

大黄素对胰腺癌裸鼠皮下移植瘤抑癌基因去甲基化作用

薛 丽 唐 坚 褚永权 陈自强 钱晓宇 陈 亮

摘 要 **目的** 通过建立胰腺癌 Panc1 细胞株皮下移植瘤模型,探讨大黄素对胰腺癌皮下移植瘤抑癌基因 p16、RASSF1A、ppENK 启动子区 CpG 岛的去甲基化作用的影响。**方法** 首先建立人胰腺癌细胞裸鼠模型,后给予不同药物浓度的大黄素(0、30、50、70mg/kg)处理裸鼠,观察大黄素对裸鼠移植瘤生长的影响,采用 MSP、RT-PCR 以及 Western blot 法分别检测不同组别移植瘤的 3 个抑癌基因甲基化状态以及 mRNA、蛋白的改变。**结果** 大黄素能够抑制胰腺癌裸鼠皮下移植瘤的生长,随着大黄素浓度的升高,其对胰腺癌裸鼠移植瘤的生长抑制率逐渐升高,特别 50、70mg/kg 浓度组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。MSP 结果显示大黄素可使裸鼠移植瘤组织的甲基化条带减弱,非甲基化条带增强,同时可以使经 RT-PCR 和 Western blot 法结果证实的低表达或无表达的 mRNA 和蛋白表达增强或者重新表达,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 通过体内实验笔者证实大黄素可以对胰腺癌裸鼠移植瘤抑癌基因 p16、RASSF1A、ppENK 发挥不同程度的去甲基化作用,使因启动子区甲基化而失表达的抑癌基因重新表达,大黄素抑制胰腺癌裸鼠移植瘤生长可能和其具有对抑癌基因去甲基化作用有关。

关键词 大黄素 胰腺癌 胰腺癌裸鼠皮下移植瘤 去甲基化

中图分类号 R6 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.01.019

Demethylation Effect of Emodin on Tumor Suppressor Gene in Pancreatic Cancer Xenograft. Xue Li, Tang Jian, Chu Yongquan, et al. Department of General Surgery, The First Hospital of Jiaxing, Zhejiang 314000, China

Abstract **Objective** To study the demethylation effect of emodin on tumor suppressor gene p16, RASSF1A, ppENK promoter CpG Island in pancreatic cancer xenograft through the establishment of pancreatic cancer cell line Panc1 subcutaneous xenograft model. **Methods** After pancreatic cancer xenograft in nude mice model being established, All the mice were randomly divided into 4 groups and treated intraperitoneally (IP) with saline and various concentrations (30, 50, 70mg/kg) of emodin. To observe the effect of emodin on tumor growth. MSP was used to detect methylation status changes of tumor suppressor gene p16, RASSF1A, ppENK gene. While mRNA and protein production of the three tumor suppressor genes were evaluated by RT-PCR and Western blotting. **Results** The emodin can inhibit the growth of the tumor xenografts in nude mice. With the increase of emodin concentration, the growth inhibition rate of pancreatic cancer xenografts in nude mice gradually increased, 50mg/kg and 70mg/kg concentrations were compared with control group ($P < 0.05$). MSP confirmed that the methylated status of the promoter regions of p16, RASSF1A, ppENK has decreased, at the same time, the unmethylated status has enhanced. The RT-PCR and Western blotting results confirmed enhanced expression or re-expression of mRNA and protein in pancreatic cancer xenograft. (compared with control group, $P < 0.05$). **Conclusion** Emodin can exert different degrees of demethylation effect on tumor suppressor gene p16, RASSF1A, ppENK gene in pancreatic cancer xenografts, making the non-expressed tumor suppressor gene to re-express. Emodin inhibits pancreatic cancer cells growth, which may be related to its demethylation of tumor suppressor genes.

Key words Emodin; Pancreatic carcinoma; Xenograft model of pancreatic cancer; Demethylation

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2016KYB286);嘉兴市科技计划项目科技工作专项计划(2016BY28011);嘉兴市医学重点学科普通外科学(04-F-15);嘉兴市科技创新团队(2013-03);引进高层次人才科研启动基金资助项目(启明星计划 2016QMX002);2016年度院级中青年人才培养计划(嘉兴市第一医院)科技创新培养人才(2016-CX-06)

作者单位:314000 嘉兴市第一医院

胰腺癌是一种从正常胰腺组织突变而来的恶性肿瘤,其中 95% 为腺癌^[1]。目前手术切除是唯一有效治疗胰腺癌的主要方法,主要适用于早期未发生转移的肿瘤,但是由于早期症状的非特异性以及多变性,诊断时 85% 多处于晚期阶段,已发生远处扩散与转移,失去手术的机会^[2]。胰腺癌术后 5 年生存率仅有 15% ~ 40%,因此做到早发现、早治疗才是预防胰

腺癌的主要手段,同时寻找更加有效的药物来治疗胰腺癌也是今后在胰腺癌治疗方面的主要任务。DNA 甲基化指在 DNA 甲基转移酶(DNMTs)催化下将甲基加到 CG 二核苷酸的胞嘧啶上,使之变成 5 甲基胞嘧啶(5 - mc)的化学修饰过程,DNMTs 在肿瘤中表达增强,导致抑癌基因(TSG)高甲基化并失活,最终促进肿瘤发生^[3]。

目前最常用于去甲基化的药物主要有 5AzA - cdR 和地西他滨两种核苷类似物,主要通过低浓度下抑制 DNMT 的活性而发挥去甲基化作用^[4]。但临床试验表明其去甲基化作用无特异性,浓度稍高常导致全部基因组的低甲基化,同时毒性不良反应最明显的是药物毒性和骨髓抑制,限制了其在临床上治疗肿瘤的应用。寻找具有特异性强,安全性高,不良反应小的去甲基化药物已成为肿瘤治疗的重要任务之一。大黄素(emodin, 1, 3, 8 - 三羟基 - 6 - 甲基蒽醌),是从大黄属、蓼属、鼠李属和番泻叶中分离出来的主要有效单体,其能够通过多种机制发挥抗肿瘤作用。笔者前期实验研究发现在体外水平大黄素可以对胰腺癌细胞 Panc1 抑癌基因 p16、RASSF1A、ppENK 发挥不同程度的去甲基化作用,使因启动子区甲基化而失表达的抑癌基因重新表达,但是体内跟体外水平差异很大,故本实验通过建立胰腺癌 Panc1 细胞株皮下移植瘤模型,在体内水平探讨大黄素对胰腺癌裸鼠皮下移植瘤抑癌基因 p16、RASSF1A、ppENK 去甲基化作用的影响^[5,6]。

材料与方法

1. 试剂:大黄素(纯度 $\geq 98\%$)、5AzA - cdR 购于美国 Sigma 公司,人胰腺癌细胞株 Panc1 由本研究组引进并保存,细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心株型),购于上海捷瑞生物工程有限公司,EpiTect® Bisulfite Kit 修饰试剂盒,EpiTect® MSP Kit 试剂盒购于德国 Qiagen 公司。RNA 提取试剂盒购于上海 Tiangen 公司,RT - PCR 引物由上海捷瑞生物技术有限公司合成。Anti - RASSF1a 抗体、ppENK 抗体购于美国 Abcam 公司,P16/INK4a 抗体购于美国 Epitomics 公司,BCA 蛋白定量试剂盒、PVDF 膜购于美国 Sigma 公司。

2. 细胞培养和胰腺癌动物模型的建立:4 ~ 6 周龄的雌性裸鼠[BALB/cA - nu(nu/nu)],体重 18 ~ 20g,购于上海肿瘤研究所,饲养于嘉兴学院医学院实验动物中心(SPF)环境中,并保持室温在 25℃,相对

空气湿度为 40% ~ 60%。稳定 1 周后,建立裸鼠皮下移植瘤模型:将处于对数生长期的 Panc1 细胞用无血清的培养基稀释,按每只裸鼠 5×10^6 个/200 μ l 注入裸鼠右侧腹部下,经 4 ~ 5 周的时间,移植瘤体积达到 100 ~ 150mm³时,给与不同浓度药物的治疗方案。此时裸鼠随机分为 5 组,对照组腹腔注射生理盐水,大黄素 30、50、70mg/kg 灌胃组,以及 0.1mg/kg 5AzA - cdR 腹腔注射组,每组 10 只裸鼠,每 3 天给 1 次药物,作用 30 天。最后 1 次治疗 1 周后,杀死裸鼠并取组织,用 4% 甲醛溶液固定或石蜡包埋,用于下面的 MSP、RT - PCR 和 Western blot 法的实验。

3. 甲基化特异性 PCR(MSP):按照细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒按照说明书的方法分别提取上述 5 组肿瘤组织的 DNA,检测 DNA 的纯度以及浓度以后,取 1 μ g 的 DNA 按照 EpiTect® Bisulfite Kit 修饰试剂盒说明书进行亚硫酸盐修饰,修饰后的 DNA,立即用于反应或保存于 - 20℃ 冰箱备用。RASSF1A、P16、ppENK 的 MSP 反应体系以及条件参见本课题组既往已表文章,实验重复 3 次^[5,6]。

4. RT - PCR 实验:按照 RNA 提取试剂盒的说明方法分别提取上述 5 组肿瘤组织的 RNA,检测 RNA 的纯度以及浓度以后,按 RNA 反转录试剂盒说明反转录合成 cDNA,PCR 反应体系 25 μ l:cDNA 1 μ l,引物各 1 μ l,2 $\times$ PCR Mastmix 12.5 μ l,Depc 水 9.5 μ l。反应条件及引物序列见本课题组既往已表文章,反应产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,紫外分析拍照^[5,6]。GAPDH 做为内参,用 p16、RASSF1A、ppENK 的灰度值与 GAPDH 的灰度值比统计分析,实验重复 3 次。

5. Western blot 法实验:使用 RIPA 常规提取上述 5 组肿瘤组织的蛋白,按照说明书使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜,5% 脱脂奶粉封闭 2h 后,4℃ 孵育相应一抗过夜,洗膜后,分别孵育相应的二抗,ECL 发光液曝光,并使用软件分析,实验重复 3 次。

6. 统计学方法:所有实验结果均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,多组间采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD - t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大黄素对裸鼠皮下移植瘤生长的影响:笔者以移植瘤裸鼠为模型,在接受生理盐水,大黄素 30、50、70mg/kg 灌胃,以及 0.1mg/kg 5AzA - cdR 腹腔注射后治疗后,生理盐水组肿瘤的体积明显要大于药物

治疗组肿瘤的体积,其中随着大黄素用药剂量的增加,其皮下移植瘤的体积也相应有所减小,5AzA -

cdR 腹腔注射组肿瘤的体积要明显小于其他各组肿瘤的体积(图1)。

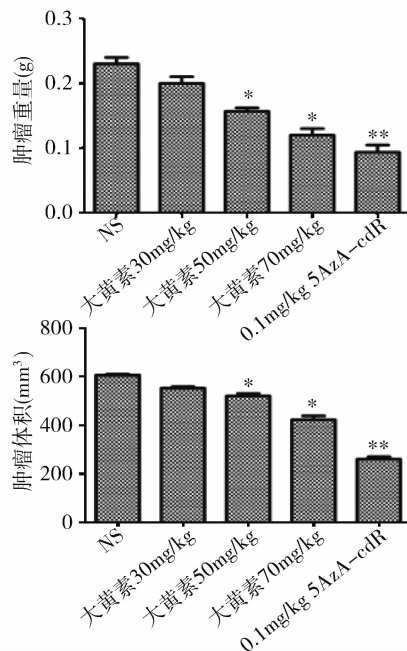


图1 大黄素对裸鼠皮下移植瘤生长的影响

A. 1. 生理盐水组;2~4 分别为大黄素 30、50、70mg/kg 灌胃组;5. 0.1mg/kg 5AzA - cdR 腹腔注射组。各组在治疗结束1周后,收集到的皮下移植瘤,大黄素组和5AzA - cdR 组肿瘤均比生理盐水组小,且5AzA - cdR 的作用要强于大黄素。B. 每组肿瘤的重量比较;C. 每组肿瘤的体积比较。与 NS(生理盐水)组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2. 甲基化特异性 PCR (MSP): p16、RASSF1A、ppENK 3 个抑癌基因在裸鼠移植瘤中存在高度甲基化,非甲基化程度低度表达。分别给予大黄素 30、50、70mg/kg 灌胃,以及 0.1mg/kg 5AzA - cdR 腹腔注射治疗后,3 个抑癌基因启动区高度甲基化状态得到了不同程度的逆转,非甲基化条带逐渐增强。随着大黄素以及 5AzA - cdR 的用药,p16、RASSF1A、ppENK 甲基化条带逐渐减弱,非甲基化条带逐渐增强,且 5AzA - cdR 作用强于大黄素(图2)。

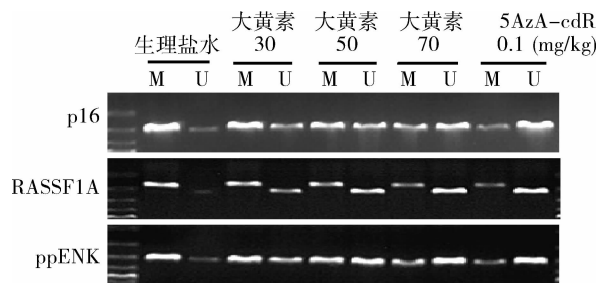


图2 MSP 显示大黄素对裸鼠移植瘤抑癌基因 p16、RASSF1A、ppENK 甲基化的影响

3. RT - PCR: 移植瘤裸鼠模型接受生理盐水组 p16 失表达,给药后 p16 重新表达并且随着大黄素治

疗剂量的提高,其 mRNA 表达也相应随之增加,5AzA - cdR 组增加最明显。没有药物作用的裸鼠移植瘤中 RASSF1A 和 ppENK 表达微弱,用药后其 mRNA 表达量上升(图3)。

4. Western blot 法检测:由图4所见在不用药生理盐水组裸鼠移植瘤中 p16、ppENK 表达微弱,RASSF1A 有一定的表达,随着大黄素以及 5AzA - cdR 的用药,原本不表达或者表达微弱的 p16、RASSF1A、ppENK 表达逐渐增加,和 5AzA - cdR 作用相似,其中在 70mg/kg 大黄素灌胃组裸鼠移植瘤中其 RASSF1A 的表达还要强于 0.1mg/kg 5AzA - cdR 腹腔注射组。

讨 论

胰腺癌发生率呈逐年升高趋势,且病死率高,据报道 2008 年美国新发现胰腺癌患者近 37680 例,其中 34290 例(91%)死亡,由于发病机制不清楚,胰腺癌的治疗仍然是巨大挑战^[7]。笔者的前期研究数据显示大黄素在体外可以通过去甲基化作用,影响全基因组表达,尤其是可使胰腺癌细胞 Panc1 抑癌基因 p16、RASSF1A、ppENK 甲基化水平下降而获得重新表达,而发挥抗癌作用。阐明了大黄素抗肿瘤的表观

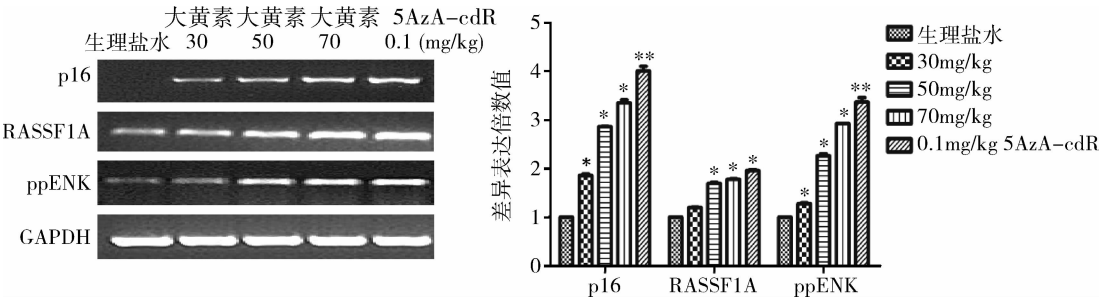


图 3 RT-PCR 显示大黄素对裸鼠移植瘤抑癌基因 p16、RASSF1A、ppENK mRNA 表达的影响
如图所示随着大黄素以及 5AzA - cdR 的用药,原本不表达或者表达微弱的 p16、RASSF1A、ppENK 表达逐渐增加,与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

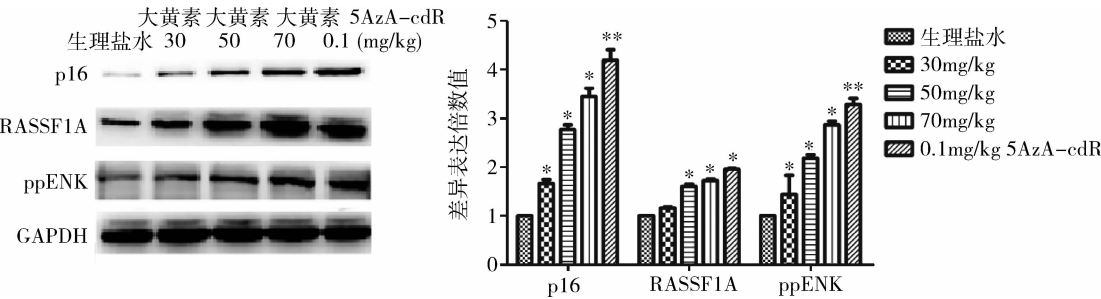


图 4 Western blot 法显示大黄素对裸鼠移植瘤抑癌基因 p16、RASSF1A、ppENK 蛋白表达的影响
与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

遗传调控机制。

胰腺癌抑癌基因的启动子区 CpG 岛甲基化被认为是表达失活的主要原因之一^[8]。ppENK 基因与抑制肿瘤细胞生长有关,ppENK 基因定位于 8q23 ~ 24,含有 4 个外显子和 3 个内含子。ppENK 基因编码产物为阿片样生长因子:甲硫氨酸 - 脑啡肽,对包括胰腺癌在内的多种肿瘤具有生长抑制功能^[9]。在胰腺癌前病变 - 胰上皮内瘤 (PanIN) 和胰腺癌细胞中均发现 ppENK 过度甲基化。Ueki 等^[10]报告 11 个胰腺癌细胞系 ppENK 全部甲基化,而且胰腺癌病理标本中 ppENK 甲基化水平明显高于正常胰腺组织。而且 4 个 ppENK 完全甲基化的胰腺癌细胞系均无相应 mRNA 表达,而所有正常胰腺组织均表达 ppENK 的 mRNA,提示 CpG 岛甲基化与 ppENK 表达失活有关。RASSF1A 基因属于 RAS 相关域 1 基因家族。

人类 RASSF1A 位于人类第 3 号染色体短臂上 (3p21.3),主要作用于 ras 蛋白相关的细胞信号转导途径,表达的 RASSF1A 蛋白能与 ras 蛋白结合诱导细胞凋亡并能抑制细胞周期素 D1 聚合,阻断细胞周期发展。在胰腺癌等恶性肿瘤中,RASSF1A 表达明显降低,其主要机制与基因突变无关,而与其启动子区表观修饰改变密切相关,尤其是启动子区的 CpG

岛甲基化。Reinhard 等^[11]发现 8 个胰腺癌细胞系中 7 个有 RASSF1A 启动子区 CpG 岛甲基化,其中 5 个完全甲基化,2 个部分甲基化。并且在完全甲基化的胰腺癌细胞系中 RASSF1A 的 mRNA 表达几乎消失,但 5 - AZA - cdR 处理后其 mRNA 又重新表达。p16 基因定位于人类染色体 9p21,编码 1 种分子质量为 16kDa 的核酸蛋白 p16,在细胞周期中发挥着重要的作用,胰腺癌细胞 panc1 中 p16 基因高度甲基化,Attri 等^[12]检测了 25 例原发性胰腺导管腺癌组织 p16 基因和蛋白的表达,结果显示 13 例 (52%) p16 基因启动子区高甲基化,其中 11 例 p16 蛋白表达缺失。上述研究提示在胰腺癌中抑癌基因 p16、RASSF1A、ppENK 存在高甲基化,并与其转录失活有关。

本体内实验研究可知 p16、RASSF1A、ppENK 3 个抑癌基因在裸鼠移植瘤中高度甲基化。分别给予大黄素 30、50、70mg/kg 灌胃,以及 0.1mg/kg 5AzA - cdR 腹腔注射治疗后,3 个抑癌基因启动子区高度甲基化状态得到了不同程度的逆转,非甲基化条带逐渐增强。RT - PCR 结果移植瘤裸鼠模型接受生理盐水组 p16 失表达,给药后 p16 重新表达并且随着大黄素治疗剂量的提高,其 mRNA 表达也相应随之增加,

5AzA - cdR 组增加最明显。没有药物作用的裸鼠移植瘤中 RASSF1A 和 ppENK 表达微弱,用药后其 mR-NA 表达量上升。Western blot 法检测结果显示在不用药生理盐水组裸鼠移植瘤中 p16、ppENK 表达微弱,RASSF1A 有一定量的表达,给药后其蛋白表达逐渐升高,和 5AzA - cdR 作用相似,其中在 70mg/kg 大黄素灌胃组裸鼠移植瘤中其 RASSF1A 的表达还要强于 0.1mg/kg 5AzA - cdR 腹腔注射组。这些数据表明大黄素在体内可使移植瘤生长放缓,降低 p16、RASSF1A、ppENK 抑癌基因的甲基化水平,使其重新表达,抑制肿瘤生长。

综上所述,体内实验同样反应了大黄素可以和体外细胞水平一样对 p16、RASSF1A、ppENK 发挥不同程度的去甲基化作用,此发现为大黄素治疗胰腺癌的机制提供了 1 个新的思路,大黄素临床上治疗胰腺癌不仅可以通过凋亡、抑制新生血管形成途径,表观遗传学中的去甲基化途径同样是其发挥作用的一种重要机制。

参考文献

- 1 Reske SN. PET and PET - CT of malignant tumors of the exocrinepancrea[J]. Radiologe,2009,49(2):131
- 2 Vanderveen KA,Chen SL,YinD,*et al.* Benefit of postoperative adjuvant therapy for pancreatic cancer: A populationbasedanalysis[J]. Cancer,2014,115(11):2420 - 2429
- 3 Cheng X,Blumental R. Mammalian DNA methyltransferases;a structural perspective structure[J]. Cancer,2008,16(3):341 - 350
- 4 Brueckner B,Kuck D,Lyko F,*et al.* DNA methyltransferaseinhibitors for cancer therapy[J]. Cancer J,2014,13(23):17 - 22
- 5 Zhang H,Bu He,Chen L,*et al.* Effects of emodin on the demethylation of tumor - suppressor genes in pancreatic cancer PANC - 1cells[J]. Oncol Rep,2015 Jun,33(6):3015 - 3023
- 6 陈亮,郭敬强,林胜璋,等. 大黄素对胰腺癌细胞抑癌基因 P16、RASSF1A 去甲基化作用研究[J]. 肝胆胰外科杂志,2014,26(4):312 - 316
- 7 Liu A,Luo J,Zhang JH,*et al.* Emodin combined gemcitabine inhibited the growth of pancreatic cancer in vitro and in vivo and its mechanisms study[J]. Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi,2012,32(5):652 - 656
- 8 Ueki T,Toyota M,Sohn T,*et al.* Hypermethylationof multiple genes in pancreatic adenocarcinoma[J]. Cancer Res,2015,60:1835 - 1839
- 9 Denning GM,Ackermann LW,Barna TJ,*et al.* Proenkephalin expression and enkephalin release are widely observed in Non - neuronal tissues[J]. Peptides,2008,29(1):83 - 92
- 10 Ueki T,Toyota M,Skinner H,*et al.* Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma[J]. Cancer Res,2015,61(23):8540 - 8546
- 11 Reinhard D,Undraga S,Liu L,*et al.* Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K - ras mutations in pancreatic carcinoma[J]. Oncogene,2015,22:3806 - 3812
- 12 Attri J,Srinivasan R,Majumdar S,*et al.* Alterations of tumor suppressor gene p16INK4α in pancreatic ductal carcinoma[J]. BMC Gastroenterol,2015,5(1):22 - 25
- (收稿日期:2017 - 04 - 19)
- (修回日期:2017 - 05 - 05)
- (上接第 56 页)
- 10 Trahair LG,Horowitz M,Stevens JE,*et al.* Effects of exogenous glucagon - like peptide - 1 on blood pressure,heart rate,gastric emptying,mesenteric blood flow and glycaemic responses to oral glucose in older individuals with normal glucose tolerance or type 2 diabetes[J]. Diabetologia,2015,58(8):1769 - 1778
- 11 Chai W,Dong Z,Wang N,*et al.* Glucagon - like peptide 1 recruits microvasculature and increases glucose use in muscle via a nitric oxide - dependent mechanism[J]. Diabetes,2012,61(4):888 - 896
- 12 American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2017[J]. Diabetes Care,2017,40(Suppl 1):S64 - S74
- 13 Lamont BJ,Li Y,Kwan E,*et al.* Pancreatic GLP - 1 receptor activation is sufficient for incretin control of glucose metabolism in mice[J]. J Clin Invest,2012,122(1):388 - 402
- 14 Retnakaran R,Kramer CK,Choi H,*et al.* Liraglutide and the preservation of pancreatic β - cell function in early type 2 diabetes:the LIBRA trial[J]. Diabetes Care,2014,37(12):3270 - 3278
- 15 Festa A,Haffner SM,Wagenknecht LE,*et al.* Longitudinal decline of β - cell function:comparison of a direct method VS a fasting surrogate measure:the insulin resistance atherosclerosis study[J]. J Clin Endocrinol Metab,2013,98(10):4152 - 4159
- 16 Giacca A,Xiao C,Oprescu AI,*et al.* Lipid - induced pancreatic β - cell dysfunction:focus on in vivo studies[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2011,300(2):255 - 262
- 17 叶启宝,何媛媛,吕齐欢,等. 利拉鲁肽治疗 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝患者的临床观察[J]. 医学研究杂志,2015,44(7):152 - 154
- 18 Rizzo M,Chandalia M,Patti AM,*et al.* Liraglutide decreases carotid intima - media thickness in patients with type 2 diabetes: 8 - month prospective pilot study[J]. Cardiovas Diabetol,2014,13(1):1 - 5
- 19 Marso SP,Daniels GH,Frandsen KB,*et al.* Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes[J]. N Engl J Med,2016,375(4):311 - 322
- (收稿日期:2017 - 04 - 03)
- (修回日期:2017 - 04 - 26)