

◇临床医学◇

5-甲基硫代腺苷对结肠癌 Hct116 细胞增殖的影响

张青松, 曹立赢, 王明君, 温英武, 费乐学, 高建超, 郑景珍, 李浩, 戴世龙

(开滦总医院普外科, 河北 唐山 063000)

摘要:目的 研究 5-甲基硫代腺苷(MTA)对结肠癌 Hct116 细胞增殖的影响及其相关机制。方法 采用 MTT 比色法及软琼脂克隆形成试验分析 MTA 对结肠癌 Hct116 细胞增殖的影响,采用 Realtime PCR 的方法分析 RNA 聚合酶Ⅲ依赖基因(tRNAs、5S rRNA)及 TFⅢB 亚单位 TBP、Bdp1 和 Brf1 基因 mRNA 水平的变化,并采用 Western Blot 的方法分析了 TFⅢB 亚单位 Bdp1 蛋白水平的变化。结果 MTA 对结肠癌 Hct116 细胞具有明显的增殖抑制作用,在这一过程中,RNA 聚合酶Ⅲ依赖基因(tRNAs、5S rRNA)的 mRNA 水平明显下调;同时 TFⅢB 亚单位 Bdp1 在 mRNA 水平和蛋白水平也出现了明显下调。结论 MTA 对结肠癌 Hct116 细胞具有明显增殖抑制作用;RNA 聚合酶Ⅲ依赖基因转录的下调、TFⅢB 亚单位 Bdp1 蛋白的下调可能在这一抗肿瘤过程中起到重要作用。

关键词:5-甲基硫代腺苷;结肠癌细胞增殖;RNA;聚合酶Ⅲ

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.04.015

Role of methylthioadenosine in cell proliferation of colon cancer Hct116 cells

ZHANG Qingsong, CAO Liying, WANG Mingjun, WEN Yingwu, FEI Lexue, GAO Jianchao,

ZHENG Jingzhen, LI Hao, DAI Shilong

(Kailuan General Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To study the role and mechanism of methylthioadenosine in cell proliferation of colon cancer Hct116 cells. **Methods** MTT assay and anchorage-independent growth were used to detect the effects of methylthioadenosine on proliferation in Hct116 cells; the level of RNA Pol Ⅲ-dependent (tRNAs, 5SrRNA) and the subunits of TFⅢB (TBP, Bdp1 and Brf1) transcription were detected with the method of Realtime PCR; the level of subunit of TFⅢB (Bdp1) protein was detected with the method of Western Blot.

Results Methylthioadenosine could significantly inhibit the proliferation of Hct116 cells; RNA Pol Ⅲ-dependent (tRNAs, 5S rRNA) transcription was downregulated significantly; mRNA and protein of the Bdp1 were also downregulated significantly in this course. **Conclusions** Methylthioadenosine could inhibit significantly the proliferation of Hct116 cells and downregulate RNA Pol Ⅲ-dependent (tRNAs, 5S rRNA) transcription and protein of the subunit of the TFⅢB Bdp1, which might play a major role in the treatment of cancer.

Key words: Methylthioadenosine; Colon cancer; Cell proliferation; RNA Pol Ⅲ

5-甲基硫代腺苷(Methylthioadenosine, MTA)是多胺和蛋氨酸代谢过程中,产生的代谢产物。我们以往的研究表明 MTA 可以明显抑制结肠癌细胞的增殖^[1]。RNA 聚合酶Ⅲ参与无翻译作用的 RNA (tRNAs 和 5S rRNAs)的转录,其转录的上调,是肿瘤细胞快速生长所必需的^[2-3]。Pol Ⅲ 基因的转录的调控主要是通过调控 TFⅢB 复合体来实现的,TFⅢB 复合体由三个亚单位 TBP、Bdp1 和 Brf1 组成^[4-5]。本研究着重分析了 MTA 对结肠癌 Hct116 细胞的增殖抑制作用过程中 tRNAs、5S rRNA 的转录水平的变化,并进一步研究这一过程中 TFⅢB 亚

单位 TBP、bdp1 和 brf1 的变化情况,以期发现 MTA 抑制结肠癌细胞增殖的初步机制。

1 材料与方法

1.1 材料 结肠癌 Hct116 细胞购自 ATCC 公司;MTA,MTT 自 Sigma 公司购买,Hct116 细胞用含 100 mL · L⁻¹ 小牛血清的 DMEM 培养液培养;RNA 提取试剂盒自 Genemega 公司购买;RT-PCR 引物设计如下:TBP (F) 5' GCT AGG TTT CTG CGG TCG CGT C-3', (R) 5' CTG TAC TGA GGC TGC TGC AGT TGC TAC-3';Brf1 (F) 5' GGA GCA GAG CCA ATC AAG CCA-3', (R) 5' CAT CAC CAT CAC AGC CGT AAT C-3';Bdp1 (F) 5' GCGTGAAGCCAAATGT-CAGG3', (R) 5' CAATGTGCTGGA CTCTGCAGC 3';

tRNAs 和 5S rRNA 引物序列在参考文献^[1]中有详述。TBP、Bdp1、 β -actin 抗体购自 San Cruz 公司; Brf1 购自美国 Bethyl 试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖检测 分为对照组和药物处理组, Hct116 细胞在药物处理前 24 h 种植于 6 孔板中。MTA 的四个不同梯度浓度分别为 0.5, 1, 2 和 3 mmol $\cdot$ L⁻¹。每一分组有两个复孔, 药物作用 16 h 后, 弃去培养液, 分别加入 5 g $\cdot$ L⁻¹ MTT 溶液 100 μ L、新鲜培养液 1 mL。培养箱中放置 4 h 后, 加入 MTT 溶解剂 1 mL, 轻轻震荡, 待结晶充分溶解, 用比色分光仪检测, 用 A570 nm 测量值减去 A690 nm 测量值, 差值与该组存活细胞数成正比关系。

1.2.2 软琼脂克隆形成试验 实验分为对照组和药物处理组, 每一分组有两个复孔, 先在培养板中铺入 5 mL 含 0.5% 琼脂糖的 DMEM 作为基层, 上层铺入混悬有 2×10^4 个细胞的含 0.35% 琼脂糖的 DMEM 培养基 1.5 mL, 实验组中加入 1 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的 MTA, 处理过程中使每组均含有等量的二甲基亚砜(DMSO), 每一分组均另有 6 个复孔, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养, 第 4 天实验孔中加入含 1 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的 MTA 的培养基 1.5 mL, 对照组加入等量培养基。7 d 后在倒置显微镜下计数 5 个高倍视野下形成瘤巢的数目之和。

1.2.3 tRNAs、5S rRNA、TBP、Bdp1 和 Brf1 的转录水平检测 (1) 药物处理及分组。分为对照组和药物处理组。药物处理前细胞种植于 6 孔板中, 每一分组有两个复孔, 16 h 后, 向每孔加入 MTA 溶液和 DMSO, 使药物处理组中 MTA 的终浓度为 1 mmol $\cdot$ L⁻¹, 药物作用时间为 8 h。(2) Realtime PCR。总 RNA 的提取(按总 RNA 提取试剂盒说明书进行)、cDNA 的合成(按试剂盒说明书进行)、合成好的 cDNA 按以下步骤进行 Realtime PCR 检测: ①各 96 孔板分别加入: Realtime 反应混合液 SYBR Green 10 μ L、对应引物各 0.5 μ L、cDNA 5 μ L(1:100 稀释后)、水 4 μ L, 共 20 μ L; ②每个样品要在同一 96 孔板中除检测待测基因外, 还需同时检测 HPRT, 以利于计算分析, 每一样品重复 2 次; ③按以下反应程序进行: 步骤 95 $^{\circ}$ C 15 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 61 $^{\circ}$ C 35 s, 循环 40 次; 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C forever。反应完成后, 确定合适的“阈值”, Realtime PCR 仪将为每个反应孔提供一个 Ct 值。

1.2.4 TBP、Bdp1 和 Brf1 的蛋白水平检测 (1) 药物处理及分组。实验分为对照组和药物处理组。

药物处理前夜细胞种植于 10 cm 培养皿中, 每组重复 2 次, 16 h 后, 向每孔加入 MTA 溶液和 DMSO, 使其甲基硫代腺苷的终浓度为 1 mmol $\cdot$ L⁻¹, 并使各组含有等量 DMSO, 药物处理时间为 8 h。(2) Western Blot。细胞被处理后, 经细胞裂解酶裂解、用 BCA 测定各样本蛋白浓度, 灌制 10% 的分离胶, 5% 的浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳。分别取各组 60 μ g 蛋白样品进行 Western Blot, 经过电泳、转膜、封闭、NC 膜放置于 TBP、Bdp1、Brf1 抗体(1:1 000)、4 $^{\circ}$ C 摇床上作用 16 h, 取出与一抗结合的 NC 膜, TBS-T 洗涤 3 次; 将 NC 膜放置于 HRP 标记二抗中(用 50 g $\cdot$ L⁻¹ 脱脂奶粉稀释成 1:20 000)中, 室温下于摇床上温育 1 h, 取出与二抗结合的 NC 膜, TBS-T 洗涤 3 次; ECL 检测试剂与膜作用 1 min 后, 暗室内 X 线片显影、定影; 以上每张膜在洗膜液中 50 $^{\circ}$ C 漂洗 30 min 后, 用以上同样方法检测内参照蛋白 β -actin。

1.3 统计学方法 采用 SPSS11.5 进行统计学处理。两组间比较用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 并采用 LSD 法进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTA 对细胞增殖的影响 MTT 比色试验结果(表 1), 经单因素方差分析: MTA 0、1、2、3 mmol $\cdot$ L⁻¹ 4 组间差异有统计学意义, F 值 80.18, $P = 0.000$; 采用 LSD 法进行组间两两比较: 除 2、3 mmol $\cdot$ L⁻¹ 组间差异无统计学意义($P = 0.166$), 其余各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这就说明 MTA 浓度在 0.5 mmol $\cdot$ L⁻¹ 以上时就可以明显抑制 Hct116 细胞的增殖, 这种抑制作用在 0 ~ 2 mmol $\cdot$ L⁻¹ 范围内存在一定的剂量依赖关系。

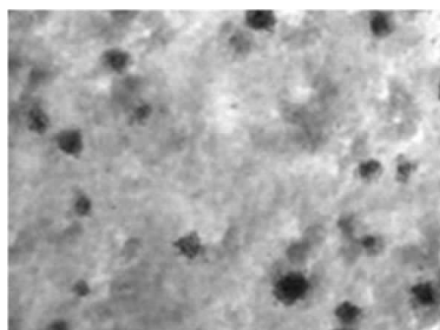
表 1 不同浓度 MTA 处理 Hct116 后细胞存活率的变化

MTA 浓度/ mmol $\cdot$ L ⁻¹	存活率/%	F 值	P 值
0	100.00 $\pm$ 0.03		
0.5	86.11 $\pm$ 1.75		
1	80.25 $\pm$ 1.90	80.18	0.000
2	64.24 $\pm$ 8.17		
3	60.77 $\pm$ 2.91		

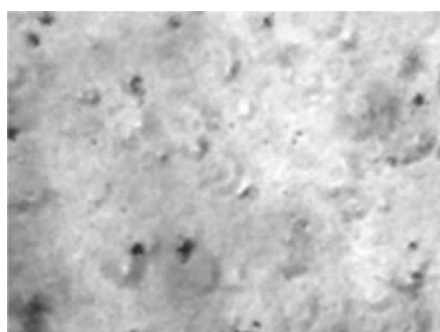
软琼脂克隆形成试验(图 1、表 2)计数表明: 对照组和药物处理组 5 个高倍视野下形成瘤巢的数目之和分别为(65.67 $\pm$ 8.14)和(15.33 $\pm$ 2.08), 两组之间统计分析提示 $P = 0.000$ 。这就进一步说明 MTA 对 Hct116 细胞的增殖存在明显抑制作用。

表2 对照组和处理组 Hct116 细胞形成瘤巢数的变化

组别	瘤巢数	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
对照组	65.67 ± 8.14	-10.37	0.000
药物处理组	15.33 ± 2.08		



对照组

MTA/1 mmol · L⁻¹图1 0.1 mmol · L⁻¹ MTA 处理 7 d 后 Hct116 细胞形成瘤巢的图片

2.2 MTA 处理结肠癌 Hct116 细胞 8 h 后 tRNAs、5S rRNA 的转录水平变化 Realtime PCR 分析(表3)结果表明:MTA 1 mmol · L⁻¹作用 8 h 后,设定对照组的值为 1,tRNAs、5S rRNA 的转录水平分别为 (0.53 ± 0.05) (*P* = 0.007)、(0.44 ± 0.06) (*P* = 0.009)。这说明 1 mmol · L⁻¹的 MTA 作用于 Hct116 细胞后,8 h 时间点上 tRNAs、5S rRNA 的转录水平出现了明显的下调。

表3 与对照组比较,药物处理组 Hct116 细胞 tRNAs、5S rRNA mRNA 水平的变化/ $\bar{x} \pm s$

项目	药物处理组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
tRNAs	0.53 ± 0.05	12.03	0.007
5S rRNA	0.44 ± 0.06	11.69	0.009

2.3 MTA 处理结肠癌 Hct116 细胞 8 h 后 TFⅢB 亚单位 TBP、Brf1 和 Bdp1 基因 mRNA 水平的变化

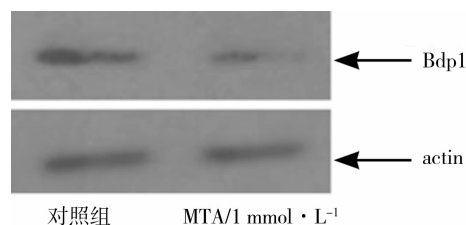
Realtime PCR 分析结果表明:MTA 1 mmol · L⁻¹作用 8 h 后,设定对照组的值为 1,TBP、Brf1 和 Bdp1 基因 mRNA 转录水平见表 4,这说明 1 mmol · L⁻¹

MTA 作用于 Hct116 细胞后,8 h 时间点上 Bdp1 基因的 mRNA 水平出现了明显的下调、而 TBP、Brf1 基因 mRNA 转录水平没有出现明显变化。

表4 与对照组比较,药物处理组 Hct116 细胞 TBP、Brf1 和 Bdp1 mRNA 水平的变化/ $\bar{x} \pm s$

项目	药物处理组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
TBP	1.01 ± 0.08	0.062	0.95
Brf1	1.06 ± 0.11	-0.06	0.97
Bdp1	0.55 ± 0.08	6.98	0.028

2.4 MTA 处理结肠癌 Hct116 细胞 8 h 后 TFⅢB 亚单位 bdp1 蛋白水平的变化 Western Blot 蛋白分析(图2)结果表明:MTA 1 mmol · L⁻¹作用 8 h 后,与对照组的相比较,Bdp1 基因在蛋白水平出现了明显的下调。

图2 与对照组比较,1 mmol · L⁻¹ MTA 处理 Hct116 细胞 Bdp1 蛋白的变化

3 讨论

结肠癌术后血行转移是治疗失败的主要原因,全身化疗可控制血行转移、降低术后肿瘤复发率。但化疗常由于副作用大,对机体免疫系统抑制,病人不能耐受^[6]。寻找疗效明确,副作用小的药物治疗,是医学工作者不懈的追求。

MTA 是多胺和蛋氨酸代谢过程中,产生的代谢产物。缺乏 MTA 代谢的关键酶 MTA 磷酸化酶(MTAP)的活性是许多肿瘤细胞的普遍特征。缺乏 MTAP 的肿瘤细胞分泌的 MTA 不能通过代谢途径被分解,从而造成 MTA 的蓄积^[7-10]。目前研究表明,提高肿瘤细胞内 MTA 浓度,会对肿瘤细胞增殖的抑制作用^[11]。MTA 可以有效的抑制 MTAP 活性缺乏的肿瘤细胞,而含有 MTAP 的正常细胞同期可以得到保护。并有研究表明长时间给予老鼠高浓度 MTA,没有发现有副作用出现^[12]。

我们以往的研究表明 MTA 对结肠癌 RKO 细胞的增殖具有明显的抑制作用^[1]。为了进一步研究 MTA 对其它结肠癌细胞的增殖抑制作用,我们采用了细胞增殖检测(MTT)和软琼脂克隆形成试验的方法,分析了 MTA 对结肠癌 Hct116 细胞的增殖抑

制作用。研究表明,MTA 对结肠癌 Hct116 细胞的增殖同样具有明显的抑制作用。

目前为止,蓄积的 MTA 如何引起结肠癌细胞增殖抑制作用的具体分子机制还不明确。RNA 聚合酶Ⅲ参与 tRNAs 和 5S rRNAs 的转录,tRNAs 和 5S rRNAs 直接参与蛋白质的合成^[13]。这些小分子 RNA 与细胞的增殖密切相关。诱发 RNA 聚合酶Ⅲ转录,可以增加 tRNAs 和 5S rRNA 的产量,可以提高细胞增殖并形成肿瘤的能力^[14]。

本研究分析了 MTA 对结肠癌 Hct116 细胞的增殖抑制过程中 Pol Ⅲ 的转录产物 tRNAs 和 5S rRNA 的影响,结果表明结肠癌 Hct116 细胞在 1 mmol · L⁻¹ MTA 作用 8 h 后出现 RNA 聚合酶Ⅲ转录的产物 tRNAs,5S rRNAs 水平的明显下调。

研究表明,RNA 聚合酶Ⅲ转录的上调,是肿瘤细胞快速生长所必需的,也是肿瘤形成的重要条件^[2]。癌基因和抑癌基因对 Pol Ⅲ 基因转录的调控主要是通过调控 TF ⅢB 复合体来实现的,TF ⅢB 复合体由三个亚单位 TBP、bdp1 和 brf1 组成^[3]。

为了研究 MTA 引起结肠癌 Hct116 细胞 RNA 聚合酶Ⅲ转录的产物 tRNAs,5S rRNAs 水平的下调是否与 TBP、bdp1 和 brf1 有关? 本研究首先采用 Realtime PCR 技术分析 MTA 处理结肠癌 Hct116 细胞 8 h 后 TF ⅢB 亚单位 TBP、bdp1 和 brf1 基因 mRNA 水平的变化。结果表明 bdp1 基因的转录水平出现了明显的下调、而 TBP、brf1 基因 mRNA 转录水平没有出现明显变化,这就提示 TF ⅢB 复合体亚单位 bdp1 可能起重要作用。为了进一步明确该结论,我们又采用 Western blot 技术,在蛋白水平进一步进行研究。研究结果支持了以上结论,MTA 处理结肠癌 Hct116 细胞 8 h 后 TF ⅢB 亚单位 bdp1 基因在蛋白水平也出现了明显的下调。

综合以上研究,我们认为 MTA 对结肠癌 Hct116 细胞的增殖具有明显的抑制作用。在这一过程中,RNA 聚合酶Ⅲ转录的产物 tRNAs,5S rRNAs 水平的明显下调;RNA 聚合酶Ⅲ转录的主要调控复合体的亚单位 bdp1 在 mRNA 和蛋白水平均出现了明显的下调。这就从 RNA 聚合酶Ⅲ转录水平的调控角度分析了 MTA 对结肠癌细胞增殖抑制的作用机制,这些研究将为 MTA 的临床推广提供实验依据。

参考文献

- [1] 王明君,张青松,曹立赢,等. 甲基硫代腺苷对结肠癌 RKO 细胞增值及 RNA 聚合酶Ⅲ依赖基因转录影响实验研究[J]. 第四军医大学学报,2016,45(3):277-281.
- [2] RIJAL K, MARAIA RJ. Active center control of termination by RNA polymerase Ⅲ and tRNA gene transcription levels in vivo [J]. PLoS Genet,2016,12(8):e1006253.
- [3] ARIMBASSERI AG, MARAIA RJ. RNA polymerase Ⅲ advances: structural and tRNA functional views [J]. Trends Biochem Sci, 2016,41(6):546-559.
- [4] BRINDEFALK B, DESSAILLY BH, YEATS C, et al. Evolutionary history of the TBP-domain superfamily [J]. Nucleic Acids Res, 2013,41(5):2832-2845.
- [5] ZHANG Q, JIN J, ZHONG Q, et al. ERα mediates alcohol-induced deregulation of Pol Ⅲ genes in breast cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2013,34(1):28-37.
- [6] 梁淑文,屈昌民,王晓英,等. 白介素-2 辅助化疗对结肠癌术后患者免疫功能及生存质量的影响[J]. 安徽医药,2015,19(8):1600-1601.
- [7] HE HL, LEE YE, SHIUE YL, et al. Characterization and prognostic significance of methylthioadenosine phosphorylase deficiency in nasopharyngeal carcinoma [J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(49):e2271.
- [8] GAMBICHLER T, SCOLA N, BECHARA FG. Significantly decreased methylthioadenosine phosphorylase expression in malignant melanoma [J]. Am J Dermatopathol, 2012,34(7):777-779.
- [9] KRYUKOV GV, WILSON FH, RUTH JR, et al. MTAP deletion confers enhanced dependency on the PRMT5 arginine methyltransferase in cancer cells [J]. Science, 2016,351(6278):1214-1218.
- [10] MARJON K, CAMERON MJ, QUANG P, et al. MTAP deletions in cancer create vulnerability to targeting of the MAT2A/PRMT5/RIOK1 axis [J]. Cell Rep, 2016,15(3):574-587.
- [11] ANDREU-PÉREZ P, HERNANDEZ-LOSA J, MOLINÉ T, et al. Methylthioadenosine (MTA) inhibits melanoma cell proliferation and in vivo tumor growth [J]. BMC Cancer, 2010,10:265.
- [12] SIMILE MM, BANNI S. 5'-Methylthioadenosine administration prevents lipid peroxidation and fibrogenesis induced in rat liver by carbon-tetrachloride intoxication [J]. Hepatology, 2001, 34(3):386-394.
- [13] DIECI G, FIORINO G, CASTELNUOVO M, et al. The expanding RNA polymerase Ⅲ transcriptome [J]. Trends in Genetics, 2007, 23(12):614-622.
- [14] GOODFELLOW SJ, INNES F, WHITE RJ. Regulation of RNA polymerase Ⅲ transcription during hypertrophic growth [J]. EMBO J, 2006,25(7):1522-1533.

(收稿日期:2016-07-16,修回日期:2016-10-29)