

大黄素联合5AzA-cdR增强对胰腺癌细胞ppENK抑癌基因的去甲基化作用研究

陈亮 唐坚 褚永权 叶剑宏 沈超 钱晓宇 姚旭枫

[摘要] 目的 研究大黄素联合5-氮-2'脱氧胞苷(5AzA-cdR)能否增强其对胰腺癌细胞抑癌基因前脑啡肽原(ppENK)的去甲基化作用。方法 选择Panc1细胞为研究对象,首先采用细胞计数实验(CCK-8)检测不同浓度大黄素对胰腺癌细胞的生长抑制情况,根据CCK-8结果选择最适大黄素用药的浓度,后将Panc1细胞分为四组:对照组、最适大黄素浓度组、5AzA-cdR组和大黄素联合5AzA-cdR用药组,采用斑点杂交实验(Dot-blot)检测四组对基因组5-甲基胞嘧啶(5mc)的影响,最后使用重亚硫酸盐测序PCR(BSP)检测四组对ppENK甲基化的影响。结果 CCK-8显示,大黄素以浓度梯度和时间梯度抑制Panc1细胞生长;Dot-blot结果显示,最适大黄素浓度组和5AzA-cdR组5mc水平低于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=12.55、20.12, P 均 <0.05),5AzA-cdR组5mc较最适大黄素浓度组下降明显,差异有统计学意义($t=17.76$, $P<0.05$),大黄素联合5AzA-cdR用药组5mc较对照组、最适大黄素浓度组以及5AzA-cdR组显著下降,差异有统计学意义(t 分别=30.22、20.77、10.45, P 均 <0.05)。BSP结果显示,最适大黄素浓度组和5AzA-cdR组ppENK甲基化水平均低于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=14.27、21.34, P 均 <0.05),5AzA-cdR组ppENK甲基化水平较最适大黄素浓度组下降明显,差异有统计学意义($t=16.41$, $P<0.05$),大黄素联合5AzA-cdR用药组ppENK甲基化水平较对照组、最适大黄素浓度组以及5AzA-cdR组显著下降,差异均有统计学意义(t 分别=32.68、19.33、10.12, P 均 <0.05)。结论 大黄素联合5AzA-cdR可增加其对胰腺癌细胞抑癌基因ppENK的去甲基化作用。

[关键词] 大黄素; 胰腺癌; 去甲基化; 5-氮-2'脱氧胞苷

Emodin and 5AzA-cdR enhance the demethylation of tumor suppressor gene ppENK in pancreatic cancer cells

CHEN Liang, TANG Jian, CHU Yongquan, et al. Department of Head and Neck Surgery, Jiaxing First Hospital, Jiaxing 314000, China.

[Abstract] **Objective** To study whether emodin combined with 5-Aza-2'-deoxycytidine (5AzA-cdR) can enhance its demethylation effect on a tumor suppressor gene ppENK of pancreatic cancer cells. **Methods** Panc1 cells were selected as the research object. First, cell count test (CCK-8) was used to detect the growth inhibition of different concentrations of emodin on pancreatic cancer cells. According to the results of CCK-8, the optimal concentration of emodin was selected. Later, the Panc1 cells were divided into four groups: control group, emodin group, 5AzA-cdR group, and emodin combined with 5AzA-cdR group. Next, Dot-blot was used to detect the effects of four groups on genomic 5-methylcytosine (5mc), and finally, bisulfite sequencing PCR (BSP) was used to detect the effects of four groups on ppENK methylation. **Results** CCK-8 shows that emodin can inhibit the growth of Panc1 cells through concentration and time gradients. The Dot-blot results showed that the 5mc levels in the emodin group and 5AzA-cdR group were lower than those in the control group, and the differences were statistically significant ($t=12.55, 20.12, P<0.05$). The 5mc level in the 5AzA-cdR group was significantly lower than that in the emodin group, and the difference was statistically significant ($t=17.76, P<0.05$). The emodin combined with 5AzA-cdR group showed a significant decrease in 5mc level compared to the control group, emodin group, and 5AzA-cdR group, and the

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2024.002.003

基金项目:浙江省自然科学基金(LQ20H160059);浙江省医药卫生科技计划项目(2024KY1670)

作者单位:314000 浙江嘉兴,嘉兴市第一医院头颈外科

difference was statistically significant ($t=30.22, 20.77, 10.45, P<0.05$). The BSP results showed that the average level of ppENK methylation in the emodin group and 5AzA-cdR group was lower than that in the control group, with statistical significance ($t=14.27, 21.34, P<0.05$). The methylation level in the 5AzA-cdR group was significantly lower than that in the larger emodin group, with statistical significance ($t=16.41, P<0.05$). The group treated with emodin combined with 5AzA-cdR showed a significant decrease in methylation level compared to the control group, emodin group, and 5AzA-cdR group, and the differences were statistically significant ($t=32.68, 19.33, 10.12, P<0.05$). **Conclusion** Emodin combined with 5AzA-cdR can enhance the demethylation of tumor suppressor gene ppENK in pancreatic cancer cells.

[Key words] emodin; pancreatic cancer; demethylation; 5AzA-cdR

胰腺癌其临床表现隐匿,早期诊断困难,容易发生远处转移,是预后很差的消化系统恶性肿瘤之一,总体五年生存率为10%左右^[1]。尽管手术切除是唯一可能的治愈手段,但由于胰腺癌早期症状不典型、易发生转移等特点,大部分患者就诊时已无法根治性切除^[2,3]。基因的异常甲基化是肿瘤发病的重要原因之一,抑癌基因的高甲基化会导致转录抑制甚至丢失,从而导致异常分化、增殖、癌变^[4]。5-氮-2'-脱氧胞苷(5-AzA-2'-deoxycytidine, 5AzA-cdR)是目前最常用的去甲基化核苷类似物之一^[7]。本次研究旨在研究大黄素联合5AzA-cdR用药对胰腺癌抑癌基因ppENK的去甲基化作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料 研究时间为2022年1月至2022年12月,本次研究在嘉兴市第一医院中心实验室完成,人胰腺癌细胞株Panc1由本次研究组引进并保存。

1.2 方法

1.2.1 细胞系和培养 将人胰腺癌细胞株Panc1置于胎牛血清中,在100 U/mL链霉素和青霉素DMEM培养基,37℃、饱和湿度、5% CO₂下培养,2~4 d换液一次,待细胞生长至70%~80%时传代培养,取其的对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 细胞计数实验(cell counting kit-8, CCK-8) 取对数生长期的Panc1细胞于96孔板中,每孔接种 $5 \times 10^3/100 \mu\text{L}$ 细胞,分别使用浓度为0、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的大黄素处理细胞24 h、48 h和72 h,每组同时设6个副孔。细胞培养结束后,每孔加入10 μL 的CCK-8继续培养1~2 h,用酶标仪测定各孔在450 nm波长下的光密度(optical density, OD),实验重复3次。并计算细胞抑制率,从而选出最适大黄素浓度。

细胞抑制率=(1-实验组 OD 值/对照组 OD

值)×100%

1.2.3 实验分组 将培养后的Panc1细胞分为四组接受不同的处理:对照组、最适大黄素浓度组(40 $\mu\text{mol/L}$)、5AzA-cdR组(1 $\mu\text{mol/L}$)和大黄素(40 $\mu\text{mol/L}$)联合5AzA-cdR(1 $\mu\text{mol/L}$)用药组。

1.2.4 Dot-blot实验 四组作用于Panc1细胞72 h后,用细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(由上海杰瑞生物工程技术有限公司生产)按照说明提取各组DNA,使用HS dsDNA Kit和Qubit Fluorometer(Invitrogen)通过荧光测定术来测定DNA的浓度。四组DNA打在尼龙膜上(Hybond-N+, GE),置于紫外发光仪器中5 min,随后5%脱脂牛奶封闭1.5 h,洗涤5 min,3次,一抗(anti-5mc)4℃孵育过夜,一抗孵育结束后二抗室温孵育1 h,洗涤后ECL发光上机检测,打点的灰度值通过Image-J软件分析。

1.2.5 亚硫酸氢盐测序法(bisulfite sequencing PCR, BSP) 使用细胞/组织基因组DNA提取试剂盒,按照说明书提取四组DNA,取1 μg DNA进行亚硫酸盐修饰,反应体系结束后,取10 μL PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳45 min,电泳结束后拍UV照片,检查BSP反应产物,反应产物回收,送上海麦普生物技术有限公司进行克隆,随机选取10个克隆进行测序,使用BiQ Analyzer软件分析样本的甲基化状态。

1.3 统计学方法 采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用F检验和LSD-t检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同大黄素浓度对Panc1细胞生长抑制作用见表1

由表1可见,大黄素以时间梯度和浓度梯度抑制胰腺癌细胞Panc1生长,40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度作用72 h后细胞生长抑制率接近半数抑制率。

表1 不同大黄素浓度对Panc1细胞的生长抑制率比较

大黄素浓度	24 h OD	24 h抑制率/%	48 h OD	48 h抑制率/%	72 h OD	72 h抑制率/%
0 $\mu\text{mol/L}$	1.26 \pm 0.01	0	1.03 \pm 0.01	0	0.89 \pm 0.01	0
10 $\mu\text{mol/L}$	1.17 \pm 0.02	7.11	0.94 \pm 0.02	8.73	0.79 \pm 0.01	11.22
20 $\mu\text{mol/L}$	1.06 \pm 0.14	15.92	0.81 \pm 0.02	21.42	0.63 \pm 0.01	29.23
40 $\mu\text{mol/L}$	0.91 \pm 0.03	27.85	0.72 \pm 0.02	30.12	0.44 \pm 0.01	50.61
80 $\mu\text{mol/L}$	0.84 \pm 0.02	33.32	0.58 \pm 0.02	43.71	0.31 \pm 0.01	65.27

2.2 四组5 mc水平和ppENK甲基化率比较见表2

表2 四组5 mc水平和ppENK甲基化率比较

组别	相对5 mc水平	ppENK甲基化率/%
大黄素联合5AzA-cdR用药组	0.21 \pm 0.04* [#] [△]	31.45 \pm 1.27* [#] [△]
5AzA-cdR组	0.47 \pm 0.11* [#]	58.61 \pm 1.15* [#]
最适大黄素浓度组	0.82 \pm 0.09*	64.19 \pm 1.31*
对照组	1.01 \pm 0.01	78.39 \pm 1.12

注: *: 与对照组比较, $P < 0.05$; #: 与最适大黄素浓度组比较, $P < 0.05$; Δ : 与5AzA-cdR组比较, $P < 0.05$ 。

由表2可见, 四组的5 mc水平和ppENK甲基化率比较, 差异均有统计学意义 (F 分别=69.86、785.14, P 均 < 0.05)。Dot-blot实验显示, 最适大黄素浓度组和5AzA-cdR组5 mc水平低于对照组, 差异均有统计学意义 (t 分别=12.55、20.12, P 均 < 0.05), 5AzA-cdR组相对5 mc水平较最适大黄素浓度组下降明显, 差异有统计学意义 ($t=17.76$, $P < 0.05$), 大黄素联合5AzA-cdR用药组5 mc的水平较对照组、最适大黄素浓度组以及5AzA-cdR组明显下降, 差异有统计学意义 (t 分别=30.22、20.77、10.45, P 均 < 0.05)。BSP结果显示, 最适大黄素浓度组和5AzA-cdR组ppENK甲基化率均低于对照组, 差异均有统计学意义 (t 分别=14.27、21.34, P 均 < 0.05), 5AzA-cdR组ppENK甲基化率较最适大黄素浓度组下降明显, 差异有统计学意义 ($t=16.41$, $P < 0.05$), 大黄素联合5AzA-cdR用药组ppENK甲基化率较对照组、最适大黄素浓度组以及5AzA-cdR组明显下降, 差异均有统计学意义 (t 分别=32.68、19.33、10.12, P 均 < 0.05)。

3 讨论

近年来, 胰腺癌的发病率逐年上升。大多数患者确诊时已经发生转移, 失去了根治性手术机会, 预后很差。虽然近年来临床使用吉西他滨已将晚期胰腺癌患者的1年生存率提高约20%, 但并未取得明显改善。越来越多的证据表明, 许多肿瘤它从

表观遗传变化和基因突变开始, 并启动肿瘤促进过程。表观遗传变化是基因表型的变化, 它是不改变基因的DNA序列的变化。DNA甲基化是基因表观遗传修饰的重要手段之一, DNA甲基化是由DNA甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 催化, 以S-腺苷甲硫氨酸提供甲基供体的形式催化, 其不改变DNA序列和遗传密码, 将甲基转移到特定的碱基上, 并且是可逆的。

Ueki等^[5]报告ppENK基因含有42个CpG岛, 其中有7个CpG岛在胰腺癌细胞系中的甲基化率为93%, 而在正常胰腺组织中则没有甲基化, 表明ppENK以及转录抑制是胰腺癌发生中的常见事件。Fukushima等^[6]报道了15例浸润性导管腺癌中14例的ppENK甲基化, 但非肿瘤胰腺上皮没有甲基化。目前最常用的去甲基化药物主要有阿扎胞苷和地西他滨两种核苷类似物^[7], 5AzA-cdR是目前应用最广泛的去甲基化核苷类似物之一, 主要通过低浓度下抑制DNMT的表达和活性发挥去甲基化作用, 但其毒副作用较大, 最明显的是药物毒性和骨髓抑制, 限制了其在肿瘤方面的临床应用。因此, 开发具有去甲基化作用、毒副作用小的药物具有重大意义。

根据课题组前期研究, 已知大黄素对胰腺癌细胞Panc1具有一定程度的去甲基化作用, 但大黄素的去甲基化强度较5AzA-cdR弱。目前治疗肿瘤多为联合用药, 基于此本课题组提出大胆设想, 大黄素联合5AzA-cdR作用于胰腺癌细胞时会不会比两种药物单独作用更强? 本次研究根据CCK-8实验结果选择了大黄素浓度为40 $\mu\text{mol/L}$ 进行进一步实验。Dot-blot结果表明, 40 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素组和5AzA-cdR组与对照组比较可以降低基因组相对5 mc的表达, 40 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素组的作用强度要弱于5AzA-cdR组, 特别当40 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素与5AzA-cdR联合使用时, 5mc的水平显著降低, 这充分说明40 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素可以增加5AzA-cdR对胰腺癌细

胞的去甲基化作用。为了进一步验证去甲基化作用,本次研究BSP结果显示对照组、大黄素组、5AzA-cdR组、大黄素联合5AzA-cdR用药组处理Panc1细胞72 h后,ppENK基因的甲基化率逐渐下降,可见大黄素联合5AzA-cdR用药可以明显增加其对抑癌基因ppENK的去甲基化作用。在生物体内,催化甲基化反应的主要是甲基转移酶(DNMT1、DNMT3a、DNMT3b),使抑癌基因发生去甲基化的途径主要有抑制甲基转移酶的活性和减少甲基转移酶的表达两种方式,其是否可以抑制甲基转移酶的活性和表达,还有待于后期研究。

综上所述,40 μmol/L大黄素联合5AzA-cdR药物可以降低5 mc的基因组水平,可以对Panc1抑癌基因ppENK发挥明显的去甲基化作用,且作用强度要比两药的单一用药强,这一发现为胰腺癌的临床治疗机制提供了新思路,而表观遗传学中的联合用药去甲基化作用也是其发挥作用的重要机制。

参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33.
- 2 Yousaf MN, Ehsan H, Muneeb A, et al. Role of radiofrequency ablation in the management of unresectable pancreatic cancer[J]. Front Med, 2021, 7(1): 1070.
- 3 Pereira SP, Oldfield L, Ney A, et al. Early detection of pancreatic cancer[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(7): 698-710.
- 4 Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: The nuts and bolts of repression[J]. J Cell Physiol, 2009, 213(2): 384-390.
- 5 Ueki T, Toyota M, Skinner H, et al. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma[J]. Cancer Res, 2011, 61(23): 8540-8546.
- 6 Fukushima N, Sato N, Ueki T, et al. Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Am J Pathol, 2002, 160(5): 1573-1581.
- 7 Dammann R, Schaquadarsurenqin U, Liu L, et al. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma[J]. Oncogene, 2003, 22(3): 3806-3812.

(收稿日期 2023-02-12)

(本文编辑 高金莲)

(上接第99页)

参考文献

- 1 张烁. 习近平在全国高校思想政治工作会议上强调:把思想政治工作贯穿教育教学全过程,开创我国高等教育事业发展新局面[N]. 人民日报, 2016-12-9(1).
- 2 程远州, 郝迎烂. 一门课六院士一讲二十年[N]. 人民日报, 2019-12-3(13).
- 3 钟文浩, 夏欧东, 朱汉祎. 三全育人背景下广东省医科高校课程思政教学现状及思考[J]. 中国卫生事业管理, 2022, 39(9): 684-690.
- 4 李卫, 申亚莉. 从思政课程到课程思政:从战略高度构建高校思想政治教育课程体系[J]. 现代职业教育, 2020(41): 70-71.
- 5 周劫人. 医学是一种“人学”[J]. 新华月报, 2011(21): 58-59.
- 6 曹俊娜, 曹福凯. 高校医学专业一体化“课程思政”建设探索与实践[J]. 现代养生, 2022, 22(20): 1797-1800.
- 7 陈海鸣, 王护国, 马志华, 等. 医学专业课程思政的研究初探[J]. 中国继续医学教育, 2021, 13(30): 49-53.
- 8 陈丽晶. 医学院课程思政建设的时代价值与实施路径研究[J]. 福建医科大学学报(社会科学版), 2022, 23(2): 73-76.
- 9 徐翀. 医学课程思政建设的思考与探索[J]. 东南大学学报(哲学社会科学版), 2021, 23(S1): 154-157.
- 10 陈金锋, 张海玲, 肖春苟, 等. 人体解剖学课程思政的教学设计与实施[J]. 解剖学研究, 2023, 45(5): 483-485.
- 11 李堃. 红医精神融入医学院课程思政的价值意蕴与实践路径[J]. 锦州医科大学学报(社会科学版), 2023, 21(1): 49-53.
- 12 “中国外科之父”: 裘法祖[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(65): 67.

(收稿日期 2024-01-14)

(本文编辑 葛芳君)