

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001945

S-腺苷甲硫氨酸通过 hepaCAM 抑制膀胱癌细胞增殖迁移

牛凌芳¹, 余朝文², 李 罗¹, 范佳鑫¹, 高英英¹, 范砚茹¹, 吴小候³, 罗春丽¹(1. 重庆医科大学检验医学院、临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属儿童医院
临床分子医学中心, 重庆 400014; 3. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探究 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)通过 hepaCAM 对膀胱癌(bladder cancer, BCa)细胞增殖和迁移的影响及其可能的分子机制。**方法:**不同浓度 SAM 作用于体外培养的 T24 和 BIU 细胞, 四甲基偶氮唑盐(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)法检测 SAM 对细胞增殖的影响。用不同浓度的 SAM(0、0.8、1.6 mmol/L)处理 T24 和 BIU 细胞 72 h 后, Real-time PCR 和 Western blot 法检测甲基结合蛋白-2(methyl DNA-binding domain protein, MBD2)、组蛋白去乙酰化酶-1(histone deacetylases, HDAC1)以及肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule, hepaCAM)的表达; 划痕及 Transwell 实验检测各组细胞的迁移能力; 克隆形成实验检测各组细胞的克隆形成能力。**结果:**SAM 抑制 T24 和 BIU 细胞生长且与药物浓度和作用时间呈正相关。与 0 mmol/L 组相比, 0.8 mmol/L 的 SAM 处理 T24 和 BIU 细胞 72 h 后 MBD2 mRNA 表达明显降低($P=0.048$; $P=0.038$), 蛋白表达明显降低($P=0.001$; $P=0.000$); 0.8 mmol/L 的 SAM 处理 T24 细胞 72 h 后 HDAC1 mRNA 和蛋白水平明显降低($P=0.000$; $P=0.001$); 0.8 mmol/L 的 SAM 处理 BIU 细胞 72 h 后 HDAC1 mRNA 水平无统计学差异($P=0.140$), 蛋白表达明显降低($P=0.004$); 0.8 mmol/L 的 SAM 处理 T24 和 BIU 细胞 72 h 后 hepaCAM mRNA 水平明显增加($P=0.003$; $P=0.008$), 蛋白表达无统计学差异($P=0.770$; $P=0.381$); 1.6 mmol/L 的 SAM 处理 T24 和 BIU 细胞 72 h 后 MBD2 mRNA 水平明显降低($P=0.003$; $P=0.000$), 蛋白表达明显降低($P=0.001$; $P=0.000$); HDAC1 mRNA 水平明显降低(均 $P=0.000$), 蛋白表达明显降低($P=0.001$; $P=0.000$); hepaCAM mRNA 和蛋白表达均明显增加(均 $P=0.000$)。划痕及 Transwell 实验结果显示 SAM 处理 T24 和 BIU 细胞 72 h 后迁移能力受到明显抑制($P<0.05$)。克隆形成实验结果显示 SAM 处理 T24 和 BIU 细胞 72 h 后细胞克隆形成能力明显降低($P<0.05$)。**结论:**SAM 可通过 MBD2/HDAC1 逆转 hepaCAM 的表达, 抑制 BCa 细胞的增殖及迁移能力。

【关键词】S-腺苷甲硫氨酸; 肝细胞黏附分子; 膀胱癌; 增殖; 迁移**【中图分类号】****【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018- -S-adenosylmethionine inhibits proliferation and migration
of bladder cancer cells via hepaCAMNiu Lingfang¹, Yu Chaowen², Li Luo¹, Fan Jiaxin¹, Gao Yingying¹, Fan Yanru¹, Wu Xiaohou³, Luo Chunli¹(1. Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine,
Chongqing Medical University; 2. Center for Clinical Molecular Medicine,
Children's Hospital of Chongqing Medical University; 3. Department of Urinary Surgery,
The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study the effect of S-adenosylmethionine(SAM) on the proliferation and migration of bladder cancer(BCa) cells via hepatocyte cell adhesion molecule(hepaCAM) and its potential molecular mechanism. **Methods:** T24 and BIU cells cultured in vitro were treated with different concentrations of SAM, and the effect of SAM on cell proliferation was evaluated by MTT assay. After treatment of T24 and BIU cells with different concentrations(0, 0.8, 1.6 mmol/L) of SAM for 72 h, real-time PCR and Western blot were used to measure the expression of methyl-CpG-binding domain protein 2(MBD2), histone deacetylase 1(HDAC1), and hepaCAM; wound healing assay and Transwell assay were used to measure the migration of cells in each group; colony formation assay was used

to measure the colony formation ability of cells in each group.

Results: SAM showed an inhibitory effect on the growth of T24 and BIU cells in a manner positively correlated with the concentration and duration of treatment. After treatment of T24 and BIU cells with 0.8 mmol/L SAM for 72 h, the mRNA and protein expression levels of MBD2 decreased significantly com-

作者介绍: 牛凌芳, Email: 2233945950@qq.com,

研究方向: 泌尿系统肿瘤。

通信作者: 罗春丽, Email: luochunli79@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81072086)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181205.1634.002.html>
(2018-12-06)

pared with those in the 0 mmol/L group(mRNA: $P=0.048$ and 0.038 , respectively; protein: $P=0.001$ and 0.000 , respectively); the mRNA expression level of HepaCAM increased significantly($P=0.003$ and 0.008 , respectively), but there were no significant differences in the protein expression level of HepaCAM($P=0.770$ and 0.381 , respectively). After treatment of T24 cells with 0.8 mmol/L SAM for 72 h, the mRNA and protein expression levels of HDAC1 decreased significantly($P=0.000$ and 0.001 , respectively); after treatment of BIU cells with 0.8 mmol/L SAM for 72 h, the protein expression level of HDAC1 decreased significantly($P=0.004$), but there was no significant difference in the mRNA expression level of HDAC1($P=0.14$). After the treatment of T24 and BIU cells with 1.6 mmol/L SAM for 72 h, there were significant decreases in the mRNA and protein expression levels of MBD2(mRNA: $P=0.003$ and 0.000 , respectively; protein: $P=0.001$ and 0.000 , respectively) and HDAC1(mRNA: $P=0.000$ and 0.000 , respectively; protein: $P=0.001$ and 0.000 , respectively), but there were significant increases in the mRNA and protein expression levels of hepaCAM(all $P=0.000$). After treatment of T24 and BIU cells with SAM for 72 h, cell migration was significantly inhibited as demonstrated by the wound healing assay and Transwell assay($P<0.05$), and cell colony formation ability was significantly reduced as demonstrated by the colony formation assay($P<0.05$). **Conclusion**: SAM can inhibit the proliferation and migration of BCa cells by reversing the expression of hepaCAM via MBD2/HDAC1.

[Key words] S-adenosylmethionine; hepatocyte cell adhesion molecule; bladder cancer; proliferation; migration

膀胱癌(bladder cancer, BCa)是老年男性常见的恶性肿瘤。在我国男性泌尿生殖系统恶性肿瘤中发病率居第一位,并且BCa每年的发病率和死亡率亦呈上升趋势^[1]。在BCa的治疗中,非肌层浸润性BCa多采用经尿道肿瘤切除术并辅助术后局部化疗,但仍有一半的患者会复发或进展为肌层浸润性BCa,一般采用根治性膀胱全切术进行治疗并辅以化疗^[2],严重影响患者的生存质量。因此,亟需寻找新的治疗方法。

S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)又名S-腺苷蛋氨酸,是甲硫氨酸的活性形式,是体内最重要的甲基供体,在DNA甲基转移酶的催化下能使DNA发生甲基化。近年来有文献报道SAM对乳腺癌、肝癌、胃癌和结肠癌细胞有促进凋亡和抑制生长的作用^[3-6],但在BCa细胞方面的研究较少,且大都是研究SAM对癌基因表达的影响从而发挥对肿瘤的抑制作用。为进一步明确SAM的作用机制,本课题从抑癌基因的角度进行阐释。

肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule, hepaCAM)是Moh等从人类肝脏中分离出来的一种新型免疫球蛋白类细胞黏附分子^[7]。研究表明hepaCAM在BCa细胞和组织中低表达或不表达,而在正常膀胱上皮细胞和组织中高表达,可通过多种信号通路参与调节BCa细胞的增殖、侵袭、转移和凋亡等生物学行为,在BCa的发生发展中起重要作用^[8-11]。

细胞中存在甲基 CpG 结合域(methyl-CpG-

binding domain, MBD),当CG岛中的C被甲基化后,能与MBD结合,同时MBD可招募组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDAC),使得某些肿瘤相关基因的启动子上组蛋白的修饰酶模式改变从而使组蛋白去乙酰化,导致异染色质化,阻碍转录因子及RNA聚合酶与DNA的结合,进而影响基因转录和表达^[12]。

本文通过探究SAM经MBD2/HDAC1逆转hepaCAM在BCa细胞中的表达机制,为阐明hepaCAM在BCa中缺失的原因并为SAM用于临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 人BCa细胞T24和BIU由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保存。

1.1.2 腺病毒 编码hepaCAM基因的腺病毒载体(adenovirus vector of hepaCAM protein, Ad-hepaCAM)及编码绿色荧光蛋白基因的腺病毒载体(adenovirus vector of green fluorescent protein, Ad-GFP)由本课题组前期构建保存。

1.1.3 主要试剂 细胞培养基RPMI1640和胎牛血清(Gibco公司);PBS(武汉博士德公司);MTT、DMSO(美国Sigma公司);SAM(美国Sigma公司);PCR引物合成(Invitrogen公司);Trizol、Taq DNA聚合酶、RT-PCR试剂盒和Real-time PCR试剂盒(Takara生物技术有限公司);蛋白提取试剂盒及Western blot相关试剂(上海碧云天生物技术有限公司);聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜、Transwell小室(美

国 Millipore 公司);hepaCAM 兔抗人多克隆抗体(ProteinTect 公司);MBD2 鼠抗人单克隆抗体 (Santa Cruz 公司)、HDAC1 鼠抗人单克隆抗体(Santa Cruz 公司); β -actin 多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 和抗鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人 BCa 细胞 T24 和 BIU 常规培养于 RP-MI1640 完全培养基(含有 10%胎牛血清,100 U/mL 青霉素和 100 g/mL 链霉素),置于 37 °C 含 5%CO₂ 的恒温培养箱中进行培养。当细胞完全贴壁并长至培养皿底部的 90%后用 0.25% 的胰酶进行消化传代。

1.2.2 MTT 实验 取对数生长期的细胞悬液接种于 96 孔板中,每孔 200 L,密度约 3000 个/孔。37 °C 含 5%CO₂ 的恒温培养箱中培养过夜,当细胞贴壁并长至孔底部的 70%后用不同浓度 SAM(0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mmol/L)处理,每种浓度设 3 个复孔,另设调零组(不含细胞的培养基)及对照组(未经 SAM 处理的细胞)。恒温培养箱中培养 24、48、72 h 后,每孔避光加入 5 mg/mL MTT 试剂 20 L,继续避光培养。5 h 后小心吸尽上清,每孔避光加入 180 L DMSO 后,振荡混匀 10 min 至结晶完全溶解,用酶标仪在 490 nm 处检测各孔吸光度值(absorbance, A),计算 SAM 对细胞的抑制率(IR%)及半数抑制率(IC₅₀),并确定其最佳作用时间和作用浓度。IR%=[1-A_{处理组}/A_{对照组}] $\times$ 100%,lgIC₅₀=lg(最大剂量)-(最大剂量/相临剂量) $\times$ [抑制率之和-(3-最大抑制率-最小抑制率)/4]。

1.2.3 SAM 处理细胞 将 T24 和 BIU 细胞正常传代至 6 孔板内,置 37 °C 含 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养,待细胞贴壁并长至孔底部的 80%后,弃去原培养液,用 0、0.8 和 1.6 mmol/L 的 SAM 处理细胞,37 °C 含 5% CO₂ 的恒温培养箱中继续培养 72 h 后,根据实验所需对细胞进行不同处理。

1.2.4 腺病毒感染细胞 将 T24 和 BIU 细胞正常传代至 6 孔板内,置 37 °C 含 5% CO₂ 恒温培养箱中培养,待细胞贴壁并长至孔底部的 80%后,弃去原培养液,加入 1 mL 不含血清的培养基,分别用 Ad-hepaCAM 和 Ad-GFP 处理细胞(分别 3 L/孔),并设空白对照组,4 h 后再加入 1 mL 完全培养基,37 °C 含 5% CO₂ 的恒温培养箱中继续培养 48 h 后,根据实验所需对细胞进行不同处理。

1.2.5 qRT-PCR 收集 0、0.8 和 1.6 mmol/L SAM 处理 72 h 后及 Ad-hepaCAM 和 Ad-GFP 处理 48 h 后的细胞,Trizol 法常规提取总 RNA,用逆转录试剂盒将提取的 RNA 逆转录成 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行 Real-time PCR 检测(以 β -actin 为内参)。反应条件为:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 30 s,退火(不同基因对应不同的温度)30 s,72 °C 延伸 30 s,共经历 30 个循环;之后 72 °C 延伸 10 min。引物序列见表 1。

1.2.6 Western blot 常规方法提取 0、0.8 和 1.6 mmol/L SAM 处理 72 h 后及 Ad-hepaCAM 和 Ad-GFP 处理 48 h 后的细

胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。以 50 μ g 蛋白上样量进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿转法将蛋白转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,1:200 比例稀释的鼠抗人 MBD2、HDAC1 单克隆抗体及 1:1 000 比例稀释的兔抗人 hepaCAM、 β -actin 多克隆抗体 4 °C 孵育过夜;TBST 洗涤 5 min $\times$ 6 次后加入 1:1 000 比例稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠或兔 IgG 抗体,室温孵育 1 h 后 TBST 洗涤 5 min $\times$ 6 次,ECL 暗室进行化学发光法显影。运用 Image J 软件对条带的灰度值进行分析,计算蛋白的相对表达量。蛋白的相对表达量=目的条带的灰度值/内参条带的灰度值。

表 1 Real-time PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
MBD2	上游:AACTGATCCGAAAATCTGGGCGC
	下游:TGCCAACTGAGGCTTGCTTC
HDAC1	上游:ATGCAAAGAAGTCCGAGGCA
	下游:CACTGTAAGACCACCGCACT
hepaCAM	上游:TACTGTAGATGTGCCCATTTCCG
	下游:CTTCTGGTTTCAGGCGGTC
β -actin	上游:TGACGTGGACATCCGCAAAAG
	下游:CTGGAAGCTGGACACGAGG

1.2.7 Transwell 实验 收集 0、0.8 和 1.6 mmol/L SAM 处理 72 h 后的细胞并用无血清培养基制成细胞悬液(细胞密度为 2×10^5 个/mL)。在 24 孔板中的 Transwell 小室的下室加入 500 μ L 含 10 %胎牛血清的培养基,上室加入 200 μ L 细胞悬液,置于 37 °C 含 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 24 h 后取出 Transwell 小室,用棉签拭去上室底部未迁移的细胞,甲醛固定 15 min 后自然晾干,0.5%结晶紫染色 5 min,自然干燥,光镜下观察拍照并随机选取 3 个不同的高倍视野计数穿膜的细胞数。

1.2.8 划痕实验 将 0、0.8 和 1.6 mmol/L SAM 处理 72 h 后的细胞正常传代至新的 6 孔板中,置于 37 °C 含 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养,待细胞贴壁并长至培养皿底部的 80%~90%时,于超净工作台内,用中号枪头在 6 孔板中央十字交叉划线,并用无血清培养基继续培养,分别在 0、24 和 48 h 时间点于低倍显微镜下拍照,利用 Image J 软件分析细胞覆盖面积。

1.2.9 平板克隆形成实验 将 0、0.8 和 1.6 mmol/L SAM 处理 72 h 后的细胞正常传代至新的 6 孔板中(细胞密度为 400 个/孔),37 °C 含 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 1~2 周,培养期间经常观察克隆形成状态,当出现肉眼可见的克隆时终止培养,吸弃上清液,用 PBS 缓慢清洗细胞 2 次,甲醛固定 15 min 后自然干燥,0.5%结晶紫染色 5 min,然后用流水缓慢洗去染色液,自然晾干后拍照,并肉眼直接计数或在低倍显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数。最后计算不同处理细胞的克隆形成率(克隆形成率=形成克隆数/接种细胞数 $\times$ 100%)。

1.3 统计学处理

所有实验数据采用 SPSS 21.0 统计学软件进行处理,结果均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 SAM 对 T24 和 BIU 细胞增殖的影响

MTT 实验结果显示,SAM 抑制人 BCa 细胞 T24 和 BIU 的生长,且抑制作用随着作用浓度的增加及作用时间的延长逐渐加强。在 T24 和 BIU 细胞中,药物作用 24 和 48 h 时,抑制率均在 50% 以下;72 h 时,药物浓度在 1.6 mmol/L 时抑制率达到 50% 以上,T24 细胞 72 h 的 IC_{50} 为 0.98 mmol/L,BIU 细胞 72 h 的 IC_{50} 为 1.19 mmol/L (图 1)。故后续实验选择 0、0.8、1.6 mmol/L 浓度作用 72 h 处理 T24 和 BIU 细胞。

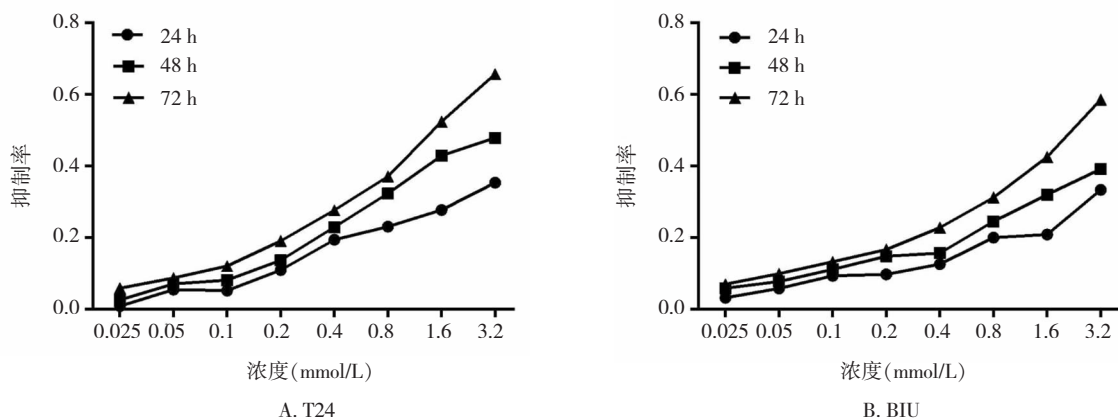


图 1 MTT 法检测 SAM 对 T24 和 BIU 细胞生长的影响

表 2 不同浓度 SAM 处理 T24 和 BIU 细胞后 MBD2、HDAC1 和 hepaCAM 的 mRNA 结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	T24			BIU		
	MBD2表达	HDAC1表达	hepaCAM表达	MBD2表达	HDAC1表达	hepaCAM表达
0 mmol/L 组	0.867 $\pm$ 0.145	1.087 $\pm$ 0.096	0.089 $\pm$ 0.007	1.055 $\pm$ 0.132	1.125 $\pm$ 0.124	0.283 $\pm$ 0.012
0.8 mmol/L 组	0.639 $\pm$ 0.051	0.534 $\pm$ 0.030	0.549 $\pm$ 0.123	0.856 $\pm$ 0.068	0.971 $\pm$ 0.144	0.419 $\pm$ 0.069
1.6 mmol/L 组	0.427 $\pm$ 0.120	0.297 $\pm$ 0.011	0.826 $\pm$ 0.161	0.497 $\pm$ 0.567	0.432 $\pm$ 0.022	0.989 $\pm$ 0.026
F 值	11.420	146.099	30.475	28.482	32.605	227.328
P 值	0.009	0.000	0.001	0.001	0.001	0.000

表 3 不同浓度 SAM 处理 T24 和 BIU 细胞后 MBD2、HDAC1 和 hepaCAM 的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

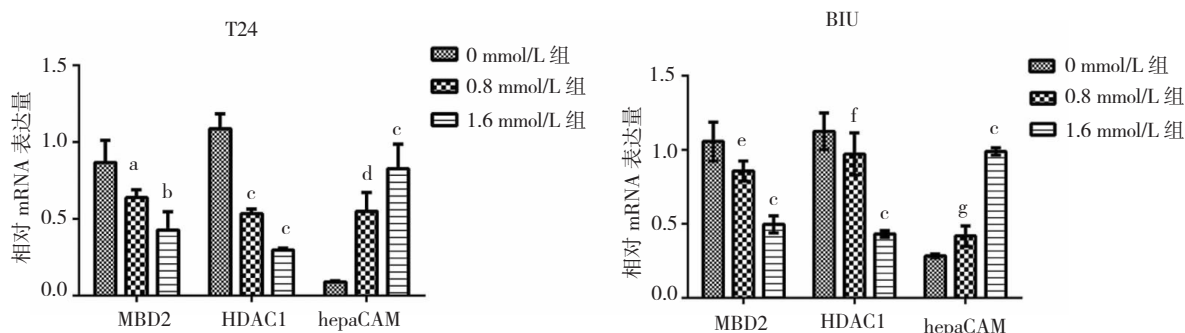
组别	T24			BIU		
	MBD2表达	HDAC1表达	hepaCAM表达	MBD2表达	HDAC1表达	hepaCAM表达
0 mmol/L 组	0.967 $\pm$ 0.147	1.231 $\pm$ 0.206	0.218 $\pm$ 0.015	0.629 $\pm$ 0.018	0.733 $\pm$ 0.047	0.093 $\pm$ 0.011
0.8 mmol/L 组	0.498 $\pm$ 0.071	0.582 $\pm$ 0.065	0.233 $\pm$ 0.016	0.412 $\pm$ 0.032	0.480 $\pm$ 0.043	0.108 $\pm$ 0.024
1.6 mmol/L 组	0.502 $\pm$ 0.065	0.607 $\pm$ 0.103	0.630 $\pm$ 0.096	0.231 $\pm$ 0.025	0.341 $\pm$ 0.103	0.299 $\pm$ 0.022
F 值	21.264	21.331	50.291	183.013	24.463	101.263
P 值	0.002	0.002	0.000	0.000	0.001	0.000

2.2 SAM 处理 T24 和 BIU 细胞后 MBD2、HDAC1 和 hepaCAM 的表达变化

qRT-PCR 检测结果显示,SAM 处理 T24 和 BIU 细胞后 MBD2 和 HDAC1 的 mRNA 表达随 SAM 浓度的升高而降低,hepaCAM 的 mRNA 表达随 SAM 浓度的升高而增高,除 0.8 mmol/L SAM 处理 T24 细胞后 MBD2 mRNA 表达和 0.8 mmol/L SAM 处理 BIU 细胞后 MBD2 及 HDAC1 mRNA 表达差异不明显外,其余差异均有统计学意义 ($P<0.05$) (图 2A,表 2)。Western blot 结果与 qRT-PCR 结果趋势一致,MBD2 和 HDAC1 的蛋白表达随 SAM 浓度的升高而降低,hepaCAM 的蛋白表达随 SAM 浓度的升高而增高,除 0.8 mmol/L SAM 处理 T24 和 BIU 细胞后 hepaCAM 蛋白的表达差异不明显外,其余差异均有统计学意义 ($P<0.05$) (图 2B,表 3)。

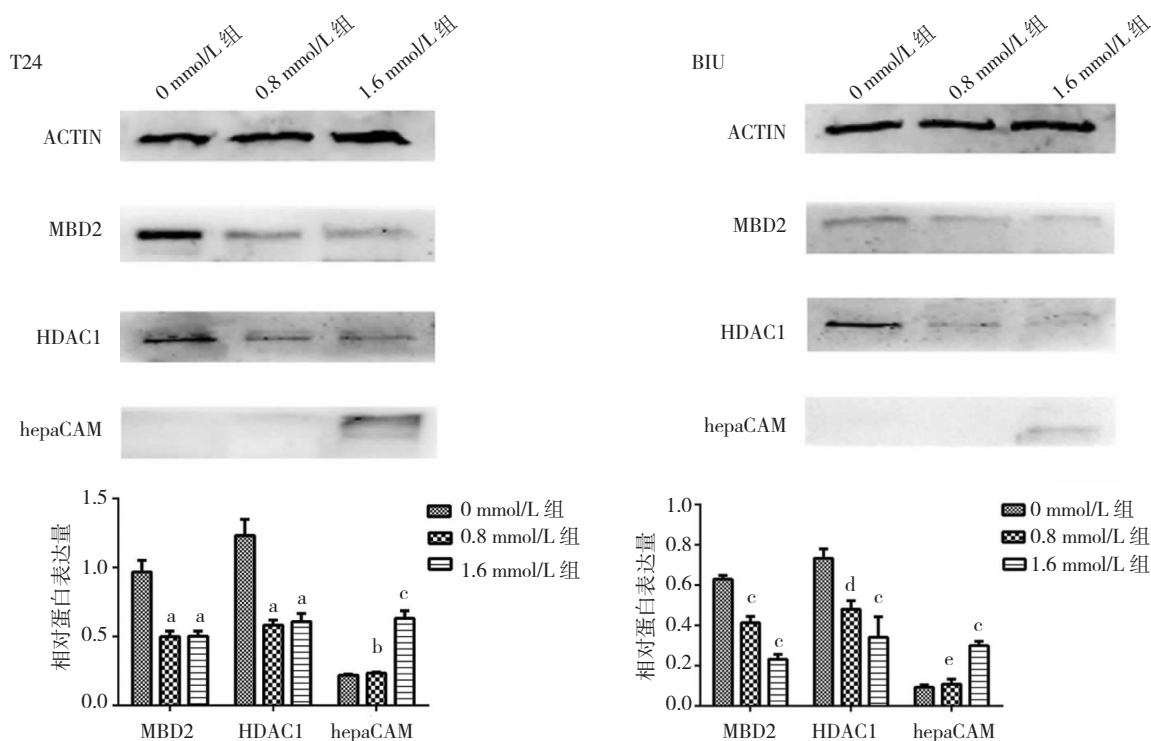
2.3 Ad-hepaCAM 转染 T24 和 BIU 细胞后 MBD2 和 HDAC1 的表达变化

qRT-PCR 检测结果显示,T24 和 BIU 细胞经 Ad-hep-



a: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.048$; b: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.003$; c: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.000$; d: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.003$; e: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.038$; f: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.140$; g: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.008$

A. 不同浓度 SAM 处理后 T24 和 BIU 细胞 MBD2、HDAC1 和 hepaCAM 的 RNA 表达变化



a: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.001$; b: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.770$; c: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.000$; d: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.004$; e: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.381$

B. 不同浓度 SAM 处理后 T24 和 BIU 细胞 MBD2、HDAC1 和 hepaCAM 的蛋白表达变化

图 2 不同浓度 SAM 处理 T24 和 BIU 细胞后 MBD2、HDAC1 和 hepaCAM 的表达变化

aCAM 转染后, 对 MBD2 和 HDAC1 的 mRNA 表达无统计学差异 ($P>0.05$) (图 3A, 表 4)。Western blot 结果与 qRT-PCR 结果一致, T24 和 BIU 细胞经 Ad-hepaCAM 转染后对 MBD2 和 HDAC1 的蛋白表达无统计学差异 ($P>0.05$) (图 3B, 表 5)。

2.4 划痕实验检测 SAM 对 T24 和 BIU 细胞转移能力的影响

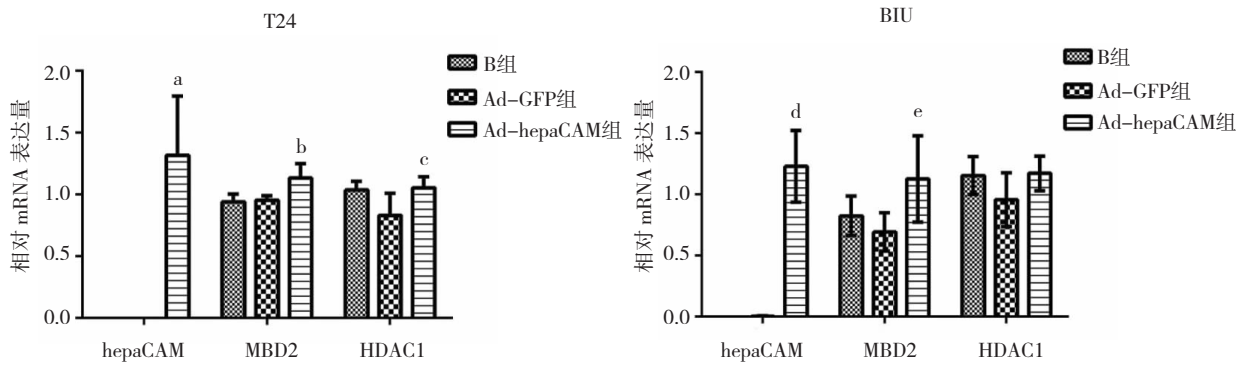
划痕实验结果显示, 经 SAM 处理后, T24 和 BIU 细胞的迁移能力均受到明显抑制, 除 0.8 mmol/L SAM 处理 T24 细胞 48 h 时和处理 BIU 细胞 24 h 和 48 h 时对迁移能力的抑制不明显外, 其余差异均有统计学意义 ($P<0.05$) (图 4, 表 6)。

2.5 Transwell 实验检测 SAM 对 T24 和 BIU 细胞转移能力的影响

Transwell 实验结果显示, 经 SAM 处理后, T24 和 BIU 细胞的迁移能力均受到明显抑制, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$) (图 5, 表 7)。

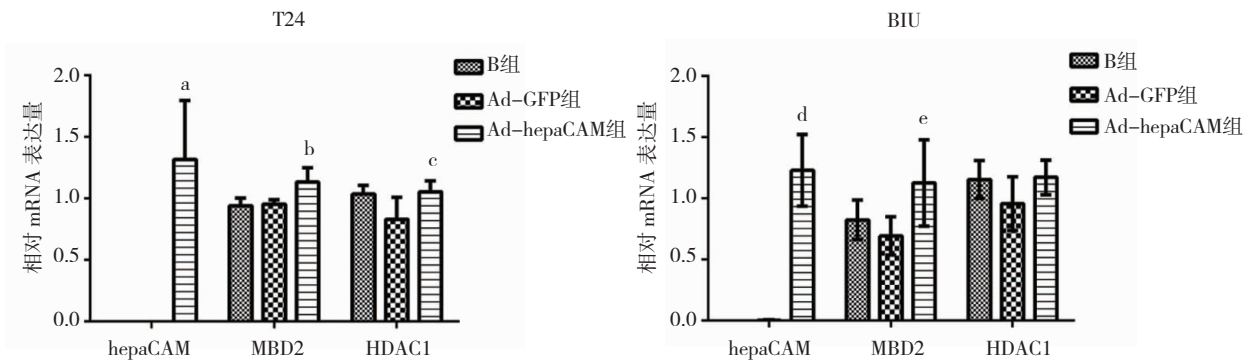
2.6 SAM 处理 T24 和 BIU 细胞后对克隆形成能力的影响

平板克隆形成实验结果显示, 经 SAM 处理后, T24 和 BIU 细胞的克隆形成能力均受到明显抑制, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$) (图 6, 表 8)。



a: 与 Ad-GFP 组比较, $P=0.000$; b: 与 Ad-GFP 组比较, $P=0.578$; c: 与 Ad-GFP 组比较, $P=0.068$; d: 与 Ad-GFP 组比较, $P=0.001$; e: 与 Ad-GFP 组比较, $P=0.578$; f: 与 Ad-GFP 组比较, $P=0.068$

A. Ad-hepaCAM 转染 T24 和 BIU 细胞后 MBD2 和 HDAC1 的 mRNA 表达变化



a: 与 Ad-GFP 组比较, $P=0.000$; b: 与 Ad-GFP 组比较, $P=0.720$; c: 与 Ad-GFP 组比较, $P=0.101$; d: 与 Ad-GFP 组比较, $P=0.244$; e: 与 Ad-GFP 组比较, $P=0.145$

B. Ad-hepaCAM 转染 T24 和 BIU 细胞后 MBD2 和 HDAC1 的蛋白表达变化

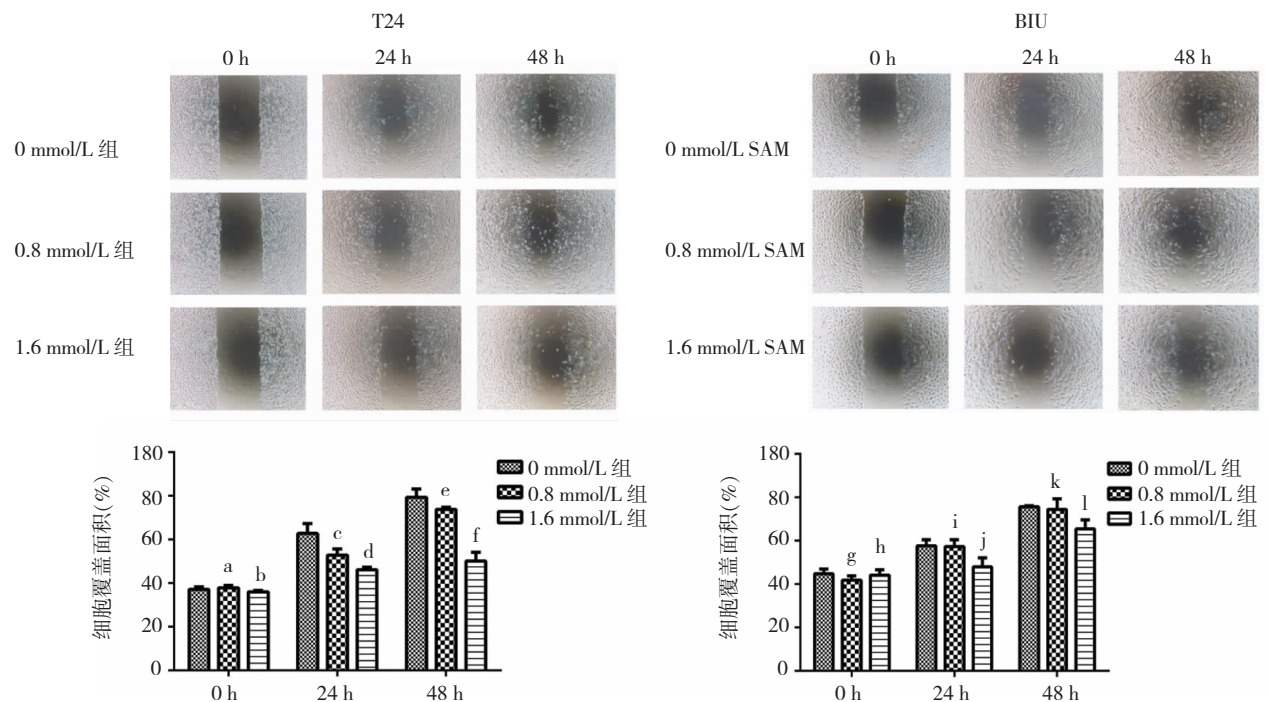
图 3 Ad-hepaCAM 转染 T24 和 BIU 细胞后 MBD2 和 HDAC1 的表达变化

表 4 Ad-hepaCAM 转染 T24 和 BIU 细胞后 MBD2 和 HDAC1 的 mRNA 结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	T24			BIU		
	MBD2表达	HDAC1表达	hepaCAM表达	MBD2表达	HDAC1表达	hepaCAM表达
B 组	0.000 ± 0.000	0.939 ± 0.062	1.035 ± 0.072	0.000 ± 0.000	0.823 ± 0.162	1.153 ± 0.155
Ad-GFP 组	0.000 ± 0.000	0.953 ± 0.035	0.829 ± 0.180	0.003 ± 0.001	0.691 ± 0.157	0.954 ± 0.220
Ad-hepaCAM 组	1.315 ± 0.479	0.984 ± 0.088	1.052 ± 0.089	1.091 ± 0.260	1.124 ± 0.354	1.170 ± 0.260
F 值	22.633	0.384	3.049	52.511	2.524	1.406
P 值	0.002	0.697	0.122	0.000	0.160	0.316

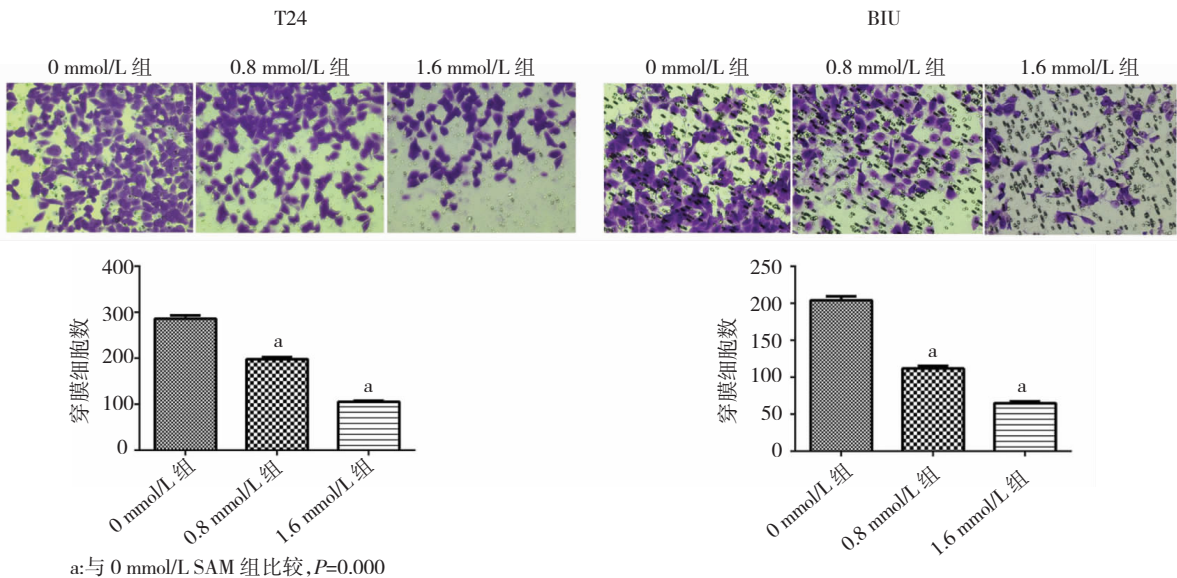
表 5 Ad-hepaCAM 转染 T24 和 BIU 细胞后 MBD 和 HDAC1 的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	T24			BIU		
	MBD2表达	HDAC1表达	hepaCAM表达	MBD2表达	HDAC1表达	hepaCAM表达
B 组	0.156 ± 0.011	1.250 ± 0.283	0.837 ± 0.024	0.150 ± 0.005	1.352 ± 0.300	1.065 ± 0.053
Ad-GFP 组	0.180 ± 0.020	1.444 ± 0.114	0.890 ± 0.022	0.134 ± 0.010	1.305 ± 0.050	0.017 ± 0.043
Ad-hepaCA 组	1.926 ± 0.070	1.500 ± 0.061	0.823 ± 0.065	1.416 ± 0.012	1.266 ± 0.025	0.949 ± 0.529
F 值	1 697.545	1.594	2.083	17 290.169	4.199	4.098
P 值	0.000	0.278	0.206	0.000	0.072	0.076



a: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.399$; b: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.228$; c: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.009$; d: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.001$; e: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.077$; f: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.000$; g: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.158$; h: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.774$; i: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.910$; j: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.014$; k: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.695$; l: 与 0 mmol/L 组比较, $P=0.015$

图 4 划痕实验检测不同浓度 SAM 对 T24 和 BIU 细胞转移能力的影响



a: 与 0 mmol/L SAM 组比较, $P=0.000$

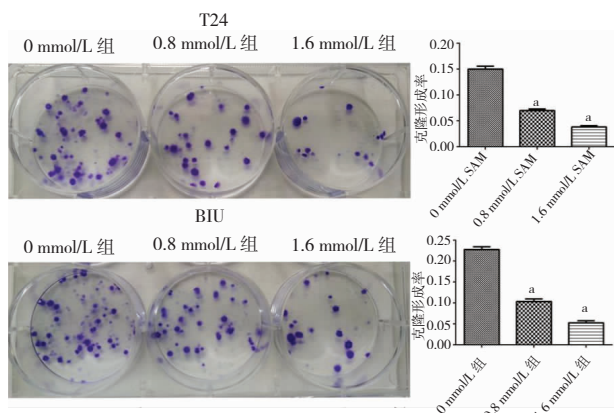
图 5 Transwell 实验检测 SAM 对 T24 和 BIU 细胞转移能力的影响

表 6 不同浓度 SAM 处理后 T24 和 BIU 细胞迁移能力 (细胞覆盖面积) 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	T24			BIU		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
0 mmol/L 组	37.133 ± 1.270	62.800 ± 4.553	79.400 ± 3.732	44.767 ± 2.203	57.733 ± 2.822	75.667 ± 0.551
0.8 mmol/L 组	37.900 ± 1.058	52.867 ± 2.857	73.767 ± 1.002	41.900 ± 1.852	57.400 ± 3.148	74.433 ± 4.842
1.6 mmol/L 组	36.000 ± 0.693	46.233 ± 1.159	50.167 ± 4.045	44.233 ± 2.434	47.933 ± 4.285	65.533 ± 4.082
F 值	2.559	20.693	69.174	1.473	7.690	6.808
P 值	0.157	0.002	0.000	0.302	0.022	0.029

表 7 不同浓度 SAM 处理组的平均穿膜细胞数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	T24	BIU
0 mmol/L 组	286.000 $\pm$ 12.12	204.333 $\pm$ 9.292
0.8 mmol/L 组	198.333 $\pm$ 7.638	112.000 $\pm$ 6.000
1.6 mmol/L 组	105.333 $\pm$ 5.033	65.000 $\pm$ 4.359
F 值	318.478	319.969
P 值	0.000	0.000



a: 与 0 mmol/L SAM 组比较, $P=0.000$

图 6 不同浓度 SAM 处理 T24 和 BIU 细胞后对克隆形成能力的影响

表 8 各组的平均克隆形成率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	T24	BIU
0 mmol/L 组	0.150 $\pm$ 0.010	0.228 $\pm$ 0.007
0.8 mmol/L 组	0.070 $\pm$ 0.005	0.103 $\pm$ 0.006
1.6 mmol/L 组	0.038 $\pm$ 0.004	0.053 $\pm$ 0.005
F 值	213.552	673.288
P 值	0.000	0.000

3 讨论

SAM在动植物体内广泛存在,由 L-甲硫氨酸和 ATP 在 S-腺苷甲硫氨酸合成酶的作用下合成,在生物体内细胞的代谢中起重要作用^[13]。美国市场上有用 SAM-e 的名字当作营养品来销售,具有保养肝脏、改善情绪和舒适关节的功效。多项研究结果显示 SAM 可通过诱导癌基因高甲基化和逆转基因组整体水平的低甲基化,抑制癌基因的表达,从而达到抑制肿瘤的作用^[3-6]。但 SAM 对抑癌基因的作用机制尚不清楚。本研究以抑癌基因 hepaCAM 为切入点,探究 SAM 能否通过 MBD/HDAC 逆转 hepaCAM 在 BCa 细胞中的表达,从而揭示 SAM 对抑癌基因的作用及其可能的机制。

DNA 甲基化是在 DNA 甲基转移酶(Dnmt)作用

下将甲基选择性地添加到胞嘧啶上形成 5-胞嘧啶的过程,是一种重要的表观遗传学标记,对维持染色质结构和调控基因表达发挥着重要作用。本课题组前期研究发现 BCa 中 hepaCAM 基因的外显子和启动子区是高甲基化的,去甲基化可以使 hepaCAM 在 BCa 细胞中重新表达^[14-15]。目前认为 DNA 甲基化可以通过 2 种途径来抑制基因的转录:直接途径是指 DNA 甲基化促进染色质凝聚,从而阻止转录因子与识别位点的结合,但这种作用途径不是抑制基因转录的主要方式,因为并非所有的转录因子结合的 DNA 序列都有 CpG 二核苷酸。间接途径是指甲基化的 CpG 与甲基化 CpG 结合蛋白家族(MeCPs)结合后,会招募转录共抑制子(如 HDACs),在甲基化位点形成包装紧密的染色质结构,阻止转录因子接近调控元件形成转录复合物,同时对组蛋白进行甲基化或脱乙酰化修饰,使染色质的构象发生改变,此机制具有普遍性。因此推测 hepaCAM 基因的失活可能也是通过这种间接途径实现的。

MeCPs 是一类能与甲基化 CpG 二核苷酸特异性结合的转录调控因子,其能在启动子的甲基化 CpG 岛区招募 HDACs,介导基因的表达沉默^[16],有机地将组蛋白修饰与 DNA 甲基化联系起来,在表观遗传中发挥着枢纽作用。本文首次验证其是否在抑癌基因 hepaCAM 的沉默过程中发挥着重要作用。MeCPs 包括 5 类多肽:MeCP2、MBD1、MBD2、MBD3 和 MBD4,其中 MBD 是 MeCPs 的保守部位,是与甲基化 DNA 结合的关键区域,且其具有特异结合甲基化 DNA 的特点^[17],MBD 家族成员可以用其与甲基化 DNA 结合的亲和力不同来区分,其中 MBD2 的亲和力最强,因此被认为是表观遗传学治疗的优良靶点。本研究检测了不同浓度 SAM 作用于 T24 和 BIU 细胞后 MBD2 的表达情况,发现 SAM 可抑制 MBD2 的表达,并随 SAM 浓度升高抑制作用增强,猜测 MBD2 有可能参与 hepaCAM 的表观沉默,即 SAM 可能通过 MBD2 来发挥对抑癌基因 hepaCAM 表达的调节。

组蛋白去乙酰化同基因启动子甲基化一样,都是在不改变基因序列的前提下对基因表达进行表观遗传学调节。有研究表明,肿瘤发生时 HDAC 会催化组蛋白 N-端赖氨酸残基去乙酰化,调节核小体的聚集,从而抑制基因转录。因此,组蛋白去乙酰化在基因转录调控中亦发挥着重要作用^[18]。根据与酵母菌 HDAC 的同源性,人类 HDAC 家族分为三类: I

型 HDACs(HDAC1-3/8)在人体肿瘤中广泛表达,只存在于细胞核内;Ⅱ型 HDACs 包括Ⅱa 型(HDAC4、5、7、9)和Ⅱb 型(HDAC6、10)和 HDAC11,在心脏、骨骼肌和脑表达最高,穿梭于细胞质和细胞核之间^[18]。本课题组前期研究表明,新型、广谱 HDAC 抑制剂帕比司他(Panobinostat)能加强 PC3 细胞核中组蛋白 H3 N-端的赖氨酸残基乙酰化,逆转 hepaCAM 表达^[19]。因此本研究选择了只存在于细胞核内的Ⅰ类 HDACs 中的 HDAC1 进行研究,证实了 SAM 可显著抑制 HDAC1 的表达,且研究表明过表达 hepaCAM 对 MBD2 和 HDAC1 的表达无统计学意义,因此认为 MBD2 和 HDAC1 可能共同参与了 hepaCAM 的表观沉默过程,SAM 在 BCa 中可能与降低 MBD2 表达,从而使其对 HDAC1 的招募降低,使乙酰化程度升高,逆转 hepaCAM 重新表达有关(图7),具体作用机制仍需在本研究基础上进一步深入探讨。

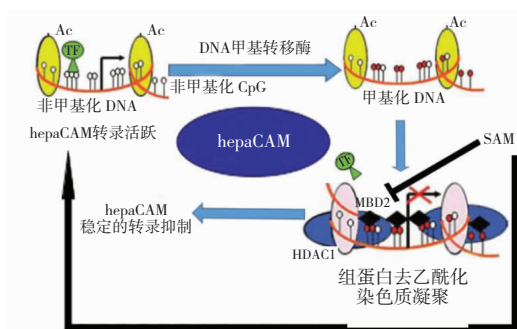


图7 机制示意图

本研究表明,SAM 可抑制人 BCa 细胞的增殖及迁移能力,当 SAM 达到足够的作用浓度和时间后,可通过 MBD2/HDAC1 逆转 hepaCAM 使其在 BCa 中重新表达从而发挥对 BCa 的抑制作用。本研究为将 SAM 用于临床治疗肿瘤提供了理论和实验依据。

参 考 文 献

[1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
 [2] Suer E, Hamidi N, Gokce MI, et al. Significance of second transurethral resection on patient outcomes in muscle-invasive bladder cancer patients treated with bladder-preserving multimodal therapy[J]. World J Urol, 2016, 34(6): 847-851.
 [3] Pakneshan P, Szyf M, Farias-Eisner R, et al. Reversal of the hypomethylation status of urokinase (uPA) promoter blocks breast cancer

growth and metastasis[J]. J Biol Chem, 2004, 279(30): 31735-31744.
 [4] Pascale RM, Simile MM, De Miglio MR, et al. Chemoprevention of hepatocarcinogenesis: S-adenosyl-L-methionine [J]. Alcohol, 2002, 27(3): 193-198.
 [5] Lu SC, Ramani K, Ou X, et al. S-adenosylmethionine in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma in a rat model [J]. Hepatology, 2009, 50(2): 462-471.
 [6] Cheng T, Grasse L, Shah J, et al. Panobinostat, a pan-histone deacetylase inhibitor: rationale for and application to treatment of multiple myeloma [J]. Drugs Today, 2015, 51(8): 491-504.
 [7] Chung Moh M, Hoon Lee L, Shen S. Cloning and characterization of hepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2005, 42(6): 833-841.
 [8] Pan C, Wu X, Luo C, et al. Exon 2 methylation inhibits hepaCAM expression in transitional cell carcinoma of the bladder [J]. Urol Int, 2010, 85(3): 347-354.
 [9] 王晓荣, 杨雪, 王胤, 等. 5-氮杂胞嘧啶核苷联合 hepaCAM 腺病毒通过抑制 p-AKT 诱导膀胱癌细胞 T24 凋亡 [J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(6): 762-767.
 [10] Wang Q, Luo C, Wu X, et al. hepaCAM and p-mTOR closely correlate in bladder transitional cell carcinoma and hepaCAM expression inhibits proliferation via an AMPK/mTOR dependent pathway in human bladder cancer cells [J]. J Urol, 2013, 190(5): 1912-1918.
 [11] Jiang XL, Zhang Y, Tan B, et al. Renal tumor-derived exosomes inhibit hepaCAM expression of renal carcinoma cells in a p-AKT-dependent manner [J]. Neoplasia, 2014, 61(4): 416-423.
 [12] Tessarz P, Santos-Rosa H, Robson SC, et al. Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification [J]. Nature, 2014, 505(7484): 564-568.
 [13] Lu SC, Mato JM. S-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer [J]. Physiol Rev, 2012, 92(4): 1515-1542.
 [14] Pan C, Wu X, Luo C, et al. Exon 2 methylation inhibits hepaCAM expression in transitional cell carcinoma of the bladder [J]. Urol Int, 2010, 85(3): 347-354.
 [15] Tao J, Liu Q, Wu X, et al. Identification of hypermethylation in hepatocyte cell adhesion molecule gene promoter region in bladder carcinoma [J]. Int J Med Sci, 2013, 10(13): 1860-1867.
 [16] Fournier A, Sasai N, Nakao M, et al. The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance [J]. Brief Funct Genomics, 2012, 11(3): 251-264.
 [17] Zou X, Ma W, Solovoyov IA, et al. Recognition of methylated dna through methyl-CpG binding domain proteins [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(6): 2747-2758.
 [18] Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy [J]. Cell, 2012, 150(1): 12-27.
 [19] 陈娥, 欧俐苹, 唐敏, 等. 帕比司他逆转前列腺癌细胞 hepaCAM 基因表达机制研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(6): 9.

(责任编辑:唐秋姗)