



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.06.025
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.06.025
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(6):889-891.

· 简要论著 ·

zebularine 对人胃癌 SGC-7901 细胞株抑癌基因 p16 表达的影响

张征, 陈先祥, 董荣坤, 董毅飞

(湖北医药学院附属人民医院 胃肠外科, 湖北 十堰 442000)

摘要

目的: 观察甲基化转移酶抑制剂 zebularine 对人胃癌 SGC-7901 细胞株抑癌基因 p16 表达的影响。

方法: 采用 MTT 法和划痕实验检测 zebularine 对人胃癌 SGC-7901 细胞株的抑制率及其细胞迁移率的影响, 采用 real-time PCR 检测作用前后抑癌基因 p16 表达的变化。

结果: (1) 终浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 zebularine 作用 24 h 能显著抑制 SGC-7901 细胞株的增殖率和迁移率。MTT 法对照组吸光度为 0.50 ± 0.01 , 实验组为 0.45 ± 0.02 , 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 对照组划痕愈合率为 $(47.45 \pm 10.05)\%$ 低于实验组的 $(88.23 \pm 5.45)\%$ ($P < 0.05$)。 (2) zebularine 作用 24 h 能显著增加抑癌基因 p16 mRNA 的表达, 实验组为 5.21 ± 0.67 显著高于对照组的 1.04 ± 0.09 ($P < 0.05$)。

结论: 甲基化转移酶抑制剂 zebularine 可以有效抑制 SGC-7901 细胞株的增殖和迁移并提高抑癌基因 p16 mRNA 的表达。

关键词

胃肿瘤; zebularine; 抑癌基因; 甲基化

中图分类号: R735.2

p16 是公认的抑癌基因, 该基因的失活在肿瘤细胞异常增生过程中起重要作用, 有研究^[1]表明 p16 基因启动子区域高甲基化是其失活的主要机制。由于 DNA 甲基化是一个可逆的过程, 多项研究^[2-3]表明, 去甲基化干预可以恢复抑癌基因的功能, 从而有效控制肿瘤的发生和发展。本研究旨在探讨甲基化转移酶抑制剂 zebularine 对人胃癌 SGC-7901 细胞株增殖、迁移及 p16 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞株 SGC-7901 购自 ATCC (American Tissue Culture Collection)。zebularine 购自 Merck-

Calbiochem 公司, 货号为 3690-10-6, 用 PBS 溶解配成 10 mmol/L 的储液分装, 冻存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。RPMI-1640 培养基、PBS 缓冲液、胰酶消化液、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司。MTT 购自美国 Sigma 公司, 使用 Bio-Rad 紫外分光光度计比色。RNA 提取液 Trizol 和反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司。引物由上海生工生物工程公司合成。Real-time PCR 使用 ABI ViiA7 实时荧光定量 PCR 仪。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

SGC-7901 使用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基 (完全培养基) 培养, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 饱和湿度, 5% CO_2 中开放培养。细胞每 2~3 d 传代 1 次, 所有实验均取对数生长期的细胞进行。实验分为实验组和对照组, 实验组为完全培养基中加入 zebularine (终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$), 对照组为不含 zebularine 的完全培养基。

1.3 MTT 实验

取对数生长期的 SGC-7901 细胞按 2.5×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板 (200 μL /孔)。待 24 h 细胞贴

基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划资助项目 (B2014056)。

收稿日期: 2015-03-09; **修订日期:** 2015-04-19。

作者简介: 张征, 湖北医药学院附属人民医院主治医师, 主要从事胃肠外科方面的研究。

通信作者: 董毅飞, Email: 87113734@qq.com

壁后,吸除原有培养基,对照组使用完全培养基培养,实验组为完全培养基中加入zebularine(终浓度为100 μmol/L),各孔的液体体积均为200 μL,每组重复10孔,培养24 h后,每孔加入5 mg/mL的MTT 20 μL,混匀,37 °C培养箱温育4 h后弃上清,每孔加入150 μL DMSO,震荡15 min,待结晶完全溶解后于酶标仪上检测490 nm波长的吸光度(A)值。实验重复3次。按以下公式计算zebularine对细胞的抑制率。抑制率(%) = 1 - (实验组A值 - 空白对照孔A值) / (对照组A值 - 空白对照孔A值) × 100%。

1.4 划痕实验

SGC-7901细胞按 2.5×10^4 个/mL的密度接种于6孔板中,每孔加入2 mL完全培养基,细胞融合度达到80%~90%时,用200 μL的枪头沿着孔中间的线做出划痕,PBS洗2次,为了排除增殖对迁移实验的影响,对照组使用不含血清的RPMI1640培养基培养,实验组为同样的培养基中加入zebularine(终浓度为100 μmol/L),每孔2 mL,每组设3个复孔。倒置显微镜下观察照相,此时记为0 h。置培养箱中继续培养24 h后取出6孔板,在同一观察点处观察划痕愈合情况。比较各组细胞的愈合情况,通过测量多个点划痕宽度,计算平均划痕愈合率。实验重复3次。划痕愈合率(%) = (0 h划痕宽度 - 24 h划痕宽度) / 0 h划痕宽度 × 100%。

1.5 Real-time PCR

SGC-7901细胞按 2.5×10^4 个/mL的密度接种于6孔板中,每孔加入2 mL完全培养基,细胞融合度达到80%~90%时,吸除原有培养基。对照组换用完全培养基培养,实验组为完全培养基中加入zebularine(终浓度为100 μmol/L),各孔的液体体积均为2 mL,每组重复3孔,培养24 h后,每孔加入1 mL Trizol(invitrogen公司),按照说明书提取总RNA,溶解于DEPC水中,储存于-80 °C。Nanodrop微量紫外分光光度仪检测RNA的浓度和纯度。将提取的总RNA稀释到浓度为1 μg/μL,进行反转录。使用Superscript® III试剂盒,随机引物,合成cDNA。Real-time PCR使用384孔板,SYBR® Green PCR试剂盒,反应体系为20 μL。p16的上游引物序列为5'-ATGGAGCCTTCGGCTGACTG-3',下游引物序列5'-CGGGCATGGTTACTGCTCT-3'。内参为GAPDH,其上游引物序列为5'-GACAGTCAGCCGCATCTTCT-3',下游引物序列为5'-ACATGTAAACCATGTAGTTGAGGT-3'。

实验重复3次。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对于GAPDH的比值。

1.6 统计学处理

使用SPSS 13.0统计软件分析,两组间均数比较采用t检验。

2 结果

2.1 zebularine 对人胃癌细胞系 SGC-7901 增殖和迁移的影响

MTT实验显示终浓度为100 μmol/L的zebularine作用24 h能明显抑制人胃癌细胞系SGC-7901的增殖,对照组吸光度为 0.50 ± 0.01 ,实验组吸光度为 0.45 ± 0.02 ,两组比较($P < 0.05$)。划痕愈合实验显示,终浓度为100 μmol/L的zebularine作用24 h能明显抑制人胃癌细胞系SGC-7901的迁移,对照组划痕愈合率为 $(47.45 \pm 10.05)\%$,实验组划痕愈合率为 $(88.23 \pm 5.45)\%$,对照组明显低于实验组($P < 0.05$)。

2.2 zebularine 对 SGC-7901 细胞 p16 mRNA 表达的影响

Real-time PCR结果显示,终浓度为100 μmol/L的zebularine作用24 h可以明显提高p16 mRNA的表达。对照组相对表达量为 1.04 ± 0.09 ,实验组为 5.21 ± 0.67 ,实验组明显高于对照组($P < 0.05$) (图1)。

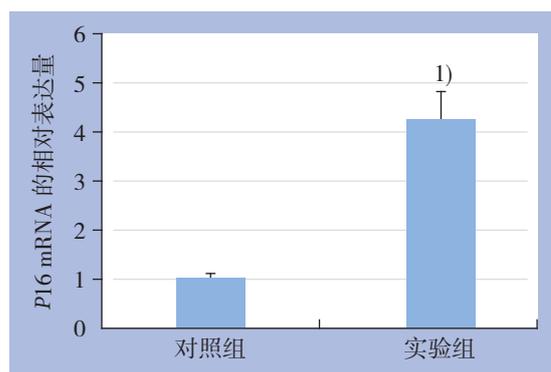


图1 zebularine 对人胃癌细胞株 SGC-7901 p16 mRNA 表达的影响 注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

DNA甲基化过程通常是在基因组中CpG岛的胞嘧啶环上第5位碳原子发生甲基化,为可遗传、可逆的过程。通过逆转甲基化过程,沉

默的抑癌基因可能重新表达,这可能是胃癌治疗的新的有效途径^[4]。DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)是DNA发生并维持甲基化的关键酶。目前已证明DNMT过度表达参与胃癌的发生^[5],以DNMT为靶点治疗胃癌的探索是目前研究的热点。

DNMT抑制剂在胃癌的治疗中研究最多的是5-杂氮胞嘧啶核苷(5-azacitidine, 5-aza-C)和5-脱氧杂氮胞嘧啶核苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC),已有多个实验验证了其有效性。随着研究的深入,这两种DNMT抑制剂的缺点也日益显现,它们水溶液中不稳定且具有毒性,应用过程中与DNA结合形成的不可逆的共价复合物可能会引起远期的并发症,包括由于DNA突变引起肿瘤再发的可能性,因此在临床应用中存在局限性^[6]。zebularine是可溶性的第二代甲基化转移酶抑制剂,口服生物利用度高,具有很高的稳定性,在体内试验和体外实验中均表现出很好的安全性^[7]。

本实验结果显示zebularine作用24 h可明显抑制人胃癌细胞系SGC-7901的增殖和迁移,证明zebularine在体外能够较好地发挥抗癌效果。为了初步研究zebularine抑制肿瘤细胞增殖和迁移的机制,本研究检测了终浓度为100 μM 的zebularine作用24 h后SGC-7901 p16 mRNA的表达量,实验证实24 h后p16 mRNA的表达明显提高。

p16基因又叫MTS(multiple tumor suppressor)基因,是1994年美国冷泉实验室发现的新抗癌基因。p16基因定位于人染色体9p21,由2个内含子和3个外显子组成,p16基因是细胞周期中的一种基本基因,其表达产物直接参与细胞增殖的负调节,当p16基因发生突变和缺失,就会丧失对细胞分裂的调控,导致细胞的异常增殖,最终形成肿瘤。

2000年,Shim等^[8]用甲基化特异性PCR研究了58例散发性胃癌,p16基因的甲基化率为42%且与p16蛋白表达呈负相关。国内研究发现,原发性胃癌p16基因的甲基化率为60.19%,对存在有p16基因启动子甲基化并表达沉默的肿瘤细胞系,用5-aza-dC治疗,使肿瘤细胞重新恢复了p16蛋白的表达,并呈现出生长抑制。进一步说明在胃癌中p16基因甲基化导致了p16表达沉默^[9]。通过实验,笔者推测zebularine可能是通过促进SGC-7901抑癌基因p16 mRNA表达,进而发挥了抑制胃癌细胞增殖和迁移的作用。

2013年,有学者^[10]发现zebularine可以在体内和体外诱导胃癌肿瘤细胞的凋亡,总之,基于其

良好的有效性、稳定性、生物利用度和安全性,zebularine有可能应用于胃癌的长期持续治疗,但尚需进一步的临床试验验证。

参考文献

- [1] Song SH, Jong HS, Choi HH, et al. Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16(INK4a) expression in gastric adenocarcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2000, 87(2):236-240.
- [2] Kim M, Lee KT, Jang HR, et al. Epigenetic down-regulation and suppressive role of DCBLD2 in gastric cancer cell proliferation and invasion[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(2):222-230.
- [3] Steele N, Finn P, Brown R, et al. Combined inhibition of DNA methylation and histone acetylation enhances gene re-expression and drug sensitivity in vivo[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(5):758-763.
- [4] Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(1): 37-50.
- [5] Ding WJ, Fang JY, Chen XY, et al. The expression and clinical significance of DNA methyltransferase proteins in human gastric cancer[J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(8):2083-2089.
- [6] Nakamura K, Aizawa K, Nakabayashi K, et al. DNA methyltransferase inhibitor zebularine inhibits human hepatic carcinoma cells proliferation and induces apoptosis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e54036. doi: 10.1371/journal.pone.0054036.
- [7] Dote H, Cerna D, Burgan WE, et al. Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by the DNA methylation inhibitor zebularine[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(12):4571-4579.
- [8] Shim YH, Kang GH, Ro JY. Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas[J]. *Labs Invest*, 2000, 80(5):689-695.
- [9] 齐翀, 李建芳, 瞿颖, 等. 胃癌及癌旁组织多个肿瘤相关基因超甲基化[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2007, 27(5):555-558.
- [10] Tan W, Zhou W, Yu HG, et al. The DNA methyltransferase inhibitor zebularine induces mitochondria-mediated apoptosis in gastric cancer cells in vitro and in vivo[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(1):250-255.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 张征, 陈先祥, 董荣坤, 等. zebularine对人胃癌 SGC-7901细胞株抑癌基因p16表达的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(6):889-891. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.06.025

Cite this article as: ZHANG Z, CHEN XX, DONG RK, et al. The effect of zebularine on p16 mRNA expression in SGC-7901 cell line[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(6):889-891. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.06.025