

放多种碱性蛋白和脂质体造成气道上皮损伤、气道反应性增高、黏液分泌增多,以及间歇性气道阻塞;EOS 尚能释放多种细胞因子,影响其它细胞功能^[5]。本实验表明:香青总黄酮中、高剂量组可明显减少哮喘大鼠 BALF 中 EOS 数量,减小气管螺旋条张力变化值,提示香青兰总黄酮可抑制哮喘发病过程中 EOS 浸润、改善哮喘气道炎症及高反应性。动物实验的结果为香青兰总黄酮的新药开发奠定了基础。

REFERENCES

[1] ZHOU D Y, CAO Q, HUANG M, et al. Effect of grape seed proanthocyanidin extract on airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma [J]. Acta

Univ Med Nanjing(Nat Sci)(南京医科大学学报:自然科学版), 2011, 31(7): 981-985

[2] LIU Y M. Collection of Uygur Medicine(维吾尔药志) [M]. Xinjiang Urumqi: Science and technology Health Publishing House of Xinjiang, 1999: 405-407

[3] WANG Z X, YANG G Z, SONG L J, et al. The effect of glycyrrhizic acid on serum IgE level of asthmatic rat model and patients with asthma [J]. Chin J Immunol(中国免疫学杂志), 2003, 19(2): 124-127

[4] WANG S L, DU F F, WANG L L, et al. Effects of Cordyceps polysaccharide on the OVA-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine asthmatic model [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(12): 1090-1094.

[5] KULKARNI N S, HOLLINS F, SUTCLIFFE A, et al. Eosinophil protein in airway macrophages: A novel biomarker of eosinophilic inflammation in patients with asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(1): 61-69.

收稿日期: 2012-06-18

地西他滨联合丙戊酸钠促胃癌 MGC-803 细胞 nm23-H1 基因表达及机制研究

张国强, 彭敏霞, 王晔恺, 周吉航, 曾芳(舟山医院, 浙江 舟山 316004)

摘要:目的 探讨地西他滨(DCA)和丙戊酸钠(VPA)联用对胃癌细胞株 MGC-803 的作用及对 non-metastasis 23-H1 基因(nm23-H1)的表达调控的影响。方法 DCA 1.5 及 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, DCA 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, DCA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 MGC-803 细胞 72 h。Annexin V/PI 法检测细胞凋亡, 实时荧光定量 PCR 检测 nm23-H1 mRNA 表达, 焦磷酸测序法检测 nm23-H1 启动子上随机选取的两个 CpG 岛位点甲基化状态。结果 VPA 1.5 +DCA 1.5 联合用药组[早期:(33.58±3.88)%, 晚期:(31.52±4.20)%]和 VPA 1.5 +DCA 3.0 联合用药组[早期:(42.61±4.23)%, 晚期:(38.01±3.86)%]凋亡率均高于其相应单药组, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。nm23-H1 mRNA 在 VPA 1.5 +DCA 1.5 联合用药组(1.84±0.46)和 VPA 1.5 +DCA 3.0 联合用药组(2.88±0.42)的表达水平均高于其相应单药组, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。VPA 1.5 +DCA 1.5 联合用药组[位点 1: (53.50±3.39)%, 位点 2: (51.17±2.71)%]和 VPA 1.5 +DCA 3.0 联合用药组[位点 1: (41.17±2.14)%, 位点 2: (39.83±2.56)%]nm23-H1 启动子两位点甲基化阳性率均低于其相应单药组, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、VPA 1.5+DCA 1.5、VPA 1.5+DCA 3.0 这 3 组的 HDAC 酶活性均低于正常对照、DCA 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、DCA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 任一组, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。结论 DCA 联合 VPA 能显著上调 nm23-H1 基因的表达, 其机制与启动子上的甲基化水平降低和去乙酰化酶活性降低有关。

关键词: nm23-H1 基因; MGC-803 细胞; 丙戊酸钠; 地西他滨

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)03-0238-05

Synergistic Effect of Decitabine and Valproic Acid on Non-metastasis 23-H1 Expression in Gastric MGC-803 Cells

ZHANG Guoqiang, PENG Mingxia, WANG Yekai, ZHOU Jihang, ZENG Fang(Zhoushan Hospital, Zhoushan 316004, China)

基金项目: 舟山市科技局科技计划项目(No.06577)

作者简介: 张国强, 男, 主任医师 Tel: 13506805168 E-mail: zgq5168.p@163.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the synergistic effect of decitabine(DCA) and valproic acid(VPA) on non-metastasis 23-H1 (nm23-H1) gene expression in gastric MGC-803 cells. **METHODS** The groups were set as follows: DCA 1.5 and 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, DCA 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, DCA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. The cells were treated by drug for 72 h. The early and late apoptosis rates were detected by staining with Annexin V and PI. The nm23-H1 mRNA expressions levels were detected by real-time quantity PCR. Methylation status of 2 CpG island selected randomly was detected by pyrosequencing. **RESULTS** The apoptosis rates of VPA 1.5 +DCA 1.5 group [early: (33.58±3.88)%, late: (31.52±4.20)%] and VPA 1.5+DCA 3.0 [early: (42.61±4.23)%, late: (38.01±3.86)%] were significantly higher than their corresponding concentration single drug groups ($P<0.01$). The nm23-H1 mRNA relative expression in VPA 1.5+DCA 1.5 group (1.84±0.46) and VPA 1.5+DCA 3.0 group(3.02±0.36) were significantly higher than their corresponding concentration single drug groups($P<0.01$). The methylation percentages of 2 CpG islands of nm23-H1 promoter in VPA 1.5 +DCA 1.5 group [site1: (53.50±3.39)%, site2: (51.17±2.71)%] and VPA 1.5+DCA 3.0 group [site1: (41.17±2.14)%, site2: (39.83±2.56)%] were significantly lower than their corresponding concentration single drug groups($P<0.01$). The histone deacetylases(HDAC) activity of each of VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, VPA 1.5+DCA 1.5, VPA 1.5+DCA 3.0 groups was significantly lower than either of Normal control, DCA 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, DCA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups($P<0.01$). **CONCLUSION** The induction of nm23-H1 mRNA expression by combinations of DCA and VPA is dependent on decreasing the methylation status of nm23-H1 promoter and reducing HDAC activity in gastric MGC-803 cells.

KEY WORDS: nm23-H1 gene; MGC-803 cell; decitabine; valproic acid

转移抑制基因 23-H1(non-metastasis 23-H1, nm23-H1)参与肿瘤细胞的浸润和转移过程,在多种肿瘤如结肠癌^[1]、前列腺癌^[2]、非小细胞肺癌^[3]中,抑癌基因 nm23-H1 的低表达与肿瘤侵袭转移及患者预后高度相关,并且体外胃癌细胞株从低侵袭性的悬浮态向高侵袭性的黏附态转化中也出现胞内 nm23-H1 的表达降低^[4]。但胃部肿瘤中 nm23-H1 的表达降低是否涉及表观遗传学的改变,利用常见的表观遗传学调控药物在体外环境如胃癌细胞株中能否激活 nm23-H1 的表达,以及这种激活对于癌细胞的性状有何影响,目前的报道尚不多见。因此笔者通过将地西他滨(decitabine, DCA)和丙戊酸钠(valproic acid, VPA)两种表观遗传学机制的药物联用,观察其在胃癌 MGC-803 细胞株促 nm23-H1 基因表达作用,探讨其对胃癌细胞活性及侵袭性抑制作用的机制。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂和仪器

地西他滨(5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷粉剂)购自 Sigma,注射用丙戊酸钠(德巴金针)购自赛诺菲-安万特公司, FITC 标记的膜联蛋白-碘化丙啶(Annexin V/PI)凋亡试剂盒购自美国 BD 公司, DNA 提取纯化试剂盒购自美国 Promega 公司, 焦磷酸测序 PCR 试剂盒 PyroMark[®] PCR Kit 购自 Qiagen 公司, 焦磷酸测序平台为 Qiagen 公司的 PyroMark Q96 ID, Trizol 购自美国 Invitrogen 公司, One Step SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 Takara, 小牛血清和 RPMI 1640 培养液购自

碧云天生物技术研究, HDAC 组蛋白去乙酰化酶(HDAC)活性比色分析试剂盒购自 Biovision。 nm23-H1-Forward: 5-TGGTGAAGACGGGCGGAG TCA-3, nm23-H1-Reverse: 5-ATCAGATGGTCGG GGATGGTAACAC-3, 产物长度 382 bp。 GAPDH-Forward: 5-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3, GAPDH-Reverse: 5-GGGGTCATTGATGGCAACA ATA-3, 产物长度 102 bp。 荧光 PCR 仪为 ABI 7500, CO₂ 培养箱为德国 Jouan IG150, 流式细胞仪为美国 BD FACSCalibur, 获取软件为 CellQuest, 细胞周期分析软件为 flowjo, 冰冻离心机为 eppendorf 5714R。

1.2 细胞培养及药物处理

胃癌细胞株 MGC-803 购自中科院上海细胞库。用含 10%小牛血清、100 U·L⁻¹青霉素、100 U·L⁻¹链霉素的 RPMI 1640 培养液在 37 °C、5%CO₂ 的培养箱中培养,取对数期细胞备用。配制密度为 1 × 10⁸ L⁻¹ 的细胞悬液接种于 6 孔培养板,每孔 2 mL,置 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养过夜,按照分组分别加入终浓度为 DCA 1.5 和 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, DCA 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, DCA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 每组设 6 复孔,作用 72 h 后各孔吸出培养液, PBS 洗 1 次,吸弃 PBS 后进行实验。

1.3 Annexin V/PI 标记法观察细胞凋亡

“1.2”项下细胞用预冷 PBS 洗涤弃上清,残渣细胞收集至流式管。每管加 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,避光静置 15 min,加 300 μL 预冷的

PBS, 振荡混匀上机检测其早期凋亡率。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 nm23-H1 mRNA 表达

Trizol 提取总 RNA, A260/280 鉴定完整性和纯度, 反应体系 20 μL : 包括总 RNA 2 μL , PCR 正向引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 1 μL , ROX Reference Dye II (50 \times)0.4 μL , Primer Script One Step Enzyme Mix II 0.8 μL , One Step Sybr RT-PCR Buffer(2 \times) 10 μL , 加 ddH₂O 补足 20 μL 。反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 40 cycles。2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法分析 nm23-H1 mRNA 相对表达量。

1.5 焦磷酸测序法检测 nm23-H1 基因启动子甲基化

通过生物信息学分析得到-3922 至-3090 区域为富含 CpG 岛区域, 设计引物扩增并采用焦磷酸测序法检测, 随机选取其中 2 个 CpG 岛位点比较此位点上各药物组甲基化水平。此实验由基因科技(上海)有限公司协助完成。

1.6 比色法检测 HDAC 活性

以试剂盒中的 Hela 细胞核提取物和曲古菌素 A 分别作为阳性和阴性对照, 将 MGC-803 细胞裂解, 12 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心取上清并纯化, 取 50 μg 蛋白提取液加入 96 孔板中, 每孔加 50 μL 2 \times HAT 分析缓冲液, 5 μL HAT 底物, 5 μL 酶混合物, 混匀 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 450 nm 读取 OD 值, 将对照组的 6 次检测结果的均值作为 100%, 各加药组均按照对照组均值为 100%换算成相应活性百分比。

1.7 统计学分析

实验数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件, 对各组中的 nm23-H1 mRNA、早期凋亡率、2 个 CpG 岛位点的甲基化百分比做单因素方差分析和 LSD 两两检验, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 Annexin V/PI 法检测细胞凋亡

所有加药组早期凋亡率均高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.01$); VPA 1.5 + DCA 3.0 联合用药组高于 DCA 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 差异具有统计学意义($P < 0.01$); VPA 1.5 + DCA 3.0 联合用药组高于 DCA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结果见表 1 和图 1。

表 1 地西他滨联合丙戊酸钠对 MGC-803 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Synergistic effect of DCA and VPA on MGC-803 apoptosis($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	凋亡率/%	
	早期	中晚期
对照组	2.91 \pm 0.39	5.31 \pm 0.36
DCA 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10.63 \pm 1.86 ¹⁾	10.93 \pm 1.32 ¹⁾
DCA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	27.33 \pm 2.19 ¹⁾	32.84 \pm 3.22 ¹⁾
VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	7.33 \pm 1.15 ¹⁾	5.23 \pm 1.36 ¹⁾
VPA 1.5+DCA 1.5	33.58 \pm 3.88 ¹⁾²⁾	31.52 \pm 4.20 ¹⁾²⁾
VPA 1.5+DCA 3.0	42.61 \pm 4.23 ¹⁾²⁾	38.01 \pm 3.86 ¹⁾²⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与其相应的单药浓度组比较, ²⁾ $P < 0.01$
 Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with corresponding concentration drug group, ²⁾ $P < 0.01$

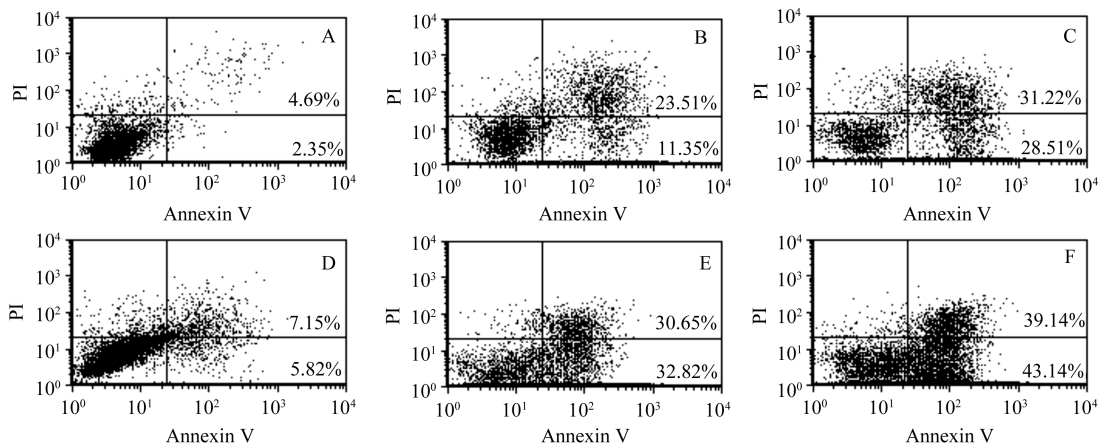


图 1 Annexin V/PI 染色检测地西他滨联合丙戊酸钠对 MGC-803 细胞凋亡的影响

A-正常对照组; B-地西他滨 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C-地西他滨 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D-丙戊酸钠 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; E-丙戊酸钠 1.5+地西他滨 1.5; F-丙戊酸钠 1.5+地西他滨 3.0

Fig 1 Synergistic effect of DCA and VPA on MGC-803 apoptosis detected by Annexin V/PI staining

A-normal control; B-DCA 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C-DCA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D-VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; E-VPA 1.5+DCA 1.5; F-VPA 1.5+DCA 3.0

2.2 地西他滨联合丙戊酸钠对 MGC-803 细胞中 nm23-H1 mRNA 表达的影响

所有加药组 nm23-H1 mRNA 均高于对照组, 差异具有统计学意义($P<0.01$); VPA 1.5+DCA 1.5 联合用药组高于 DCA 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 差异具有统计学意义($P<0.01$); VPA 1.5+DCA 3.0 联合用药组高于 DCA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。结果见表 2。

表 2 地西他滨联合丙戊酸钠对 HL-60 细胞中 nm23-H1 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab 2 Synergistic effect of DCA and VPA on nm23-H1 mRNA expression of MGC-803 cells($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	nm23-H1 mRNA 相对表达量
对照组	0.43±0.12
DCA 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.96±0.21 ¹⁾
DCA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.31±0.20 ¹⁾
VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.69±0.09 ¹⁾
VPA 1.5+DCA 1.5	1.84±0.46 ¹⁾²⁾
VPA 1.5+DCA 3.0	2.88±0.42 ¹⁾²⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与其相应的单药浓度组比较, ²⁾ $P<0.01$
 Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with corresponding concentration drug group, ²⁾ $P<0.01$

2.3 焦磷酸测序法检测 nm23-H1 基因启动子甲基化

所有加药组 nm23-H1 mRNA 均高于对照组, 差异具有统计学意义($P<0.01$); VPA 1.5+DCA 1.5 联合用药组高于 DCA 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 差异具有统计学意义($P<0.01$); VPA 1.5+DCA 3.0 联合用药组高于 DCA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。结果见表 3 和图 2。

表 3 地西他滨联合丙戊酸钠对 MGC-803 细胞中 nm23-H1 启动子 2 个 CpG 位点甲基化水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab 3 Synergistic effect of DCA and VPA on 2 CpG sites of nm23-H1 promoter in MGC-803 cells($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	CpG 位点 1 甲基化比率/%	CpG 位点 2 甲基化比率/%
对照组	91.17±2.79	80.50±2.88
DCA 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	65.00±2.83 ¹⁾	62.50±3.08 ¹⁾
DCA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	53.17±4.07 ¹⁾	50.50±1.87 ¹⁾
VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	75.33±3.67 ¹⁾	68.50±3.27 ¹⁾
VPA 1.5+DCA 1.5	53.50±3.39 ¹⁾²⁾	51.17±2.71 ¹⁾²⁾
VPA 1.5+DCA 3.0	41.17±2.14 ¹⁾²⁾	39.83±2.56 ¹⁾²⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与其相应的单药浓度组比较, ²⁾ $P<0.01$
 Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with corresponding concentration drug group, ²⁾ $P<0.01$

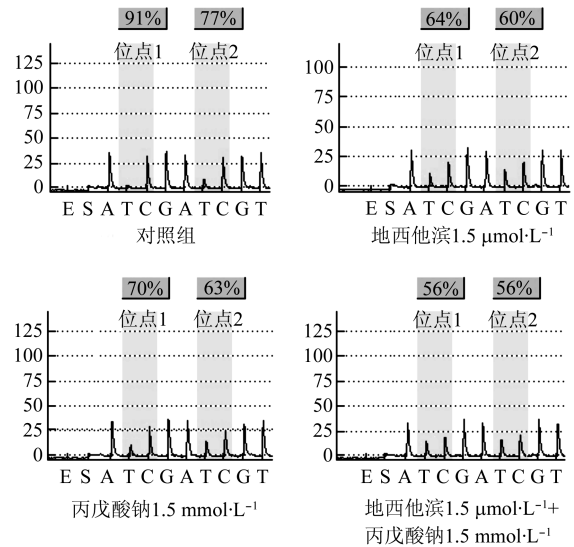


图 2 焦磷酸测序法检测 nm23-H1 基因启动子 2 个 CpG 位点甲基化(正义链)

Fig 2 Methylation percentages of 2 CpG sites of nm23-H1 promoter calculated by pyrosequencing(sense chain)

2.4 比色法检测 HDAC 活性

VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、VPA 1.5+DCA 1.5、VPA 1.5+DCA 3.0 这 3 组的 HDAC 酶活性均低于对照组、DCA 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、DCA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 任一组, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。结果见表 4。

表 4 地西他滨联合丙戊酸钠对 MGC-803 细胞中 HDAC 的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab 4 Synergistic effect of DCA and VPA on HDAC in MGC-803 cells($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	相对对照组的 HDAC 活性百分比/%
对照组	100.00±11.24
DCA 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	98.00±5.90
DCA 3.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	93.83±8.03
VPA 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	48.00±10.30 ¹⁾
VPA 1.5+DCA 1.5	46.83±10.19 ¹⁾
VPA 1.5+DCA 3.0	45.67±8.24 ¹⁾

注: 与前 3 组比较, ¹⁾ $P<0.01$

Note: Compared with the first three groups, ¹⁾ $P<0.01$

3 讨论

nm23 基因定位于 17 号染色体长臂的着丝点附近, 有 3 种亚型, 其中以 nm23-H1 与癌细胞转移的关系更为密切。Que 等^[5]认为胃癌患者癌组织中低表达 nm23-H1 和高表达的 h-prune 基因共同作用从而增强了肿瘤细胞转移活性, 引起较差的预后。在体外, 利用载体过表达 nm23-H1 也能通过

TGF- β 信号通路^[6]抑制多种肿瘤细胞活性。DCA 和 VPA 分别为 DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化两种不同表观遗传学机制的药物,在体内体外联用对多种肿瘤细胞均体现出较佳的抗肿瘤活性和恢复抑癌基因表达的效果,如卢等^[7]联用 DCA 和 VPA 对 U266 细胞恢复抑癌基因 RASSF1A 基因的表达, Luszczyk 等^[8]联用 DCA 和 VPA 作用于小细胞肺癌引起其 DNA 损伤。除了直接作用于细胞活性以外,两类药联用还能间接增强部分肿瘤细胞对外部处理因素的敏感性,如 Cho 等^[9]观察到 2 类药联用能增强结肠癌细胞和乳腺癌细胞的辐射敏感性。本研究显示,2 种药物能共同促胃癌细胞 MGC-803 凋亡,并且早期/中晚期凋亡率均呈 DCA 剂量依赖性,其中可能和共同促抑癌基因 nm23-H1 的表达有关。通过焦磷酸测序随机选取两位点发现,nm23-H1 启动子区 DNA 甲基化与组蛋白去乙酰化有协同抑制基因转录的作用,而 DCA 和 VPA 联用则具有逆转这一作用的效果。但对胃癌细胞的研究发现,高甲基化的、转录静止的基因通过组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 和 DNA 甲基转移酶抑制剂 DCA 处理后能再活化,但仅用 TSA 则收效甚微。这一研究提示了 DNA 甲基化在转录调控中占主导地位,它可以通过不依赖于组蛋白去乙酰化的方式抑制基因的转录^[10]。同时笔者也观察到,去甲基化药物对 HDAC 活性抑制效果较低,甲基化药物浓度的增强也并未能明显加强丙戊酸钠抑制 HDAC 活性的作用,这也进一步印证了 DNA 甲基化在转录调控中的主导地位。

目前临床胃癌的一线化疗方案的顺铂等药物多为细胞周期特异性或非特异性药物,通过干扰细胞分裂某一特定或多个时期实现对肿瘤细胞的增殖抑制,对正常细胞带有非特异性杀伤作用,不良反应多。相对于细胞周期化疗药物,表观遗传学调控药物有着低毒,起效快等优点,但往往单种表观遗传学药物疗效并不稳定。笔者通过在体外联用两种机制药物发现其能大大增强肿瘤细

胞的早期凋亡率,这可能和 nm23-H1 基因得到了重激活有关。提示临床上将两种药物联用可能会收到更好的疗效。但本研究尚存有局限性:虽然笔者观察到 nm23-H1 表达增强,但由于表观遗传学药物具有激活多种抑癌基因的效果,故不排除两药联合作用于 MGC-803 细胞凋亡中有其他抑癌基因的参与,尚需进一步研究。

REFERNECES

- [1] PASZ-WALCZAK G, SALAGACKA A, POTEMSKI P, et al. Maspin and Nm23-H1 expression in colorectal cancer [J]. *Neoplasma*, 2010, 57(2): 95-101.
- [2] ANDOLFO I, DE MARTINO D, LIGUORI L, et al. Correlation of NM23-H1 cytoplasmic expression with metastatic stage in human prostate cancer tissue [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2011, 384(4-5): 489-498.
- [3] LIU C, LIU J, WANG X, et al. Prognostic impact of nm23-H1 and PCNA expression in pathologic stage I non-small cell lung cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2011, 104(2): 181-186.
- [4] IIZUKA N, TANGOKU A, HAZAMA S, et al. Nm23-H1 gene as a molecular switch between the free-floating and adherent states of gastric cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2001, 174(1): 65-71.
- [5] OUE N, YOSHIDA K, NOGUCHI T, et al. Increased expression of h-prune is associated with tumor progression and poor survival in gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(8): 1198-205.
- [6] MARINO N, MARSHALL J C, STEEG P S. Protein-protein interactions: a mechanism regulating the anti-metastatic properties of Nm23-H1 [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2011, 384 (4-5): 351-362.
- [7] CHO H J, KIM S Y, KIM K H, et al. The combination effect of sodium butyrate and 5-Aza-2'-deoxycytidine on radiosensitivity in RKO colorectal cancer and MCF-7 breast cancer cell lines [J]. *World J Surg Oncol*, 2009, 7: 49.
- [8] STATHIS A, HOTTE S J, CHEN E X, et al. Phase I study of decitabine in combination with vorinostat in patients with advanced solid tumors and non-Hodgkin's lymphomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(6): 1582-1590.
- [9] LEE J H, LEE K H, LEE J H, et al. Decreased incidence of febrile episodes with antibiotic prophylaxis in the treatment of decitabine for myelodysplastic syndrome [J]. *Leuk Res*, 2011, 35(4): 499-503.
- [10] MENG C F, ZHU X J, PENG G, et al. Promoter histone H3 lysine 9 di-methylation is associated with DNA methylation and aberrant expression of p16 in gastric cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(5): 1221-1227.

收稿日期: 2012-05-24