

• 实验研究 •

塞来昔布上调 Cyclin D1 基因甲基化水平对食管癌细胞增殖和凋亡的抑制作用

裴书飞¹, 张向东¹, 卢万里², 胡天弘³

1. 南阳市中心医院 消化内科, 河南 南阳 473000

2. 南阳市中心医院 胸外科, 河南 南阳 473000

3. 郑州大学 基础医学院, 河南 郑州 450001

摘要: 目的 探究塞来昔布通过上调 Cyclin D1 基因甲基化水平对食管癌细胞增殖和凋亡的作用及机制。方法 将细胞分为对照、转染和塞来昔布组, 分别转染阴性对照载体、Cyclin D1 过表达载体和 Cyclin D1 转染后给予 60 μmol/L 塞来昔布。采用 MTT 法、流式细胞术分别检测细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡率的变化, Western blotting 法检测细胞周期和细胞凋亡相关蛋白表达水平; 甲基化特异性 PCR (MS-PCR)、qRT-PCR 法用于检测 Cyclin D1 甲基化特异性扩增片段和 Cyclin D1 mRNA 表达水平。结果 塞来昔布能够抑制 Cyclin D1 诱导的细胞体外增殖, 阻滞细胞周期向 S 期转化, 并促进食管癌细胞凋亡; MS-PCR 结果显示塞来昔布能够上调 Cyclin D1 基因甲基化水平, 在转录水平抑制细胞内 Cyclin D1 mRNA 的表达。结论 塞来昔布能够通过上调 Cyclin D1 基因甲基化水平发挥抑制食管癌细胞增殖、促进其体外凋亡的作用。

关键词: 塞来昔布; 食管癌; Cyclin D1; 甲基化

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)06-1057-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.06.001

Inhibition of celecoxib on the proliferation and apoptosis of esophageal cancer cells by up-regulating the methylation level of Cyclin D1 gene

PEI Shu-fei¹, ZHANG Xiang-dong¹, LU Wan-li², HU Tian-hong³

1. Department of Gastroenterology, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China

2. Department of Thoracic Surgery, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China

3. School of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanism of celecoxib on the cell proliferation and apoptosis by regulating methylation status of Cyclin D1 in esophageal carcinoma cells. **Methods** Cells were divided into control group, transfected group and celecoxib group. Cells in the control group were transfected with negative control vector while cells in the transfected group and celecoxib group were transfected with Cyclin D1-overexpression vector. The celecoxib group was treated with 60 μmol/L celecoxib solution after transfection. MTT and flow cytometry were used to detect the cell proliferation capacity, cell cycle distribution, and cell apoptotic rates *in vitro*. Western blotting was used to measure the expression levels of related proteins. MS-PCR and qRT-PCR were used to detect the Cyclin D1 promoter region methylation level and Cyclin D1 mRNA expression level. **Results** Celecoxib can inhibit cell proliferation *in vitro*, which was promoted by Cyclin D1 overexpression, block cell cycle transition into S phase and promote cell apoptosis. MS-PCR showed that celecoxib could up-regulate the methylation level of Cyclin D1 gene and suppressed Cyclin D1 mRNA expression at transcriptional level. **Conclusion** Celecoxib can inhibit cell proliferation and promote apoptotic rate of esophageal cancer cells through up-regulating the methylation level of Cyclin D1.

Key words: celecoxib; esophageal carcinoma; Cyclin D1; methylation

收稿日期: 2020-05-15

基金项目: 河南省科技计划发展项目 (202102310408)

作者简介: 裴书飞 (1983—), 女, 研究方向为肝病、胃肠道疾病和消化道肿瘤等。E-mail: howmanya123@163.com

食管癌是目前发病率位列第 4 位的恶性肿瘤,特别在我国以鳞状细胞癌为主要亚型的食管癌集中高发于河北、河南及太行山域^[1],其恶性程度高、治疗效果差,术后 5 年生存率仅为 30%,晚期确诊患者化疗 5 年生存率不到 10%^[2],极大的威胁着人们的生命健康。近年来随着对表观遗传学机制的深入研究,多种原癌基因的激活及抑癌基因的表达抑制协同作用于食管鳞状细胞癌的发生过程中,地西他滨、5-氮胞苷等药物已被证实具有逆转表观遗传学改变的作用^[3],此外,研究表明长期服用包括塞来昔布、阿司匹林等在内的非甾体抗炎药(NSAIDs)能够有效预防消化道肿瘤的发生^[4],而其作用机制除与抑制环氧酶-2(COX-2)的活性相关外,越来越多的研究表明 NSAIDs 类药物可通过调节癌症相关基因启动子区甲基化水平发挥抑制肿瘤生长的作用^[5]。本研究通过检测 Cyclin D1 基因启动子区甲基化水平及相关分子表达变化,旨在揭示塞来昔布对鳞状细胞癌增殖及调亡的抑制作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人食管鳞癌细胞 Eca-109 细胞购自美国菌种保藏中心(ATCC);胎牛血清(FBS)、RPMI1640 培养基、PBS 缓冲液、0.25%胰酶溶液均购自 Gibco;塞来昔布,粉剂,规格 1 g/袋,产品批号 PHR1683,购自 Sigma;Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen);MTT (Aladdin);Annexin V-FITC 细胞调亡检测试剂盒(货号 KGA108-1,江苏凯基生物公司);RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒(货号 70-PQ0011)、ECL 发光试剂盒(货号 70-U1421)均购自联科生物公司;QIAmp DNA blood mini kit(货号 51104)购自 QIAGEN;EZ DNA Methylation-Gold kit(货号 D5007)购自 Zymo;Cyclin D1 过表达载体及同型阴性对照物载体委托上海通用生物公司设计合成;Cyclin D1(货号 sc20044)、CDK2(货号 sc-53219)、CDK4(货号 sc-260)、Bax(货号 sc-7480)、caspase-3(货号 sc-119)、caspase-9(货号 sc-56038)和 GAPDH(货号 sc-25778)等蛋白抗体均购自 Santa cruz。

1.2 细胞分组及转染

原代 Eca-109 细胞复苏后培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养基中,培养条件:5% CO₂、37 °C 恒温,稳定传代 3 次后分组接种于 6 孔板中,组别设置为:转染同型对照载体的对照组、转染 Cyclin D1 过表达载体的转染组和转染 Cyclin D1 过

表达载体同时给予塞来昔布的塞来昔布组。细胞转染参照 Lipofectamine™ 3000 试剂盒说明书,转染 48 h 后更换培养基,收集稳定转染的细胞给予 60 μmol/L 塞来昔布溶液(塞来昔布粉剂溶解于 DMSO 进行配制)^[6],对照组和 Cyclin D1 组细胞同时给予等浓度的 DMSO 进行处理。

1.3 MTT 法检测塞来昔布对食管癌细胞增殖活性的抑制作用

将各组稳定转染后的细胞等量接种于 96 孔板中,每组设置 6 个平行对照,常规培养至细胞贴壁,分别加入上述 DMSO 或塞来昔布溶液,持续干预 24、48、72 h 后向孔内加入 5 mg/mL MTT 溶液 100 μL,恒温培养箱中静置 4 h 后取出,DMSO 溶解结晶产物,采用酶标仪检测各组反应液在 570 nm 波长下的吸光度(A)值。

1.4 塞来昔布对食管癌细胞周期进程的影响

稳定转染后的各组细胞经给药处理 48 h 后消化离心,PBS 洗涤细胞 1 次,加入 70%冷乙醇重悬细胞并固定过夜,隔日离心收集上述细胞,参照细胞周期检测试剂盒说明书染色处理后采用流式细胞仪检测各组细胞周期分布变化,Flow Jo 10.0 软件用于实验数据的分析。

1.5 塞来昔布对食管癌细胞调亡的抑制作用

另取上述洗涤后 1×10^5 个细胞,用适量 Annexin V-FITC 染色结合液重悬细胞沉淀,参照 Annexin V-FITC 细胞调亡检测试剂盒说明书染色处理后采用流式细胞仪检测各组细胞调亡比例,并设置空白细胞单一染色样本用于光路补偿调节,Flow Jo 10.0 软件用于实验数据的分析。并根据早期和晚期细胞调亡数计算细胞调亡率。

$$\text{细胞调亡率} = (\text{早期细胞调亡数} + \text{晚期细胞调亡数}) / \text{细胞总数}$$

1.6 Western blotting 法检测塞来昔布对食管癌细胞 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达水平的影响

给药处理后弃各组细胞培养及上清,PBS 洗涤细胞 1 次,加入细胞裂解液冰浴裂解细胞 30 min、4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 收集裂解液上清,BCA 蛋白定量试剂盒定量各组样品蛋白浓度,按比例加入上样缓冲液煮沸变性蛋白。各取 20 μL 样品行 12% SDS-PAGE 恒压电泳,湿转法转移蛋白至 PVDF 膜上,常规抗体孵育后将蛋白条带转移至凝胶成像仪中曝光,以 GAPDH 为内参蛋白,定量计算各组样品间蛋白相对表达水平。

1.7 塞来昔布对食管癌细胞 Bax、caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达的影响

给药处理 48 h 后收集各组细胞参照 QIAmp DNA blood mini kit 说明书提取各样品细胞总 DNA，经核酸定量检测 DNA 浓度后用于亚硫酸盐还原法修饰所得 DNA 溶液，实验操作参照 EZ DNA Methylation-Gold kit 说明书，将未甲基化的 DNA 序列中的“C”还原为“U”为后续 PCR 扩增实现“U”向“T”的转化提供可能。MS-PCR 特异性扩增引物设计使用 CpG 岛在线搜索工具 MethPrimer(<http://www.urogene.org/methprimer/>)，甲基化片段 (M) 扩增引物：上游 5' -GGTTGGTATTCCTATG-3'，下游 5' -CGAAGGTATTCGTTAAT-3'；未甲基化片段 (U) 扩增引物：上游 5' -GGTAGGTCGCCATAGGT-3'，下游 5' -AACATTTCTAATGGTT-3'。PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳，电泳产物转移至凝胶成像仪中曝光显影。

1.8 qRT-PCR 法检测塞来昔布对食管癌细胞 Cyclin D1 mRNA 甲基化水平的影响

收集各组细胞离心沉淀后加入 1 mL TRIzol 裂解提取细胞总 RNAs，逆转合成 cDNAs，标定各组样本 cDNAs 浓度后参照 Power Up SYBR Green Kit 说明书定量检测目的基因表达量。GADPH 作为参比基因，每组细胞样本设置 3 个平行对照，以采集到荧光信号均值 (Ct 值) 计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的基因

的相对表达量。PCR 扩增引物序列如下：Cyclin D1 上游 5' -CGGTTATTCGCGGATGG-3'，下游 5' -TAT TACTTGTTCGCGTT-3'；GAPDH 上游 5' -AAAGT TCGTGGTTAAT-3'，下游 5' -CCGTTATGGCGAT TGTTT-3'。

1.9 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 18.0 软件进行处理，检测所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 塞来昔布对食管癌细胞增殖活性的抑制作用

与对照组相比，转染组给药 48、72 h 的 A 值明显高于对照组 ($P < 0.05$)，说明给药 48 h 转染成功。与转染组比较，塞来昔布组给药 48、72 h 的 A 值明显低于转染组 ($P < 0.05$)。与给药 24 h 比较，同组给药 48 h 的 A 值明显升高 ($P < 0.05$)；与给药 48 h 比较，同组给药 72 h 的 A 值明显升高，两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。塞来昔布对食管癌细胞增殖活性的抑制作用见表 1。

2.2 塞来昔布对食管癌细胞周期进程的影响

与对照组相比，转染组 G₂/M 期和 S 期的分布比例显著增加 ($P < 0.05$)，G₀/G₁ 期的分布比例显著降低 ($P < 0.05$)。与转染组比较，塞来昔布组 G₂/M 期和 S 期的分布比例显著降低 ($P < 0.05$)，G₀/G₁ 期的分布比例显著增加 ($P < 0.05$)。见表 2、图 1。

表 1 塞来昔布对食管癌细胞增殖活性的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Inhibition of celecoxib on the proliferative activity of esophageal carcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A 值		
		给药 24 h	给药 48 h	给药 72 h
对照	—	0.43 ± 0.03	0.63 ± 0.07	0.87 ± 0.06
转染	—	0.41 ± 0.04	0.81 ± 0.08 ^{*▲}	1.25 ± 0.14 ^{*▲△}
塞来昔布	60	0.45 ± 0.03	0.72 ± 0.07 ^{#▲}	0.96 ± 0.10 ^{#▲△}

与对照组同时时间比较：^{*} $P < 0.05$ ；与转染组同时时间比较：[#] $P < 0.05$ ；与同组给药 24 h 比较：[▲] $P < 0.05$ ；与同组给药 48 h 比较：[△] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs control group at the same time; [#] $P < 0.05$ vs transfected group at the same time; [▲] $P < 0.05$ vs treatment for 24 h in the same group; [△] $P < 0.05$ vs treatment for 48 h in the same group

表 2 塞来昔布对食管癌细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of celecoxib on cell cycle distribution in esophageal carcinoma ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	G ₀ /G ₁ /%	G ₂ /M/%	S/%
对照	—	68.22 ± 5.29	24.28 ± 1.92	7.50 ± 0.06
转染	—	46.43 ± 3.74 [*]	35.85 ± 2.48 [*]	17.72 ± 1.81 [*]
塞来昔布	60	57.76 ± 3.98 [#]	28.15 ± 1.67 [#]	14.09 ± 1.10 [#]

与对照组比较：^{*} $P < 0.05$ ；与转染组比较：[#] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs transfected group

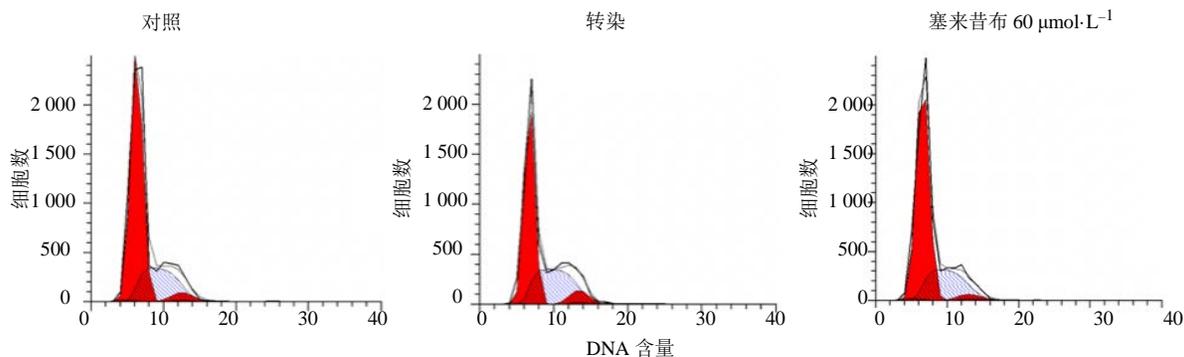


图 1 塞来昔布对食管癌细胞周期进程的影响

Fig. 1 Effects of celecoxib on cell cycle progression of esophageal carcinoma

2.3 塞来昔布对食管癌细胞凋亡的抑制作用

与对照组相比，转染组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。与转染组比较，塞来昔布组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)，见图 2、表 3。

2.4 塞来昔布对食管癌细胞 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达水平的影响

与对照组相比，转染组细胞内 CDK2、CDK4

蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.05$)。与转染组比较，塞来昔布组细胞内 CDK2、CDK4 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。见图 3、表 4。

2.5 塞来昔布对食管癌细胞 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达的影响

与对照组相比，转染组细胞内 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。与

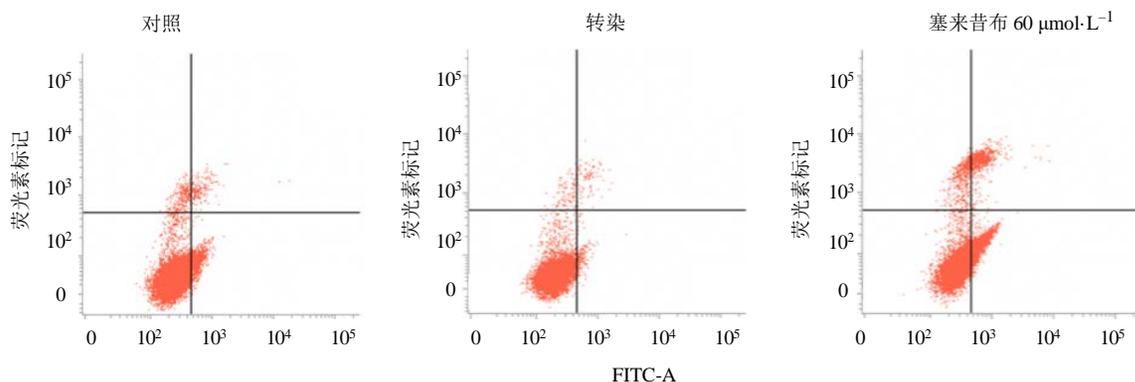


图 2 塞来昔布对食管癌细胞凋亡的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effect of celecoxib on apoptosis of esophageal carcinoma cells

表 3 塞来昔布对食管癌细胞凋亡的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Inhibitory effect of celecoxib on apoptosis of esophageal carcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	细胞凋亡率/%
对照	—	9.47 ± 0.82
转染	—	$3.28 \pm 0.29^*$
塞来昔布	60	$24.17 \pm 2.11^\#$

与对照组比较: $^*P < 0.05$; 与转染组比较: $^\#P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs control group; $^\#P < 0.05$ vs transfected group

转染组比较，塞来昔布组细胞内 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。见表 5、图 4。

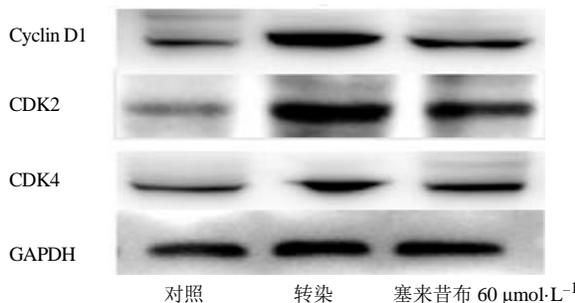


图 3 塞来昔布对 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达水平的影响
Fig. 3 Effects of celecoxib on Cyclin D1 and CDK4 protein expression levels

表4 塞来昔布对 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of celecoxib on Cyclin D1 and CDK4 protein expression levels ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Cyclin D1/GAPDH 表达	CDK2/GAPDH 表达	CDK4/GAPDH 表达
对照	—	1.00 ± 0.08	0.67 ± 0.07	1.26 ± 0.13
转染	—	2.38 ± 0.17*	2.82 ± 0.21*	1.63 ± 0.15*
塞来昔布	60	1.21 ± 0.10 [#]	1.88 ± 0.16 [#]	1.30 ± 0.11 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与转染组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs transfected group

表5 塞来昔布对食管癌细胞 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of celecoxib on the expression of Bax, Caspase-3, and Caspase-9 in esophageal carcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Bax/GAPDH 表达	Caspase-3/GAPDH 表达	Caspase-9/GAPDH 表达
对照	—	1.23 ± 0.13	1.46 ± 0.13	0.72 ± 0.05
转染	—	0.58 ± 0.06*	0.38 ± 0.03*	0.52 ± 0.04*
塞来昔布	60	1.87 ± 0.15 [#]	1.21 ± 0.09 [#]	0.88 ± 0.07 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与转染组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs transfected group

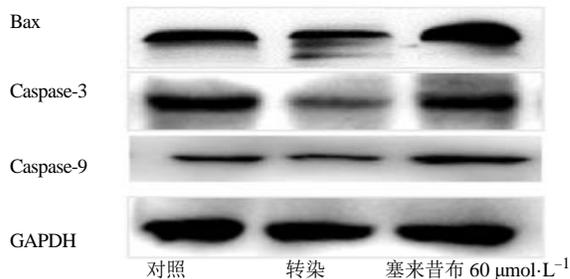


图4 塞来昔布对食管癌细胞 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of celecoxib on the expression of Bax, Caspase-3, and Caspase-9 in esophageal carcinoma cells

2.6 塞来昔布对食管癌细胞 Cyclin D1 mRNA 甲基化水平的影响

与对照组相比, 转染组细胞内 Cyclin D1 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与转染组比较, 塞来昔布组细胞内 Cyclin D1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。见图5、表6。

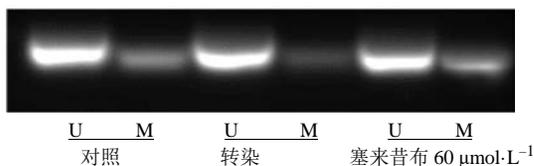


图5 塞来昔布对食管癌细胞 Cyclin D1 mRNA 甲基化水平的影响

Fig. 5 Effects of celecoxib on Cyclin D1 mRNA methylation in esophageal carcinoma cells

表6 塞来昔布对食管癌细胞 Cyclin D1 mRNA 甲基化水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effects of celecoxib on Cyclin D1 mRNA methylation in esophageal carcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Cyclin D1 mRNA 表达
对照	—	1.00 ± 0.07
转染	—	4.56 ± 0.38*
塞来昔布	60	0.72 ± 0.06 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与转染组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs transfected group

3 讨论

DNA 甲基化作为一种可逆转的、不改变基因核苷酸序列的表观遗传学调控机制, 近年来在多种肿瘤的研究中受到广泛关注^[7-8], 整体基因组 DNA 的全局低甲基化或 CpG 岛的高甲基化贯穿了肿瘤发生发展的始末, 其中对于抑癌基因的去甲基化治疗研究目前较为成熟, 已有研究发现与食管鳞状细胞癌有关的 RASSF8、CDO1、P16ink4a、CDH1 等基因原发高甲基化位点是造成细胞癌变、恶性增殖及转移的分子诱因^[3, 9-10], 其治疗手段常集中于 5-杂氮-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-dC)、5-氮杂-2-脱氧胞苷 (5-Aza) 等 DNA 甲基转移酶抑制剂和表没食子儿茶素没食子酸酯等部分天然产物^[11], NSAIDs 类药物预防和治疗胃肠道癌症的作用效果虽已有报道但研究十分局限。然而对于原癌基因的全局低甲基化及过表达造成了食管鳞状细胞癌细胞恶变少有研究, 本研究首次检测了塞来昔布对 Cyclin D1 基因表达及其甲基

化水平的调节作用,为探究其调节食管鳞状细胞癌细胞增殖及凋亡的分子机制提供了新的理论依据。

在正常细胞中,细胞增殖和凋亡两种机制共同存在并维持细胞及人体对生命代谢活动,细胞凋亡及自噬是对衰老和异常细胞的自我更替及保护,在肿瘤发生发展过程中,原癌基因异常表达或代偿性激活时,正常细胞的增殖及凋亡平和遭到破坏,进而加剧肿瘤细胞的扩增及转移^[12],本研究前期结果显示 Cyclin D1 异常高表达于食管鳞状细胞癌细胞系中并在 Eca-109 细胞系中显示出较正常食管上皮细胞 HEEC 细胞 Cyclin D1 表达差异倍数最大,因而选取 Eca-109 细胞用于构建 Cyclin D1 过表达细胞系进行后续功能及分子实验。通过 MTT、流式细胞术和 Western blotting 法等实验发现过表达 Cyclin D1 能够显著通过加速细胞周期进程,促进 Eca-109 细胞实现 G₀/G₁ 期向 G₂/M 期及 S 期的进展实现对 Eca-109 细胞体外增殖的促进作用,在该过程中除 Cyclin D1 自身蛋白表达水平的增加,同时检测到 CDK2 和 CDK4 蛋白水平在细胞中随 Cyclin D1 表达增加而升高,反之给予塞来昔布干预后,CDK2 和 CDK4 蛋白表达水平随细胞增殖活力降低而减少,CDK4 蛋白表达水平与对照组细胞无差异。以往研究表明细胞周期依赖性蛋白激酶(CDKs)受到细胞周期素(cyclins)家族的调控,二者的结合会诱导一系列关键底物的磷酸化进而激活下游基因转录、推动细胞周期进程,在这个过程中 CDK2 和 CDK4 与 Cyclin D1 结合后主要调控细胞向 S 期的转化和分布^[13],提示塞来昔布通过阻遏 Cyclin D1 表达抑制了细胞内 CDK2 和 CDK4 的激活,进而阻滞了细胞周期在 G₀/G₁ 期和 G₂/M 期的分布比例,最终造成了对 Eca-109 细胞增殖的抑制。同时细胞凋亡检测结果显示塞来昔布能够拮抗 Cyclin D1 介导的细胞凋亡抑制,并显著增加 Eca-109 细胞内促凋亡蛋白 Bax、caspase-3 和 caspase-9 的表达。最后检测塞来昔布对 Cyclin D1 基因甲基化水平的影响,结果显示塞来昔布可以通过上调 Cyclin D1 甲基化水平抑制 Cyclin D1 mRNA 的转录,以往研究表明塞来昔布对 DNMT3a 等甲基转移酶的表达具有抑制作用^[14],而干扰 DNMT3a 的表达并不能对 Cyclin D1 产生影响^[15],提示塞来昔布对 Cyclin D1 基因甲基化的调控与 DNMTs 无关,另一方面在转录水平对目的基因转录的调控常受到其反义转录因子的调节^[16],不同的 Cyclins 蛋白发挥对细胞周期正性或

负性的调节^[17],由此提示塞来昔布对 Cyclin D1 基因甲基化的调控可能与诱导其反义转录因子的表达或改变 Cyclins 基因空间构象相关,但其具体分子机制还有待进一步的探索。

综上所述,塞来昔布能够上调 Cyclin D1 基因甲基化水平调节食管癌细胞体外增殖及凋亡,此外本研究仍缺少在多种食管癌细胞系及临床样品数据的支撑,为后续临床指导塞来昔布靶向治疗提供新的理论依据。

参考文献

- [1] Sasaki Y, Tamura M, Koyama R, et al. Genomic characterization of esophageal squamous cell carcinoma: Insights from next-generation sequencing [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(7): 2284-2293.
- [2] Zhang J, Jiang Y, Wu C, et al. Comparison of clinicopathologic features and survival between eastern and western population with esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Thorac Dis*, 2015, 7(10): 1780-1786.
- [3] Bao Y, Wang Q, Guo Y, et al. PRSS8 methylation and its significance in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 28540-28555.
- [4] Antunes D M, Mfsd R, Guimarães D M, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs modulate gene expression of inflammatory mediators in oral squamous cell carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(5): 2385-2394.
- [5] Wilson L E, Kim S, Xu Z, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and genomic DNA methylation in blood [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138920.
- [6] 蔺茹君, 李思源, 肖智伟, 等. 塞来昔布抑制食管癌细胞系 Eca109 增殖 [J]. *基础医学与临床*, 2019, 39(1): 88-89.
- [7] Leonhardt H, Cardoso M C. DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer [J]. *J Cell Biochem Suppl*, 2000, Suppl 35: 78-83.
- [8] 曾子奕, 徐海帆. DNA 甲基化与肿瘤的相关研究 [J]. *现代医药卫生*, 2015, 31(7): 1007-1009.
- [9] Ushiku H, Yamashita K, Katoh H, et al. Promoter DNA methylation of CDO1 gene and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Dis Esophagus*, 2017, 30(2): 1-9.
- [10] Kumar R, Kannan R R, Verma A K, et al. High ALDH1, S phase fraction, p16 INK4A in esophageal squamous cell carcinoma could predict response to neoadjuvant chemotherapy [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13 Suppl): 2788.
- [11] Morris J, Moseley V R, Cabang A B, et al. Reduction in

- promotor methylation utilizing EGCG (epigallocatechin-3-gallate) restores RXR α expression in human colon cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 35313-35326.
- [12] Kumar R M R, Schor N F. Methylation of DNA and chromatin as a mechanism of oncogenesis and therapeutic target in neuroblastoma [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(31), doi: 10.18632/oncotarget.25084.
- [13] 翁 熊, 祝顺琴, 崔红娟. 青蒿琥酯通过阻滞细胞周期抑制胶质母细胞瘤细胞增殖 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(4): 772-778.
- [14] Liu J F, Yi S L, Drew P A, *et al.* The effect of celecoxib on DNA methylation of CDH13, TFPI2, and FSTL1 in squamous cell carcinoma of the esophagus *in vivo* [J]. 2016, 27(9): 848.
- [15] 王佳辰. 在肝癌细胞系中 DNA 甲基转移酶 3b 通过 mir-145 调节 Cyclin-D1 基因表达的研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2015.
- [16] Tufarelli C, Sloane S J A, David G, *et al.* Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease [J]. *Nat Genet*, 34(2): 157-165.
- [17] Bloom J, Cross F R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(2): 149-160.