蛋白条带 (图 1)。利用 Quantity One 软件分析各条带的光密度值,将目的条带与内参 β-actin 条带的光密度值的比值作为 DNMT1 及 MeCP2 蛋白的相对表达量。



注: 1~3 为叶酸浓度 1 μg/ml; 4、5 为叶酸浓度 1000 μg/ml

图 1 DNMT1 和 MeCP2 蛋白在宫颈癌细胞中的表达

(4) real-time PCR 法检测宫颈癌细胞中 DNMT1 和 MeCP2 mRNA 水平:取 1 × 10<sup>6</sup>/ml 密度的宫颈癌细胞,充分破碎、裂解,采用 Trizol 试剂提取总 RNA,用紫外分光光度计对 RNA 样品行纯度测定,获得样本 RNA 浓度,按照标准荧光定量 PCR 引物设计原则,确定 DNMT1 (F: 5' -GCC AAC GAG TCT GGC TTT GAG-3', R: 5' -GTG TCG ATG GGA CAC AGG TGA-3') 和 MeCP2 (F: 5' -TGT TCC GCC CAG TGG ATT C -3', R: 5' -GCA CGG GAT GGT GGT AAT AAT CTC-3') 的引物序列以及管家基因 (β-actin) 的引物序列 (F: 5' -TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3', R: 5' -CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3')。根据 PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa) 提供的说明书分别进行反转录反应和

PCR反应,获得DNMT1和MeCP2的特异性扩增曲线和溶解曲线。以每个样品的 $C_t$ 值与各自对应的 $\beta$ -actin的 $C_t$ 值的比值代表目的DNMT1和MeCP2 mRNA表达水平。 $C_t$ 比值越小,说明达到设定阈值所需的循环数越多,对应的mRNA表达水平越高。

4. 统计学分析:利用SPSS 16.0软件,进行资料的 $t$ 检验、方差分析、相关分析等。

### 结 果

1. 叶酸对Caski和C33A细胞增殖及凋亡的影响:不同叶酸浓度对两种细胞的增殖均有抑制作用,随着叶酸浓度的增加,叶酸对细胞增殖的抑制作用增强,呈正相关(C33A: $r=0.984, P<0.001$ ; Caski: $r=0.978, P=0.002$ ),见图2。不同叶酸水平对Caski和C33A细胞凋亡的影响基本一致,除叶酸缺乏组和10  $\mu\text{g/ml}$ 干预组外,其他各叶酸干预组与对照组比较,细胞凋亡率的差别均有统计学意义,两种细胞的凋亡率均随着叶酸浓度增加呈上升趋势(图3),具有明显线性关系(C33A: $r=0.989, P<0.001$ ; Caski: $r=0.994, P<0.001$ )。

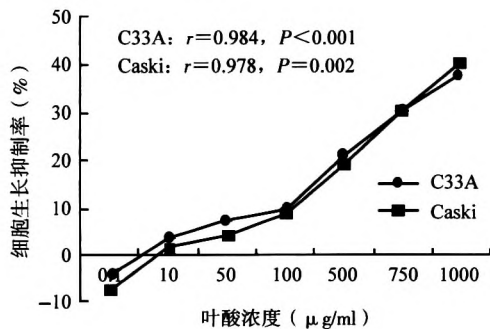


图2 叶酸对C33A和Caski细胞增殖抑制的影响

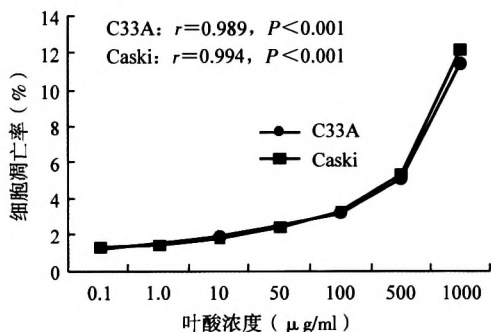


图3 叶酸对C33A和Caski细胞凋亡的影响

2. 叶酸对宫颈癌细胞中DNMT1蛋白和mRNA表达的影响:不同叶酸浓度下,两种细胞中DNMT1蛋白表达水平总体比较差异均有统计学意义(C33A: $F=73.67, P<0.001$ ; Caski: $F=32.21, P<0.001$ ),DNMT1 mRNA的 $C_t$ 比值在Caski细胞有差

别( $F=30.63, P<0.001$ ),但在C33A细胞其差异无统计学意义( $F=1.13, P=0.395$ )。随着叶酸水平的增加,DNMT1蛋白的表达水平逐渐降低,呈负相关(C33A: $r=-0.914, P<0.001$ ; Caski: $r=-0.859, P=0.003$ ),而DNMT1 mRNA的 $C_t$ 比值在两细胞中的变化无统计学意义(C33A: $r=0.433, P=0.159$ ; Caski: $r=-0.297, P=0.341$ )。相同叶酸浓度下,DNMT1蛋白和mRNA表达水平在Caski细胞均较C33A细胞为高,特别是当叶酸浓度为50、500、750、1000  $\mu\text{g/ml}$ 时,DNMT1蛋白表达水平的差异均有统计学意义,而DNMT1 mRNA的 $C_t$ 比值除在750  $\mu\text{g/ml}$ 外其余各叶酸浓度水平差异均有统计学意义(图4、5)。

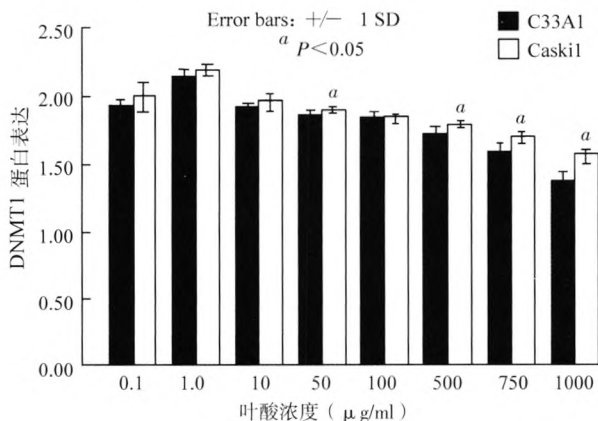


图4 不同叶酸水平C33A和Caski细胞DNMT1蛋白表达量

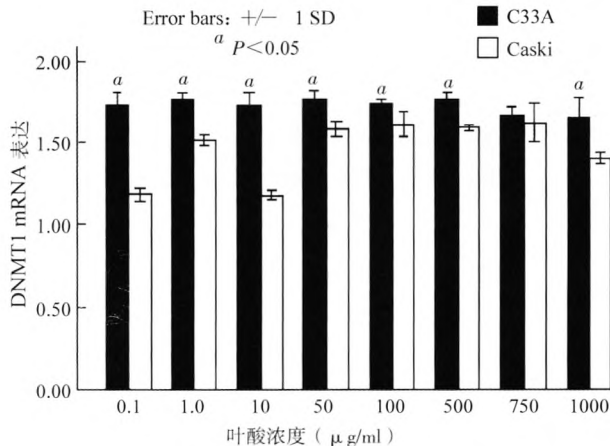


图5 不同叶酸水平C33A和Caski细胞DNMT1 mRNA表达( $C_t$ 比值)

3. 叶酸对宫颈癌细胞中MeCP2蛋白和mRNA表达的影响:不同叶酸水平两种细胞中MeCP2蛋白相对表达量的差异(C33A: $F=40.59, P<0.001$ ; Caski: $F=37.81, P<0.001$ )及MeCP2 mRNA的 $C_t$ 比值差异(C33A: $F=177.36, P<0.001$ ; Caski: $F=125.49, P<0.001$ )均有统计学意义。随着叶酸浓度的增加,MeCP2蛋白表达量呈逐渐降低趋势(C33A:

$r = -0.830, P = 0.005$ ; Caski:  $r = -0.981, P < 0.001$ ), 而 MeCP2 mRNA 的 Ct 比值变化无统计学意义 (C33A:  $r = 0.195, P = 0.621$ ; Caski:  $r = 0.209, P = 0.533$ )。相同叶酸浓度下, MeCP2 蛋白和 mRNA 表达水平在 C33A 细胞较 Caski 细胞普遍为高, 在叶酸浓度为 0.1、1.0、750  $\mu\text{g/ml}$  时, MeCP2 蛋白表达水平差异有统计学意义, 而 mRNA 的 Ct 比值在除 100  $\mu\text{g/ml}$  外的其余各叶酸浓度水平中的差异均有统计学意义(图 6、7)。

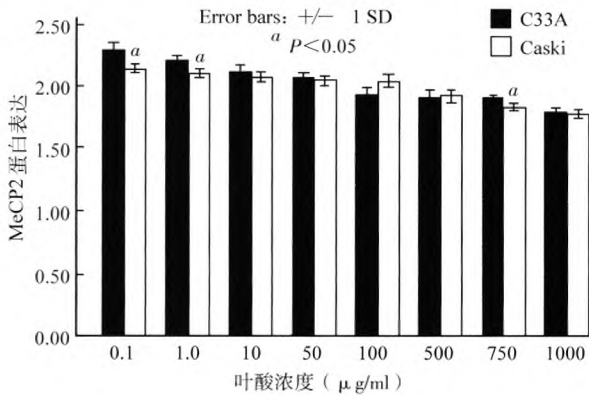


图 6 不同叶酸水平 C33A 和 Caski 细胞 MeCP2 蛋白表达量

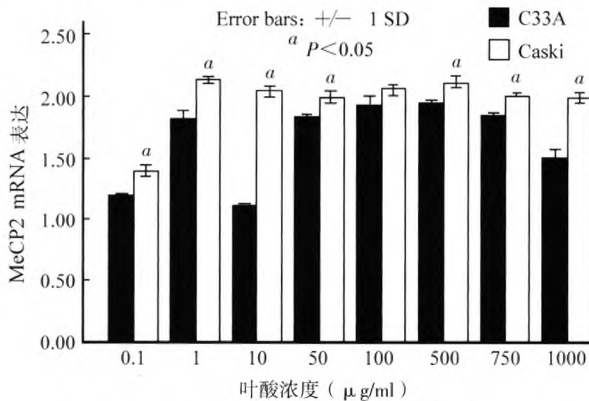


图 7 不同叶酸水平 C33A 和 Caski 细胞 MeCP2 mRNA 表达 (Ct 比值)

### 讨 论

叶酸具有参与 DNA 合成及甲基化的两大生物学功能, 叶酸水平的改变与肿瘤的发生紧密关联。国外学者及本组前期人群研究结果提示, 低叶酸水平可增加罹患宫颈癌的风险<sup>[7,8]</sup>。近年来, 多数研究倾向于补充适量叶酸可预防癌变的发生<sup>[9]</sup>, 但叶酸对癌变后的转归及对癌细胞增殖与凋亡的影响目前报道不尽一致, Novakovic 等<sup>[10]</sup>的研究提示, 叶酸对结肠癌细胞的生长可能有促进作用, 而有研究显示随着叶酸浓度的增加卵巢癌<sup>[11]</sup>、宫颈癌<sup>[12]</sup>细胞的生长抑制率亦增加。本研究结果显示, 随着叶酸浓度

的增加, HPV 阳性和阴性宫颈癌细胞的生长抑制率和凋亡率均逐渐上升, 呈正相关关系, 提示补充叶酸对宫颈癌细胞的增殖有抑制作用。当然, 体外实验结果与人群研究的结果不可等同, 对于叶酸补给的具体剂量尚需在人群研究中探讨和确定。

DNA 甲基化已经成为当前进行肿瘤表观遗传研究的主要内容。在肿瘤细胞中基因组甲基化模式常常发生改变, 出现整体的低甲基化伴随特定区域 CpG 岛的高甲基化<sup>[1,3]</sup>, DNMT 转录和蛋白表达增高往往先于甲基化的变化<sup>[13]</sup>, 在许多肿瘤中呈高表达<sup>[3,14]</sup>。在哺乳动物中, 叶酸作为甲基的主要供体参与了 DNA 甲基化过程, 而 DNMT 的主要功能是催化甲基基团与胞嘧啶环结合维持和调节 DNA 甲基化, 两者间生物学功能的联系提示叶酸对宫颈癌发生发展的影响可能与 DNMT 的活性和功能有关<sup>[7,15]</sup>。本组和其他学者的研究均表明, 叶酸可以影响 DNMT1 的表达<sup>[8,16]</sup>, 且与多种肿瘤相关基因 CpG 岛高甲基化密切相关, 补充叶酸可以改善其甲基化状态使基因恢复表达<sup>[17]</sup>。基于动物研究的资料显示, 叶酸缺乏组较对照组 DNMT1 的表达水平为高 ( $P < 0.001$ )<sup>[18]</sup>。本研究结果显示, 叶酸缺乏情况下, 宫颈癌细胞 DNMT1 蛋白和 mRNA 的表达量均较高, 随着叶酸干预浓度的加大, DNMT1 蛋白表达量呈下降趋势, 而 mRNA 的变化无相同趋势, 提示补充叶酸可以逆转 DNMT1 蛋白的异常高表达, 而对 DNMT1 转录水平的作用不明显。

基因的转录一方面受到甲基化程度的影响, 另一方面与 MeCP2 和特定区域 CpG 岛的结合量密切相关。MeCP2 是第一个被发现的具有可以特异性识别 DNA 甲基化的家族成员, 一旦 MeCP2 结合到甲基化的 DNA 上, 它就招募组蛋白、组蛋白去乙酰化酶和其他蛋白, 通过甲基化结合区 (methyl-CpG-domain MBD) 与甲基化的 DNA 和甲基转移酶相结合, 阻碍转录因子的结合而抑制基因表达<sup>[5,19]</sup>, 这是许多抑癌基因和肿瘤相关基因转录失活的原因。MeCP2 的过量表达可以增加机体细胞恶变的危险性<sup>[6]</sup>, 小鼠叶酸和甲基缺乏性饮食诱导的肝癌模型研究发现, 在癌变早期即出现了 MeCP2 蛋白表达增加<sup>[18]</sup>。本研究显示叶酸可影响 MeCP2 在宫颈癌细胞中的表达, 随着叶酸浓度升高, MeCP2 蛋白和 mRNA 的表达均逐渐降低, 尤其是对蛋白表达的影响具有统计学意义, 提示叶酸变化可能影响到基因组的甲基化状态, 间接影响 MeCP2 蛋白表达, 同样发现, 叶酸水平与 MeCP2 mRNA 之间的相关性不

明显,推测叶酸对MeCP2在转录水平的影响较弱。

应予以注意的是,本研究发现,在相同叶酸水平,HPV16阳性的Caski细胞较HPV阴性的C33A细胞DNMT1蛋白及mRNA表达水平普遍为高,而MeCP2蛋白和mRNA表达水平则在C33A细胞较高。提示高危型HPV16感染和DNMT1活性异常可能对宫颈癌的发生具有协同作用,而HPV16感染对MeCP2的异常转录或蛋白表达可能具有抑制作用,其详细机制有待深入探讨。

### 参 考 文 献

- [1] Peedicayil J. The role of DNA methylation in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr Clin Pharmacol*, 2012, 7(4): 333-340.
- [2] Robert MF, Morin S, Beaulieu N, et al. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet*, 2003, 33(1): 61-65.
- [3] Kanai Y, Hirohashi S. Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state. *Carcinogenesis*, 2007, 28(2): 2434-2442.
- [4] Humeniuk R, Mishra PJ, Bertino JR, et al. Molecular targets for epigenetic therapy of cancer. *Curr Pharm Biotechnol*, 2009, 10(2): 161-165.
- [5] Bogdanović O, Veenstra GJ. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*, 2009, 118(5): 549-565.
- [6] Bernard D, Gil J, Dumont P, et al. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 is required for prostate cancer cell growth. *Oncogene*, 2006, 25(9): 1358-1366.
- [7] Flatley JE, McNeir K, Balasubramani L, et al. Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(10): 2782-2789.
- [8] Wang JT, Huo XX, Ding L, et al. Effect of folic acid and DNA methyltransferase I on cervical cancer and its precancerous lesion. *Chin J Epidemiol*, 2011, 32(6): 617-621. (in Chinese)  
王金桃, 霍晓旭, 丁玲, 等. 叶酸与DNA甲基转移酶1在宫颈癌及癌前病变中的作用. *中华流行病学杂志*, 2011, 32(6): 617-621.
- [9] Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr*, 2000, 130(2): 129-132.
- [10] Novakovic P, Stempak JM, Sohn KJ, et al. Effects of folate efficiency on gene expression in the apoptosis and cancer pathways in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 2006, 27(5): 916-924.
- [11] Lai DM, Liu T, Zhang J, et al. Proliferation inhibiting effects of folate on ovarian cancer cells. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Medical Science*, 2010, 30(4): 386-389. (in Chinese)  
赖董梅, 刘特, 张健, 等. 叶酸对卵巢癌细胞的增殖抑制作用. *上海交通大学学报: 医学版*, 2010, 30(4): 386-389.
- [12] Wen C, Xu RX. The experiment of inhibitory effects of folic acid on the in vitro growth of human cervical carcinoma cell line. *Prev Med Trib*, 2009, 15(1): 56-57, 93. (in Chinese)  
温程, 许裕仙. 叶酸在体外对入宫颈癌细胞生长抑制作用的实验研究. *预防医学论坛*, 2009, 15(1): 56-57, 93.
- [13] Jones PA, Takat D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 2001, 293(5532): 1068-1070.
- [14] Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(6): 376-392.
- [15] Kim KC, Friso S, Choi SW. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. *J Nutr Biochem*, 2009, 20(12): 917-926.
- [16] Piyathilake CJ, Macaluso M, Brill I, et al. Lower red blood cell folate enhances the HPV-16-associated risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Nutrition*, 2007, 23(3): 203-210.
- [17] Jiménez-Chillarón JC, Díaz R, Martínez D, et al. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie*, 2012, 94(11): 2242-2263.
- [18] Ghoshal K, Li X, Datta J, et al. A folate- and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats. *J Nutr*, 2006, 136(6): 1522-1527.
- [19] Fuks F, Hued PJ, Wolf D, et al. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem*, 2003, 278(6): 4035-4040.

(收稿日期: 2012-09-22)

(本文编辑: 张林东)