

天花粉蛋白诱导 Syk(L) 基因去甲基化抑制喉癌 Hep-2 细胞生长研究

金巧智 李志海 蔡志毅 陈武兵 王 雪

摘 要 **目的** 探讨天花粉蛋白通过全长型脾酪氨酸激酶[full-length form of spleen tyrosine kinase, Syk(L)] 基因去甲基化途径恢复 Syk(L) 表达对喉癌 Hep-2 细胞增殖、侵袭迁移的抑制作用。**方法** 采用 CCK-8 法及 Transwell 实验检测不同浓度天花粉在不同时间点对 Hep-2 细胞增殖及处理 72h 后细胞侵袭迁移能力的影响;采用 MS-HRM 法、Q-RT-PCR 及 Western blot 法检测不同浓度天花粉蛋白对 Hep-2 细胞 Syk(L) 基因甲基化水平及其表达的影响。**结果** CCK-8 结果显示,天花粉蛋白对喉癌 Hep-2 细胞的增殖有抑制作用,且呈浓度、结果时间依赖性;Transwell 结果显示,天花粉蛋白能显著抑制 Hep-2 细胞的侵袭迁移能力;MS-HRM 结果显示,天花粉蛋白可以逆转 Hep-2 细胞 Sky(L) 基因的高甲基化状态,恢复 Syk(L) mRNA 及蛋白的表达。**结论** 天花粉蛋白通过逆转 Syk(L) 基因启动子 CpG 岛的甲基化状态,使喉癌 Hep-2 细胞中 Syk(L) 基因表达活化,恢复 Syk mRNA 及蛋白的表达,最终发挥抑癌基因的作用抑制 Hep-2 细胞恶性生物学行为,具有开发并成为抗肿瘤药物的潜在价值。

关键词 天花粉蛋白 喉癌 全长型脾酪氨酸激酶 去甲基化

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.03.014

Research on the Demethylation of Syk(L) Gene Induced by Trichosanthin to Inhibit the Growth of Laryngeal Carcinoma Hep-2 Cell. Jin Qiaozhi, Li Zhihai, Cai Zhiyi, et al. Department of Otolaryngology, Taizhou Municipal Hospital, Zhejiang 318000, China

Abstract Objective To investigate the inhibition on the proliferation and metastasis of laryngeal squamous carcinoma Hep-2 cells by the expression of Syk(L) gene through the demethylation of the full length spleen tyrosine kinase [Syk(L)] gene. **Methods** The proliferation of Hep-2 cell which was treated with different concentrations of Trichosanthin at different time points was tested by CCK-8 assay, and the ability of invasion and metastasis of Hep-2 cells treated after 72 hours was detected by Transwell assay. Methylation level and the expression of Syk(L) gene in Hep-2 cells which were treated with different concentrations of Trichosanthin were detected through MS-HRM, Q-RT-PCR and Western blot. **Results** The results of CCK-8 showed that Trichosanthin inhibited the proliferation of Hep-2 cells with the dependence of concentration and time in a dose- and time-dependent manner. Transwell results showed that Trichosanthin significantly inhibited the invasion and metastasis of Hep-2 cells. MS-HRM showed that Trichosanthin could reverse the hypermethylation of the Sky(L) gene in Hep-2 cells and restore the expression of Syk(L) mRNA and protein. **Conclusion** Trichosanthin activates Syk(L) gene expression in Hep-2 cells and restores Syk mRNA and protein expression by reversing the hypermethylation status of CpG island of Syk(L) gene promoter, thus exerts anti-oncogene effect to inhibit the malignant biological behavior of Hep-2 cells, which has potential values in being developed into antitumor drugs.

Key words Trichosanthin; Laryngeal carcinoma; Full-length form of spleen tyrosine kinase; Demethylation

脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)是一种非受体型的酪氨酸激酶, Syk 蛋白有全长型脾酪氨酸激酶[full-length form of spleen tyrosine kinase, Syk(L)]和缩短型脾酪氨酸激酶[shortened form of spleen tyrosine kinase, Syk(S)]两种异构体,其中 Syk

(L)发挥着潜在抑癌基因的作用。本课题组前期通过对 Syk(L) 基因的研究发现,其蛋白在喉鳞癌组织中表达降低,研究进一步通过转染技术及裸鼠移植瘤实验发现喉癌细胞中 Syk(L) 低表达与细胞的恶性生物学行为密切相关,随着 Syk(L) 表达水平的升高,喉癌细胞的恶性生物学行为受到明显抑制^[1-3]。研究还发现, Syk mRNA 及蛋白低表达与 Syk DNA 启动子 CpG 岛高甲基化相关^[2,4], 利用去甲基化药物 5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2013ZA132)

作者单位:318000 台州市立医院耳鼻咽喉科(金巧智、李志海、蔡志毅、陈武兵);325000 温州医科大学第一临床医学院(王雪)

通讯作者:李志海,电子邮箱:li00hai@tom.com

aza - CdR) 逆转 Syk 基因的高甲基化状态, 肿瘤细胞的恶性生物学行为受到抑制, 提示逆转 Syk DNA 启动子 CpG 岛高甲基化将是去甲基药物抑制喉癌生长的新作用靶点^[4]。

天花粉蛋白 (tfichosanthin, TCS) 是从葫芦科植物栝楼的块根内提取的有效成分, 是一种具有多种生物学活性的单链核糖体失活蛋白。研究发现, 天花粉蛋白发挥抑癌基因的作用主要通过基因去甲基化途径, 达到抑制肿瘤细胞生长的目的^[5-7]。由于天花粉蛋白的细胞毒性相对较小, 因而天花粉蛋白有望成为新型的可应用于临床的去甲基化抗肿瘤药物。目前关于天花粉蛋白是否对喉癌的生长具有抑制作用, 国内外未见报道。本研究通过天花粉蛋白处理喉癌 Hep - 2 细胞, 观察天花粉蛋白对喉癌细胞增殖及侵袭转移能力的影响, 并通过检测天花粉蛋白对 syk (L) 基因的甲基化水平的影响, 探讨二者间的关联, 为天花粉蛋白作为新型去甲基化抗癌药物及其作用新靶点提供理论依据, 为喉癌的治疗提供新的思路和途径。

材料与方法

1. 一般资料: 天花粉蛋白 (1.2mg/ml) 购自上海金山制药公司; 人喉鳞癌细胞株 Hep - 2 购买于中国科学院上海细胞库; 总 RNA 快速提取试剂盒购自 Generay 公司; 反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit 购自美国 Fermentas 公司; 兔抗人的 Syk (L) 特异性抗体购自英国 Abcam 公司; 二抗羊抗兔抗体购自福州迈新生物技术开发有限公司; 3 - 磷酸油醛脱氢酶 (GAPDH) 购自英国 Abcam 公司; Transwell 侵袭小室购自 Coster 公司; Matrigel 胶购自美国 BD 公司; Epitect 重亚硫酸盐试剂盒购自 Qiagen 公司, 全基因组甲基化标准品购自德国 Qiagen 公司; 甲基化修饰试剂盒购自德国 Qiagen 公司; 即用型 Tap 酶 PCR 试剂盒购自上海捷瑞生物科技有限公司; PCR - HRM 试剂购自美国 BioRad 司, LightCycler4800 荧光定量仪购自瑞士 Roche 公司; Nanodrop1000 定量仪购自美国 Thermo 公司。

2. 方法

(1) 细胞培养: 将 Hep - 2 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 在 37℃、含 5% CO₂、湿润空气的恒温密闭式培养箱中培养, 取对数生长期的细胞备用。

(2) CCK - 8 实验检测天花粉蛋白作用后喉癌 Hep - 2 细胞体外增殖能力: 取对数生长期的 Hep - 2

细胞并调整浓度为 4×10^4 /ml, 以每孔 100μl 接种于 96 孔培养板, 置入 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 24h 换液, 分别加入 10、20、40、80、100mg/L 不同浓度天花粉蛋白的培养基, 同上设置阴性对照孔, 每组平行设 6 孔, 继续培养 24、48、72h 后于每孔中加入 10μl CCK - 8 试剂, 轻晃混匀, 放置于培养箱中培养 1h。再测 450nm 波长下每孔的吸光度 (A) 值, A 值越高表示活细胞数越多, 细胞增殖活性也越高。得到 3 个时间点的 A 值后绘制细胞增殖曲线, 实验重复 3 次。

(3) 天花粉蛋白作用后喉癌 Hep - 2 细胞侵袭及迁移能力测定: 取不同浓度天花粉蛋白作用 72h 后生长对数期喉癌 Hep - 2 细胞, 以 1% FBS RPMI1640 培养基同步化 24h。将 Matrigel 4℃ 冰上解冻, 用 0℃ 的无血清 1640 培养基稀释, 将 100μl 稀释胶加入 transwell 小室的上室, 下室加入 600μl 各组培养基, 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育 24h。用棉签擦去上室非侵袭细胞, 移去 transwell, 倒置, 风干。滤膜用 4% 甲醛固定 30min, 风干, 含 0.1% 结晶紫溶液染色 30min。取出, PBS 清洗。直径上取 4 个视野, 照相, 计数, 计算肿瘤细胞的侵袭能力。除去 Matrigel 包被基膜步骤, 其余步骤同侵袭实验, 计数穿膜细胞数, 可反映肿瘤细胞的转移能力。实验结果均重复 3 次。

(4) MS - HRM 测定 Syk (L) 基因启动子甲基化情况: 按细胞 DNA 提取试剂盒说明书提供的步骤进行 DNA 提取, 取 DNA 标本 1μg, 按照 Epitect 重亚硫酸盐试剂盒说明书进行甲基化修饰、纯化、回收。以全基因组甲基化标准品作为 100% 甲基化标准品, 与 100% 全基因组非甲基健康人外周血 DNA 按比例混合, 稀释制成 0%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 系列浓度甲基化 DNA, 将标准品经过 PCR 扩增后进行 MS - HRM 溶解曲线检测, 重复检测 3 次获得标准曲线。使用软件 Methprimer 设计引物, HRM 上游引物: 5' - ATTTTGTGGGTTTGTGGTG - 3', 下游引物: 5' - ACTTCCTTAACACACCCAAAC - 3', 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。扩增条件: 95℃ 15min; 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 45s, 40 个循环。HRM 反应条件: 95℃ 1min, 40℃ 1min 预处理后, 65℃ 1s, 溶解温度 76~95℃, 每升高 0.1℃ 采集 1 次数据, 每秒检测荧光 40 次, 获得 HRM 曲线图并分析, 根据待测标本在标准曲线上的位置判定其甲基化程度, 每份标本重复检测 3 次, 最后其平均结果为甲基化程度。

(5) Q - RT - PCR 法检测天花粉蛋白对 Hep - 2

细胞 Syk(L) mRNA 表达影响:Trizol 离心柱法提取经不同浓度天花粉蛋白处理后各组下总 RNA,以相应溶剂为对照组,取 2 μ l RNA 溶液于高精度分光光度计检测。A260/A280 比值在 2.0~2.3 符合纯度要求。参照反转录试剂盒说明完成反转录反应。参照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书完成荧光定量 PCR 扩增,PCR 扩增反应体积为 25 μ l,包括 IQ SYBR Green Supermix 12.5 μ l,cDNA 溶液 2 μ l,上、下游引物 1 μ l,再加 ddH₂O 至终体积 25 μ l。Syk(L)上游引物:5'-TACCCAACATTACGCCAAGAT-3',下游引物:5'-AGAATGCTTCCCACATCAACA-3'。GAPDH 基因作为内参,上游引物:5'-AGAAGGCTGGGGCT-CATTTG-3',下游引物:5'-AGGGGCCATCCACAGTCT-TC-3'。在 50℃ 3min,95℃ 3min 变性后,共进行 40 个循环扩增,每一循环包括 95℃ 10s,60℃ 20s,72℃ 30s。未转染组作为对照组,GAPDH 基因作为内对照。每个样本重复 5 次,记录 CT 值,取平均值。计算各组 Hep-2 细胞的 Syk(L) mRNA 相对表达量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

(6) Western blot 法检测天花粉蛋白对 Hep-2 细胞 Syk(L) 蛋白表达影响:将培养的细胞用预冷的 PBS 漂洗后加入 200 μ l 预冷的 RIPA 裂解液,并提取蛋白,用 BCA 法测定蛋白质浓度。将 50 μ g 的蛋白加入 5 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(10% 分离胶,5% 浓缩胶),分离后利用电泳仪将蛋白转至硝酸纤维素膜(PVDF)上,将 PVDF 膜浸入含 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h,然后移入含有一抗 Syk(L) 单克隆抗体的小袋中孵育过夜,加入二抗室温孵育 1h,经增强发光法发光,X 线胶片显影。GAPDH 基因作为内参照,Image J 软件(NIH)计算 Syk(L) 与 GAPDH 的灰度比,进行蛋白相对表达量分析。实验重复 3 次。

3. 统计学方法:采用 SPSS 18.0 统计学软件对数据进行统计分析处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,利用软件检验各组数据的正态性,对不符合正态性的数据进行正态性数据转换,两个独立样本组间均数比较用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析;各 Syk(L) 基因启动子甲基化程度用检出率(%)表示,Syk(L) 基因启动子甲基化程度与天花粉蛋白浓度的相关性,采用 *Chi-Square* 检验。所有检验均为双侧检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 天花粉蛋白对喉癌 Hep-2 细胞增殖的抑制作用:经不同浓度天花粉蛋白作用不同时间后喉癌

Hep-2 细胞吸光度值(*A* 值)见表 1。喉癌 Hep-2 细胞经不同质量浓度天花粉蛋白作用不同时间后,与阴性对照组相比,随着浓度的升高,其 *A* 值逐渐下降,除 10mg/L 组在 24h 处 *A* 值与阴性对照组比较,差异无统计学意义($t=2.438$ 、 $P>0.05$),其他浓度组 *A* 值差异均有统计学意义($P<0.05$);不同浓度组间的 *A* 值差异有统计学意义($F=9.40$ 、 $P<0.01$)。此结果表明天花粉蛋白对喉癌 Hep-2 细胞增殖起抑制作用,且具有浓度及时间依赖性。

表 1 不同浓度天花粉蛋白作用不同时间后喉癌 Hep-2 细胞增殖 *A* 值结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	24h	48h	72h
阴性对照	1.200 $\pm$ 0.031	1.600 $\pm$ 0.038	2.140 $\pm$ 0.039
天花粉蛋白(10mg/L)	1.170 $\pm$ 0.034	1.390 $\pm$ 0.042*	1.910 $\pm$ 0.041*
天花粉蛋白(20mg/L)	0.940 $\pm$ 0.024*	1.170 $\pm$ 0.055*	1.850 $\pm$ 0.064*
天花粉蛋白(40mg/L)	0.780 $\pm$ 0.027*	0.970 $\pm$ 0.032*	1.500 $\pm$ 0.033*
天花粉蛋白(80mg/L)	0.650 $\pm$ 0.240*	0.800 $\pm$ 0.022*	1.300 $\pm$ 0.061*
天花粉蛋白(100mg/L)	0.500 $\pm$ 0.220*	0.600 $\pm$ 0.022*	1.030 $\pm$ 0.059*

与阴性对照组(除 24h 组)比较,* $P<0.05$

2. 天花粉蛋白对喉癌 Hep-2 细胞侵袭及迁移能力的抑制作用:不同浓度天花粉蛋白作用后喉癌 Hep-2 细胞平均侵袭及迁移细胞数目见表 2,随着天花粉蛋白浓度增高,喉癌 Hep-2 细胞平均侵袭及迁移细胞数目均逐渐减少(图 1、图 2)。与阴性对照组相比,除 10mg/L 组平均侵袭及迁移细胞数目比较差异无统计学意义(t 分别为 2.338、2.297, $P>0.05$),其他浓度组差异均有统计学意义($P<0.05$);不同浓度组间的平均侵袭及迁移细胞数目差异均有统计学意义($F=9.44$ 、 $P<0.01$)。可见天花粉蛋白对喉癌 Hep-2 细胞侵袭及迁移能力均具有抑制作用,其抑制能力随着浓度的增高而增强。

3. 天花粉蛋白作用后喉癌 Hep-2 细胞 Syk(L) 基因启动子甲基化情况:MS-HRM 溶解曲线重复检测 3 次,获得系列浓度标准曲线(图 3),不同浓度甲基化标准品反复 3 次检测结果显示其曲线基本重叠一致,证明 MS-HRM 技术良好的重复性,待测样本在系列浓度标准曲线中的相应位置与其甲基化程度的高低相对应,根据在标准曲线中的位置可推测待测样本的甲基化程度。经 MS-HRM 检测,不同浓度天花粉蛋白作用后喉癌 Hep-2 细胞 Syk(L) 基因启动子甲基化情况见表 3,Syk(L) 基因启动子甲基化水平与天花粉蛋白浓度呈明显负相关($\chi^2=13.18$ 、 $P=0.041$),Syk(L) 甲基化水平随天花粉蛋白浓度增高而降低。

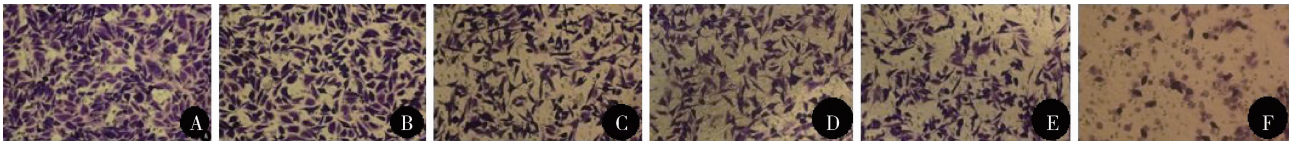


图 1 不同浓度天花粉蛋白作用后喉癌 Hep-2 细胞侵袭能力情况 (HE, ×400)

A. 阴性对照组 Hep-2 细胞; B. 天花粉蛋白 (10mg/L) 组 Hep-2 细胞; C. 天花粉蛋白 (20mg/L) 组 Hep-2 细胞; D. 天花粉蛋白 (40mg/L) 组 Hep-2 细胞; E. 天花粉蛋白 (80mg/L) 组 Hep-2 细胞; F. 天花粉蛋白 (100mg/L) 组 Hep-2 细胞; 随着天花粉蛋白浓度的升高, 喉癌 Hep-2 细胞侵袭数目逐渐减少

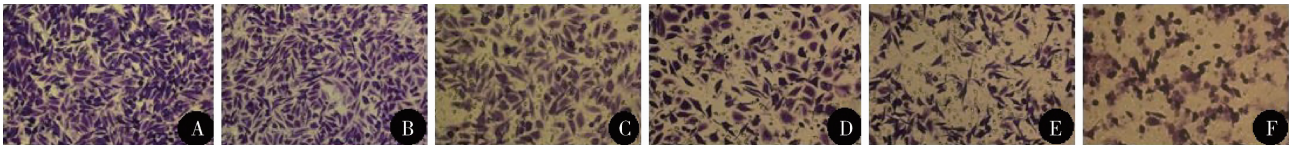


图 2 不同浓度天花粉蛋白作用后喉癌 Hep-2 细胞迁移能力情况 (HE, ×400)

A. 阴性对照组 Hep-2 细胞; B. 天花粉蛋白 (10mg/L) 组 Hep-2 细胞; C. 天花粉蛋白 (20mg/L) 组 Hep-2 细胞; D. 天花粉蛋白 (40mg/L) 组 Hep-2 细胞; E. 天花粉蛋白 (80mg/L) 组 Hep-2 细胞; F. 天花粉蛋白 (100mg/L) 组 Hep-2 细胞; 随着天花粉蛋白浓度的升高, 喉癌 Hep-2 细胞迁移数目逐渐减少

表 2 不同浓度天花粉蛋白作用后喉癌 Hep-2 细胞平均侵袭及迁移细胞数目 ($\bar{x} \pm s$)

组别	平均侵袭数	平均迁移数
阴性对照	350.03 ± 18.27	526.04 ± 27.13
天花粉蛋白 (10mg/L)	330.03 ± 20.12	501.04 ± 26.41
天花粉蛋白 (20mg/L)	290.48 ± 24.31 *	450.39 ± 23.07 *
天花粉蛋白 (40mg/L)	260.27 ± 21.44 *	400.09 ± 19.11 *
天花粉蛋白 (80mg/L)	220.43 ± 24.22 *	322.13 ± 23.31 *
天花粉蛋白 (100mg/L)	170.08 ± 21.19 *	251.21 ± 24.12 *

与阴性对照组比较, * $P < 0.05$

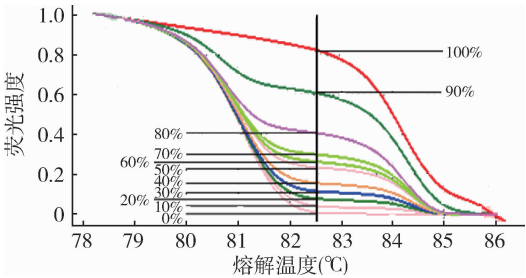


图 3 Syk(L) 基因甲基化检查标准溶解曲线

曲线从下至上依次代表了不同甲基化程度 (0%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 和 100%) 的标准品经过扩增后的 MS-HRM 溶解曲线

表 3 不同浓度天花粉蛋白作用后喉癌 Hep-2 细胞 Syk(L) 基因启动子甲基化情况 (n)

组别	0%	0% ~ 30%	30% ~ 70%	70% ~ 100%	甲基化总数	甲基化率 (%)
阴性对照	0	0	1	5	6	100.00
天花粉蛋白 (10mg/L)	0	1	2	3	6	100.00 *
天花粉蛋白 (20mg/L)	0	3	2	1	6	100.00 *
天花粉蛋白 (40mg/L)	2	3	1	0	4	66.67 *
天花粉蛋白 (80mg/L)	4	2	0	0	2	33.33 *
天花粉蛋白 (100mg/L)	5	1	0	0	1	20.00 *

与阴性对照组比较, * $P < 0.05$

4. 天花粉蛋白作用后喉癌 Hep-2 细胞 SyK(L) mRNA 表达情况: 各组细胞 Syk(L) 及内参照基因 GAPDH 扩增曲线及溶解曲线表明 CT 值稳定重现好、引物特异性好、PCR 扩增效率稳定, 故结果可靠。mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算方法, 各组细胞 SyK(L) mRNA 相对表达量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 具体值见表 4。随

着天花粉蛋白浓度增高, 喉癌 Hep-2 细胞 Syk(L) mRNA 相对表达量逐渐升高, 方差分析显示差异有统计学意义 ($F = 9.40, P < 0.01$); 与阴性对照组比较, 除 10mg/L 组 Syk(L) mRNA 相对表达量差异无统计学意义 ($t = 2.323, P > 0.05$) 外, 其他浓度组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。由此表明天花粉蛋白可提

高喉癌 Hep-2 细胞 Syk(L) mRNA 表达,并与浓度呈正相关。

表 4 不同浓度天花粉蛋白作用后喉癌 Hep-2 细胞 Syk(L) mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Syk(L) mRNA 相对表达量
阴性对照	1.104 ± 0.013
天花粉蛋白 (10mg/L)	5.113 ± 0.014 *
天花粉蛋白 (20mg/L)	11.133 ± 0.016 *
天花粉蛋白 (40mg/L)	17.133 ± 0.015 *
天花粉蛋白 (80mg/L)	22.007 ± 0.012 *
天花粉蛋白 (100mg/L)	27.959 ± 0.068 *

与阴性对照组比较, * $P < 0.05$

5. 天花粉蛋白作用后喉癌 Hep-2 细胞 Syk(L) 蛋白表达情况: Western blot 法检测各组细胞的 Syk(L) 蛋白相对表达量见表 5。喉癌 Hep-2 细胞 Syk(L) 蛋白相对表达量随着天花粉蛋白浓度升高而增多(图 4), 方差分析显示其差异有统计学意义 ($F = 9.46, P < 0.01$); 与阴性对照组比较, 除 10mg/L 组 Syk(L) 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义 ($t = 2.314, P > 0.05$) 外, 其他浓度组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。天花粉蛋白可提高喉癌 Hep-2 细胞 Syk(L) 蛋白表达。

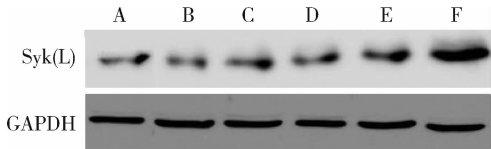


图 4 不同浓度天花粉蛋白作用后喉癌 Hep-2 细胞 Syk(L) 蛋白的表达

A. 阴性对照组; B. 花粉蛋白 (10mg/L) 组; C. 天花粉蛋白 (20mg/L) 组; D. 天花粉蛋白 (40mg/L) 组; E. 天花粉蛋白 (80mg/L) 组; F. 天花粉蛋白 (100mg/L) 组

表 5 不同浓度天花粉蛋白作用后喉癌 Hep-2 细胞 Syk(L) 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Syk(L) 蛋白相对表达量
阴性对照	0.448 ± 0.029
天花粉蛋白 (10mg/L)	0.496 ± 0.029
天花粉蛋白 (20mg/L)	0.597 ± 0.031 *
天花粉蛋白 (40mg/L)	0.699 ± 0.033 *
天花粉蛋白 (80mg/L)	0.801 ± 0.029 *
天花粉蛋白 (100mg/L)	0.890 ± 0.032 *

与阴性对照组比较, * $P < 0.05$

讨 论

近年来, Syk 基因作为信号转导过程中一个重要

因子得到广泛研究。研究发现, Syk 基因是一种候选抑癌基因^[8]。该基因的失活在很多恶性肿瘤的发生过程中发挥着重要的作用, 是调控肿瘤细胞生物学功能的关键分子。

本课题组前期通过对鼻咽癌的研究发现, 鼻咽癌细胞株中存在不同程度的 Syk 基因启动子甲基化状态, 通过去甲基化药物可以恢复 Syk 基因的表达, 抑制肿瘤细胞的发生、发展、侵袭迁移能力^[4,9]。在肝癌、结肠癌及乳腺癌等肿瘤中也发现 Syk 基因启动子 CpG 岛中存在甲基化, 恢复其表达可以抑制肿瘤的恶性生物学行为^[10-12]。由于选择性拼接存在于转录过程中, 这导致细胞内有两种 Syk 蛋白异构体存在, 即 Syk(L) 和 Syk(S), 在乳腺癌及胃癌等肿瘤中 Syk 的潜在抑癌基因功能实际上是 Syk(L) 发挥的, 而其异构体 Syk(S) 则具有潜在癌基因的功能^[13,14]。因此在探讨 Syk 基因在喉癌发生、发展中的功能时, 不能单纯检测 Syk 的表达水平, 而应针对 Syk(L) 基因进行特异性检测。本课题组前期通过 CCK-8、Transwell 实验发现转染 pIRES2-EGFP-Syk(L) 的喉癌 Hep-2 细胞增殖及侵袭能力明显降低; 通过裸鼠成瘤实验发现, 接种转染 Syk(L) 肿瘤细胞的裸鼠, 其肿瘤平均体积及质量显著小于对照组的裸鼠。由此可见, Syk(L) 可抑制喉癌 Hep-2 细胞的增殖及侵袭能力, 这与 Syk(L) 抑制其他肿瘤细胞增殖的实验结果一样。通过过表达 Syk(L), 喉癌细胞的增殖、成瘤、侵袭等恶性生物学行为受到明显抑制, Syk(L) 的低表达或缺失是引起喉癌发生、发展的原因之一。

国内外已有较多关于 Syk 表达沉默原因及对肿瘤恶性生物学行为影响的机制研究, 认为 Syk 基因启动子甲基化可能是其表达沉默的主要机制。通过 CpG 岛甲基化诱导抑癌基因沉默的基因修饰过程是可以逆转的, 在 CpG 岛去甲基化后, 该抑癌基因的表达可得到恢复。因此, 通过逆转基因的甲基化状态来阻止或者治疗肿瘤疾病正成为临床治疗癌症的新思路。目前最常用于去甲基化的药物只要有 5-氮胞苷和 5-杂氮-2-脱氧胞苷两种核苷类似物, 但是其毒性不良反应大, 具有诱癌性、高浓度时具有细胞毒性及化学不稳定性等, 限制了其在临床上的应用^[15]。中药抗肿瘤国内外已有较多的研究^[16,17]。因此从天然植物或草药中提取特异性好、安全性高、毒性不良反应小的活性成分来逆转 DNA 的甲基化, 逐渐成为新的研究目标。体外实验发现 TCS 对前列腺癌等肿瘤细胞的生长具有明显的抑制作用^[18]。且国

内有报告其具有逆转 DNA 甲基化的作用,天花粉蛋白通过诱导多基因的改变引起一系列级联反应,最终使肿瘤细胞发生凋亡^[5]。这表明天花粉蛋白是一个多作用靶点的、具有很高开发价值的抗肿瘤药物,又由于天花粉蛋白的细胞毒性相对较小,因而天花粉蛋白有望成为新型的可应用临床的抗肿瘤药物。

本研究以细胞增殖实验证实天花粉蛋白以时间和剂量依赖性抑制喉癌细胞的生长,Transwell 实验表明天花粉蛋白以浓度梯度抑制喉癌细胞的侵袭及迁移。MS-HRM 检测经不同浓度天花粉蛋白处理后 Hep-2 细胞的甲基化水平,结果显示,随着浓度的增加,Hep-2 细胞的甲基化率逐渐升高,提示天花粉蛋白能有效逆转喉癌细胞 Syk(L)启动子的甲基化状态,发挥一定程度的去甲基化作用。进一步证实 Syk(L)基因启动子甲基化可能是导致喉癌发生、发展的机制之一,这与笔者前期研究结果是一致的^[2]。Q-RT-PCR 及 Western blot 法检测研究显示,天花粉蛋白在逆转喉癌细胞 Syk(L)启动子甲基化状态,能够上调其 mRNA 和蛋白质的表达水平,天花粉蛋白通过重新激活因甲基化处于沉默状态的 Syk(L)基因的转录活性,恢复 Syk(L)基因的表达。

综上所述,天花粉蛋白可以明显抑制喉癌肿瘤细胞增殖及侵袭转移。TCS 可能是通过逆转 Syk(L)基因启动子甲基化状态,恢复其表达,从而抑制喉癌细胞的恶性生物学行为。本研究为 TCS 作为新型去甲基化药物治疗恶性肿瘤提供了理论依据。

参考文献

- 1 李志海,蔡志毅,金巧智,等. 全长型脾酪氨酸激酶基因转染对喉癌细胞恶性生物学行为的抑制作用[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 49(11):943-949
- 2 李志海,蔡志毅,金巧智,等. MS-HRM 技术定量检测喉鳞癌 Syk(L)基因启动子甲基化的方法及意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2014,24(23):3440-3442
- 3 张朝晖,李志海,金巧智,等. 全长型脾酪氨酸激酶基因转染对人喉鳞癌裸鼠移植瘤的生长抑制作用[J]. 医学研究杂志, 2015, 44(6):65-69
- 4 Jin QZ, Liu CB, Yan C, *et al.* 5-aza-CdR induces the demethylation of Syk promoter in nasopharyngeal carcinoma cell[J]. Gene, 2012, 511(2):224-226
- 5 彭平平,黄利鸣,韩钰,等. 重组天花粉蛋白高表达对入宫颈癌

- Caski 细胞 p73 基因甲基化影响的机制研究[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(9):1290-1293
- 6 尤程程,黄利鸣,韩钰,等. 重组天花粉蛋白体外诱导宫颈癌 He-La 细胞 p27 基因去甲基化的研究[J]. 中草药, 2010, 41(2):245-249
- 7 Huang Y, Song H, Hu H, *et al.* Trichosanthin inhibits DNA methyltransferase and restores methylation-silenced, gene expression in human cervical cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(4):872-878
- 8 Lee HS, Kim BH, Chi NY, *et al.* Prognostic implications of and relationship between CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in hepatocellular carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2009,15(3):812-820
- 9 金巧智,鄢冲,陈武兵,等. Syk 基因启动子去甲基化对鼻咽癌细胞侵袭转移能力的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2013,23(3):631-634
- 10 Shin SH, Lee KH, Kim BH, *et al.* Downregulation of spleen tyrosine kinase in hepatocellular carcinoma by promoter CpG island hypermethylation and its potential role in carcinogenesis[J]. Lab Invest,2014, 94(12):1396-1405
- 11 Yang Z, Huo L, Chen H, *et al.* Hypermethylation and prognostic implication of Syk gene in human colorectal cancer[J]. Med Oncol, 2013, 30(2):1-8
- 12 Xia TS, Shi JP, Ding Q, *et al.* Reactivation of Syk gene by AZA suppresses metastasis but not proliferation of breast cancer cells[J]. Med Oncol, 2012, 29(2):448-453
- 13 Wang L, Duke L, Zhang P S, *et al.* Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63(15):4724-4730
- 14 Nakashima H, Natsugoe S, Ishigami S, *et al.* Clinical significance of nuclear expression of spleen tyrosine kinase (Syk) in gastric cancer [J]. Cancer Lett, 2006, 236(1):89-94
- 15 Brueckner B, Kuck D, Lyko F. DNA methyltransferase inhibitors for cancer therapy[J]. Cancer J, 2007, 13(1):17-22
- 16 黄栋栋,金巧智,陈武兵,等. 牛蒡子苷元诱导人鼻咽癌 CNE-1 细胞凋亡及其作用机制[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(1):101-105
- 17 陈武兵,蔡志毅,金巧智,等. 中药紫草素对鼻咽癌 CNE-2 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2014,24(6):769-772
- 18 Li J, Li H, Zhang Z, *et al.* The anti-cancerous activity of recombinant trichosanthin on prostate cancer cell PC3[J]. Biol Res, 2016, 49(1):1-6

(收稿日期:2017-06-23)

(修回日期:2017-07-04)