

5-氮杂-2'-脱氧胞苷对人甲状腺乳头状癌细胞 DNA 甲基化及 DAPK 基因表达的影响

梁书卿 魏 枫 孙洪莉 郝 朦 王晓艳 李冉浩 马玉博

摘要 目的 探讨 DNA 甲基化在甲状腺乳头状癌中的作用机制,使用去甲基化药物 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)对死亡相关蛋白激酶(DAPK)基因表达水平的影响。方法

将 10 $\mu\text{mol/L}$ 的去甲基化制剂 5-Aza-CdR 分别应用于人甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞株及人正常甲状腺 Nthy-ori-3 细胞株,Real-time PCR 和 Western blot 法检测用药前后 DAPK、DNA 甲基转移酶(DNMTs) mRNA 和蛋白的表达情况。结果

Real-time PCR 结果显示,与人正常甲状腺细胞相比,人甲状腺乳头状癌中 DNMTs mRNA 高表达;人甲状腺乳头状癌细胞应用 5-Aza-CdR 治疗后, DNMTs mRNA 的表达量减少,而 DAPK 的 mRNA 表达量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$); Western blot 结果显示,与人正常甲状腺细胞相比,甲状腺乳头状癌中 DNMTs 蛋白的表达高, DAPK 蛋白表达少,经 5-Aza-CdR 作用 48 h 后, DNMTs 蛋白表达降低, DAPK 蛋白表达升高($P < 0.05$)。甲状腺正常细胞中不论给药前后, DAPK 及 DNMTs 的 mRNA 及蛋白表达均无差异。结论 DNA 甲基化在甲状腺乳头状癌中扮演重要的角色, 5-Aza-CdR 可能通过调节 DNMTs 的 mRNA 及蛋白的表达使沉默的 DAPK 基因恢复表达,从而发挥对甲状腺乳头状癌的防治作用。

关键词 甲状腺乳头状癌; DNA 甲基化; DAPK 基因; 甲基转移酶; 5-Aza-CdR

中图分类号 R 581.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)12-1861-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.12.009

甲状腺癌是内分泌系统中最常见的恶性肿瘤,在过去几十年的发病率呈逐年上升趋势^[1]。肿瘤的发生涉及基因的多种复杂变化及基因表型的改变,其中,表观遗传学改变在肿瘤的发生发展中起了重要的作用, DNA 甲基化是一种由 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)介导的化学修饰,与肿瘤的发生发展密切相关^[2-4]。死亡相关蛋

白激酶基因(death-associated protein kinase, DAPK)启动子区域甲基化促进多种肿瘤的发生,但在甲状腺乳头状癌上少有报道,是目前研究的热点之一^[5-6]。因此,抑制 DNMTs 可能作为治疗甲状腺癌的靶点, 5-Aza-CdR 是一种甲基转移酶抑制剂,研究^[7-8]显示该药已经成功作用于肺癌、白血病等肿瘤,而在甲状腺癌中作用尚不清楚。该文以甲状腺乳头状癌细胞系及甲状腺正常细胞系为研究对象,通过体外给予 5-Aza-CdR 来观察细胞系中 DAPK、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B mRNA 和蛋白表达的情况,为研究甲状腺癌的发生发展机制及治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人正常甲状腺细胞(Nthy-ori-3)、人甲状腺乳头状细胞(TPC-1)均购自复旦细胞库;去甲基化制剂 5-Aza-CdR 购自美国 Sigma 公司;1640 培养基、胎牛血清、PBS 均购自美国 Gibco 公司;反转录试剂盒购自日本 Toyobo 公司;一抗 GAPDH、DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 均购自美国 CST 公司;DAPK 抗体购自英国 Abcam 公司;抗兔辣根过氧化物酶(HRP) Ig G 二抗购自北京中杉金桥技术有限公司;引物均由上海生物技术公司合成;RealSYBR Mixture 购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Nthy-ori-3、TPC-1 细胞的培养及细胞模型的制备 Nthy-ori-3、TPC-1 细胞在含 10% 胎牛血清的 1640 培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育箱中培养 2~3 d 传代。根据实验要求,将细胞分别接种于培养皿或孔板中,取对数生长期细胞进行下一步实验。培养 Nthy-ori-3、TPC-1 细胞,待其状态稳定,形态饱满,达到指数生长期,融合度约为 60%~70% 时换液,实验组加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-Aza-CdR,对照组加入完全培养基继续培养,整个实验分为甲状腺正常细胞未加药组 Nthy-ori-3(-)、甲状腺正常细胞加药组 Nthy-ori-3(+),甲状腺乳头状癌未加药组 TPC-1(-)、甲状腺乳头状癌加药组 TPC-1(+),继续置

2020-07-14 接收

基金项目:内蒙古自治区科技计划项目(编号:201802128)

作者单位:内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院内分泌科,包头 014010

作者简介:梁书卿,女,硕士研究生;

魏 枫,女,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: 1135172562@qq.com

于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。

1.2.2 Real-time PCR 检测各组 DAPK 及 DNMTs 的 mRNA 表达 采用 TRIzol 法提取各实验组细胞总 RNA ,使用 NanoDrop-2000 检测提取的 RNA 浓度 ,使用 Toyobo 反转录试剂盒按照说明书操作进行 DNA 反转录 ,在 ABI7900 上进行 Real-time PCR ,引物序列见表 1。反应体系均为: Mix 10 μl ,cDNA 2 μl; 上下游引物各 0.5 μl; 去离子水 7 μl; 扩增均在不同的管中进行 ,扩增反应条件: 95 °C 预变性 5 min ,95 °C 变性 30 s (DAPK: 59°C ,DNMT1、DNMT3A、DNMT3B: 60°C ,GAPDH: 59°C) 退火 30 s ,72 °C 延伸 30 s 共 40 个循环 ,最后 72 °C 继续 5 min 让反应充分 4 °C 暂时保存 ,实验重复 3 次。

所有反应设置 3 个复孔 ,目标基因的 CT 值通过 GAPDH 的 CT 值均一化 ,即 $\Delta CT = CT_{\text{目标}} - CT_{\text{GAPDH}}$,而目标基因 mRNA 相对丰度值以 $\Delta\Delta CT$ 值 (DD value) 表示 , $\Delta\Delta CT = 2^{-\Delta CT}$ 。通过比较各组目标基因 $\Delta\Delta CT$,分析其表达的变化。

表 1 荧光定量 RCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物大小 (bp)
DAPK	上游: GAGGACGAGGTGATGCTGTATG	129
	下游: CTCTGTGCTTTGCTGGTGGAT	
DNMT1	上游: AACCTTACACTAG CCCGAG	124
	下游: CCATCCGATTTGGCTCTTTCA	
DNMT3A	上游: GACAAGAATGCCACCAAAGC	190
	下游: CGTCTCCGA ACC ACATGAC	
DNMT3B	上游: AGGGAAGACTCGATCCTCGTC	154
	下游: GTGTGTAGCTTAGCAGACTGG	
GAPDH	上游: AGAAGGCTGGGGCTCATTTG	258
	下游: AGGGCCATCCACAGTCTTC	

1.2.3 Western blot 检测各实验组 DAPK 及 DNMTs 的蛋白表达 收集药物作用前后的细胞 ,用 RIPA 细胞裂解液(强) 裂解细胞 ,提取各组蛋白 ,BCA 蛋白定量法测提取蛋白的浓度。20 μg 蛋白定量 ,用 SDS-PAGE(5% ~ 10%) 分离 ,再转到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h ,加入一抗体(1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜 ,再在与辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 3 000) 室温孵育 2 h。每步完成都要用 TBST 洗涤 3 次 ,每次 10 min。ECL 发光液处理 ,图像通过 Tanon-5800 成像系统获得 ,以 GAPDH 为内参。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析 ,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,多组间的比较采用单因

素方差分析 ,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Real-time PCR 上机实验 加样上机进行 Real-time PCR 实验 ,扩增曲线不同颜色代表 4 个分组: 甲状腺正常细胞未给药组 Nthy-ori-3(-) 、甲状腺正常细胞给药组 Nthy-ori-3(+) 、甲状腺乳头状癌细胞未给药组 TPC-1(-) 、甲状腺乳头状癌细胞给药组 TPC-1(+) ,曲线共同抬头于第 20 循环 ,反应良好 ,见图 1。

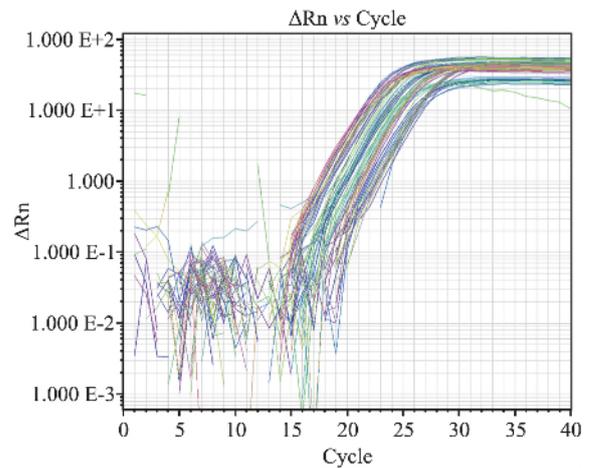


图 1 Real-time PCR 扩增曲线图

2.2 Real-time PCR 分析各组 DNMTs mRNA 的表达 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 的 mRNA 表达水平以 GAPDH mRNA 为内参得到各组相对值 ,与正常甲状腺细胞未给药组相比 ,甲状腺乳头状癌细胞未给药组的 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 的 mRNA 的表达量较高 ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与甲状腺乳头状癌细胞未给药组相比 ,甲状腺乳头状癌细胞给药组经 5-Aza-CdR 处理 48 h 后 ,DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 的 mRNA 表达量均下降 ($F = 9.381, 17.009, 4.867, P = 0.005, 0.001, 0.033$) ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 Real-time PCR 分析各组 DAPK mRNA 的表达 Real-time PCR 结果显示 ,各组 DAPK mRNA 的表达存在差异 ($F = 10.790, P = 0.003$)。在人正常甲状腺细胞中 DAPK 表达甚少 ,且加药后无改变 ,差异无统计学意义 ($P = 0.999$) ;甲状腺乳头状癌细胞经 5-Aza-CdR 处理 48 h 后 ,DAPK 基因 mRNA 的表达升高 ,差异有统计学意义 ($P = 0.024$)。见图 3。

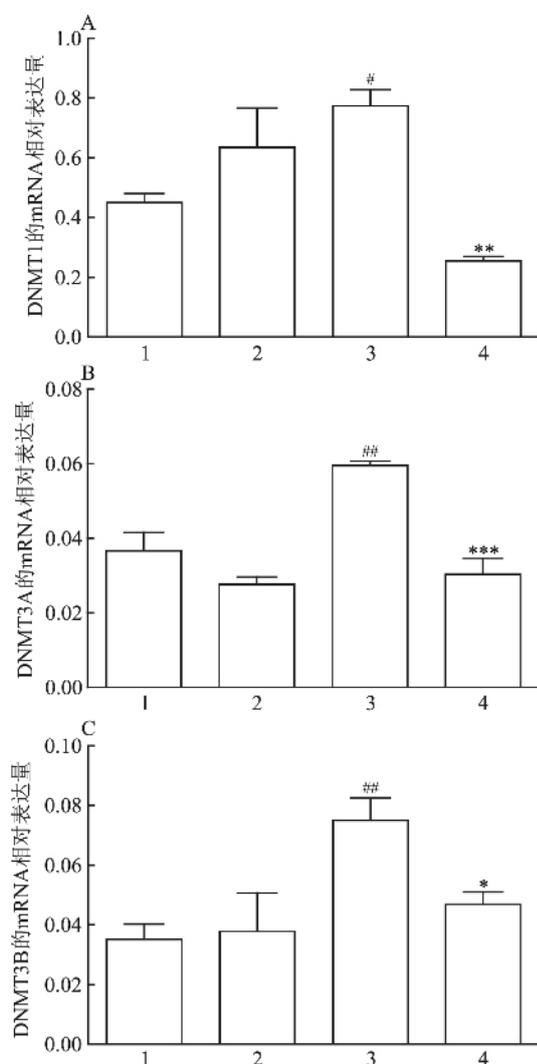


图2 各实验组甲基转移酶 mRNA 的相对表达量

A: DNMT1 的 mRNA 相对表达量; B: DNMT3A 的 mRNA 相对表达量; C: DNMT3B 的 mRNA 相对表达量; 1: 人正常甲状腺细胞未给药组; 2: 人正常甲状腺细胞给药组; 3: 人甲状腺乳头状癌细胞未给药组; 4: 人甲状腺乳头状癌细胞给药组; 与人正常甲状腺细胞未给药组比较: $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$; 与人甲状腺乳头状癌细胞未给药组比较: $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

2.4 Western blot 分析各组 DNMTs 蛋白的表达

Western blot 结果显示, 各组 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 蛋白水平表达存在差异 ($F = 7.642$, $P = 0.010$; $F = 4.983$, $P = 0.031$; $F = 13.446$, $P = 0.002$)。正常甲状腺细胞无论给药前后, DNMTs 的蛋白表达均无差异 ($P > 0.05$)。与人正常甲状腺细胞未给药组相比, 甲状腺乳头状癌细胞未给药组中 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 的蛋白表达量高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与甲状腺乳头状癌细胞未给药组相比, 5-Aza-CdR 处理 48 h 后 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 的蛋白表达量下降, 差异有统

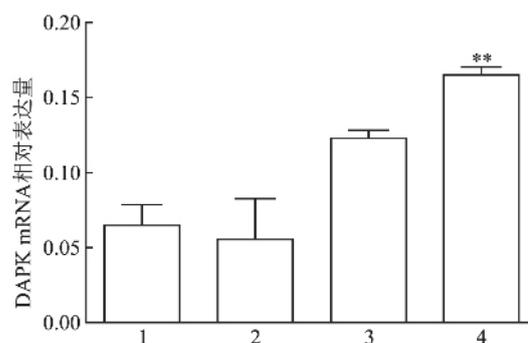


图3 DAPK mRNA 相对表达量

1: 人正常甲状腺细胞未给药组; 2: 人正常甲状腺细胞给药组; 3: 人甲状腺乳头状癌细胞未给药组; 4: 人甲状腺乳头状癌细胞给药组; 与人甲状腺乳头状癌细胞未给药组比较: $^{**}P < 0.01$

计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 Western blot 分析各组 DAPK 基因蛋白的表达

Western blot 结果显示, 各组 DAPK 蛋白表达水平存在差异 ($F = 7.954$; $P = 0.009$)。在正常甲状腺细胞中抑癌基因 DAPK 蛋白有表达, 且加药前后无改变, 差异无统计学意义 ($P = 0.485$); 与正常甲状腺细胞未给药组相比, 甲状腺乳头状癌细胞未给药组抑癌基因 DAPK 蛋白表达低, 差异有统计学意义 ($P = 0.006$)。经 5-Aza-CdR 处理 48 h 后, 人甲状腺乳头状癌细胞中 DAPK 基因蛋白表达升高, 差异有统计学意义 ($P = 0.002$)。见图 5。

3 讨论

DAPK 最早发现于 1995 年, 是一种钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 调节的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 参与凋亡、自噬和炎症等多种细胞过程^[9-10], 是凋亡的正性调节因子之一。Jing et al^[11] 研究发现通过抑制 miR-34a-5p 阻止 p53-DAPK 轴的破坏, 上调 DAPK 的表达, 从而抑制肾透明细胞癌的进展。DAPK 作为一种肿瘤抑制基因, 其启动子区域 CpG 岛的高甲基化致使基因转录沉默而失去功能, 参与肿瘤的发生发展。已经在乳腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、胃癌、宫颈癌等肿瘤中发现 DAPK 基因启动子区域因不同程度的高甲基化导致其表达低。在哺乳动物细胞中, 目前已知有 3 种 DNMT (DNMT1、DNMT3A、DNMT3B) 参与了 DNA 的甲基化修饰过程, DNA 启动子区域 CpG 岛甲基化后并不会改变核酸的序列, 只是部分碱基发生甲基化的修饰, 因此基因的甲基化是一种可以被逆转的表观遗传学修饰过程。使用甲基转移酶抑制剂可以逆转启动区域的高甲基化, 使 DAPK 重新表达^[12-13]。徐雅娣等^[14] 研

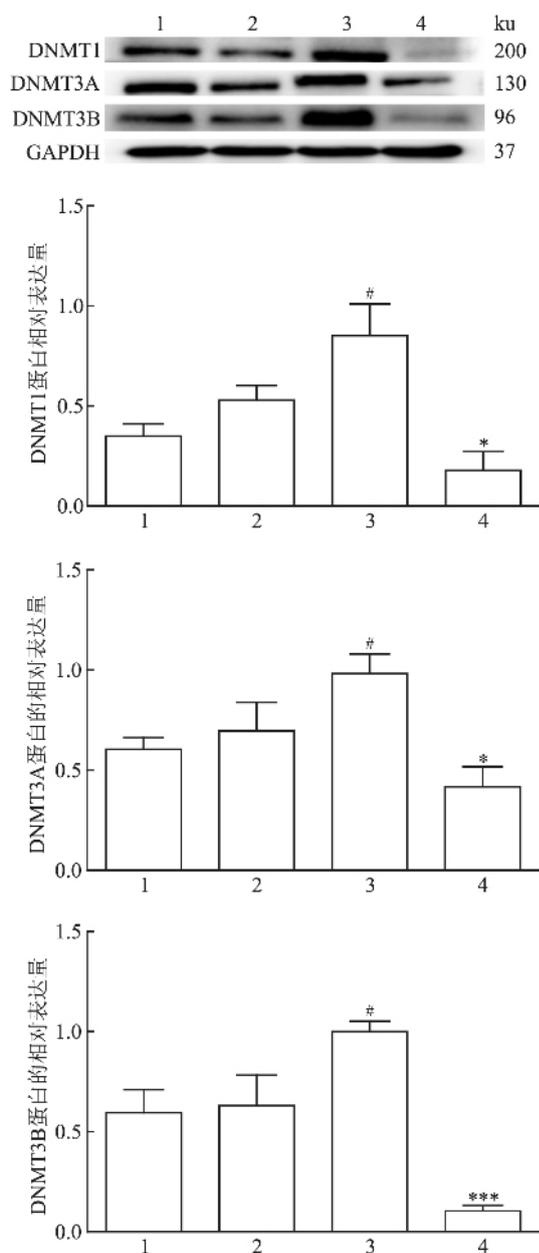


图4 Western blot 法检测各实验组甲基转移酶的蛋白相对表达量
1: 人正常甲状腺细胞未给药组; 2: 人正常甲状腺细胞给药组; 3: 人甲状腺乳头状癌细胞未给药组; 4: 人甲状腺乳头状癌细胞给药组; 与人正常甲状腺细胞未给药组比较: [#] $P < 0.05$; 与人甲状腺乳头状癌细胞未给药组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{***} $P < 0.001$

究发现, DNMT1 抑制剂通过调控增殖及侵袭相关蛋白的表达抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭。5-Aza-CdR 是一种典型 DNMT 抑制剂, 已经有研究^[12, 15-16]报道 5-Aza-CdR 通过沉默甲基转移酶诱导肺癌、乳腺癌、食管癌等细胞株的 DAPK mRNA 的重新表达。但是目前国内外尚未发现 5-Aza-CdR 作用在人甲状腺乳头状癌细胞株 DAPK 基因表达影响的相关报道。研究显示甲状腺乳头状癌细胞系 TPC-1 中

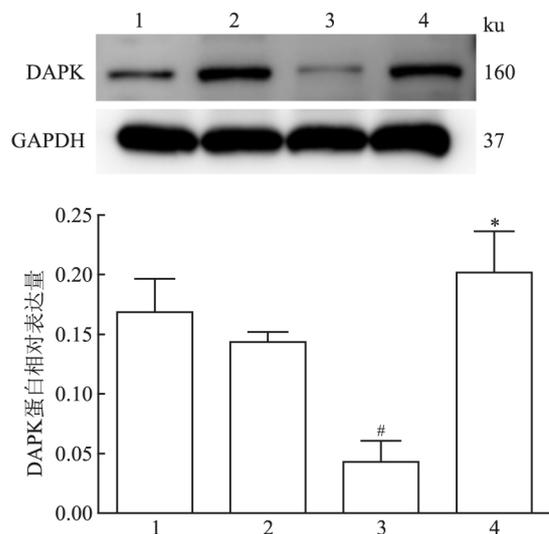


图5 Western blot 法检测各实验组 DAPK 的蛋白相对表达量

1: 人正常甲状腺细胞未给药组; 2: 人正常甲状腺细胞给药组; 3: 人甲状腺乳头状癌细胞未给药组; 4: 人甲状腺乳头状癌细胞给药组; 与人正常甲状腺细胞未给药组比较: [#] $P < 0.05$; 与人甲状腺乳头状癌细胞未给药组比较: ^{*} $P < 0.05$

DNMTs 表达上调, 其抑癌基因 DAPK 的表达水平很弱。使用去甲基化药物 5-Aza-CdR 处理 TPC-1 细胞后, DNMTs 的 mRNA 及蛋白表达水平降低, 而 DAPK 的 mRNA 及蛋白表达水平升高, 提示 5-Aza-CdR 可能通过沉默甲基转移酶而降低抑癌基因 DAPK 启动子区域的甲基化水平从而诱导其重新表达。

综上所述, 本研究结果表明 DNMTs 表达上调可能通过影响甲状腺乳头状癌细胞抑癌基因 DAPK 的过度甲基化, 使其转录表达过程沉默, 促进甲状腺乳头状癌的发生发展, 5-Aza-CdR 可以通过沉默甲基转移酶而诱导 DAPK 的重新表达, 进而发挥对甲状腺乳头状癌的防治作用。

参考文献

- [1] McLeod D S, Sawka A M, Cooper D S. Controversies in primary treatment of low-risk papillary thyroid cancer [J]. Lancet, 2013, 381(9871): 1046-57.
- [2] Khatami F, Larijani B, Heshmat R, et al. Promoter methylation of four tumor suppressor genes in human papillary thyroid carcinoma [J]. Iran J Pathol, 2019, 14(4): 290-8.
- [3] Zhang Y, Sun B, Huang Z, et al. Shikonin inhibits migration and invasion of thyroid cancer cells by downregulating DNMT1 [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 661-70.
- [4] Nojima M, Iwasaki M, Kasuga Y, et al. Correlation between global methylation level of peripheral blood leukocytes and serum C reactive protein level modified by MTHFR polymorphism: a cross-sectional study [J]. J Clin Lab Invest, 2019, 99(1): 1-10.

- tional study [J]. *BMC Cancer* 2018 ,18(1) : 184.
- [5] Wang H , Zhou L Y , Guan Z B , et al. Prognostic significance of DAPK promoter methylation in lymphoma: a meta-analysis [J]. *PLoS One* 2019 ,14(1) : e0210943.
- [6] Cai F , Xiao X , Niu X , et al. Association between promoter methylation of DAPK gene and HNSCC: a meta-analysis [J]. *PLoS One* ,2017 ,12(3) : e0173194.
- [7] 华丛书, 马冬春, 陈海, 等. p16 与非小细胞肺癌临床病理的关系及 5-Aza-CdR 对肺癌 A549 细胞中 p16 表达的影响 [J]. *四川大学学报(医学版)* ,2018 ,49(3) : 404-7.
- [8] Momparler R L , Côté S , Momparler L F , et al. Epigenetic therapy of acute myeloid leukemia using 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in combination with inhibitors of histone methylation and deacetylation [J]. *Clin Epigenetics* ,2014 ,6(1) : 19.
- [9] Yan X , Zhou R , Ma Z. Autophagy-cell survival and death [J]. *Adv Exp Med Biol* 2019 ,1206: 667-96.
- [10] Sulaiman Alsaadi M. Role of DAPK1 in neuronal cell death , survival and diseases in the nervous system [J]. *Int J Dev Neurosci* , 2019 ,74: 11-7.
- [11] Jing Z F , Bi J B , Li Z , et al. Inhibition of miR-34a-5p can rescue disruption of the p53-DAPK axis to suppress progression of clear cell renal cell carcinoma [J]. *Mol Oncol* ,2019 ,13(10) : 2079-97.
- [12] Liu B , Song J , Luan J , et al. Promoter methylation status of tumor suppressor genes and inhibition of expression of DNA methyltransferase 1 in non-small cell lung cancer [J]. *Exp Biol Med (Maywood)* ,2016 ,241(14) : 1531-9.
- [13] Krajnovic M , Radojkovic M , Davidovic R , et al. Prognostic significance of epigenetic inactivation of p16 , p15 , MGMT and DAPK genes in follicular lymphoma [J]. *Med Oncol* ,2013 ,30(1) : 441.
- [14] 徐雅娣, 赵兵, 卞尔保, 等. DNMT1 抑制剂 DC_517 对胶质瘤细胞增殖和侵袭的影响 [J]. *安徽医科大学学报* ,2019 ,54(11) : 1692-7.
- [15] Yang B , Yang Z G , Gao B , et al. 5-Aza-CdR can reverse gefitinib resistance caused by DAPK gene promoter methylation in lung adenocarcinoma cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol* ,2015 ,8(10) : 12961-6.
- [16] Bai J , Zhang X , Hu K , et al. Silencing DNA methyltransferase 1 (DNMT1) inhibits proliferation , metastasis and invasion in ESCC by suppressing methylation of RASSF1A and DAPK [J]. *Oncotarget* ,2016 ,7(28) : 44129-41.

Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on DNA methylation and DAPK expression in human papillary thyroid carcinoma cells

Liang Shuqing , Wei Feng , Sun Hongli , et al

(Dept of Endocrinology the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College , Inner Mongolia University of Science and Technology , Baotou 014010)

Abstract Objective To investigate the mechanism of DNA methylation in papillary thyroid carcinoma , effects of the demethylated drug 5-aza-2'-deoxycytidine(5-Aza-CdR) on the expression level of death-associated protein kinase(DAPK) genes. **Methods** Human thyroid papillary carcinoma cell line TPC-1 and human normal thyroid cell line Nthy-ori-3 were treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR. Real-Time PCR and Western blot were used to detect the expression levels of DAPK , DNA methyltransferases (DNMTs) mRNA and protein before and after treatment. **Results** Real-Time PCR results showed that DNMTs mRNA was highly expressed in human thyroid papillary carcinoma cells compared with normal thyroid cells. After 5-Aza-CdR treatment in human thyroid papillary cancer cells , the expression level of DNMTs mRNA decreased , while that of DAPK mRNA increased , and there was significant difference($P < 0.05$) ; Western blot results showed that the expression of DNMTs protein was higher in human thyroid papillary carcinoma and DAPK protein expression was less compared with normal thyroid cells , after 5-Aza-CdR was applied for 48 h , the expression of DNMTs protein decreased and the expression of DAPK protein increased($P < 0.05$) . Before and after administration , mRNA and protein expressions of DAPK and DNMTs in normal thyroid cells were not different. **Conclusion** DNA methylation plays an important role in papillary thyroid carcinoma , 5-Aza-CdR may regulate the expressions of DNMTs mRNA and protein to restore the expression of silenced DAPK gene , which may play a preventive role in thyroid papillary carcinoma.

Key words thyroid papillary carcinoma; DNA methylation; DAPK gene; methyltransferase; 5-Aza-CdR