

5-Aza-CdR 对胶质瘤细胞生长及 *LRRC4* 基因异常甲基化的影响*

张祖萍^{1, 2)} 武明花^{1)**} 唐海林¹⁾ 王 蓉¹⁾ 李 丹¹⁾ 李小玲¹⁾ 李桂源^{1)**}

(¹⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078; ²⁾中南大学湘雅医学院寄生虫学教研室, 长沙 410078)

摘要 *LRRC4* 是一个新发现的胶质瘤抑癌基因, 它在多种胶质瘤细胞系和胶质瘤组织表达缺失或下调, 前期研究结果表明胶质瘤细胞和组织中 *LRRC4* 的编码区未发生突变、缺失或重排。为了获得 *LRRC4* 作为胶质瘤抑癌基因的进一步证据, 采用去甲基化制剂 5-Aza-CdR 处理 *LRRC4* 表达缺失的 SF126 和 SF767 胶质瘤细胞, MSP 和 RT-PCR 检测表明, *LRRC4* 的启动子在表达缺失的 SF126 和 SF767 细胞存在完全的甲基化, 而 5-Aza-CdR 能逆转 *LRRC4* 启动子的甲基化状态, 恢复 *LRRC4* 的表达。MTT 法测定显示, 5-Aza-CdR 使 SF126 和 SF767 胶质瘤细胞增殖受到明显抑制, 并呈时间和剂量的依赖性。同时流式细胞仪检测显示, 5-Aza-CdR 使 SF126 和 SF767 胶质瘤细胞周期阻滞于 G0/G1 期。因此, 5-Aza-CdR 能抑制胶质瘤细胞 SF126 和 SF767 增殖并干扰其细胞周期, *LRRC4* 启动子异常甲基化是其在胶质瘤细胞中表达缺失的重要机制, 5-Aza-CdR 能逆转 *LRRC4* 基因的甲基化, 恢复 *LRRC4* 的表达, 为 *LRRC4* 作为胶质瘤去甲基化治疗的靶标提供了科学依据。

关键词 5-Aza-CdR, 胶质瘤细胞, *LRRC4* 基因, DNA 甲基化

学科分类号 Q75, R73

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00811

胶质瘤是成人最常见原发性脑肿瘤, 占中枢神经系统肿瘤的 50% 以上。和其他恶性肿瘤一样, 胶质瘤的发生和发展是遗传学和表观遗传学两大类机制共同作用的、多基因参与、多阶段变异累积形成的病理过程。在胶质瘤发生和发展过程中, 抑癌基因的失活是关键因素之一。抑癌基因功能丧失可通过多种途径, 现已证实 DNA 甲基化是基因缺失和突变之外抑癌基因失活的第三种机制, 而且在某些情况下是其失活的唯一机制^[1]。

LRRC4 (leucine-rich repeat containing-4) 是一个新发现的胶质瘤抑癌基因^[2], 在多种胶质瘤细胞系和胶质瘤组织表达缺失或下调, 但我们前期研究结果表明胶质瘤细胞和组织中 *LRRC4* 的编码区未发生突变、缺失或重排^[3, 4]。本研究中, 我们采用去甲基化制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR) 处理胶质瘤细胞系 SF767 和 SF126, 观察了 5-Aza-CdR 对胶质瘤细胞生长的影响, 并进一步探讨了胶质瘤细胞中 *LRRC4* 失活的机制及去甲基化制剂对 *LRRC4* 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系. SF126 和 SF767 细胞为胶质瘤细胞株, 购自北京协和细胞生物所。SF126 和 SF767 细胞培养于含 10% 小牛血清的 MEM 培养基 (Gibco 公司)。

1.1.2 主要试剂. 5-Aza-CdR 和 MTT 为 Sigma 公司产品; 总 RNA 抽提试剂 TRIZOL 购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购自 Promega 公司; DNA

* 国家重重点基础研究发展计划 (973) 资助项目 (2006CB91052, 2006CB910504), 国家 111 计划资助项目 (111-2-12), 国家自然科学基金资助项目 (30770825, 30600224) 和湖南省自然科学基金资助项目 (06JJ20080)。

** 通讯联系人。

李桂源. Tel: 0731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

武明花. Tel: 0731-4805446, E-mail: wuminghua554@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-11-25, 接受日期: 2009-03-25

抽提试剂盒购自 TaKaRa 公司; EZ DNA Methylation-Gold Kit 购自美国 ZYMO RESEARCH 公司.

1.1.3 引物序列. *LRRC4* 甲基化检测引物序列, 甲基化引物: 5' AGCGTAGTATTTAGCGAGTGC 3' (正向引物); 5' TAAACCCTAACACCGACTCG 3' (反向引物). 非甲基化引物: 5' GGGAGTGTAGTATTTAGTGAGTGT 3' (正向引物); 5' TAAACCCTAACACCAACTCACTC 3' (反向引物). *LRRC4* RT-PCR 引物序列, 5' CAACTTGGCCCAACAATAACC 3' (正向引物); 5' CATCCGACCTCAGAAATGT 3' (反向引物). *GAPDH* 的 RT-PCR 引物序列: 5' GTCAGTGGTGGACC-TGACCT 3' (正向引物); 5' AGGGGAGATTCACTGTGG-TG 3' (反向引物). 引物由上海博尚生物公司合成.

1.2 方法

1.2.1 5-Aza-CdR 配制. 将 5-Aza-CdR 按 10 mmol/L 浓度溶于 pH 7.4 PBS 溶液后, 分装成 100 μ l/管, 储存于 -70℃ 备用.

1.2.2 MTT 法测定 5-Aza-CdR 对胶质瘤细胞增殖活性的影响. 取处理前的对数生长期的 SF126 和 SF767 胶质瘤细胞, 消化后计数, 调整细胞浓度为 1×10^4 个/ml, 按每孔 10^3 个细胞接种于 96 孔培养板. 共接种 6 块板, 每组 5 个孔, 接种 24 h 后去上清, 加入含 5-Aza-CdR 的培养液, 使其终浓度分别为 0 μ mol/L、0.5 μ mol/L、2.5 μ mol/L、5.0 μ mol/L 和 10.0 μ mol/L, 继续放入 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养, 每天更换含 5-Aza-CdR 的新鲜培养基. 然后在 1 天, 2 天, 3 天, 4 天, 5 天和 6 天各时间点分别取一板, 每孔加入 MTT 溶液(5 g/L) 20 μ l, 继续孵育 4 h, 终止培养, 弃去培养液, 每孔加入 150 μ l 二甲亚砜, 震荡 10 min, 选择 570 nm 波长, 在酶标仪上测定各孔的吸光度值.

1.2.3 流式细胞仪检测 5-Aza-CdR 对胶质瘤细胞周期的影响. 将 SF126 和 SF767 细胞传代 24 h 后, 将 5-Aza-CdR 按 0 μ mol/L、0.5 μ mol/L、2.5 μ mol/L、5.0 μ mol/L 和 10.0 μ mol/L 的浓度配制的培养液分别加入培养瓶中, 每天更换含 5-Aza-CdR 的新鲜培养基, 待 72 h 后分别回收细胞, 以胰酶消化并 2 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, PBS 洗涤细胞 3 次, 75%乙醇固定, 用 RNaseA(终浓度为 0.1 g/L) 消化 30 min, 加入 0.05 g/L 碘化丙锭(PI) 250 μ l, 室温避光染色 30 min 后上机检测, 测定细胞周期,

每组实验重复 3 次.

1.2.4 MSP 方法检测胶质瘤细胞株中 *LRRC4* 的甲基化状态. 收集经 0 μ mol/L 和 5.0 μ mol/L 5-Aza-CdR 处理 72 h 的 SF126 和 SF767 细胞, 按 DNA 抽提试剂盒(TaKaRa 公司)步骤抽提基因组 DNA. 分别取 500 ng DNA 按 EZ Methylation-Gold Kit 的操作步骤进行重亚硫酸盐处理, 纯化回收 DNA 用于甲基化特异 PCR 分析. 甲基化特异性 PCR 引物设计选择位于 *LRRC4* 启动子区富含 CpG 位点区域. PCR 反应循环条件: 95℃ 变性 45 s, 58℃ 退火 90 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 38 个循环. 甲基化引物和非甲基化引物扩增长度均为 153 bp.

1.2.5 RT-PCR 分析 5-Aza-CdR 处理胶质瘤细胞株中 *LRRC4* 的表达. 收集不同浓度 5-Aza-CdR 处理的胶质瘤细胞, TRIZOL 试剂提取各组细胞总 RNA. 用 DNase (Roche 公司)消化 RNA 中痕量的 DNA, 再取 2 μ g 总 RNA, 利用 Promega 公司的 Reverse Transcription System 将 RNA 逆转录成为 cDNA. 取 2 μ l cDNA 为模板进行 PCR 反应, PCR 扩增条件: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 45 s, 32 个循环; 72℃ 10 min. 当 *LRRC4* 基因扩增 10 个循环后加入内对照 *GAPDH* 的引物继续进行 22 个循环终止. 同时用水作为阴性对照. PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下凝胶成像.

1.3 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数比较采用单因素方差分析, 两组均数比较采用 *t* 检验, 所有数据均由 SPSS 12.0 统计软件进行处理, $P < 0.05$ 为统计学上差异显著性.

2 结 果

2.1 5-Aza-CdR 对胶质瘤细胞增殖的影响

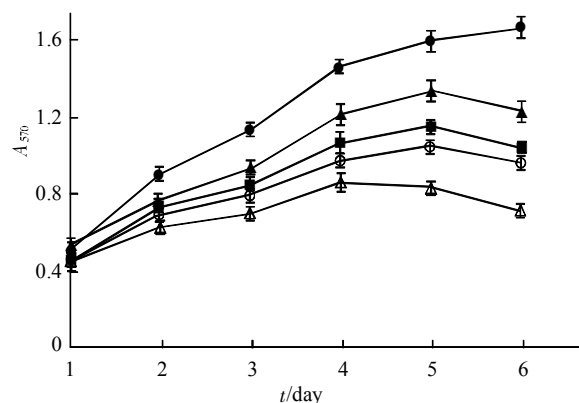
经 0 μ mol/L、0.5 μ mol/L、2.5 μ mol/L、5.0 μ mol/L 和 10.0 μ mol/L 5 个不同浓度 5-Aza-CdR 处理 SF126 和 SF767 胶质瘤细胞 1~6 天后, 除了 0.5 μ mol/L 5-Aza-CdR 处理 SF126 细胞 1 天和 0.5 μ mol/L、2.5 μ mol/L 5-Aza-CdR 处理 SF767 细胞 1 天后未见细胞生长明显抑制, 其他作用浓度和时间, 随着 5-Aza-CdR 浓度增加, 抑制 SF126 和 SF767 两株细胞生长的作用明显增强, 呈现明显的时间和剂量依赖性(表 1, 2 及图 1, 2).

Table 1 The effect on SF126 cell growth of different concentration 5-Aza-CdR for different time

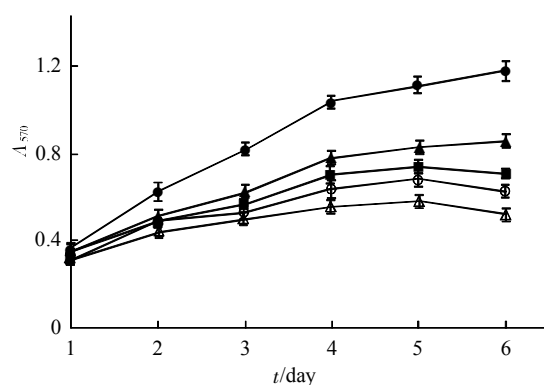
$c(5\text{-Aza-CdR})/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	A					
	1d	2d	3d	4d	5d	6d
0	0.504 ± 0.073	0.902 ± 0.027	1.128 ± 0.019	1.456 ± 0.032	1.592 ± 0.056	1.656 ± 0.054
0.5	0.535 ± 0.033	$0.759 \pm 0.049^*$	$0.934 \pm 0.026^*$	$1.215 \pm 0.062^*$	$1.337 \pm 0.047^*$	$1.231 \pm 0.059^*$
2.5	$0.458 \pm 0.048^*$	$0.724 \pm 0.046^*$	$0.841 \pm 0.037^*$	$1.062 \pm 0.050^*$	$1.148 \pm 0.036^*$	$1.036 \pm 0.019^*$
5.0	$0.451 \pm 0.027^*$	$0.701 \pm 0.041^*$	$0.796 \pm 0.028^*$	$0.978 \pm 0.017^*$	$1.044 \pm 0.035^*$	$0.965 \pm 0.023^*$
10.0	$0.447 \pm 0.052^*$	$0.627 \pm 0.036^*$	$0.704 \pm 0.023^*$	$0.857 \pm 0.044^*$	$0.832 \pm 0.032^*$	$0.714 \pm 0.039^*$

* $P < 0.05$ vs control group. ($\bar{x} \pm s$)**Table 2** The effect on SF767 cell growth of different concentration 5-Aza-CdR for different time

$c(5\text{-Aza-CdR})/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	A					
	1d	2d	3d	4d	5d	6d
0	0.358 ± 0.021	0.621 ± 0.035	0.815 ± 0.029	1.029 ± 0.015	1.107 ± 0.032	1.172 ± 0.034
0.5	0.345 ± 0.043	$0.518 \pm 0.019^*$	$0.621 \pm 0.021^*$	$0.776 \pm 0.027^*$	$0.824 \pm 0.019^*$	$0.854 \pm 0.029^*$
2.5	0.344 ± 0.022	$0.483 \pm 0.017^*$	$0.561 \pm 0.015^*$	$0.695 \pm 0.037^*$	$0.732 \pm 0.029^*$	$0.703 \pm 0.017^*$
5.0	$0.307 \pm 0.021^*$	$0.484 \pm 0.018^*$	$0.523 \pm 0.027^*$	$0.633 \pm 0.038^*$	$0.678 \pm 0.023^*$	$0.621 \pm 0.032^*$
10.0	$0.312 \pm 0.021^*$	$0.439 \pm 0.016^*$	$0.494 \pm 0.027^*$	$0.554 \pm 0.022^*$	$0.578 \pm 0.016^*$	$0.514 \pm 0.025^*$

* $P < 0.05$ vs control group. ($\bar{x} \pm s$)**Fig. 1** The effect on SF126 cell growth curve of 5-Aza-CdR

SF126 cells were treated by various concentration 5-Aza-CdR for 1~6 days. The proliferation of cells was detected by MTT assay on 1st day, 2nd day, 3rd day, 4th day, 5th day and 6th day. ●—●: 0 $\mu\text{mol/L}$; ▲—▲: 0.5 $\mu\text{mol/L}$; ■—■: 2.5 $\mu\text{mol/L}$; ○—○: 5.0 $\mu\text{mol/L}$; △—△: 10.0 $\mu\text{mol/L}$.

**Fig. 2** The effect on SF767 cell growth curve of 5-Aza-CdR

SF767 cells were treated by various concentration 5-Aza-CdR for 1~6 days. The proliferation of cells was detected by MTT assay on 1st day, 2nd day, 3rd day, 4th day, 5th day and 6th day. ●—●: 0 $\mu\text{mol/L}$; ▲—▲: 0.5 $\mu\text{mol/L}$; ■—■: 2.5 $\mu\text{mol/L}$; ○—○: 5.0 $\mu\text{mol/L}$; △—△: 10.0 $\mu\text{mol/L}$.

2.2 5-Aza-CdR 对胶质瘤细胞周期进程的影响

SF767 和 SF126 细胞经不同浓度 5-Aza-CdR 处理 3 天后, 流式细胞仪分析显示, SF767 细胞在 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 处理后 G0/G1 期的细胞数量明显增加, S 期和 G2/M 期的细胞

数目明显下降. 而 SF126 细胞在 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 处理浓度开始即出现 G0/G1 期的细胞数量明显增加, S 期和 G2/M 期的细胞数目明显下降 (图 3).

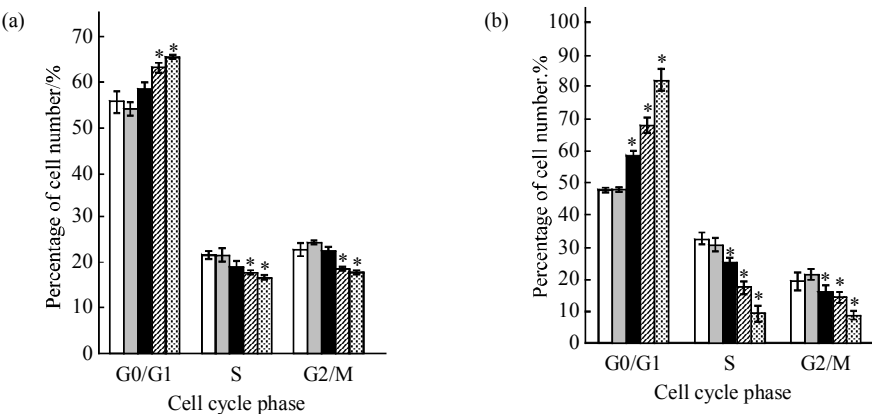


Fig. 3 The effect on glioma cell lines cell cycle of 5-Aza-CdR

Glioma cells were exposure to 5-Aza-CdR for 3 days. Cell cycle phase distribution was analysed by flow cytometry (FCM). (a) SF767 cell. (b) SF126 cell. * $P < 0.05$ vs control group. □: 0 $\mu\text{mol/L}$; ■: 0.5 $\mu\text{mol/L}$; ■: 2.5 $\mu\text{mol/L}$; ▨: 5.0 $\mu\text{mol/L}$; ▩: 10.0 $\mu\text{mol/L}$.

2.3 5-Aza-CdR 对胶质瘤细胞中 *LRRC4* 甲基化的影响

LRRC4 基因在 SF126 和 SF767 胶质瘤细胞中

为完全甲基化状态，而在经过 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR 处理 3 天后，则表现为不完全甲基化状态，即该基因甲基化得到部分逆转(图 4).

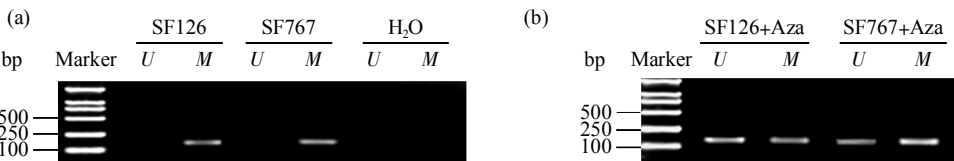


Fig. 4 *LRRC4* methylation status analysis in glioma cell lines by methylation-specific PCR

DNA from the indicated glioma cell lines was bisulfite-modified and analyzed for methylation of the *LRRC4* promoter by methylation-specific PCR analysis. The presence of a PCR product in lane U indicates unmethylated *LRRC4*. The presence of a PCR product in lane M indicates the methylated *LRRC4*. (a) SF126 and SF767 cells were untreated by 5-Aza-CdR. (b) SF126 and SF767 cells were treated by 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR for 3 days.

2.4 5-Aza-CdR 恢复胶质瘤细胞株中 *LRRC4* 的表达

经不同浓度 5-Aza-CdR 处理 SF126 和 SF767 胶质瘤细胞 4 天后，RT-PCR 检测 *LRRC4* 表达结果显示，在未经 5-Aza-CdR 处理的 SF126 和 SF767

细胞中未检测到 *LRRC4* 的表达，而在经过 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-Aza-CdR 处理后则恢复了 *LRRC4* 基因 mRNA 的表达，且 *LRRC4* mRNA 的表达水平与用药剂量有一定量效关系(图 5).

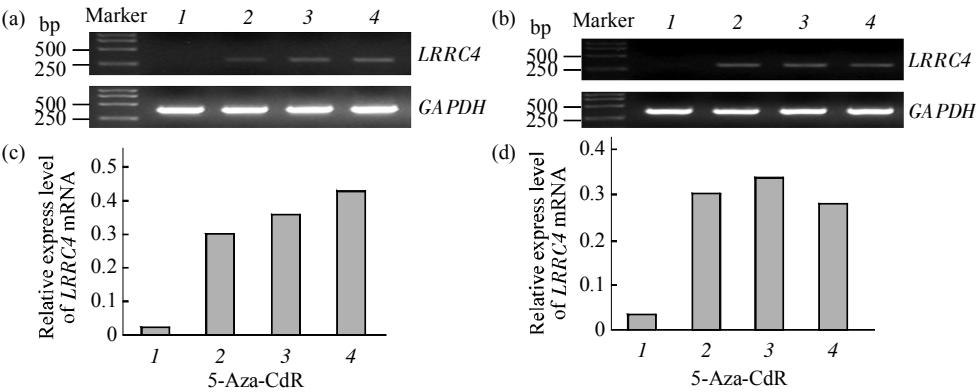


Fig. 5 5-Aza-CdR induced the expression of *LRRC4* in glioma cell lines

Glioma cell lines SF767 and SF126 were treated with four different doses of 5-Aza-CdR (0, 2.5, 5.0 and 10.0 $\mu\text{mol/L}$), as indicated above each lane, for three days. Total RNA was isolated from control, and treated cells were then analyzed by RT-PCR using the *LRRC4* primer set (top panel) and *GAPDH* primer set (bottom panel). (a)SF126 cells were treated by different doses of 5-Aza-CdR. (b) SF767 cells were treated by different doses of 5-Aza-CdR. (c) *LRRC4* mRNA relative express level in SF126 treated by different doses of 5-Aza-CdR. (d) *LRRC4* mRNA relative express level in SF767 treated by different doses of 5-Aza-CdR. 1: 0 $\mu\text{mol/L}$; 2: 2.5 $\mu\text{mol/L}$; 3: 5.0 $\mu\text{mol/L}$; 4: 10.0 $\mu\text{mol/L}$.

3 讨 论

DNA 甲基化是指生物体在 DNA 甲基化转移酶 (DNMT) 的催化下, 把 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 上的甲基转移到 CpG 二核苷酸中的胞嘧啶的第 5 位碳原子上, 从而形成 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 的过程^[5]. DNA 甲基化不仅在基因表达调控、细胞增殖、分化发育及基因印迹等方面起着重要作用, 而且与肿瘤的发生发展关系密切. 研究发现全基因组的低甲基化和局部 CpG 岛的高甲基化并存是肿瘤细胞中的普遍现象^[6]. 启动子区域 CpG 岛的高甲基化是抑瘤基因、DNA 修复基因、促凋亡基因失活的主要方式之一^[7-9]. 由于 DNA 甲基化并不是基因序列发生改变, 而只是碱基对发生甲基化修饰, 所以 DNA 甲基化是可逆的, 可通过应用去甲基化抑制剂诱导因甲基化失活的基因重新表达.

5-Aza-CdR 是一种 DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1) 的抑制剂, 它通过与 DNA 甲基化甲基转移酶的共价结合, 降低 DNA 甲基转移酶的活性, 从而实现去甲基化的功能, 逆转 DNA 的甲基化, 使甲基化沉默的基因重新表达. 肿瘤抑制基因的启动子被甲基化后功能丧失, 而 5-Aza-CdR 能重新激活肿瘤抑制基因的表达, 恢复其功能. 该药物目前已用于白血病的临床治疗, 并取得一定的疗效^[10, 11]. 本研究证实 5-Aza-CdR 对人胶质瘤细胞系 SF126 和 SF767 有显著的增殖抑制作用, 并呈浓度和时间的依赖性. 同时, 随着 5-Aza-CdR 浓度的增加, G0/G1 期的细胞数量明显增加, S 期和 G2/M 期的细胞数目明显下降, 出现 G0/G1 期阻滞. 因此, 5-Aza-CdR 抑制胶质瘤细胞 SF126 和 SF767 增殖可能是由于甲基化沉默的基因重新表达、干扰细胞周期所致.

LRRC4 是我室采用 EST 介导的定位候选克隆策略结合 5' RACE 的方法, 从染色体 7q31-32 克隆的一个富含亮氨酸重复序列的超家族新成员^[12]. *LRRC4* 不仅是脑组织特异性基因, 而且是与胶质瘤密切相关的抑瘤基因. 我们的前期研究结果表明, 外源性 *LRRC4* 基因转染可使胶质瘤细胞系 U251 生长速度减慢, 生长周期阻滞在 G0/G1 期, 软琼脂集落形成率下降, 裸鼠成瘤体积明显缩小和成瘤时间明显延迟^[13, 14]. *LRRC4* 不仅在多种恶性胶质瘤细胞系 (U251、U87、SF126、SF767、BT325 和 M17) 中表达缺失^[3], 而且在 87.5% 的原发性胶质瘤中存在显著表达下调或缺失^[15]. 为了获得

LRRC4 作为胶质瘤抑瘤基因进一步的证据, 我们初步考察 *LRRC4* 基因在胶质瘤中表达下调或缺失的机制, 发现在胶质瘤组织中 *LRRC4* 的编码区并未发生突变、缺失或重排^[4], 在表达缺失的胶质瘤细胞系中也未发现其编码区突变、缺失^[3]. 本研究是在我们成功克隆 *LRRC4* 启动子的基础之上, 考察了启动子甲基化对 *LRRC4* 表达的影响. 甲基化特异性 PCR 检测证实 *LRRC4* 启动子在胶质瘤细胞 SF126 和 SF767 中存在完全甲基化, 同时发现, 5-Aza-CdR 能够逆转 *LRRC4* 基因启动子甲基化状态, 使该基因得以开放, *LRRC4* 的 mRNA 得以重新表达, 并且与药物作用浓度存在一定的相关性. 由此证明, 5-Aza-CdR 能够使胶质瘤细胞 SF126 和 SF767 中 *LRRC4* 基因去甲基化, 使基因恢复其转录活性, 从而能够发挥 *LRRC4* 的肿瘤抑制作用, 此外也证明了 *LRRC4* 启动子甲基化是其在胶质瘤细胞中表达缺失的重要机制.

总之, 5-Aza-CdR 抑制胶质瘤细胞 SF126 和 SF767 增殖可能与干扰细胞周期、提高 *LRRC4* 的表达有关. *LRRC4* 在胶质瘤细胞中的表达缺失与其启动子的异常甲基化修饰相关, 5-Aza-CdR 能逆转 *LRRC4* 基因的甲基化, 恢复 *LRRC4* 的表达, 为 *LRRC4* 作为胶质瘤去甲基化治疗的靶标提供了科学依据.

参 考 文 献

- 1 Herman J G, Baylin S B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 2003, **349** (21): 2042~2054
- 2 武明花, 李小玲, 李桂源. 脑组织特异性基因 / 脑胶质瘤抑瘤基因 *LRRC4* 的功能研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34** (12): 1234~1239
Wu M H, Li X L, Li G Y. *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34** (12): 1234~1239
- 3 武明花, 李小玲, 黄琛, 等. *LRRC4* 基因在脑胶质瘤细胞系中表达缺失. *中南大学学报(医学版)*, 2007, **32** (2): 231~234
Wu M H, Li X L, Huang C, *et al.* *J Cent South Univ (Med Sci)*, 2007, **32** (2): 231~234
- 4 王洁如. 定位于染色体 7q31-32 脑组织相对特异表达新基因 *LRRC4* 的克隆和功能初步研究: [学位论文]. 长沙: 中南大学湘雅医学院, 2002
Wang J R. Identification and functional study of *LRRC4*, a novel brain-specific gene on chromosome 7q31-32: [thesis]. Changsha: Xiang Ya School of Medicine, Central South University, 2002
- 5 Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Nat Rev*, 2002, **16** (1): 6~21
- 6 Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 2008, **358** (11): 1148~1159
- 7 Merlo A, Herman J G, Mao L, *et al.* 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor *P16/CDKN2/MTS1* in human cancers. *Nat Med*, 1995, **1** (7): 686~

- 692
- 8 Hsu H S, Wen C K, Tang Y A, *et al.* Promoter hypermethylation is the predominant mechanism in *hMLH1* and *hMSH2* deregulation and is a poor prognostic factor in nonsmoking lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(15): 5410~5416
 - 9 Schildhaus H U, Krockel I, Lippert H, *et al.* Promoter hypermethylation of *p16INK4a*, *E-cadherin*, *O6-MGMT*, *DAPK* and *FHIT* in adenocarcinomas of the esophagus, esophagogastric junction and proximal stomach. *Int J Oncol*, 2005, **26**(6): 1493~1500
 - 10 Wijermans P W, Krulder J W, Huijgens P C, *et al.* Continuous infusion of low-dose 5-Aza-2'-deoxycytidine in elderly patients with high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, 1997, **11**(1): 1~5
 - 11 Momparler R L. Epigenetic therapy of cancer with 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol*, 2005, **32**(5): 443~451
 - 12 Zhang Q H, Wang J R, Fan S Q, *et al.* Expression and functional characterization of *LRRC4*, a novel brain-specific member of the LRR superfamily. *FEBS Lett*, 2005, **579**(17): 3674~3682
 - 13 Zhang Q H, Wang L L, Cao L, *et al.* Study of a novel brain relatively specific gene *LRRC4* involved in glioma tumorigenesis suppression using the Tet-on system. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, **37**(8): 532~540
 - 14 王洁如, 李小玲, 范松清, 等. *LRRC4* 基因表达能降低胶质母细胞瘤细胞系 U251 的生长和成瘤潜能. *癌症*, 2003, **22**(9): 897~902
 - 15 王洁如, 钱 骏, 董 利, 等. 富亮氨酸重复超家族新成员 *LRRC4* 的克隆与在脑瘤中的表达分析. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29**(2): 233~239
 - 16 Wang J R, Qian J, Dong L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29**(2): 233~239

Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on Proliferation of Glioma Cell Lines and Abnormal Methylation of *LRRC4* Gene*

ZHANG Zu-Ping^{1,2)}, WU Ming-Hua^{1)**}, TANG Hai-Lin¹⁾, WANG Rong¹⁾,
LI Dan¹⁾, LI Xiao-Ling¹⁾, LI Gui-Yuan^{1)**}

⁽¹⁾ Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China;

⁽²⁾ Parasitology Department of Xiangya Medical School, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract *LRRC4*, leucine-rich repeat C4 protein, is a new member of leucine-rich repeat (LRR) superfamily. It is a novel tumor suppressor. *LRRC4* inactivation is commonly found in glioma cell lines and primary glioma biopsies. Previous study did not find any genetic alteration of *LRRC4* in primary glioma. In order to explore an alternative mechanism underlying inactivation of *LRRC4* in glioma, glioma cell lines SF126 and SF767 were treated by methylase inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR). Methylation-specific PCR was used to examine the methylation status changes of *LRRC4* promoter in SF126 and SF767 cell lines. *LRRC4* mRNA expression in SF126 and SF767 cell lines treated by 5-Aza-CdR was detected by RT-PCR. In addition, the effect on glioma cell lines cell growth and cell cycle of 5-Aza-CdR were assayed by MTT and FCM. The results indicated that *LRRC4* promoter was completely methylated in SF126 and SF767 cells. However, *LRRC4* promoter aberrant hypermethylation can be reversed and *LRRC4* expression can be induced by 5-Aza-CdR. Moreover, 5-Aza-CdR displayed a growth inhibitory effect on SF126 and SF767 cells in a dose- and time-dependent manner after exposure to 5-Aza-CdR at different concentration for different time. FCM analysis showed that SF126 and SF767 cells cell cycles were blocked at G0/G1 phase after 5-Aza-CdR treatment for three days. Taken together, glioma cell lines SF126 and SF767 cell growth could be inhibited and cell cycles could be blocked by 5-Aza-CdR; promoter hypermethylation is the important mechanism of *LRRC4* inactivation in glioma cell lines; methylation can be reversed and *LRRC4* expression can be induced by 5-Aza-CdR. All this suggest that *LRRC4* may serve as a demethylation therapeutic target in glioma.

Key words 5-Aza-CdR, glioma cell lines, *LRRC4* gene, DNA methylation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00811

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2006CB910502, 2006CB910504), The 111 Project of China (111-2-12), The National Natural Science Foundation of China (30770825, 3060024) and Hunan Province Natural Sciences Foundations of China (06JJ20080).

**Corresponding author.

LI Gui-Yuan. Tel: 86-731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

WU Ming-Hua. Tel: 86-731-4805446, E-mail: wuminghua554@yahoo.com.cn

Received: November 25, 2008 Accepted: March 25, 2009