

# 10-羟基喜树碱对肝癌细胞 HepG2 DNA 甲基化水平的调节作用研究<sup>Δ</sup>

许光明\*, 贺香嫦, 林丽美, 张晓青, 周牡娜(湖南中医药大学药学院, 长沙 410208)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)45-4245-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.45.07

**摘要** 目的:研究10-羟基喜树碱对肝癌细胞HepG2的DNA甲基化水平的调节作用。方法:体外培养HepG2细胞,分为给药组(10-羟基喜树碱25 μg/ml)和空白对照组,每组6个小组,每小组5个平行孔,分别于给药后24、48、72 h各组取2个小组,一组用MTT法检测HepG2细胞的生长抑制率;另一组提取HepG2细胞的DNA,酸水解后高效液相色谱法检测其甲基化率。结果:10-羟基喜树碱作用24、48、72 h后,HepG2细胞的生长抑制率分别为(61.6±4.9)%、(85.7±0.7)%、(97.9±0.7)%;给药组HepG2细胞DNA甲基化率分别为(2.81±0.34)%、(6.67±0.24)%、(6.83±0.24)% ,明显高于相应的空白对照组[(1.88±0.13)%、(1.91±0.11)%、(1.98±0.18)%]( $P<0.05$ ),且与作用时间呈正相关。结论:10-羟基喜树碱在抑制HepG2细胞的生长的同时提高了细胞DNA的甲基化水平。

**关键词** 10-羟基喜树碱;甲基化;肝癌细胞HepG2;抑癌机制

## Effects of 10-hydroxycamptothecine on the Regulation of DNA Methylation Level in Liver Cancer Cell HepG2

XU Guang-ming, HE Xiang-chang, LIN Li-mei, ZHANG Xiao-qing, ZHOU Mu-na (College of Pharmacy, Hunan University of TCM, Changsha 410208, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of 10-hydroxycamptothecine (10-HCPT) on the regulation of DNA methylation level in liver cancer cell HepG2. METHODS: Liver cancer cell HepG2 was cultured *in vitro* and divided into medication group (10-HCPT 25 μg/ml) and blank control group with 6 subgroups in each group. There were 5 parallel holes in each subgroup. 2 subgroups were sampled in each group 24, 48 and 72 h after medication. For one subgroup, the growth inhibition rates of HepG2 was detected by using MTT assay; for another subgroup, DNA of HepG2 and the parallel test cell were extracted respectively, and the methylation rate was determined by HPLC after acid hydrolysis. RESULTS: After treated with 10-HCPT for 24, 48 and 72 h, the growth inhibition rates of HepG2 were (61.6±4.9)%, (85.7±0.7)% and (97.9±0.7)%. The DNA methylation rate of medication group were (2.81±0.34)%, (6.67±0.24)% and (6.83±0.24)%, which were significantly higher than those of blank control group [(1.88±0.13)%, (1.91±0.11)% and (1.98±0.18)%] ( $P<0.05$ ), positively associated with treatment time. CONCLUSIONS: 10-HCPT may increase the overall DNA methylation level during inhibiting cancer cell.

**KEYWORDS** 10-hydroxycamptothecine; Methylation; Liver cancer cell HepG2; Cancer inhibition mechanism

也不利于医疗水平的提高。

### 参考文献

- [1] 佚名.关于“全面贯彻医改政策、尽快落实药事服务费实施”的建议[J].药品评价,2012(11):6.
- [2] 苏兰,简露,阳浩,等.医院药学药品调剂服务之探索[J].中国药业,2012,21(20):60.
- [3] 李力.取消药品加成后对公立医院的影响及对策[J].现代经济信息,2013(18):164.
- [4] 马音,金朝辉,徐珽.医院药库药品信息流与药品物流间的关系分析[J].中国药业,2012,21(18):64.
- [5] 高社.对取消药品加成的再思考[J].中国卫生经济,2013,

Δ基金项目:湖南省教育厅科研项目(No.11JC0943);湖南省“十二五”中药学重点学科资助项目(No.湘教通[2011]76)

\*副教授,博士。研究方向:生物药品分析。电话:0731-88458232。

E-mail:1052262329@qq.com

32(10):27.

- [6] 范治国.浅析改革或取消(公立医院)药品加成政策[J].中国药房,2009,20(10):721.
- [7] 李希娜,杨丽杰,李丹露,等.日本医科大学附属病院医院药学开展的介绍及对我国的启发[J].中国药房,2010,21(29):2710.
- [8] 是松伟.制造企业如何实现人力成本突围[J].人力资源,2010(11):1.
- [9] 庞昌生.试论取消药品加成与建立公立医院补偿机制[J].中国病案,2012,13(12):36.
- [10] 徐力新.公立医院取消药品加成后的医疗价格机制探讨[J].中国卫生经济,2013,32(11):63.
- [11] 高永萍.取消药品加成收入的思考[J].山西财税,2013(10):39.

(收稿日期:2014-02-11 修回日期:2014-10-24)

肝癌的发生与发展涉及多种因素,其中DNA甲基化可能发挥了重要作用<sup>[1-2]</sup>。DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)作用下,将一个甲基添加到胞嘧啶5-C上,形成5-甲基胞嘧啶的过程。70%~80%的dmC位于CpG二联核苷中,这种富含CpG二联核苷的区域被称为CpG岛(CpG islands)。异常甲基化是引起基因组不稳定及基因异常表达的分子基础,肿瘤的发生和发展与此密切相关,也被认为是人类肿瘤早期特征之一,故成为近年来肿瘤发生、发展的主要研究热点之一。

异常甲基化包括抑癌基因的高甲基化和原癌基因的低甲基化。降低抑癌基因的甲基化水平和提升原癌基因的甲基化水平都可抑制肿瘤发生发展。在研究过程中,抑癌基因的去甲基化即降低基因的甲基化水平的调控研究<sup>[2-4]</sup>报道较多,相应的去甲基化药物的研究<sup>[5]</sup>也较多,而对于肿瘤组织DNA整体低甲基化,特别是药物对原癌基因甲基化的提升调节作用报道较少。实际上,肿瘤细胞整个基因组中普遍存在低甲基化<sup>[6-13]</sup>情况,研究利用药物提高肿瘤细胞整体低甲基化水平可达到抑癌目的。

10-羟基喜树碱(10-hydroxycamptothecine)是抗肿瘤活性较强的喜树碱(Camptothecin)类化合物,目前提出的其可能的抗肿瘤机制有细胞凋亡通路、信号通路、细胞周期和端粒损伤作用等<sup>[14-15]</sup>。本文基于提高肿瘤细胞整体低甲基化水平可实现抑癌效果的原理,初次探索了10-羟基喜树碱对肝癌细胞中DNA甲基化水平的调节情况。试验发现,10-羟基喜树碱在抑制癌细胞生长的同时明显提高了DNA的甲基化水平,为该化合物抗癌的分子机制的进一步研究提供了较好的基础,也为肿瘤的早期治疗增加了一个有效的途径。

## 1 材料

### 1.1 仪器

CO<sub>2</sub>培养箱(日本三洋公司);高效液相色谱仪(Agilent仪器公司);Multiskan MK3 酶标仪(美国 Thermo Lab systems 公司);SW-CJ-1D型无菌操作台(苏州净化设备有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

喜树碱注射液[有效成分:10-羟基喜树碱,哈尔滨三联药业有限公司,批号:130103C2(42),规格:5 mg:5 ml];5-C甲基化的脱氧胞苷(dmC)、DNA成脱氧胞苷(dC)标准品(美国 Sigma 公司,批号:20C-278256、casmo951-77-9,纯度:优级纯);MTT、DMEM低糖培养基(美国 Thermo Scientific 公司);二甲基亚砜(DMSO,美国 Amresco 有限公司);DNA提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司);甲醇为色谱纯,水为双蒸水。

### 1.3 细胞

肝癌细胞HepG2由湖南中医药大学中医内科研究所提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 10-羟基喜树碱给药量的选择

采用MTT法检测10-羟基喜树碱对HepG2细胞作用24、48、72 h的生长抑制率。结果显示,0.25、2.5、25、50、100、200、400 μg/ml 10-羟基喜树碱对HepG2细胞作用24 h的生长抑制率分别为(22.3 ± 2.2)%、(43.0 ± 0.6)%、(61.6 ± 4.9)%、(59.9 ± 8.3)%、(68.0 ± 0.9)%、(68.5 ± 0.9)%、(70.7 ± 5.2)%;作用48 h的生长抑制率分别为(40.7 ± 3.4)%、(73.0 ± 4.0)%、(85.7 ± 0.7)%、(87.5 ± 0.7)%、(85.6 ± 2.5)%、(85.2 ± 1.4)%、(89.8 ± 0.5)%;作用72 h的生长抑制率分别为(55.6 ± 3.6)%、(89.10 ± 2.0)%、(97.9 ± 0.7)%、(99.7 ± 0.7)%、(96.6 ± 2.5)%、(97.2 ± 1.4)%、(99.0 ± 0.5)%。由此可以看出,在10-羟基喜树碱给药量大于25 μg/ml后对HepG2细胞的生长抑制

率基本趋于平稳,因而选择给药量为25 μg/ml进行下述试验。

### 2.2 分组与给药

取对数生长期的HepG2细胞接种于96孔培养板中(密度为5×10<sup>4</sup>个/孔),设12组,每组5个平行孔。经过优化试验,细胞大部分贴壁生长时,6组为给药组吸去原培养液加入25 μg/ml 10-羟基喜树碱溶液,另6组为空白对照组加入磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.2)。作用24、48、72 h时分别从给药组和空白对照组中各取出2组,一组每孔加入MTT(5 mg/ml)20 μl,37 °C继续培养4 h后,吸去上清液,每孔加入DMSO 100 μl,振荡10 min使结晶充分溶解,酶标仪490 nm波长处检测吸光度(A),观察细胞的抑制情况;另一组用于提取DNA。

### 2.3 细胞生长抑制作用

10-羟基喜树碱(25 μg/ml)对HepG2细胞生长抑制率的测定结果显示,作用24、48、72 h的生长抑制率分别为(61.6 ± 4.9)%、(85.7 ± 0.7)%、(97.9 ± 0.7)% ,表明给药后该肿瘤细胞被较好地抑制,抑制作用与作用时间呈正相关。

### 2.4 细胞中DNA的提取及DNA的水解

将收集的细胞按照提取试剂盒的方法和步骤提取DNA。参照相关文献<sup>[16]</sup>,经过试验摸索选用酸水解的方法水解dC及dmC。具体方法:吸取提取的DNA试液25 μl(约2 μg),置于2.5 ml的聚氯乙烯(PVC)管中,加50%高氯酸25 μl,加盖,于沸水中水解1 h,取出,冷却后,加入1.0 mol/L NaOH调pH至6.0,最后用0.45 μm滤膜滤过待用。

### 2.5 色谱试验

2.5.1 色谱条件与甲基化水平测试。色谱柱为Diamonsil C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相A为0.1 mol/L NH<sub>4</sub>Ac水溶液,B为甲醇,梯度洗脱程序为0、7、10、15、30 min时B分别为4%、5%、10%、20%、30%,流速为0.60 ml/min;检测波长为260 nm;柱温为25 °C;进样量为20 μl。DNA提取液经水解后,过0.45 μm滤膜,进样测定,记录色谱。结果表明,图中dC、dmC的保留时间分别为8.08、12.62 min,得到dC、dmC的峰面积分别为A<sub>dC</sub>和A<sub>dmC</sub>,计算胞嘧啶甲基化率(dmC,%)。计算公式为:dmC = A<sub>dmC</sub> × f<sub>dmC</sub> / (A<sub>dmC</sub> × f<sub>dmC</sub> + A<sub>dC</sub> × f<sub>dC</sub>) × 100%,式中,f<sub>dC</sub>、f<sub>dmC</sub>为dC、dmC的定量校正因子,用相应的标准品检测其峰面积后计算而得。胞嘧啶的甲基化水平检测色谱图见图1。

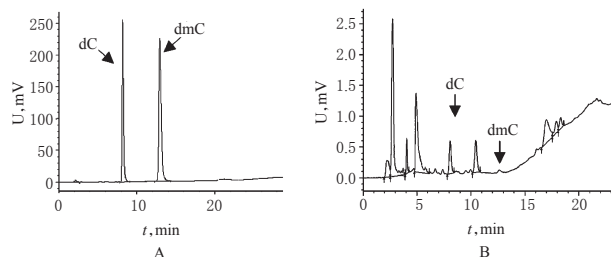


图1 胞嘧啶的甲基化水平检测色谱图

A. dC、dmC标准品; B. DNA提取液

### Fig 1 The chromatogram of cytosine methylation level

A. dC and dmC standard; B. DNA extract

2.5.2 重复性试验。取5份DNA提取液水解后,进样测定,计算甲基化水平,5次进样测试结果的RSD为1.26%,表明方法的精密性符合测试要求。

2.5.3 稳定性试验。取DNA提取液水解后,于0、2、4、6、8 h进样测定,记录峰面积,结果5个时间点测试峰面积的RSD为1.92%,表明测试过程的稳定性符合要求。

2.5.4 回收率试验。取DNA提取液6份,分别按等浓度加入法加入dC、dmC适量,测定甲基化率,并计算回收率,结果见

表1。

表1 回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery test(n=6)

原有甲基化率, %	加标甲基化率, %	测得甲基化率, %	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
2.212	2.457	4.586	96.61		
2.212	2.457	4.620	98.01		
2.212	2.457	4.574	96.12	96.70	1.35
2.212	2.457	4.552	95.22		
2.212	2.457	4.565	95.74		
2.212	2.457	4.633	98.52		

### 2.6 样品测试及统计学分析

分别于24、48、72 h取空白对照组和给药组细胞,提取DNA后水解,测试甲基化水平,每组测5份。结果24、48、72 h的空白对照组细胞DNA甲基化率分别为(1.88 ± 0.13)%、(1.91 ± 0.11)%、(1.98 ± 0.18)%。给药组细胞DNA甲基化率分别为(2.81 ± 0.34)%、(6.67 ± 0.24)%、(6.83 ± 0.24)%。采用SPSS 19统计软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用t检验, P < 0.05表示差异具有统计学意义。结果显示,与空白对照组比较,给药组细胞DNA甲基化率均明显升高,差异具有统计学意义(P < 0.05或P < 0.01);表明10-羟基喜树碱在抑制肿瘤细胞生长的同时提高了细胞DNA的甲基化水平。

### 3 讨论

DNA甲基化可以逆转,在机体发育过程和分化后的躯体细胞中,DNA甲基化是一个甲基化和去甲基化反应的动态平衡过程。抑癌基因发生高甲基化后造成基因表达下降或沉默,直接或间接促进肿瘤的发生发展。另一方面,原癌基因的低甲基化更容易导致肿瘤细胞的快速增长。尽管在肿瘤细胞中基因低甲基化的现象最早被发现,但人们普遍热衷于对肿瘤细胞中高甲基化现象的研究。最近几年,低甲基化导致肿瘤发生的现象受到人们的重视和研究。在肝细胞癌变过程,DNA低甲基化通过下述3种机制参与肿瘤的形成与发展:第一,基因组广泛低甲基化导致细胞染色体的不稳定性增加;第二,特定基因低甲基化激活原癌基因、生长因子基因;第三,DNA低甲基化后能促进肿瘤的转移<sup>[12-13,17-18]</sup>。

10-羟基喜树碱是抗肿瘤活性较强的喜树碱类化合物,目前认识到的可能抗肿瘤机制有细胞凋亡通路、信号通路、细胞周期和端粒损伤作用等。对于该药对肿瘤细胞的DNA甲基化的调节情况,特别是整体低甲基化的调节情况的研究较少报道。本试验使用10-羟基喜树碱作用于肝癌细胞,结果发现该药物在抑制肿瘤细胞过程中,明显地提高了肿瘤细胞DNA的整体甲基化水平,从而初步说明了提高癌基因的甲基化水平是该药物可能的作用机制之一,为进一步确定该药物是否对某个或某几个原癌基因的甲基化水平有提高、从而研究如何控制提高相关原癌基因的基因甲基化水平奠定了基础。总之,这一发现体现了通过提高DNA整体甲基化水平可以实现早期防癌控癌的思路和手段,具有重要的科学价值。

另外,本试验采用酸水解、高效液相色谱法检测DNA整体甲基化水平的方法,与其他如甲基化特异性的聚合酶链式反应(PCR)方法、免疫化学法、氯乙醛法、甲基化敏感性限制性内切酶直接测序法等方法<sup>[19]</sup>相比较,避免了PCR扩增、酶水解等复杂的过程,具有简单、快速的特点。但高效液相色谱法目前只适用于DNA整体甲基化水平的检测,对于某基因甲基化位点的测定目前尚不能完成。基于此,摸索利用高效液相色谱法检测基因甲基化位点也是未来探索和研究的方

### 参考文献

- [1] Nagai M, Nakamura A, Makina R, et al. Expression of DNA (5-cytosin)-methyltransferases (DNMTs) in hepato-cellular carcinomas[J]. *Hepatol Res*, 2003, 26(3): 186.
- [2] 邱烈.CpG岛甲基化异常的致癌作用[J]. *检验医学与临床*, 2007, 4(8): 746.
- [3] Ahmed IA, Pusch CM, Hamed T, et al. Epigenetic alterations by methylation of RASSF1A and DAPK1 promoter sequences in mammary carcinoma detected in extracellular tumor DNA[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 199(2): 96.
- [4] 李培坤, 耿小平, 朱立新.DNA甲基化抑制剂研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2010, 37(3): 198.
- [5] 赵军, 黄金路, 赵国海.去甲基化药物治疗肿瘤新进展[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(6): 849.
- [6] 汤绍辉, 杨冬华.DNA低甲基化与肝细胞癌[J]. *临床内科杂志*, 2007, 24(8): 512.
- [7] 李爽, 刘文天.DNA低甲基化与胃癌发病的关系[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2007, 34(9): 698.
- [8] Beier V, Mund C, Hoheisel JD. Monitoring methylation changes in cancer[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2007, 104(1): 1.
- [9] Luo DY, Zhang BZ, Lv LB, et al. Methylation of CpG islands of p16 associated with progression of primary gastric carcinomas[J]. *Lab Invest*, 2006, 86(6): 591.
- [10] Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1775(1): 138.
- [11] Nishigaki M, Aoyagi K, Danjoh I, et al. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6): 2 115.
- [12] Szyf M. DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy[J]. *Biochemis: Mosc*, 2005, 70(5): 533.
- [13] Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA demethylation and cancer: therapeutic implications[J]. *Cancer Lett*, 2004, 211(2): 133.
- [14] 西娜, 侯连兵.喜树碱及其衍生物的研究进展[J]. *中国药房*, 2006, 17(13): 1 017.
- [15] 胡文晋, 胡巍, 方芸.喜树碱类药物抗肿瘤机制研究进展[J]. *中国药房*, 2012, 23(27): 2 581.
- [16] Demeulemeester MAC, Stallen NV, Proft MPD. Degree of DNA methylation to chicory (*Cichorium intybus* L.): influence of plant age and vernalization[J]. *Plant Science*, 1999, 142(1): 101.
- [17] Szyf M. Targeting DNA methylation in cancer[J]. *Bull Cancer*, 2006, 93(9): 961.
- [18] Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA methylation and breast cancer[J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(6): 1 187.
- [19] 顾婷婷, 张忠明, 郑鹏生.DNA甲基化研究方法的回顾与评价[J]. *中国妇幼保健研究*, 2006, 17(6): 555.

(收稿日期:2014-04-20 修回日期:2014-09-28)