论著

文章编号:1000-5404(2014)13-1370-06

5-氮杂-2-脱氧胞苷和曲古抑菌素A对胃癌MGMT基因表达及NF-κB活性的影响

孟 兰[1,2],程 民[1,2],沈国栋[1,2],徐婷娟[1],刘林青[1,2],唐杨琛[1,2],韩晓青[1,2],沈 千[2],胡世莲[1,2] (230001 合肥,安徽医科大学附属省立医院:老年医学科,安徽省老年医学研究所[1],肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨5-氮杂-2-脱氧胞苷(5-Aza-2′-deoxycytidine,5-Aza-dC)和曲古抑菌素A(trichostatin A,TSA)对不同分化程度的人胃癌MKN-45和MGC-803细胞系增殖、凋亡,抑癌基因O^6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O^6-Methylguanine-DNA Methyltransferase, MGMT)甲基化水平及其核转录因子NF-κB磷酸化程度影响。**方法** 利用CCK-8、流式细胞术、MSP、RT-PCR、Western blot等方法检测5-Aza-dC(10 μmol/L)、TSA(1 μmol/L)单独或联合刺激后,MKN-45和MGC-803细胞增殖、凋亡,MGMT甲基化、mRNA、蛋白表达水平及NF-κB p65蛋白的磷酸化程度。**结果** ①5-Aza-dC、TSA单独或联合使用均可抑制MKN-45和MGC-803细胞的生长,与单药组相比,联合用药组抑制作用更明显($P<0.05$);②5-Aza-dC及TSA均可促进MKN-45和MGC-803细胞的凋亡,联合用药组凋亡率[(8.43±1.80)%和(21.75±3.06)%]均明显高于5-Aza-dc组[(7.33±1.18)%、(15.22±1.03)%]和TSA组[(3.53±1.18)%、(12.66±1.10)%]($P<0.05$);③5-Aza-dC、TSA单独或联合刺激均可逆转MGMT基因甲基化,使其mRNA及蛋白表达水平上调,联合用药作用更加明显($P<0.05$);④NF-κB活性高表达的MKN-45和MGC-803经5-Aza-dC和TSA处理后细胞的NF-κB活性降低,且联合用药组[(12.81±4.18)%和(9.08±2.66)%]抑制程度较5-Aza-dc组[(39.13±3.38)%、(34.90±4.89)%]和TSA组[(27.55±5.00)%、(22.11±3.07)%]更加明显($P<0.05$)。**结论** 5-Aza-dC与TSA均可抑制胃癌细胞生长和促进细胞凋亡,逆转MGMT基因甲基化反应,提高基因表达和抑制NF-κB的活性,二药联合作用提示效果更加明显。

[关键词] 胃癌;5-氮杂-2-脱氧胞苷;曲古抑菌素A;MGMT基因;核转录因子-κB
[中图法分类号] R73-361; R735.2; R965 [文献标志码] A

Effects of 5-Aza-dC combined with trichostatin A on MGMT expression and NF-κB activity in gastric carcinoma cells

Meng Lan[1,2], Cheng Min[1,2], Shen Guodong[1,2], Xu Tingjuan[1], Liu Linqing[1,2], Tang Yangchen[1,2], Han Xiaoqing[1,2], Shen Gan[2], Hu Shilian[1,2] ([1]Department of Geriatrics, Anhui Provincial Institute of Geriatric Medicine, [2]Anhui Provincial Key Laboratory of Tumor Immunotherapy and Nutrition Therapy, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei, Anhui Province, 230001, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of 5-Aza-2′-deoxycytidine (5-Aza-dC) and trichostatin A (TSA) alone, or in combination on the proliferation, apoptosis, the methylation level of O^6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and the phosphorylation of NF-κB in human gastric carcinoma cell lines with different differentiation grades (MKN-45 and MGC-803). **Methods** After MKN-45 and MGC-803 cells were treated by 5-Aza-dC, TSA and combination respectively, the cell viability was assayed by CCK-8 kit, and apoptosis by Annexin V-FITC/PI staining. The methylation level of MGMT promoter was determined by methylation specific PCR (MSP), and mRNA expression by RT-PCR. Western blotting was employed to detect the expression of MGMT, NF-κB p65 and p-NF-κB p65 in the 2 cell lines. **Results** 5-Aza-dC or TSA monotherapy and combination significantly inhibited cell growth in a dose- and time- dependent manner in MKN45 and MGC-803 cells, and the combination treatment was more significant in the inhibition ($P<0.05$). The monotherapies and combination treatment both improved cell apoptosis, and the combination group [(8.43±1.80)% and (21.75±1.06)%] had higher apoptotic rate than the 5-Aza-dC [(7.33±1.18)% and (15.22±1.03)%] and TSA [(3.53±1.18)% and (12.66±1.10)%] monotherapies ($P<0.05$). The monotherapies and combination

[基金项目] 国家自然科学基金(81071808);安徽省国际科技合作计划项目(1303063017);安徽省科技厅科技攻关项目(12010402126);安徽省自然科学基金(H1610)
[通信作者] 胡世莲,E-mail:hushilian@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140124.1021.003.html(2014-01-24)

treatment all reversed MGMT promoter methylation, and increased its mRNA and protein levels, but the combination treatment showed more significant effects ($P<0.05$). The expression levels of NF-κB p65 were significantly reduced in the MKN-45 and MGC-803 cells after monotherapies and combination treatment, and the combination treatment [(12.81 ± 4.18)% and (9.08 ± 2.66)%] showed stronger inhibitory effects than the 5-Aza-dC [(39.13 ± 3.38)% and (34.90 ± 4.89)%] and TSA [(27.55 ± 5.00)% and (22.11 ± 3.07)%] monotherapies($P<0.05$). **Conclusion** Both 5-Aza-dC and TSA inhibit the proliferation, induce the apoptosis, and enhance MGMT expression by changing the methylation and decreasing NF-κB activity in human gastric carcinoma MKN-45 and MGC-803 cells. And the combination treatment shows more significant effects than either of the 2 drugs.

[**Key words**] gastric cancer; 5-Aza-2′-deoxycytidine; trichostatin A; O^6-methylguanine-DNA methyltransferase; NF-κB

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81071808), the International Cooperation Project of Science and Technology of Anhui Province (1303063017), the Tackling Project of Science and Technology of Anhui Provincial Department of Science and Technology (12010402126) and the Natural Science Foundation of Anhui Province (H1610). Corresponding author: Hu Shilian, E-mail:hushilian@126.com

流行病学研究表明,全球每年胃癌新发病例约有93万人[1],由于早期临床症状不典型,多数胃癌患者确诊时已处于晚期,预后差,病死率高,5年生存率低于20%[2]。目前,化疗是临床上晚期胃癌治疗的常用方案,然而,常规化疗药物治疗效果欠佳,并有严重的不良反应和化疗耐受性。研究证明,DNA甲基化转移酶(methyltransferase, DNMTS)和组蛋白脱乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)的高表达与抑癌基因异常甲基化有关[3],抑癌基因启动子区异常甲基化与肿瘤的发生、发展关系密切。O^6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O^6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)作为普遍存在的DNA修复酶,在正常组织、癌旁组织及肿瘤组织中表达呈递减趋势[4-5];NF-κB在许多恶性肿瘤中异常活化[6-7],是肿瘤发生的高危因素之一[8],亦是肿瘤发生、发展中的关键环节之一。利用甲基转移酶抑制剂5-Aza-dC和组蛋白去乙酰化酶抑制剂TSA处理不同分化程度胃癌细胞,检测抑癌基因MGMT表达水平及核转录因子NF-κB活性的变化情况,探讨两药的抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及材料

1.1.1 细胞株、培养基及药物 人胃癌细胞株MKN-45和MGC-803细胞购自北京肿瘤研究所,RPMI1640培养液及胎牛血清购自美国Gibco公司,胰蛋白酶、青霉素-链霉素购自碧云天公司,5-Aza-dC、TSA购自Sigma公司。

1.1.2 细胞增殖及凋亡试剂 细胞增殖实验试剂盒(CCK-8)购自日本同仁化学研究所,Annexin V、PI染料购自Sigma公司。

1.1.3 总DNA、RNA提取,MSP及RT-PCR试剂及核酸电泳试剂 Trizol试剂、逆转录试剂盒购于Invitrogen公司,异丙醇、氯仿、无水乙醇等分析纯试剂购自国药集团化学试剂有限公司,焦碳酸二乙酸钠(DEPC)购自BIOBASIC(BBI)公司,dNTPmix (10 mmol/L)、OligdT18、*Taq* DNA聚合酶购自上海生工生物工程有限公司,M-MGMT(83 bp)上游引物:5′-TTTCGACGTTCGTAGGTTTTCGC3′,下游引物:5′- GCAC-TCTTCCGAAAACGAAACG-3′;U-MGMT(91 bp)上游引物:5′-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3′,下游引物:5′-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3′;MGMT(107 bp)上游引物:5′-TGAATGCCTATTTCCACC-3′,下游引物:5′-CTTCCATAACACCTGTCT-3′;β-actin (186 bp)上游引物:5′-TGTGATGGTGGGTATGGGTCA-3′,下游引物:5′-TTAATGTCACGCACGATTTCC-3′。上述引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.4 总蛋白的提取及蛋白质免疫印迹电泳检测试剂 Western blot/PI裂解液、彩色预染分子量标准购自碧云天公司,anti-MGMT、anti-β-actin抗体、山羊抗鼠及山羊抗兔二抗抗体等均购自Santa Cruz公司,anti-NF-κB p65抗体及其磷酸化抗体均购自Cell Signaling公司。

1.2 实验方法

1.2.1 药物的配制 使用DMSO分别将5-Aza-dC及TSA溶解成1 mg/mL的贮存液,使用RPMI1640完全培养基稀释成所需的浓度后,处理细胞。

1.2.2 增殖实验 收集处于对数生长期的MKN-45和MGC-803细胞,计数并调整浓度为1×10^4/mL,接种于96孔板,200 μL/孔,每组设3个复孔,培养24 h后,待细胞完全贴壁后弃去培养基,加入含不同药物的培养基,200 μL/孔,同时设立对照组;5-Aza-dC及TSA分别设置低、中、高3个浓度,分别是2、10、50 μmol/L和0.2、1、5 μmol/L,时间依赖性分别选择中间浓度即10 μmol/L和1 μmol/L,分别于24、48、72 h时间点各取1板,每孔加入10 μL的CCK-8反应试剂,孵育1 h,测定波长450 nm处光密度值[D(450)],计算各组细胞存活情况。

1.2.3 细胞凋亡的检测 收集处于对数生长期的MKN-45和MGC-803细胞,计数并调整细胞数为1×10^4/mL,接种于6孔板,3 mL/孔,实验为4组:①对照组(RPMI1640培养基);②5-Aza-dC组(10 μmol/L);③TSA组(1 μmol/L);④5-Aza-dC(10 μmol/L) + TSA(1 μmol/L)组,培养48 h后,使用不含EDTA的胰酶消化,收集细胞,并使用4 ℃预冷的PBS洗涤细胞2次(1 500 r/min离心5 min),调整细胞数为1×10^6个/mL,使用200 μL的Binding Buffer重悬细胞,转管,每管加入5 μL的Annexin V,室温避光孵育30 min,每管加入5 μL 10 mg/mL

的PI，室温，避光，孵育10 min，使用BD FACSCanto™ Ⅱ Flow Cytometer流式细胞仪检测凋亡情况，每组实验重复3次。Winmdi 2.8软件分析实验数据。

1.2.4　甲基化特异性PCR（methylation specific PCR，MSP）及RT-PCR反应　收集处于对数生长期的MKN-45和MGC-803细胞，计数并调整细胞数为1×10^5/mL，接种于50 mm的培养皿，终体积为15 mL。实验分组：①对照组（RPMI1640培养基）；②5-Aza-dC组（10 μmol/L），培养72 h；③TSA组（1 μmol/L），培养48 h；④5-Aza-dC（10 μmol/L）+TSA（1 μmol/L）组，5-Aza-dC处理24 h后给予TSA继续培养48 h。收集细胞，MSP方法：DNA提取试剂盒提取总的DNA，用琼脂糖凝胶电泳检测并用紫外分光光度计检测DNA的纯度和浓度。采用MSP法检测，MGMT甲基化与非甲基化引物均由TaKaRa公司合成。在PCR仪上进行扩增，反应条件进行扩增：95 ℃预变10 min后（95 ℃ 30 s、65/66 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s），重复35个循环，72 ℃，延伸10 min，扩增片段分别是甲基化为81 bp，非甲基化为93 bp。取8 μL的PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶上进行DNA电泳，用UVI凝胶成像及图像分析系统（Quantity One软件）进行拍照和图像分析。RT-PCR：使用TRIzol试剂盒提取总RNA，之后进行逆转录，2 μg的总RNA，20 μL反应体系。以cDNA作为模版，按如下反应条件进行扩增：95 ℃，3 min（95 ℃ 30 s、56 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s），重复30个循环，72 ℃，延伸10 min，产物进行电泳分析，用UVI凝胶成像系统进行拍照、Quantity One软件分析图像。

1.2.5　Western blot检测　MGMT蛋白表达水平检测的细胞同RT-PCR方法处理，NF-κB p65蛋白和NF-κB p65的磷酸化水平检测的细胞同细胞凋亡检测的方法共处理6 h，收集各组细胞并按Western blot/PI裂解液方法提取蛋白，采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度，每孔上样量为4 μg，用10% SDS-PAGE凝胶电泳，转膜，封闭，加入一抗（1∶1 000稀释），4 ℃孵育，过夜，TBST漂洗PVDF膜7 min ×5次，加入二抗稀释液（1∶2 000）37 ℃孵育，1 h，TBST漂洗PVDF膜7 min ×5次。加入辣根过氧化物酶，HRP-ECL发光法曝光，使用Image J凝胶图像处理系统分析结果。

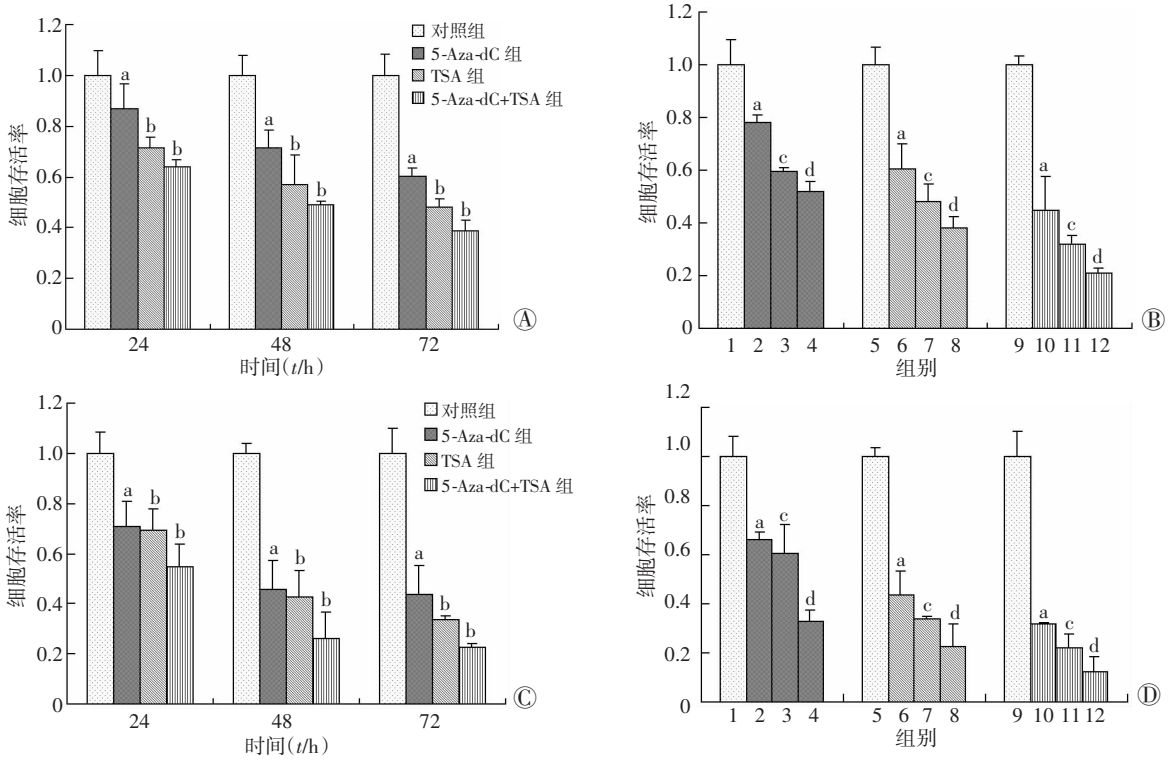
1.3　统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件进行统计分析，各组间差异显著性使用方差分析。

2　结果

2.1　CCK-8法检测5-Aza-dC、TSA单独及联合应用对胃癌MKN-45和MGC-803细胞增殖的影响

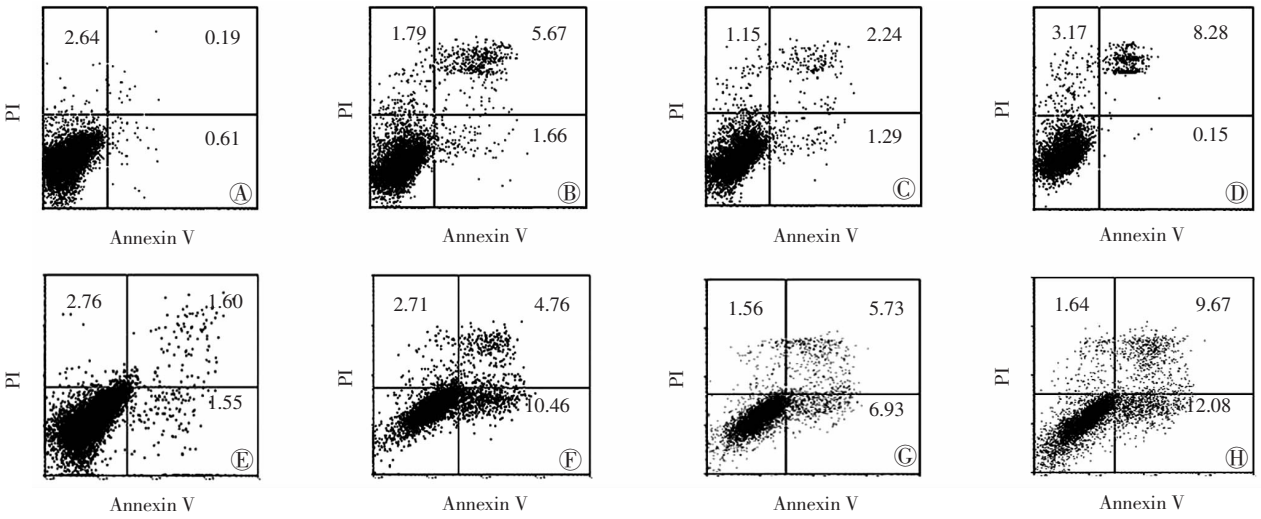
5-Aza-dC、TSA单独或联合处理MKN-45和MGC-803细胞24、48、72 h后，细胞存活率降低（图1），表明5-Aza-dC和TSA均可抑制细胞增殖。与单独用药相比，联合用药组细胞生长抑制率更明显（$P<0.05$），5-Aza-dC与TSA对MKN-45和MGC-803细胞的抑制作用存在时间与剂量依赖性，5-Aza-dC联合TSA（50 μmol/L 5-Aza-dC+5 μmol/L TSA）处理72 h，MKN-45细胞抑制率最高为69.2%，而分化程度较高的MGC-803细胞的增殖抑制程度更加敏感为87.8%。



1、5、9：对照组；2、3、4：分别为2、10、50 μmol/L 5-Aza-dC组；6、7、8：分别为0.2、1、5 μmol/L TSA组；10、11、12：分别为2、10、50 μmol/L 5-Aza-dC与0.2、1、5 μmol/L TSA联用组；a：$P<0.05$与对照组比较；b：$P<0.05$，与5-Aza-dC组和TSA组比较；c：$P<0.05$，与5-Aza-dC（2 μmol/L）和/或TSA（0.2 μmol/L）组比较；d：$P<0.05$，与5-Aza-dC（10 μmol/L）和/或TSA（1 μmol/L）组比较

A、C：不同时间药物处理后细胞存活情况；B、D：不同剂量药物处理后细胞存活情况

图1　CCK-8法检测各组MKN-45细胞（A、B）和MGC-803细胞（C、D）的存活情况



A ~ D: MKN-45 细胞;E ~ H:MGC-803 细胞;A、E:对照组;B、F:5-Aza-dC 组;C、G:TSA 组;D、H:5-Aza-dC + TSA 组

图 2　流式细胞仪检测 5-Aza-dC、TSA 单独或联合应用对 MKN-45 和 MGC-803 细胞凋亡的影响

2.2　流式细胞仪检测 5-Aza-dC、TSA 单独及联合应用对胃癌细胞 MKN-45 和 MGC-803 细胞凋亡的影响

5-Aza-dC、TSA 单独处理 48 h 后,MKN-45 和 MGC-803 细胞凋亡增多,与对照组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$),两药联合处理组细胞凋亡率较单独用药组细胞凋亡更加明显,且 MGC-803 细胞的凋亡率远远高于 MKN-45 细胞 ($P<0.05$,图 2、表 1)。

表 1　5-Aza-dC、TSA 单独或联合应用对 MKN-45 和 MGC-803 细胞凋亡的影响[$n=3$,$(\bar{x}\pm s)\%$]

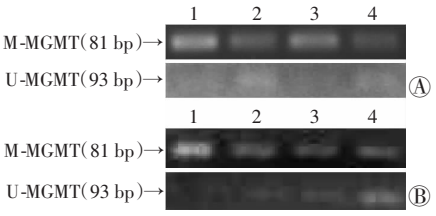
细胞	组别	早期凋亡	晚期凋亡	总凋亡
MKN-45	对照组	0.61 ± 0.12	0.19 ± 0.21	0.80 ± 0.15
	5-Aza-dC 组	1.66 ± 0.23	5.67 ± 0.54	7.33 ± 1.18[a]
	TSA 组	1.29 ± 0.13	2.24 ± 0.46	3.53 ± 1.18[a]
	5-Aza-dC + TSA 组	0.15 ± 0.13	8.28 ± 1.54	8.43 ± 1.80[b]
MGC-803	对照组	1.60 ± 0.19	1.55 ± 0.24	3.15 ± 0.71
	5-Aza-dC 组	4.76 ± 0.60	10.46 ± 0.28	15.22 ± 1.03[a]
	TSA 组	5.73 ± 0.40	6.93 ± 0.31	12.66 ± 1.10[a]
	5-Aza-dC + TSA 组	9.67 ± 0.72	12.08 ± 1.01	21.75 ± 3.06[b]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 5-Aza-dC 组、TSA 组比较

2.3　MSP 及 RT-PCR 检测 5-Aza-dC 和 TSA 单独及联合应用对胃癌 MKN-45 和 MGC-803 细胞 MGMT 基因表达的影响

用 MSP 检测 MGMT 基因启动子区甲基化水平,发现在 5-Aza-dC 和 TSA 单独或联合处理的 MKN-45 和 MGC-803 细胞中,MGMT 基因甲基化水平与空白对照组相比较明显降低,同时非甲基化产物增多,其中联合处理组比单药处理组变化更为明显($P<0.05$,图 3)。

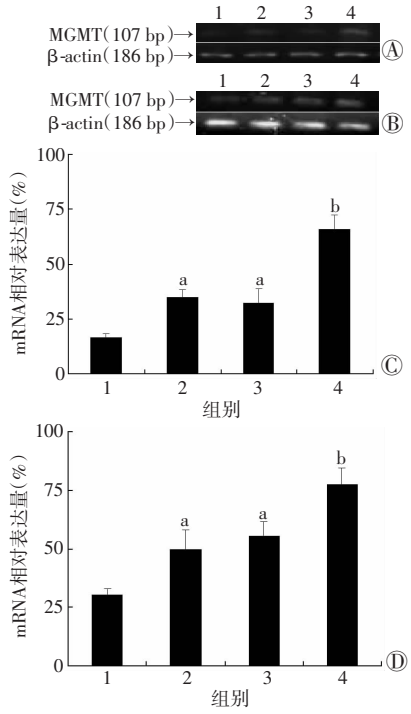
RT-PCR 检测药物处理后抑癌基因 MGMT mRNA 表达量,与对照组相比,各实验组抑癌基因 MGMT mRNA 表达量均明显升高($P<0.05$),两药联合处理后表达量升高更显著($P<0.05$,图 4),MGC-803 细胞 MGMT 基因 mRNA 升高更加明显。抑癌基因 MGMT 蛋白表达情况与 mRNA 水平趋势相同,各实验组 MGMT 蛋白表达显著高于对照组($P<0.05$,图 5)。与 MKN-45 细胞经相同药物处理后相比,MGC-803 细胞 MGMT 基因升高更加明显。



1:对照组;2:5-Aza-dC 组;3:TSA 组;4:5-Aza-dC + TSA 组

A:MKN-45 细胞;B:MGC-803 细胞

图 3　MSP 检测各组 MKN-45 和 SGC-803 细胞 MGMT 基因的甲基化水平

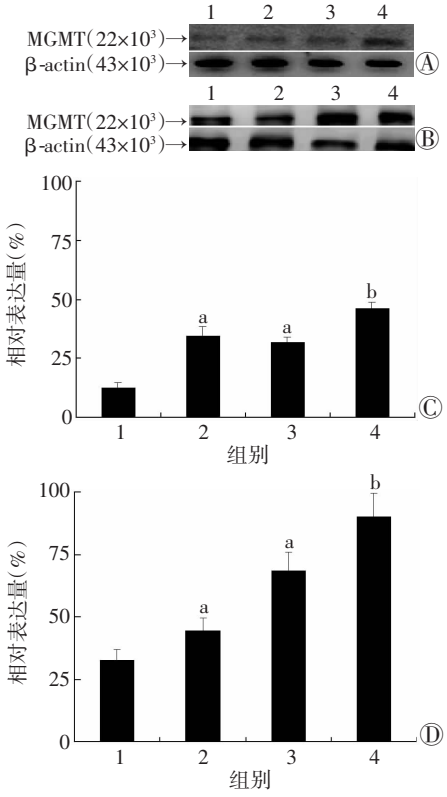


1:对照组;2:5-Aza-dC 组;3:TSA 组;4:5-Aza-dC + TSA 组

A、B: RT-PCR 检测结果;C、D: MGMT 基因 mRNA 相对表达量

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与单药组比较

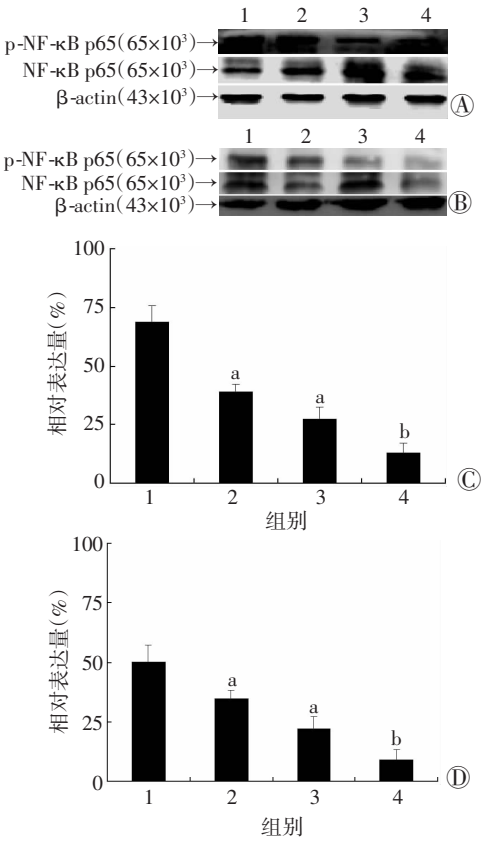
图 4　RT-PCR 检测各组 MKN-45 细胞(A、C)和 MGC-803 细胞(B、D)MGMT 基因 mRNA 的表达



1:对照组;2:5-Aza-dC 组;3:TSA 组;4:5-Aza-dC + TSA 组

A、B: Western blot 检测结果;C、D: 半定量分析结果 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与单药组比较

图5 Western blot 检测各组 MKN-45 细胞(A、C)和 MGC-803 细胞(B、D)MGMT 蛋白的表达



1:对照组;2:5-Aza-dC 组;3:TSA 组;4:5-Aza-dC + TSA 组

A、B:Western blot 检测结果;C、D:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与单药组比较

图6 Western blot 检测各组 MKN-45 细胞(A、C)及 MGC-803 细胞(B、D)NF-κB p65 蛋白表达及其磷酸化的变化

2.4 Western blot 检测 5-Aza-dC、TSA 单独或联合处理对胃癌 MKN-45 和 MGC-803 细胞 NF-κB p65 蛋白表达及其磷酸化程度的影响

以 β-actin 的蛋白水平为参照,5-Aza-dC 和 TSA 处理 MKN-45 和 MGC-803 细胞 6 h 后,发现 NF-κB p65 磷酸化蛋白表达水平均降低,与对照组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$),联合用药组磷酸化水平降低更加明显,并且高分化程度 MGC-803 细胞的 NF-κB p65 磷酸化蛋白抑制更加明显($P<0.05$,图6)。

3 讨论

遗传和表观遗传机制在胃癌的发生、发展中起着重要作用[9],具体形式包含甲基化和组蛋白去乙酰化[7],这种异常修饰可抑制基因转录,导致表达沉默。5-Aza-dC 是研究最多的甲基转移酶抑制剂,能与 DNA 甲基转移酶共价结合,降低 DNA 甲基转移酶的生物活性,进而改变多个抑癌基因启动子的甲基化状态[10];除了 DNA 甲基化,染色质重塑在基因转录调控中同样起着重要作用,HDAC 可以移去组蛋白 H3、H4 赖氨酸残基上的乙酰基,将带正电荷的赖氨酸残基暴露,吸引到带负电荷的 DNA 中进而产生紧密的染色质结构,使启动子不易接近转录调控元件,从而抑制转录[11],TSA 作为 HDAC 转移酶抑制剂,可以逆转这些基因的沉默,并且有研究证实组蛋白乙酰化和 DNA 去甲基化之间通过甲基结合蛋白(methyl-CpG binding proteins, MBDs)实现相互协同抗肿瘤作用[12]。

体外增殖实验我们发现,5-Aza-dC 和 TSA 均能抑制不同分化程度胃癌细胞的生长,表现出明显的时间与剂量依赖性,联合用药抑制作用更强,同时,发现对高分化型的胃癌细胞 MGC-803 的细胞毒性更加敏感;凋亡实验提示:5-Aza-dC 和 TSA 均能促进细胞凋亡,联合作用效果更明显($P<0.05$),MGC-803 细胞凋亡更明显,这与一些文献[13-14]报道是一致的。MGMT 基因作为一种普遍存在的 DNA 修复酶,能保护细胞免受烷化剂造成的 DNA 损伤[15],发挥抗肿瘤机制,MGMT 表达沉默或缺失会增加突变和癌变的风险[16]。本实验结果显示抑癌基因 MGMT 表达水平的升高与 5-Aza-dC 和 TSA 逆转了其甲基化有关,并且二药联合作用具有明显的协同作用,即逆转 MGMT 基因的甲基化

程度更加明显,基因的表达水平更高,并且 MGC-803 细胞 MGMT 表达水平升高更加明显。

NF-κB 作为与肿瘤密切相关的核转录因子,常常以 P50/P65 二聚体的形式存在于胞质中,当被多种分子和受体刺激活化,可进一步在基因水平调节 Bcl-2 家族、IL-8、IAPS、COX-2、hTERT 的表达,参与胃癌的发生、发展[17],由于 NF-κB 在胃癌组织中的高活性,常常通过抑制其活性发挥抗肿瘤作用[18-19]。我们进一步通过 Western blot 检测 NF-κB 的活性表达,发现胃癌细胞株 MKN-45 和 MGC-803 的 NF-κB 活性均高表达,经 5-Aza-dC 和 TSA 处理后细胞的 NF-κB 活性降低,联合用药作用更加明显,且分化程度较高的 MGC-803 抑制程度更加明显。

综上所述,我们推测 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-Aza-dC 和组蛋白去乙酰化转移酶抑制剂 TSA 可能是通过逆转 MGMT 的甲基化和抑制 NF-κB 的活性进而行使抗肿瘤的作用,二者联合应用效果更加明显;同时,我们发现分化程度不同的胃腺癌细胞株 MKN-45 和 MGC-803 对 5-Aza-dC 和 TSA 处理的敏感性不同,这 2 种细胞的 MGMT 甲基化变化和表达受药物诱导发生的变化也不同,提示二药抗肿瘤作用可能与肿瘤的恶性程度有关。MGMT 和 NF-κB 共同参与了胃癌的发生,目前,虽然对二者之间关系尚不清楚,但随着研究的不断深入,可以预测 5-Aza-dC 和 TSA 具有临床潜在抗肿瘤作用,本研究也为进一步探讨 MGMT 和 NF-κB 之间关系提供实验依据。

参考文献:

[1] Hu H, Liu J, Yao L, *et al*. Real-time bioluminescence and tomographic imaging of gastric cancer in a novel orthotopic mouse model[J]. Oncol Rep, 2012, 27(6): 1937-1943.

[2] de-Martel C, Forman D, Plummer M. Gastric cancer: epidemiology and risk factors[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2013, 42(2): 219-240.

[3] Rodr guez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology[J]. Nat Med, 2011, 17(3): 330-339.

[4] 阎慧娟, 米建强. 胃癌及癌前病变中 MGMT 的表达及其意义[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(2): 300-302.

[5] 何绍亚, 韩盛玺. MGMT 在肿瘤发生中作用的研究进展[J]. 西部医学, 2009, 21(7): 1213-1215.

[6] Chao X, Zao J, Xiao-Yi G, *et al*. Blocking of PI3K/AKT induces apoptosis by its effect on NF-κB activity in gastric carcinoma cell line SGC7901[J]. Biomed Pharmacother, 2010, 64(9): 600-604.

[7] Long Y M, Ye S, Rong J, *et al*. Nuclear factor kappa B: a marker of chemotherapy for human stage Ⅳ gastric carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(30): 4739-4744.

[8] Lu R, Gao X, Chen Y, *et al*. Association of an NFKB1 intron SNP (rs4648068) with gastric cancer patients in the Han Chinese population[J]. BMC Gastroenterol, 2012, 12: 87.

[9] Oue N, Hamai Y, Mitani Y, *et al*. Gene expression profile of gastric carcinoma: identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis, and carcinogenesis by serial analysis of gene expression[J]. Cancer Res, 2004, 64(7): 2397-2405.

[10] Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, *et al*. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia[J]. Blood, 2007, 109(1): 52-57.

[11] Qu Z, Yan P, Fu J, *et al*. DNA methylation-dependent repression of PDZ-LIM domain-containing protein 2 in colon cancer and its role as a potential therapeutic target[J]. Cancer Res, 2010, 70(5): 1766-1772.

[12] Giacinti L, Giacinti C, Gabellini C, *et al*. Scriptaid effects on breast cancer cell lines[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(10): 3426-3433.

[13] 董必文, 段凤英, 段训凰. 5-氮-2′-脱氧胞苷联合曲古抑菌素 A 对人肺腺癌细胞株 A549 增殖和凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(17): 1857-1860.

[14] 刘林青, 胡世莲, 沈干, 等. 5-氮杂-2-脱氧胞苷及曲古抑菌素 A 对人胃癌 SGC-7901 细胞生长及 CHFR 基因表达水平的影响[J]. 中国癌症杂志, 2012, 22(8): 573-577, 588.

[15] 郭校锡, 谭家驹. DNA 修复酶 MGMT 与食管癌关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(3): 460-461.

[16] Fukushige S, Horii A. DNA methylation in cancer: a gene silencing mechanism and the clinical potential of its biomarkers[J]. Tohoku J Exp Med, 2013, 229(3): 173-185.

[17] Zhou F, Wei H, Ding A, *et al*. Different cellular localization of NF-κB p65 expression as an indicator of different prognoses of stage Ⅰ-Ⅲ gastric cancer patients[J]. Clin Transl Sci, 2013, 6(5): 381-385.

[18] Qin Y, Chen J, Li L, *et al*. Exogenous morphine inhibits human gastric cancer MGC-803 cell growth by cell cycle arrest and apoptosis induction[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(4): 1377-1382.

[19] Ho H H, Chang C S, Ho W C, *et al*. Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth *via* increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF-κB activity[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 266(1): 76-85.

(**收稿**:2013-10-30;**修回**:2013-12-31)

(编辑 王 红)