

泌尿系统疾病诊断与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000260

双氢青蒿素对前列腺癌 PC-3 细胞 UCHL1 基因转录调节的影响及机制

丁璇¹, 李俊枫², 罗子国¹, 许舸¹, 唐 溧¹

(1. 重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016; 2. 重庆市垫江县人民医院肿瘤科, 重庆 408300)

【摘要】目的:探讨双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)对前列腺癌 PC-3 细胞泛素羧基末端水解酶 1(ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1, UCHL1)基因转录调节的影响及机制。**方法:**将 PC-3 细胞分为空白组、DHA 组及 5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)组(2.5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR)。空白组为不加药物; DHA 组根据浓度的不同再分为 DHA1、DHA2、DHA3、DHA4 组, DHA 终浓度分别为 12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 。培养 48 h 后, 收集细胞。应用 real-time PCR 检测 UCHL1 及 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMTs)的 mRNA 表达; 亚硫酸氢盐基因组测序法(bisulfite genomic sequencing, BGS)检测 UCHL1 CpG 岛的甲基化状态; Western blot 法检测 UCHL1 蛋白的表达。**结果:**DHA 和 5-Aza-CdR 分别处理细胞后, UCHL1 的启动子甲基化水平明显降低($\chi^2=150.1, P=0.000$; $\chi^2=127.7, P=0.000$); UCHL1 mRNA 表达水平明显上调(P 均 <0.05); UCHL1 蛋白表达水平上升(P 均 <0.05), 双氢青蒿素处理后甲基化转移酶的 mRNA 表达减少(P 均 <0.05)。**结论:**DHA 可逆转 PC-3 细胞 UCHL1 基因的甲基化状态, 其可能通过下调 DNMTs 的表达而影响 DNA 的甲基化过程。

【关键词】双氢青蒿素; 前列腺癌; 泛素羧基末端水解酶 1

【中图分类号】R737.25

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-11-09

Effects of dihydroartemisinin on modulating UCHL1 gene expression in human prostate cancer cell line PC-3 and its mechanism

Ding Xuan¹, Li Junfeng², Luo Ziguol¹, Xu Ge¹, Tang Li¹

(1. Institute of Life Science, Chongqing Medical University; 2. Department of Oncology, Dianjiang People's Hospital of Chongqing)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of dihydroartemisinin(DHA) on regulating ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) gene expression in human prostate cancer cell line PC-3 and its mechanism. **Methods:** PC-3 cells were divided into six groups including four groups treated with DHA at concentrations of 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$; 5-Aza-CdR group cultured in the media with 5-Aza-2'-deoxycytidine at concentrations of 2.5 $\mu\text{mol/L}$ and blank group cultured with blank media. CpG island of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) methylation levels were determined by bisulfite genomic sequencing. UCHL1 mRNA expression levels were determined via realtime fluorescence quantitative PCR whereas the expression levels of UCHL1 protein were determined using Western blot. **Results:** In the DHA groups and 5-Aza-CdR group, UCHL1 promoter methylation levels were decreased dramatically ($\chi^2=150.1, P=0.000$; $\chi^2=127.7, P=0.000$). mRNA expression levels of UCHL1 were dramatically increased ($\chi^2=150.1, P=0.000$; $\chi^2=127.7, P=0.000$). Protein expression levels of UCHL1 were significantly increased ($P<0.05$). In DHA groups, mRNA expression levels of DNA methyltransferase were decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** DHA can induce the demethylation of CpG island of UCHL1 through downregulating the expression of DNA methyltransferase in PC-3 cells.

【Key words】 dihydroartemisinin; prostate cancer; ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1

前列腺癌是男性生殖系统最常见的恶性肿瘤。目前研究表明, 前列腺癌的发生、进展及恶性转化

与基因改变和表观遗传学改变等机制相关^[1-2], 其中 DNA 甲基化在前列腺癌的发生发展以及雄激素非依赖性前列腺癌形成中具有重要作用; 由于基因启动子 DNA 甲基化具有可逆性的特点。因此, 检测基因启动子 DNA 甲基化状态可作为前列腺癌早期诊断和治疗提供新的方法。

作者介绍: 丁璇, Email: 422252505@qq.com,

研究方向: 前列腺癌的药物化疗。

通信作者: 罗子国, Email: luoziguo@cqmu.edu.cn。

基金项目: 重庆市委攻关课题资助项目(编号: cstc2012gg-yyjs10017)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000260.html>

近年来,双氢青蒿素(dihydroartemisinin,DHA)抗肿瘤作用越来越受到人们关注。Gao 等^[3]研究表明,DHA 能抑制前列腺癌 PC-3 细胞和肝癌 HepG2 细胞的增殖并诱导其凋亡,且 DHA 对人雄激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞具有明显生长抑制效应,且该效应与药物浓度、作用时间密切相关,200 $\mu\text{mol/L}$ 的 DHA 处理 72 h 能有效抑制 PC-3 细胞增殖,抑制率最高达 $(75.32 \pm 0.10)\%$,但凋亡率仅 $(28.91 \pm 1.73)\%$,说明除凋亡途径外可能存在其他抑癌途径。泛素羧基末端水解酶 1(ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1,UCHL1)在多种肿瘤中被确定为肿瘤抑癌基因^[4-5],在前列腺癌中其启动子区域呈高甲基化并表达缺失^[6],提示 DNA 甲基化可能参与上述基因表达调控。应用去甲基化药物恢复肿瘤细胞 DNA 的异常甲基化状态,使抑癌基因重新表达,有望成为治疗前列腺癌的新途径。因此,本研究探讨 DHA 对 UCHL1 基因的转录调节和甲基化作用及其调控机制,为 DHA 抗肿瘤的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

PC-3 细胞购于中科院上海细胞生物研究所细胞库;DHA、5-氮杂-2-脱氧胞苷(5-aza-2-deoxycytidine,5-Aza-CdR)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)及 DNA 提取试剂盒为美国 Sigma 公司产品;RPMI1640 培养基、胎牛血清为美国 Hyclone 公司产品;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)购自武汉博士德公司;real-time PCR 试剂盒为日本 Takara 生物公司产品;UCHL1 多克隆抗体 ab10404 购自英国 Abcam 公司。

1.2 药物

DHA 用 DMSO 充分溶解,超声波助溶配成 0.2 mol/L 的母液,超声波助溶,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。实验前用 RPMI1640 培养基稀释至所需浓度(DMSO 终体积分数 $<0.1\%$)。5-Aza-CdR 用 DMSO 充分溶解配成 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 储存液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养及处理 人前列腺癌 PC-3 细胞株在 10% Hyclone 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5.0% CO_2 、饱和湿度条件下培养。实验共分为 6 组:空白组、DHA 组(D1 组、D2 组、D3 组、D4 组)、5-Aza-CdR 阳性对照组。5-Aza-CdR 组在细胞培养液中加入 5-Aza-CdR,终浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 。D1、D2、D3、D4 组在细胞培养液中加入 DHA,终浓度为 12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 。细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养 48 h 后,收集细胞。

1.3.2 Real-time PCR 检测 UCHL1 及 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferase,DNMTs)的表达 细胞处理同前,根据操作

说明用 Trizol 试剂提取总 RNA,并用紫外分光计测定其浓度,逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 引物序列及扩增条件分别为:UCHL1 上游引物:5'-CTATG-AACTTGATGGACGAATGCC-3',下游引物:5'-GGACTTCT-CCTTGCTCAGCCTC-3',扩增片段长度为 122 bp;DNMT1 上游引物:5'-GAGGAAGCTGCTAAGGACTAGTTC-3',下游引物:5'-ACTGCACAATTTGATCACTAAATC-3',扩增片段长度为 206 bp;DNMT3a 上游引物:5'-TAAGCTGGAGCTGCA-GGAGT-3',下游引物:5'-GGAAACCAAATACCCTTTCCA-3',扩增片段长度为 179 bp;DNMT3b 上游引物:5'-CTTTGCT-ACAAGGGCTGAAG-3',下游引物:5'-CCTGCTGACATCATCATCC-3',扩增片段长度为 179 bp;以 β -actin 为内参,上游引物 5'-GTCCACCGCAAATGCTTCTA-3',下游引物:5'-TGCTGTCACCTTCACCGTTC-3',扩增片段长度为 190 bp。扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,59.6 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 共 40 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 时采集荧光。根据仪器读取的 CT 值,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析。各组实验重复 3 次。

1.3.3 Western blot 法检测前列腺癌细胞中 UCHL1 蛋白的表达 细胞处理同前,收集各组 PC-3 细胞,提取并定量总蛋白;50 μg 总蛋白进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,蛋白质电转移至印记膜上,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h;一抗(UCHL1 兔源单抗 ab10404),1:1 000 稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 缓冲液洗膜 30 min;HRP-二抗(1:4 000 稀释)室温孵育 1 h,TBST 缓冲液洗膜 3×10 min 显影和定影。以 β -actin 为内参,实验重复 3 次,拍照并记录。

1.3.4 亚硫酸氢盐基因组测序法(bisulfite genomic sequencing,BGS)检测 UCHL1 基因的甲基化 细胞处理同前,按照说明书提取细胞 DNA,并用紫外分光光度计测定 DNA 浓度,经亚硫酸盐处理后,回收 DNA,并进行扩增,扩增引物为:上游引物为 5'-AGGATTGTTTATATATTTAAGGAA-3',下游引物为 5'-ACTTAATCCCTACCAACAACC-3',扩增长度为 546 bp,扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,66 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 20 个循环,再修复延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 8 min。产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收扩增产物连接载体,提取质粒后依据文献[7]报道各组选取 5 个克隆位点进行测序,了解其甲基化状态。

1.4 结果判定

1.4.1 Real-time PCR 测定 UCHL1 等基因的表达 结果处理 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法: $A=\text{CT}(\text{目的基因,待测样本})-\text{CT}(\text{内标基因,待测样本})$, $B=\text{CT}(\text{目的基因,对照样本})-\text{CT}(\text{内标基因,对照样本})$, $K=A-B$,表达倍数= 2^{-K} 。

1.4.2 Western blot 法测定各组 PC-3 细胞中蛋白相对含量分析 用 Image J 软件中的条带灰度分析,计算 UCHL1 蛋白与内参蛋白比值。

1.5 统计学方法

所有实验数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同组间比较采用单因素方差分析,甲基化结果采用卡方检验,DNMTs 结果采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 各组 UCHL1 mRNA 的表达

UCHL1 mRNA 在各组中均有表达 ($F=1\ 316.84, P=0.000$)。与空白组相比较, 5-Aza-CdR 组中 UCHL1 基因 mRNA 表达平均上调倍数为 (227.56 ± 21.67) 倍 ($P=0.002$)。DHA 组中, D1 组 UCHL1 基因 mRNA 表达平均上调倍数为 (45.08 ± 13.17) 倍 ($P=0.015$); D2 组 UCHL1 基因 mRNA 表达平均上调倍数为 (207.02 ± 20.63) 倍 ($P=0.001$); D3 组 UCHL1 基因 mRNA 表达平均上调倍数为 (27.10 ± 8.26) 倍 ($P=0.014$), D4 组 UCHL1 基因 mRNA 表达平均上调倍数为 (6.36 ± 4.72) 倍 ($P=0.019$) (图 1)。

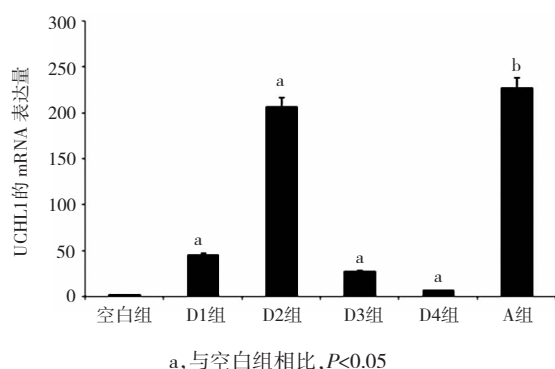


图 1 qRT-PCR 检测各组中 UCHL1 的 mRNA 表达

Fig.1 Expression of UCHL1 mRNA detected by qRT-PCR

2.2 UCHL1 蛋白在各组中的表达

PC-3 细胞处理 48 h 后, UCHL1 蛋白在各组中的表达均较空白组明显增高 ($F=111.409, P=0.000$)。空白组为 0.05 ± 0.02 ($P=0.000$); D1 组为 1.00 ± 0.56 ($P=0.000$); D2 组为 2.02 ± 0.16 ($P=0.000$); D3 组为 1.41 ± 0.12 ($P=0.000$); D4 组为 0.99 ± 0.05 ($P=0.000$); 5-Aza-CdR 组为 2.62 ± 0.16 ($P=0.000$) (图 2, 3)。

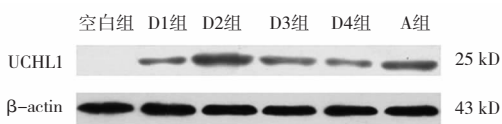


图 2 Western blot 检测各组中 UCHL1 蛋白的表达

Fig.2 Expression of UCHL1 protein detected by Western blot

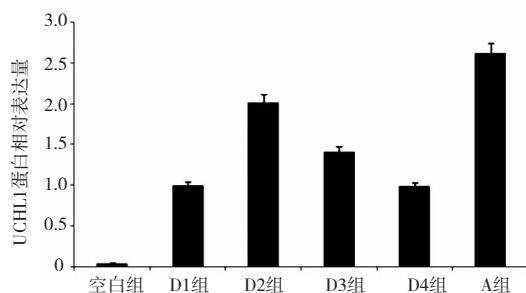


图 3 各组中 UCHL1 蛋白表达相对表达量

Fig.3 Relative expression of UCHL1

2.3 UCHL1 的 CpG 甲基化状态

由于 D2 组与空白组相比, UCHL1 的 mRNA 和蛋白表达差异大, 本实验评估了空白组、D2 组和 5-Aza-CdR 组 UCHL1 的甲基化状态。

UCHL1 基因 BGS 扩增片段包括 49 个 CpG 岛, 分别加入 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 DHA 和 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 5-Aza-CdR 处理 48 h 后, UCHL1 克隆测序结果显示, CpG 岛的甲基化程度降低。分别是, 对照组: 92.24% (226/245), 5-Aza-CdR 组: 44.90% (110/245), DHA 组: 50.20% (123/245)。与空白组相比, DHA 可明显降低 UCHL1 甲基化程度 ($\chi^2=150.1, P=0.000$); 5-Aza-CdR 亦有同样趋势 ($\chi^2=127.7, P=0.000$) (图 4)。



图 4 BGS 检测各组中 UCHL1 CpG 甲基化状态

Fig.4 Methylation status of UCH-L1 CpG detected by BGS

2.4 DHA 对 DNMTs 表达的影响

PCR 结果显示, 经 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 DHA 处理 48 h 后, 与空白组相比, DNMT1 基因 mRNA 表达平均下调倍数为 (2.45 ± 0.26) 倍 ($t=0.78, P=0.045$); DNMT3a 基因 mRNA 表达平均下调倍数为 (3.04 ± 0.70) 倍 ($t=-0.265, P=0.020$); DNMT3b 基因 mRNA 表达平均下调倍数为 (3.75 ± 0.05) 倍 ($t=0.984, P=0.031$), 表明 DHA 能抑制 DNMTs mRNA 的表达 (图 5)。

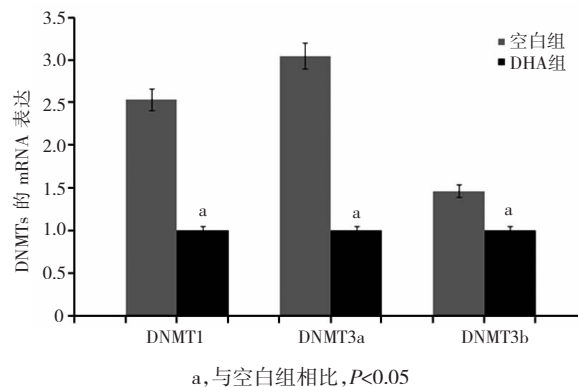


图 5 qRT-PCR 检测各组中 DNMTs 的 mRNA 表达

Fig.5 Expression of DNMTs mRNA detected by qRT-PCR

3 讨论

DNA 甲基化是调控基因表达的一种方式,是在 DNMTs 的作用下,将 S-腺苷甲硫氨酸上的甲基转移到胞嘧啶第 5 位碳原子上,生成 5-甲基胞嘧啶^[8],是不改变基因序列的一种基因修饰方式,具有可逆性。如果改变肿瘤相关基因异常甲基化状态,使其重新活化、表达,可能延缓前列腺癌的发生和发展。Ummanni 等^[9]研究表明,在 90%(18/20)的前列腺肿瘤临床标本中 UCHL1 启动子区域存在高甲基化,相对与正常前列腺组织只有 15%(3/20),并且前列腺癌的 UCHL1 蛋白和 mRNA 水平明显低于癌周正常组织。结果表明,UCHL1 是一种抑癌基因,并且 UCHL1 可以作为潜在的前列腺癌肿瘤生物标记物。同时,大量研究表明,青蒿素类药物 DHA 对胃癌、乳腺癌、卵巢癌、肝细胞癌、前列腺癌等治疗过程中,在体内代谢后的活性成分发挥抗肿瘤作用^[10-13]。高小玲等^[14]研究发现,DHA 对 PC-3 细胞具有明显生长抑制效应,且与药物浓度,作用时间密切相关。

为了观察 DHA 对 UCHL1 转录和翻译水平的影响,本实验采用 5-Aza-CdR 作为阳性对照,5-Aza-CdR 是一种甲基化转移酶抑制剂,可以与 DNMTs 发生特异性的共价结合,逆转 DNA 的甲基化过程,诱导肿瘤细胞向正常细胞分化或诱导肿瘤细胞凋亡,并发挥去甲基化的功能。5-Aza-CdR 在治疗激素非依赖性前列腺癌的临床实验中表现出积极作用^[15-16],但没有持续强优势的结果。一个可能的原因是 5-Aza-CdR 在生理条件下不稳定,二是若 5-Aza-CdR 在体内血药浓度降低后短时间内检测不到,会导致癌细胞的 DNA 甲基化系统的恢复,从而使抑癌基因重新被沉默^[14]。并且其具有骨髓抑制和肝肾毒性等副作用,因此,寻求高效低毒的新药有现实的临床意义。

本研究表明,DHA 可以调控 UCHL1 转录活性,使 UCHL1 基因表达上调,25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 DHA 处理 48 h 后,UCHL1 基因 mRNA 表达平均上调 207.02 倍,其蛋白表达较空白组也明显增高。同时研究发现在 PC-3 细胞中 UCHL1 表现出很大程度的甲基化,BGS 检测结果表明其甲基化率达 92.24%,经过 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 DHA 处理 48 h 后,UCHL1 的甲基化水平降至 50.20%。UCHL1 表达的上调可以促使 P53 的表达,并且通过去泛素化酶活

性抑制细胞增殖^[17]。DNMTs 在 DNA 甲基化中起着至关重要的作用,在许多癌症,如肝癌、子宫内膜癌、前列腺癌中检测到 DNMTs 的过度表达^[18-20],而 DNMTs 的异常活化参与肿瘤抑制基因高甲基化沉默和肿瘤的发生。因此,加入 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 DHA 处理细胞 48 h 后,检测 DNMTs 的表达情况,发现 DNMT1, DNMT3a, DNMT3b 的 mRNA 表达均降低。通过本研究结果显示,DHA 可能与 5-Aza-CdR 作用机理一致,UCHL1 基因表达增高,其机制可能是 DHA 下调了 DNMT1, DNMT3a, DNMT3b 的表达,进而降低了 UCHL1 的甲基化程度,使其重新表达并发挥功能。随着 DHA 浓度的升高,200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 DHA 发挥其细胞毒作用,诱导细胞凋亡^[14];而在 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时,DHA 主要是通过抑制 DNA 甲基化转移酶 mRNA 的表达,使 DNA 甲基化转移酶减少,同时是否存在其他机制,还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Saghir FS, Rose IM, Dali AZ, et al. Gene expression profiling and cancer-related pathways in type I endometrial carcinoma[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2010, 20(5): 724-731.
- [2] 王小海, 夏术阶. 前列腺癌的表现遗传学机制[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2009, 30(5): 425-428.
- [3] Gao X, Luo Z, Xiang T, et al. Dihydroartemisinin induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in HepG2 human hepatoma cells[J]. *Tumori*, 2011, 97(6): 771-780.
- [4] Oka D, Yamashita S, Tomioka T, et al. The presence of aberrant DNA methylation in noncancerous esophageal mucosae in association with smoking history: a target for risk diagnosis and prevention of esophageal cancers[J]. *Cancer*, 2009, 115(15): 3412-3426.
- [5] Seliger B, Handke D, Schabel E, et al. Epigenetic control of the ubiquitin carboxyl terminal hydrolase 1 in renal cell carcinoma[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2009(7): 90.
- [6] Wang Y, Yu Q, Cho AH, et al. Survey of differentially methylated promoters in prostate cancer cell lines[J]. *Neoplasia*, 2005, 7(8): 748-780.
- [7] Zhang J, Wang C, Chen M, et al. Epigenetic silencing of glutaminase 2 in human liver and colon cancers[J]. *BMC Cancer*, 2013, doi: 10.1186/1471-2407-13-601 [Epub ahead of print].
- [8] 张晔, 杨斌, 白同, 等. 丹参酮 II A 对肝癌细胞系 SMMC-7721 去甲基化作用的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(8): 421-425.
- [9] Ummanni R, Jost E, Braig M, et al. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) is a potential tumour suppressor in prostate cancer and is frequently silenced by promoter methylation[J]. *Mol Cancer*, 2011(10): 129.

泌尿系统疾病诊断与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000163

婴儿双歧杆菌介导HSV-TK/GCV自杀基因治疗系统对裸鼠肾细胞癌肿瘤细胞凋亡及NF- κ B活性的影响

肖 啸,任 劲,杨 柒,唐 伟

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘要】目的:证实婴儿双歧杆菌(*bifidobacterium infantis*,BI)介导单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase,HSV-TK)/丙氧鸟苷(ganciclovir,GCV)自杀基因系统对裸鼠肾癌的治疗作用,检测其诱导裸鼠肾癌组织细胞凋亡的作用及对核因子- κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B)信号通路的影响。**方法:**引瘤后原代细胞培养注射细胞悬液法建立裸鼠皮下荷瘤肾癌模型,并随机分为BI-pGEX-TK/GCV组(重组质粒组)、BI-pGEX-5X-1/GCV组(空质粒组)、BI/GCV组(空BI组)和生理盐水/GCV对照组(生理盐水组)。分别经尾静脉注射BI-pGEX-TK、BI-pGEX-5X-1、BI和生理盐水,联合腹腔注射GCV,4周后,称取裸鼠质量及肿瘤质量。TUNEL法检测各组肿瘤细胞凋亡情况,qRT-PCR、Western blot检测各组肿瘤组织Rel A、Caspase-3 mRNA及蛋白表达水平。**结果:**(1)重组质粒组荷瘤裸鼠体质量明显高于其余3组($P=0.006$),肿瘤组织质量明显降低($P=0.003$)。(2)TUNEL法检测发现各组均有不同程度的肿瘤细胞凋亡,以重组质粒组最为明显($P=0.000$)。(3)与空质粒组、空BI组及生理盐水组比较,重组质粒组Rel A蛋白表达明显下调($P=0.000$),Caspase-3蛋白表达明显上调($P=0.000$)。**结论:**BI介导HSV-TK/GCV自杀基因系统对荷瘤裸鼠肾癌有明显的抑制作用,可能通过影响NF- κ B信号通路的活性,诱导荷瘤裸鼠肾癌肿瘤细胞的凋亡,发挥抑癌作用。

【关键词】婴儿双歧杆菌;肾细胞癌;基因治疗;核因子- κ B

【中图分类号】R737.11;R73-36

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-09-06

作者介绍:肖 啸,Email:xiaorder@aliyun.com,

研究方向:泌尿系肿瘤。

通信作者:唐 伟,Email:tangwei2060@163.com。

基金项目:重庆市卫生局医学科研计划资助项目(编号:2011-1-012)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000163.html

- [10] Sun H, Meng X, Han J, et al. Anti-cancer activity of DHA on gastric cancer—an in vitro and in vivo study[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(6): 3791-3800.
- [11] Wu GS, Lu JJ, Guo JJ, et al. Synergistic anti-cancer activity of the combination of dihydroartemisinin and doxorubicin in breast cancer cells[J]. *Pharmacol Rep*, 2013, 65(2): 453-459.
- [12] Wu B, Hu K, Li S, et al. Dihydroartemisinin inhibits the growth and metastasis of epithelial ovarian cancer[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(1): 101-108.
- [13] He Q, Shi J, Shen XL, et al. Dihydroartemisinin upregulates death receptor 5 expression and cooperates with TRAIL to induce apoptosis in human prostate cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(10): 819-824.
- [14] 高小玲, 罗子国, 王丕龙, 等. 双氢青蒿素诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡及其机制研究[J]. *中草药*, 2010, 41(1): 81-84.
- [15] Perry AS, Foley R, Woodson K, et al. The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13(2): 357-377.
- [16] Thibault A, Figg WD, Bergan RC, et al. A phase II study of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in hormone independent metastatic (D2) prostate cancer[J]. *Tumori*, 1998, 84(1): 87-89.
- [17] Xiang T, Li L, Yin X, et al. The ubiquitin peptidase UCHL1 induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis through stabilizing p53 and is frequently silenced in breast cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29783.
- [18] Saito Y, Kanai Y, Nakagawa T et al. Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(4): 527-532.
- [19] Liao X, Siu MK, Chan KY et al. Hypermethylation of RAS effector related genes and DNA methyltransferase 1 expression in endometrial carcinogenesis[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(2): 296-302.
- [20] Morey Kinney SR, Smiraglia DJ, James SR, et al. Stagespecific alterations of DNA methyltransferase expression, DNA hypermethylation, and DNA hypomethylation during prostate cancer progression in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(8): 1365-1374.

(责任编辑:唐宗顺)