

干扰 DOT1L 基因抑制胃癌 MGC-803 细胞增殖、侵袭和迁移

王庆康 宋早智 刘雪 钱军

摘要 目的 观察抑制 DOT1L 基因表达对胃癌 MGC-803 细胞增殖、迁移及侵袭的影响,并探讨其机制。方法 采用 Western blot 检测 BGC-823、MGC-803、SGC-7901 胃癌细胞系中 DOT1L 基因的表达量;分别采用 Real-time PCR、Western blot 检测各组细胞 DOT1L mRNA 和相关蛋白表达量;通过细胞集落克隆实验和 CCK-8 法检测细胞增殖能力;通过 Transwell 实验和划痕损伤实验检测细胞侵袭和迁移能力;通过 Western blot 检测细胞中的上皮间质转化(EMT)相关分子(E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin)的蛋白表达量。结果 DOT1L 在 3 种胃癌细胞中呈不同程度表达,在 MGC-803 细胞中表达量最高;转染后 DOT1L 相关蛋白及 mRNA 的表达能力显著降低($P < 0.05$);与对照组比较,细胞增殖、侵袭和迁移能力均明显减弱($P < 0.05$);细胞中 N-Cadherin、Vimentin 蛋白表达减少($P < 0.05$),E-Cadherin 蛋白表达增加($P < 0.05$)。结论 抑制 DOT1L 基因表达可降低胃癌 MGC-803 细胞的增殖与集落形成能力;并通过调控 N-Cadherin、Vimentin、E-Cadherin 的表达逆转 EMT 进程,进而减弱胃癌 MGC-803 细胞的迁移和侵袭能力。

关键词 胃癌;DOT1L 基因;细胞增殖;细胞迁移;细胞侵袭;上皮间质转化

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)12-1848-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.003

2019-07-19 接收

基金项目:2018 年度安徽高校自然科学研究项目(编号:KJ2018A1013)

作者单位:蚌埠医学院第一附属医院肿瘤外科 蚌埠 233010

作者简介:王庆康,男,硕士研究生;

钱军,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:Qianjun215036@sina.com

在我国,胃癌发病率和病死率分居恶性肿瘤的第二位和第三位,晚期胃癌的 5 年生存率小于 5%^[1-2]。放化疗主要用于中晚期胃癌患者的治疗,但因其不良反应较多,患者通常难以耐受。类端粒沉默干扰体-1(disruptor of telomeric silencing-1, DOT1)是一种在哺乳动物进化过程中发挥作用的保守蛋白,其在人类基因中被称为 DOT1-like(DOT1L)^[3]。DOT1L 可使组蛋白 H3 的第 79 位赖氨酸(H3K79)发生甲基化^[4]。对肺癌 A549 或 NCI-H1299 细胞 DOT1L 基因干扰后,细胞常表现出非增殖的多核表型^[5]。上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是胃癌发生发展的关键驱动因素,在胃癌侵袭、复发转移的早期阶段均发挥重要作用^[6]。有研究^[7]表明,EMT 与 H3K79 甲基化修饰有一定相关性。该研究通过干扰胃癌 MGC-803 细胞中 DOT1L 基因,下调 H3K79 甲基化水平,进而观察 DOT1L 基因对胃癌 MGC-803 细胞增殖的影响,并探索迁移及侵袭能力改变与 EMT 的相关性。

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂 MGC-803、BGC-823、SGC-7901 细胞株均由本实验室提供;RPMI 1640 培养基、1%青霉素-链霉素混合物均购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;Real-time PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司;TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;Primescript RT 试剂购自日本 Takara 公司;CCK-8 试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、0.1%结晶紫均购

the function of CHIR99021 in islet cell generation. **Results** Mouse embryonic stem cells could effectively differentiate into islet cells by adding three different solution formulations at three different time periods. In the early and late stages of islet cell formation, CHIR99021 addition and overexpression of β -catenin both could increase the efficiency of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells, characterized by up-regulation of Pdx1 and Ins1 expression. In the contrast, downregulation of β -catenin by two short hairpins RNA impaired the function of CHIR99021. **Conclusion** Activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway at specific stages of mouse embryonic stem cell differentiation into insulin-secreting cells can promote the formation of islet cells. Our results provide useful clues for the application of stem cells for the treatment of diabetes in the future.

Key words embryonic stem cells; differentiation; diabetes; insulin; β -catenin

自上海碧云天公司; Transwell 小室购自北京 Unique 生物公司; matrigel 基质胶购自美国 BD 公司; polybrene、嘌呤霉素、胰酶均购自美国 Sigma 公司; DOT1L、H3K79me1、H3K79me2、H3K79me3、EMT 标识基因蛋白-抗(鼠抗)均购自美国 ABclonal 公司; β -actin 一抗(鼠抗)、DOT1L、H3K79me1、H3K79me2、H3K79me3、EMT 标识基因蛋白、 β -actin 二抗(羊抗鼠)均购自美国 Abbkine 公司; DOT1L 基因相关的上下游 PCR 引物(上海生工生物有限公司); 上海吉玛公司构建 DOT1L-shRNA(正义序列: 5'-CCGGCCCCGCAAGAAGAAGCTAAACCTCGAGG-TTTAGCTTCTTCTTGGCGGCTTTTTG-3'; 反义序列: 5'-AATTCAAAAAGCCCCGCAAGAAGAAGCTAAACC-TCGAGGTTTAGCTTCTTCTTGGCGGC-3'), 命名为 *pLKO.1 puro-DOT1L-shRNA*; 阴性对照 shRNA(正义序列: 5'-CCGGCCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGC-TCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGGTTTTG-3'; 反义序列: 5'-AATTCAAAAACCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG-3'), 命名为 *pLKO.1 puro-shNC*。

1.2 Western blot 法比较 3 种不同胃癌细胞株 DOT1L 基因的表达水平 收集 MGC-803、BGC-823、SGC-7901 离心后细胞沉淀, 提取总蛋白。检测蛋白浓度后, 使用 RIPA 裂解液调整各组蛋白样品至等体积等浓度后, 加入上样缓冲液, 沸水煮沸 10 min 使蛋白变性。取等体积 3 组蛋白样品组上样。110 V 恒压电泳完成后电转移至 0.45 μ m PVDF 膜上, 经 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后, 转移至孵育盒中, 加入 TBST 稀释后的 DOT1L 抗体和 β -actin 的抗体并 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入二抗室温摇床孵育 2 h, 洗膜 3 次, 每次 10 min。ECL 发光液发光显色, 使用 Image J 软件图像分析, 计算出各组细胞中 DOT1L 基因蛋白的相对表达量。

1.3 选取胃癌 MGC-803 细胞进行病毒感染 将胃癌 MGC-803 细胞均匀接种于 6 孔板中, 每孔约种 5×10^5 个细胞, 控制 polybrene 终浓度为 6 μ g/ml, 按使用说明, 用 *pLKO.1 puro-DOT1L-shRNA* 和 *pLKO.1 puro-shNC* 分别感染胃癌细胞。病毒感染 48 h 后更换含 10% 血清培养基, 加入调整后浓度为 3 μ g/ml 的嘌呤霉素, 筛选 MGC-803 细胞 2 周后继续扩增。

1.4 Real-time PCR 检测 DOT1L 基因的转染 提取总 RNA, 使用 Primescript RT 试剂对不含 DNA 的 RNA 逆转录合成 cDNA。通过使用 Step One Plus

Real-time PCR 系统, 用 SYBR Green RT-PCR 试剂盒进行所有 qRT-PCR 的 mRNA 分析。以下引物用于 qRT-PCR: DOT1L 上游引物: 5'-CATCACTATG-GCGTCGAGAAA-3', 下游引物: 5'-CGCCTCTCTC-CAATGTGTATT-3'; β -actin 上游引物: 5'-CAGGAAG-GAAGGCTGGAAG-3', 下游引物: 5'-CGGGAAATCGTGCGTGAC-3'。PCR 反应总体系为 10 μ l: ddH₂O 3.2 μ l, Rox 0.2 μ l, 上游和下游引物各 0.3 μ l, Mix 5 μ l, cDNA 1 μ l。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s 后 60 $^{\circ}$ C 退火 34 s, 共 40 个循环。 β -actin 作为内参, 实验重复 3 次。各组 Ct 值与 β -actin 的 Ct 值相减得到 Δ Ct, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法比较。

1.5 Western blot 法检测转染效果 按 1.2 项步骤检测 MGC-803 细胞转染慢病毒后, 各组细胞中 H3K79 甲基化水平。

1.6 细胞集落克隆实验和 CCK-8 实验检测细胞增殖能力

1.6.1 细胞集落克隆实验 消化各组细胞并计数, 以 1×10^3 /孔的密度接种在 6 孔板中, 每组均设置 3 个亚孔。培养至肉眼可见细胞集落后, 弃培养基并加入 PBS 洗涤, 加入 600 μ l 0.1% 的结晶紫染色。室温下晾干, 倒置显微镜 40 倍镜下相同拍照位置拍照, 计算单克隆集落数并作图。

1.6.2 CCK-8 实验 消化细胞并计数后, 调整细胞密度为 3×10^3 /孔并接种接种于 4 块 96 孔板, 每组均设置 3 个亚孔。培养 24、48、72、96 h 后向各孔中加入 10 μ l CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h 后。在波长 450 nm 下检测各组细胞吸光度值, 绘制增殖曲线图。

1.7 细胞划痕损伤实验检测 MGC-803 细胞体外迁移能力 6 孔板每孔约接种 5×10^5 个细胞, 各组均设 3 个亚孔。待细胞隔夜刚长满贴壁, 吸出培养基, 加入 PBS 洗涤 3 次。经皿底垂直划直线, 加入 PBS 洗去漂浮细胞。使用不含血清的 RPMI 1640 培养基进行细胞培养, 0、24 h 后显微镜下拍照并标记拍照位置。用 Photoshop 软件测量细胞划痕距离。本实验重复 3 次。划痕愈合率 = (1 - 24 h 距离 / 0 h 距离) \times 100%。

1.8 Transwell 实验检测 MGC-803 细胞迁移和侵袭能力

1.8.1 细胞迁移实验 无血清培养基调整细胞密度为 5×10^5 /ml, 加入 100 μ l 至 Transwell 上室, 每组均设置 3 个亚室。下室加入含 15% 血清的培养基 500 μ l。培养 24 h 后, 弃去小室内培养基, PBS 洗涤并用棉签轻轻擦拭滤膜上层。甲醇和结晶紫分别进

行固定和染色,时长均为 20 min 相同位置下取 5 个高倍视野进行细胞计数。

1.8.2 细胞侵袭实验 将提前 24 h 预冷的 10 μl Matrigel 与 60 μl 的无血清培养基混匀,晾干后还需加入 50 μl 无血清培养基水化基底膜。培养箱中孵育 30 min。余步骤同 Transwell 细胞迁移实验。

1.9 Western blot 法检测 EMT 标识基因蛋白表达水平 按 1.2 项步骤检测胃癌细胞中 E-Cadherin、N-Cadherin 和 Vimentin 蛋白的表达水平。

1.10 统计学处理 涉及实验均独立重复 3 次。采用 SPSS 21.0 及 Graph Prism 6.0 软件进行分析及绘图,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用 *F* 检验和 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 法比较胃癌 MGC-803、BGC-823、SGC-7901 细胞 DOT1L 表达水平 Western blot 结果显示 3 种胃癌细胞系中,胃癌 MGC-803 细胞 DOT1L 表达水平最高。本研究拟挑选胃癌 MGC-803 细胞进行后续实验,见图 1。

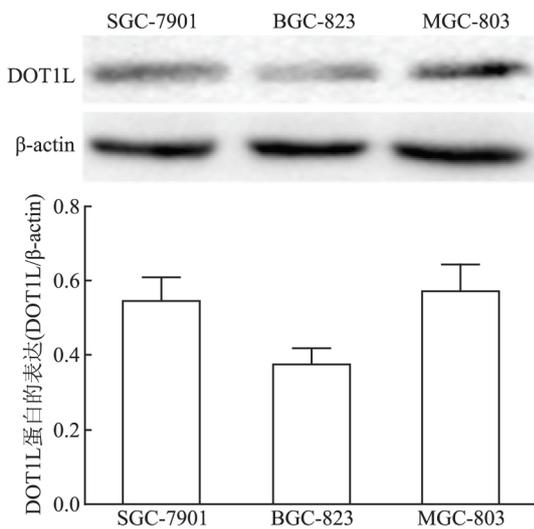


图1 Western blot 法检测 3 种胃癌细胞株中 DOT1L 基因蛋白的相对表达水平

2.2 Real-time PCR 检测 DOT1L mRNA 表达水平 将 *pLKO.1 puro-DOT1L-shRNA* 和 *pLKO.1 puro-shNC* 分别感染胃癌 MGC-803 细胞,检测 3 组细胞中 DOT1L mRNA 的表达水平。结果表明,感染慢病毒 shDOT1L 组细胞 mRNA 表达水平较空白对照组和阴性对照组明显下调,差异有统计学意义 (*F* = 54.200, *P* < 0.05),见图 2。

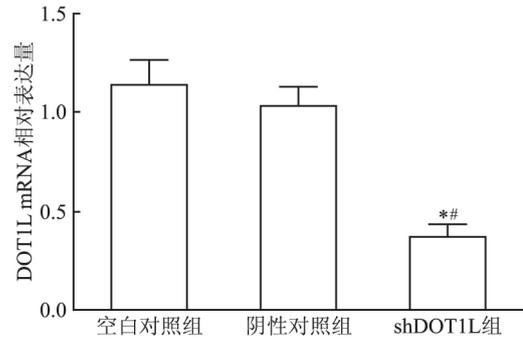


图2 Real-time PCR 检测 DOT1L mRNA 水平与空白对照组比较: * *P* < 0.05; 与阴性对照组比较: # *P* < 0.05

2.3 Western blot 法检测 3 组细胞 DOT1L 甲基化水平 shDOT1L 组细胞内 H3K79me1、H3K79me2 和 H3K79me3 的表达水平显著降低,灰度值差异具有统计学意义 (*F* = 71.100, *P* < 0.05; *F* = 104.800, *P* < 0.05; *F* = 33.940, *P* < 0.05)。H3K79 甲基化水平下调表明 MGC-803 细胞的 DOT1L 基因干扰有效。这与荧光定量 PCR 结果一致,证明该细胞可用于后续实验,见图 3。

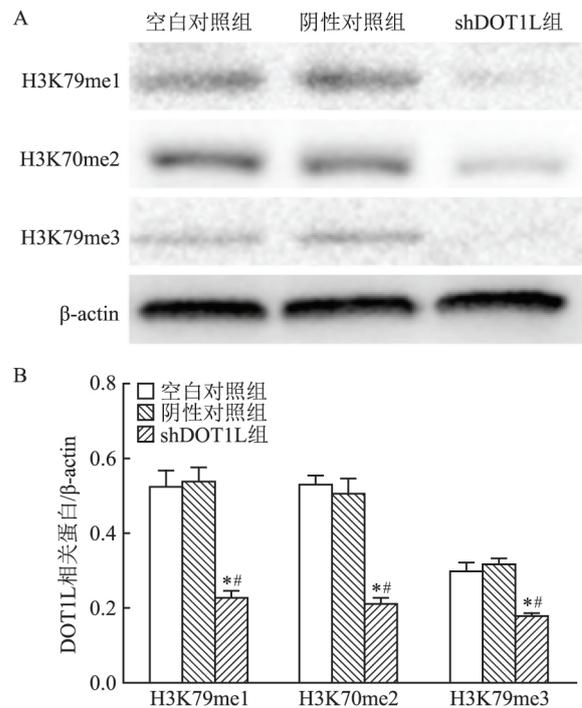


图3 干扰 DOT1L 表达对 MGC-803 细胞 H3K79 甲基化水平的影响

A: Western blot 法检测干扰 DOT1L 表达对 H3K79 甲基化蛋白相对表达水平的影响; B: 干扰 DOT1L 表达对 H3K79 甲基化蛋白相对表达量的影响; 与空白对照组比较: * *P* < 0.05; 与阴性对照组比较: # *P* < 0.05

2.4 细胞集落克隆实验和 CCK-8 法检测细胞增殖能力

① 细胞集落克隆结果显示,转染 DOT1L-shRNA 慢病毒后细胞形成的集落密度大小尚不及对照组。选取 5 个固定位置,使用倒置显微镜 40 倍镜下拍照,空白对照组、阴性对照组及 shDOT1L 组平均集落数分别为 (11.80 ± 0.97) 、 (12.00 ± 1.00) 和 (4.20 ± 0.66) ,差异有统计学意义 ($F = 24.920$, $P < 0.05$),见图 4。② CCK-8 实验结果显示,shDOT1L 组细胞在 48、72、96 h 的增殖效率明显低于空白对照组和阴性对照组,差异有统计学意义 ($F = 21.440$, $P < 0.05$; $F = 11.390$, $P < 0.05$; $F = 36.620$, $P < 0.05$)。以上结果提示干扰 DOT1L 基因表达抑制 MGC-803 细胞的增殖能力,见图 5。

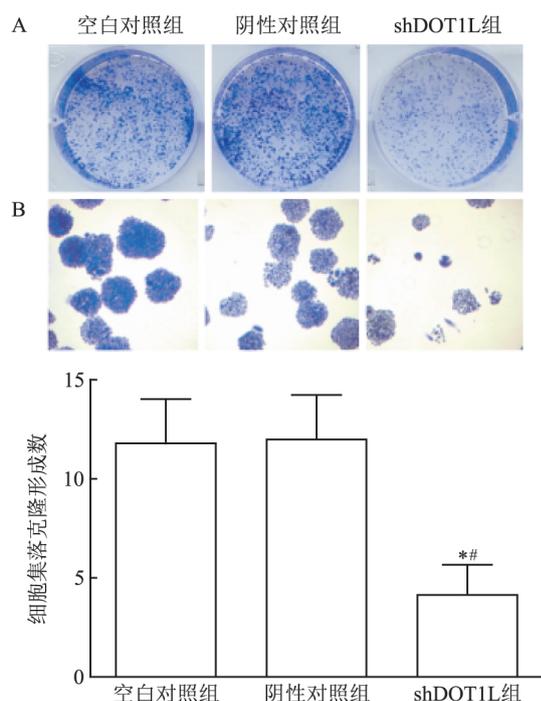


图 4 细胞集落克隆实验检测 MGC-803 细胞增殖效率

A: 不同组别细胞平板克隆结晶紫染色结果; B: 不同组别倒置显微镜下细胞团块数量 $\times 40$; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

2.5 划痕实验检测细胞体外迁移能力 空白对照组及阴性对照组细胞迁移率为 $(56 \pm 1.05)\%$ 、 $(51 \pm 1.31)\%$, shDOT1L 组迁移率为 $(25 \pm 1.33)\%$ 。结果表明,干扰 DOT1L 表达的 MGC-803 细胞 24 h 的迁移能力显著降低,差异有统计学意义 ($F = 43.600$, $P < 0.05$),见图 6。

2.6 Transwell 实验检测细胞迁移及侵袭能力 Transwell 侵袭实验结果显示 24 h 后 shDOT1L 组迁移细胞数 (62.33 ± 6.89) 较空白对照组 $(226.70 \pm$

$9.39)$ 和阴性对照组 (208.30 ± 12.67) 显著减少,差异有统计学意义 ($F = 82.190$, $P < 0.05$)。Transwell 迁移实验结果显示,24 h 后空白对照组、阴性对照组和 shDOT1L 组细胞穿膜数分别为 (356.70 ± 21.17) 、 (331.30 ± 12.81) 、 (169.00 ± 9.64) ,差异具有统计学意义 ($F = 44.110$, $P < 0.05$)。这表明干扰 DOT1L 基因表达能够明显减弱 MGC-803 细胞的迁移和侵袭能力,见图 7。

2.7 Western blot 法检测 EMT 标识基因蛋白表达水平 结果显示,干扰 DOT1L 表达可以减少 MGC-803 细胞中 N-Cadherin 和 Vimentin 的表达,差异具有统计学意义 ($F = 20.400$, $P < 0.05$; $F = 23.730$, $P < 0.05$),而 E-Cadherin 蛋白表达增加 ($F = 76.060$, $P < 0.05$)。这一结果说明,下调 DOT1L 基因能部分逆转 MGC-803 细胞的 EMT 表型,见图 8。

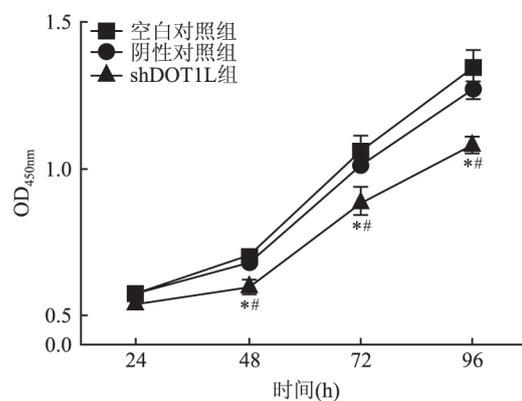


图 5 CCK-8 实验检测细胞增殖效率

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

DOT1L 是一种赖氨酸甲基转移酶,可以使组蛋白 H3 的第 79 位赖氨酸 (H3K79) 产生单甲基、二甲基和三甲基化^[8]。在哺乳动物体内,H3K79 甲基化与转录的活性相关^[9]。有研究^[10]表明,在混合谱系白血病中,DOT1L 抑制剂让机体可以产生较强的抗肿瘤作用。针对 DOT1L 基因高表达的肺癌和乳腺癌以及伴有 MYCN 扩增的神经母细胞瘤,DOT1L 基因同样也是潜在的治疗靶点^[11-13]。然而,目前 DOT1L 对胃癌的发生发展有何影响,尚无相关报道。

本研究以 DOT1L 基因高表达的胃癌细胞系 MGC-803 为研究对象,设计针对 DOT1L 的 *pLKO.1 puro-DOT1L-shRNA* 感染 MGC-803 细胞。成功筛选出 DOT1L 低表达的细胞株后,探讨其对细胞增殖能

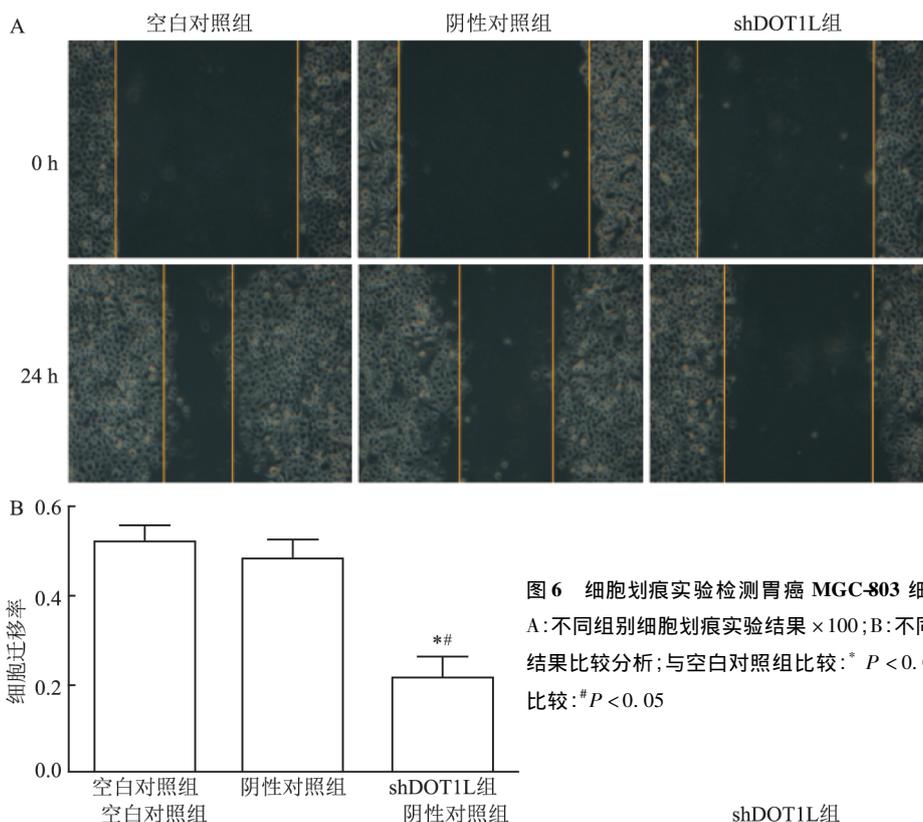


图6 细胞划痕实验检测胃癌 MGC-803 细胞迁移能力
 A:不同组别细胞划痕实验结果 ×100;B:不同组别细胞迁移率结果比较分析;与空白对照组比较: * P < 0.05;与阴性对照组比较: # P < 0.05

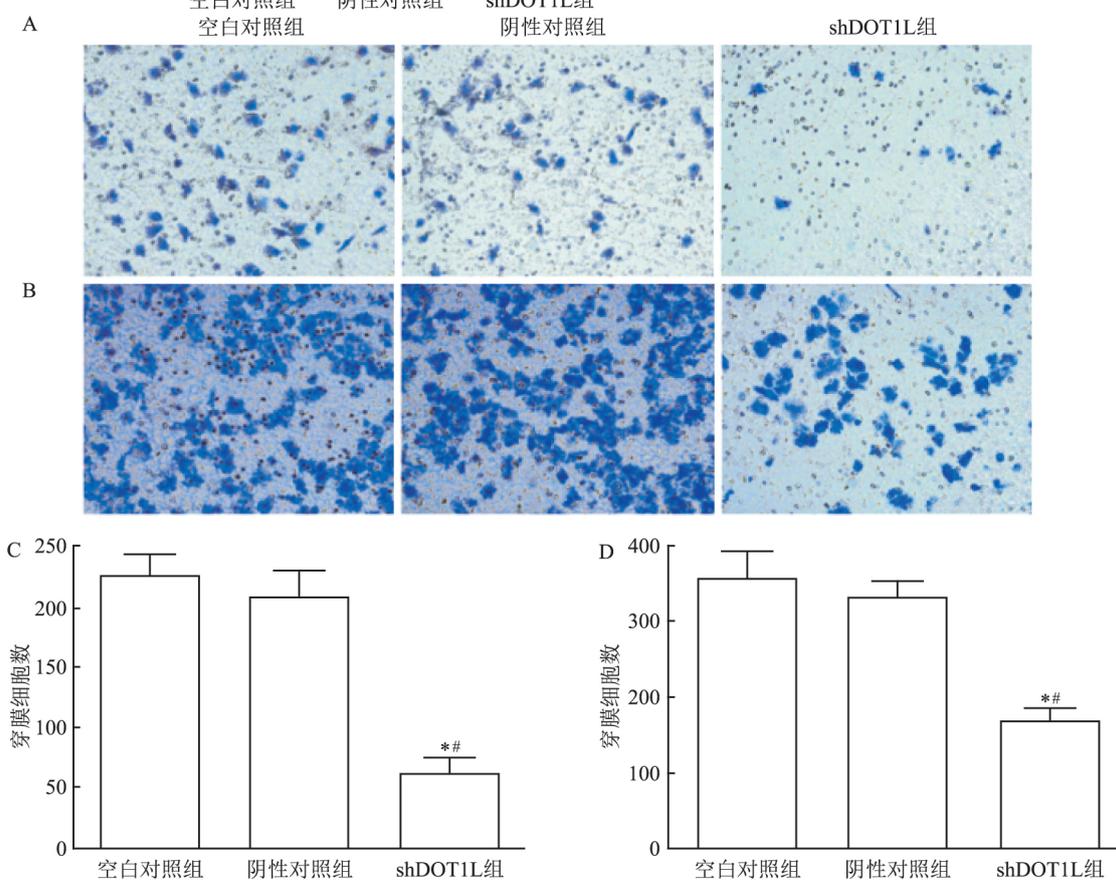


图7 Transwell 小室实验检测细胞侵袭和迁移能力

A:Transwell 侵袭实验不同组别穿透小室的结晶紫染色结果 ×200;B:Transwell 迁移实验不同组别穿透小室的结晶紫染色结果 ×200;C:Transwell 侵袭实验不同组别穿透小室细胞数量;D:Transwell 迁移实验不同组别穿透小室细胞数量;与空白对照组比较: * P < 0.05;与阴性对照组比较: # P < 0.05

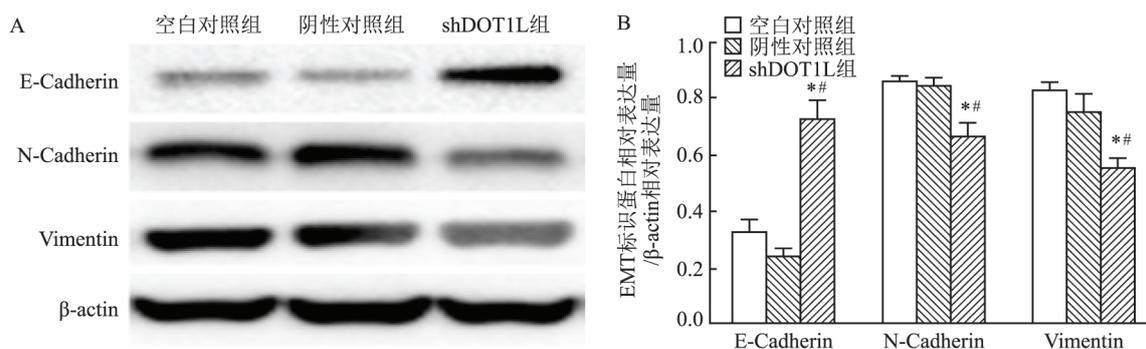


图8 干扰 DOT1L 表达对 EMT 标识基因蛋白表达的影响

A: Western blot 法检测干扰 DOT1L 表达对 EMT 标识蛋白相对表达水平的影响; B: 干扰 DOT1L 表达对 EMT 标识蛋白相对表达量的影响; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

力的改变以及 EMT 与迁移侵袭能力改变的相关性。结果显示, 转染后实验组 mRNA 和相关蛋白的表达均较对照组显著降低, 表明转染模型成功建立。通过 CCK-8 法验证其抑制 MGC-803 细胞的增殖活性。细胞集落克隆形成实验结果显示, DOT1L 表达能力降低可显著抑制 MGC-803 细胞集落的形成能力, 表现为集落数目显著减少, 细胞形态多种多样, 而对照组细胞大小形态一致, 集落生长旺盛。该结果表明, DOT1L 基因在胃癌 MGC-803 细胞恶性增殖过程中发挥着重要作用。迁移实验结果显示, 干扰 DOT1L 表达后, 胃癌 MGC-803 细胞体外迁移速度明显减慢, Transwell 上室的穿膜细胞数目明显减少。在 Transwell 侵袭实验中, 自上室侵袭至下室的细胞数目同样减少。因此, DOT1L 基因表达降低也会减弱 MGC-803 细胞的迁移和侵袭能力。

EMT 不仅是一种复杂的多步骤过程, 它还是一种复杂的形态学变化过程, 并与上皮和间充质基因的转录或表达水平改变有关^[14]。例如上皮细胞标记物 E-Cadherin 表达减少, 会导致上皮细胞的极性降低, 细胞与细胞之间的连接减弱, 而 N-Cadherin 与 Vimentin 表达增加则使肿瘤细胞迁移和侵袭潜力增强^[15]。本研究发现, 干扰 DOT1L 基因正常表达后, 胃癌 MGC-803 细胞的 EMT 过程也会受到影响, 表现为 E-Cadherin 的表达上调而 N-Cadherin 及 Vimentin 的表达下调。这或许表明干扰 DOT1L 基因表达导致 EMT 过程受到抑制, 进而导致胃癌 MGC-803 细胞的侵袭和迁移能力发生改变。

该研究通过成功干扰 DOT1L 基因表达, 研究实验组与对照组 MGC-803 细胞增殖、迁移及侵袭能力的改变。结果表明, 干扰 DOT1L 基因表达后可显著减弱 MGC-803 细胞的体外增殖能力。体外侵袭和

迁移能力同样减弱明显, 其机制可能与调控 EMT 相关蛋白的表达有关。因此, 考虑靶向阻断或者干扰人体内 DOT1L 基因生物学作用, 或许能给胃癌的治疗提供新的思路。由于胃癌 MGC-803 细胞并不能完全代表其他类型的胃癌细胞系, 体外细胞实验亦不能够完全模拟体内生理生化环境, 因此该实验也存在一定的局限性。为明确 DOT1L 基因作用于胃癌细胞的具体机制, 需要进一步的探索研究。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin 2016, 66(2): 115-32.
- [2] Rugge M, Genta R M, Di M F, et al. Gastric cancer as preventable disease [J]. Clin Gastroenterol Hepatol 2017, 15(12): 1833-43.
- [3] Nguyen A T, Zhang Y. The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation [J]. Genes Dev, 2011, 25(13): 1345-58.
- [4] Bovio P P, Franz H, Heidrich S, et al. Differential methylation of H3K79 reveals DOT1L target genes and function in the cerebellum *in vivo* [J]. Mol Neurobiol 2018, 56(6): 4273-87.
- [5] Kim W, Kim R, Park G, et al. Deficiency of H3K79 histone methyltransferase Dot1-like protein (DOT1L) inhibits cell proliferation [J]. J Biol Chem 2012, 287(8): 5588-99.
- [6] Zheng H, Li W, Wang Y, et al. miR-23a inhibits E-cadherin expression and is regulated by AP-1 and NFAT4 complex during Fas-induced EMT in gastrointestinal cancer [J]. Carcinogenesis, 2014, 35(1): 173-83.
- [7] Evanno E, Godet J, Piccirilli N, et al. Tri-methylation of H3K79 is decreased in TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer [J]. Clin Epigenetics 2017, 9: 80.
- [8] Wang X, Wang H, Xu B, et al. Depletion of H3K79 methyltransferase Dot1L promotes cell invasion and cancer stem-like cell property in ovarian cancer [J]. Am J Transl Res 2019, 11(2): 1145-53.
- [9] Steger D J, Lefterova M I, Ying L, et al. DOT1L/KMT4 recruit-

- ment and H3K79 methylation are ubiquitously coupled with gene transcription in mammalian cells[J]. *Mol Cell Biol* 2008 28(8): 2825–39.
- [10] Wang W T, Han C, Sun Y M, et al. Activation of the lysosome-associated membrane protein LAMP5 by DOT1L serves as a body-guard for MLL fusion oncoproteins to evade degradation in Leukemia[J]. *Clin Cancer Res* 2019, 25(9): 2795–808.
- [11] Jiao Z Y, Cao H T, Li Y M. Possible role of cancer stem cells in colorectal cancer metastasizing to the liver[J]. *Curr Stem Cell Res Ther* 2016, 11(5): 440–3.
- [12] Wong M, Tee A E L, Milazzo G, et al. The histone methyltransferase DOT1L promotes neuroblastoma by regulating gene transcription[J]. *Cancer Res* 2017. 77(9): 2522–33.
- [13] Nassa G, Salvati A, Tarallo R, et al. Inhibition of histone methyltransferase DOT1L silences ERalpha gene and blocks proliferation of antiestrogen-resistant breast cancer cells[J]. *Sci Adv* 2019 5(2): eaav5590.
- [14] Misra A, Pandey C, Sze S K, et al. Hypoxia activated EGFR signaling induces epithelial to mesenchymal transition (EMT) [J]. *PLoS One* 2012 7(11): e49766.
- [15] Rout-Pitt N, Farrow N, Parsons D, et al. Epithelial mesenchymal transition (EMT): a universal process in lung diseases with implications for cystic fibrosis pathophysiology [J]. *Respir Res* 2018, 19(1): 136.

Effects of DOT1L silencing on the proliferation, invasion and migration of human gastric cancer cells MGC-803 and its mechanism

Wang Qingkang, Song Zaozhi, Liu Xue, et al

(Dept of Surgical Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233010)

Abstract Objective To observe the effects of inhibiting DOT1L gene on the proliferation, invasion and migration of gastric cancer cells MGC-803, and to explore its mechanism. **Methods** Western blot was used to detect the expression of DOT1L in gastric cancer cell lines BGC-823, MGC-803 and SGC-7901. The expression of DOT1L mRNA and relevant protein in cells was detected by Real-time PCR and Western blot respectively. Colony formation and CCK-8 assay were performed to analyze the proliferation of DOT1L-silencing tumor cells. The migration and invasion ability were observed by Transwell experiment. The cell migration ability was observed by cell scratch test; Western blot was used to detect the expression of epithelial-mesenchymal-transition (EMT) related molecules (E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentin) in the cells. **Results** DOT1L was expressed in three gastric cancer cell lines at different degree, among which the DOT1L expression was the highest in MGC-803 cells. The expression of DOT1L mRNA and relevant protein was decreased significantly after inhibiting the expression of DOT1L gene ($P < 0.05$). Compared with the control group, the ability of cell migration and invasion was significantly reduced ($P < 0.05$). The expression of N-Cadherin and Vimentin protein was decreased in the cells ($P < 0.05$) and the expression of E-Cadherin was increased ($P < 0.05$). **Conclusion** DOT1L silencing affects the proliferation, migration and invasion abilities of gastric cancer cells MGC-803, and reverses the EMT process by regulating the expression of N-Cadherin, Vimentin, E-Cadherin, thereby reducing the migration and invasion ability of gastric cancer cells MGC-803.

Key words gastric cancer; DOT1L gene; cell proliferation; cell migration; cell invasion; epithelial mesenchymal transition