

地西他滨联合 GSK126 通过诱导“病毒模拟”对人膀胱癌 T24 细胞的抑制作用研究

许 嵘^{1,6}, 陈家俊², 丁小明³, 欧阳超群¹, 张文州¹, 陈琳琳¹, 谢志新¹, 林阳君¹, 唐生安⁴, 许瑞安⁵, 辛 军^{2*}

1. 泉州医学高等专科学校 药学院, 福建 泉州 362011

2. 福建医科大学附属泉州第一医院 泌尿外科, 福建 泉州 362000

3. 泉州医学高等专科学校 基础医学部, 福建 泉州 362011

4. 天津医科大学 药学院 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070

5. 华侨大学 医学院, 福建 泉州 362000

6. 南加州大学 凯克医学中心 诺里斯综合癌症中心, 美国 洛杉矶 90089

摘要: 目的 研究 DNA 去甲基化药物地西他滨与 Zeste 基因增强子同源物 2 (enhancer of Zeste Homolog 2, EZH2) 抑制剂 GSK126 联合应用对膀胱癌诱导“病毒模拟”免疫应答的抗肿瘤作用。方法 将膀胱癌细胞株 T24 分为 4 组, 对照组、地西他滨单药组、GSK126 单药组、地西他滨与 GSK126 联合用药组。用细胞倍增时间测定 T24 细胞的增殖能力, 用药物联合分析计算联合指数 (CI), 用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 ERV-Fc1、ERV-W、IFIT2、IRF7、MDA5、RGH2 和 RIG1 内源性逆转录病毒基因 (endogenous retrovirus, ERV) 的表达。结果 地西他滨药物联合应用对 T24 细胞有显著的抑制作用 ($P < 0.05$), 两者之间具有协同作用 ($CI < 1$), 7 个 ERVs 的表达上调。结论 地西他滨联合 GSK126 对膀胱癌 T24 细胞有协同增殖抑制作用, 其机制可能与诱导“病毒模拟”有关。

关键词: 地西他滨; Zeste 基因增强子同源物 2; GSK126; DNA 甲基化; 病毒模拟; 内源性的逆转录病毒; 联合指数

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2021)01-0016-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.01.003

Inhibitory effect of decitabine combined with GSK126 on T24 cells by inducing “viral mimicry”

XU Rong^{1,6}, CHEN Jia-jun², DING Xiao-ming³, OU-YANG Chao-qun¹, ZHANG Wen-zhou¹, CHEN Lin-lin¹, XIE Zhi-xin¹, LIN Yang-jun¹, TANG Sheng-an⁴, XU Rui-an⁵, XIN Jun²

1. School of Pharmacy, Quanzhou Medical College, Quanzhou 362011, China

2. Department of Urology, the First Hospital of Quanzhou Affiliated Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China

3. Department of Basic Medicine, Quanzhou Medical College, Quanzhou 362011, China

4. Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

5. School of Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362000, China

6. Norris Comprehensive Cancer Center, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles 90089, USA

Abstract: **Objective** To study the anti-tumor effect of DNA demethylation inhibitor decitabine combined with EZH2 inhibitor GSK126 in “viral mimicry” immune response of bladder cancer. **Methods** The inhibitory effects of decitabine, GSK126, decitabine combined with GSK126 on human bladder cancer cell line T24 were determined by doubling time, the combination index (CI) was calculated by medicine combination analysis, and seven endogenous retroviruses (ERVs) of ERV-Fc1, ERV-W, IFIT2, IRF7, MDA5,

收稿时间: 2020-08-21

基金项目: 中国博士后基金资助项目 (2016M591399); 天津市教委自然科学基金重点项目 (2019ZD031); 泉州市科技计划项目 (2018N111S、2019N076S)

作者简介: 许 嵘 (1978—), 男, 副教授, 主要从事表观遗传药物研究。E-mail: xurongabc0806@163.com

*通信作者: 辛 军 (1968—), 男, 教授, 主要从事泌尿男生殖系统疾病的微创诊疗。E-mail: junxinj@163.com

RGH2 and RIG1 were detected by qRT-PCR. **Results** The combination of the two inhibitors had a significant inhibitory effect on T24 cells ($P < 0.05$), and there was a synergistic effect of the two inhibitors ($CI < 1$). The expression of seven ERVs was up-regulated. **Conclusion** Decitabine combined with GSK126 can synergistically inhibit proliferation of bladder cancer, and the mechanism may be related to the induction of "viral mimicry".

Key words: decitabine; EZH2; GSK126; DNA methylation; viral mimicry; endogenous retroviruses; combination index

膀胱癌最常见的类型是膀胱尿路上皮癌,在世界较发达地区的男性中,其患病率在癌症中排名第 4 位。异常 DNA 甲基化(5-甲基胞嘧啶, 5mC)是膀胱癌和其他癌症的关键特征^[1-2]。膀胱癌携带异常表观基因组,不仅是由于异常的 DNA 甲基化,而且也是表观遗传效应物,如 DNA 甲基转移酶 3a 基因(DNMT3A)和 Zeste 基因增强子同源物 2(EZH2)的频繁突变,有研究观察到泌尿系统肿瘤中抑癌基因 TCF21 启动子甲基化增加,基因表达降低^[3-5]。因此,膀胱癌是一种可以通过表观遗传治疗成功的疾病。

DNA 甲基化沉默内源性的逆转录病毒(ERV)刺激免疫应答,成为有吸引力的靶点^[6]。目前,DNA 去甲基化药物(HMA)地西他滨(5-氮杂-2'-脱氧胞苷)经 FDA 批准用于骨髓增生异常综合征(MDS)的治疗,并已应用在临床中^[7],然而,只有少数未经选择的患者受益^[8],因此,寻找提高抗肿瘤免疫和增强治疗反应的合理组合是一个重大挑战。EZH2 是致癌基因,作为膀胱肿瘤发生的主要调节因子,在表观遗传调控以及各种关键信号通路调节中起关键作用,EZH2 抑制剂 GSK126 已被开发,正在进行临床试验^[9]。在此,本研究考察地西他滨联合 GSK126 通过激活内源性逆转录病毒相关基因转录,诱导干扰素免疫应答的抗肿瘤作用,包括减少膀胱癌细胞增殖和增强免疫信号传导,为临床膀胱癌的治疗新方法提供参考。

1 材料

人膀胱癌细胞株 T24 来自美国 Norris 癌症中心。细胞置于 DMEM 培养基中(10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素-链霉素),在 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养。细胞长至 70%~80% 丰度时用 DPBS 和胰酶进行传代。地西他滨(质量分数≥97%, 10 mg, 货号 A3656)与 GSK126(质量分数≥98%, 5 mg, 货号 500580)均购自 Sigma 公司。Z1 细胞计数仪(Beckman Coulter 公司);CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞倍增时间测定

取对数生长期 T24 细胞,以 5×10^4 /孔接种于 6 孔培养板中,按照 2、1、0.5、0.3、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度依次加入含地西他滨的培养液,每个浓度 3 个复孔,设只加培养基的对照孔,作用 24 h 后弃除含药培养液,再加入新鲜培养液继续培养,共孵育 5 周,每周对 T24 细胞进行计数并传代,测定其细胞倍增时间;按照 10、2、1、0.5、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度依次加入含 GSK126 的培养液,GSK126 每 24 小时更换含药培养液,共孵育 4 周,余同上。

2.2 细胞增殖能力测定

取对数生长期 T24 细胞,以 5×10^4 /孔接种于 6 孔培养板中,随机分为 4 组,对照组和 3 个给药组(地西他滨组、GSK126 组、地西他滨+GSK126 联合组),每组 3 个复孔。地西他滨组加入浓度为 300 nmol/L 地西他滨培养液,作用 24 h 后弃除含药培养液,再加入新鲜培养液继续培养;GSK126 组加入浓度为 500 nmol/L GSK126 培养液,GSK126 每 24 小时更换含药培养液;联合组加入地西他滨和 GSK126,方法同上,共孵育 5 周,每周对 T24 细胞进行计数并传代,测定其细胞增殖率(给药组细胞数量/对照组细胞数量)。

2.3 药物联合作用分析

取对数生长期 T24 细胞,以 1×10^3 /孔接种于 96 孔培养板上,加入含 0.1% DMSO、浓度梯度的地西他滨(10~2 500 nmol/L)、浓度梯度 GSK126(1.0~250 $\mu\text{mol/L}$),联合组加入地西他滨(2.5~500 nmol/L)和 GSK126(2.5~500 $\mu\text{mol/L}$),体积比 1:1,100 μL /孔进行孵化,地西他滨作用 24 h 后弃除含药培养液,再加入新鲜培养液继续培养;GSK126 每 24 小时更换含药培养液,共孵育 5 d 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,在 37 °C 孵化 2 h,在波长 450 nm 处对培养板进行扫描,测定其吸光度(A)值,计算 T24 细胞的增殖率,根据 Chou-Talalay 方法得到联合指数(combination index, CI)^[10]。

$$\text{细胞增殖率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测相关基因表达

取对数生长期 T24 细胞, 随机分为 4 组: 对照组和 3 个给药组[地西他滨组(300 nmol/L)、GSK126 组(500 nmol/L)、地西他滨(300 nmol/L)和 GSK126 (500 nmol/L) 联合组], 地西他滨组加入浓度为 300 nmol/L 地西他滨培养液, 作用 24 h 后弃除含药培养液, 再加入新鲜培养液继续培养; GSK126 组加入浓度为 500 nmol/L GSK126 培养液, GSK126 每 24 小时更换含药培养液; 联合组加入地西他滨和 GSK126, 方法同上, 共孵育 10 d, 收集每组 1.2×10^6 个细胞, 使用 RNeasy 试剂盒提取 RNA, 以此作为模板合成 cDNA 第 1 链。使用 Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR 对 cDNA 样品进行实时定量聚合酶链反应 (qPCR), 引物序列见表 1, 每个反应设置 3 个重复。反应体系: SYBR FAST qPCR Master Mix 10 μ L, F/R 引物各 0.4 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 加 ddH₂O 至 20 μ L; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C、3 min, 然后按 95 $^{\circ}$ C、3 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s 进行 39 个循环。使用 GAPDH 作内参, 通过比较 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值进行相对定量分析。

2.5 数据统计分析

根据 Chou-Talalay 方法, 运用 CompuSyn 软件分析各药物及其组合的剂量-效应协同效应, 计算 CI, 确认 2 种药物的相互作用; 运用 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 数据比较由 Two-way ANOVA *t* 检验完成, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

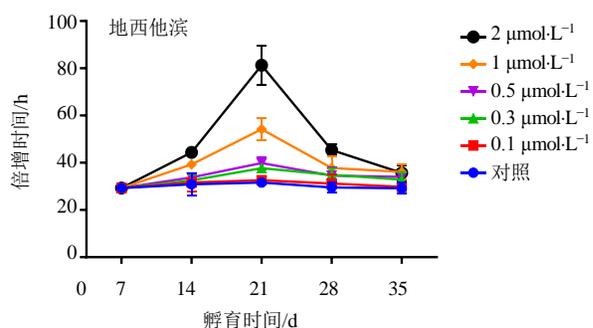


表 1 基因引物序列
Table 1 Gene primer sequence

基因	序列
ERV-Fc1	上游引物: 5'-TTTCCCACCGCTGGTAATAG-3' 下游引物: 5'-AGGCTAAGGATTCGGCTGAG-3'
ERV-W	上游引物: 5'-TGAGTCAATTCTCATACTG-3' 下游引物: 5'-AGTTAAGAGTTCTTGGGTGG-3'
IFIT2	上游引物: 5'-GTGCAAGGACTTGGGAAATG-3' 下游引物: 5'-CCAGAGTGTGGCTGATGCT-3'
IRF7	上游引物: 5'-GTGGACTGAGGGCTTGTAG-3' 下游引物: 5'-TCAACACCTGTGACTTCATGT-3'
MDA5	上游引物: 5'-CACTTCCTTCTGCCAAACTG-3' 下游引物: 5'-GAGCAACTTCTTTCAACCACAG-3'
RGH2	上游引物: 5'-CGCCACACTTCAATCTCTCC-3' 下游引物: 5'-CGTGGTCTGACACCTCTGAA-3'
RIG1	上游引物: 5'-CCAGCATTACTAGTCAGAAGGAA-3' 下游引物: 5'-CACAGTGCAATCTTGTTCATCC-3'

3 结果

3.1 地西他滨和 GSK126 对膀胱癌 T24 细胞倍增时间的影响

随着地西他滨的浓度增加, 对 T24 细胞生长抑制增强, 最大抑制作用出现在 21 d, 随后抑制作用逐渐减弱, 在第 35 天, 细胞倍增时间恢复正常。在 GSK126 干预下, 地西他滨浓度由 0 增加到 10 μ mol/L, 对 T24 细胞生长有所抑制, 但影响不大, 见图 1。

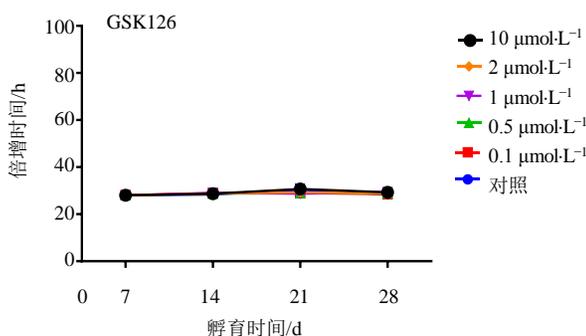


图 1 地西他滨和 GSK126 对 T24 细胞倍增时间的影响

Fig. 1 Effects of decitabine and GSK126 on doubling time of T24 cells

3.2 地西他滨和 GSK126 联合应用对膀胱癌 T24 细胞有协同抑制作用

在地西他滨和 GSK126 联合干预下, 在 21 d 时, 对 T24 细胞增殖抑制作用最大, 细胞增殖率为

28.64% ($P < 0.05$), 随后抑制作用逐渐减弱 (图 2-A); 对 T24 细胞的 $CI < 1$, 说明 2 种药物具有协同作用 (图 2-B)。地西他滨和 GSK126 联合治疗, 表现出对膀胱癌细胞增殖协同和强大的抑制作用。

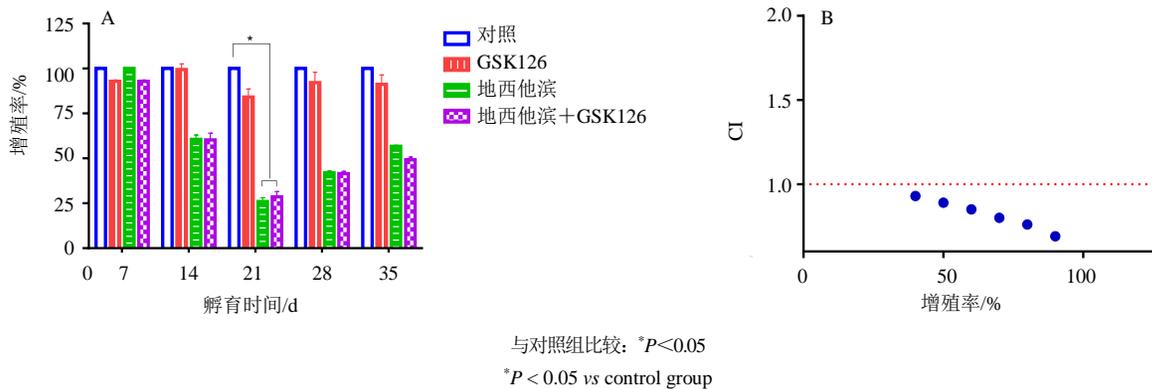


图 2 地西他滨和 GSK126 联合干预对 T24 细胞增殖的影响 (A) 和联合指数 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of decitabine and GSK126 combination on proliferation of T24 cells (A) and combination index (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 地西他滨和 GSK126 联合激发特异性免疫相关基因的潜力

地西他滨诱导 7 个 ERVs 相关基因上调, 并且依赖于 MDA5 和 ERV 转录增加。地西他滨和 GSK126 联合应用较地西他滨单药组, 增强干扰素 I 型反应相关免疫基因 (MDA5、RIG1 和 IRF7) 和 ERV 转录, 而且转录物表达量均一致 (图 3)。说明地西他滨和 GSK126 联合治疗通过干扰素 I 型反应诱导免疫应答对膀胱癌进行增殖抑制。

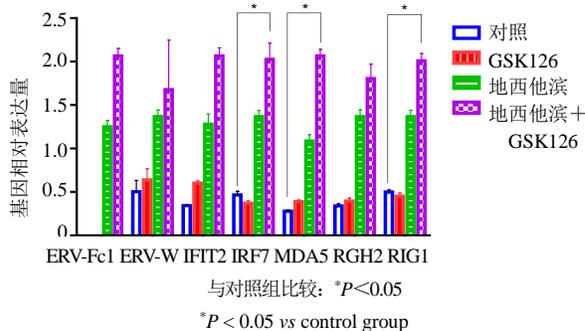


图 3 地西他滨和 GSK126 联合作用对 T24 细胞 ERVs 相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of decitabine and GSK126 combination on expression of seven ERVs related genes of T24 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

表观遗传可塑性包括 DNA 甲基化和组蛋白修饰^[11-13], 涉及功能性启动子和增强子元件之间的平衡作用^[14-15]。HMA 对基因表达改变是有限的, 这可能解释了其在膀胱癌和其他癌症的临床试验中的有限的抗肿瘤作用^[16]。绝大多数去甲基化启动子的基因仍然因为 PRC2 占据 H3K27m3 而保持沉默^[17-18], 或者含有被 PRC2 占据 H3K4m3 和

H3K27m3 的二价结构域^[19-20]。抑制因子复合物 PRC2 是组蛋白 H3K27 三甲基酶, 其核心亚单位是 EZH2^[21], 甲基化 H3K27 成为 H3K27me3, 导致转录沉默^[22]。因此, 期望 EZH2 抑制剂以激活由于二价性而保持沉默的大多数去甲基化基因, 与 HMA 具有协同作用, 可增强 HMA 治疗膀胱癌的疗效。Chiappinelli 等^[23]发现在病毒感染时胞质双链 RNA (dsRNA) 表达上调, 并触发干扰素 I 型反应。HMA 通过上调 ERV, 激活干扰素 I 型通路逆转免疫逃避治疗肺癌^[24]。Roulois 等^[7]认为在结肠癌细胞中也存在基于 RNA 传感蛋白的 dsRNA 传感系统。本研究验证了地西他滨介导的 7 个内源性逆转录病毒序列的诱导上调, 触发“病毒模拟”。

综上所述, 表观遗传可塑性不是关键驱动因子基因的突变导致癌症侵袭性, 而是通过表观遗传调控^[25]。这些效应在泌尿系统肿瘤模型中被破坏并部分逆转, 在地西他滨联合 GSK126 治疗后, 减缓膀胱癌细胞增殖, 并增强免疫应答, 为表观遗传学治疗的概念提供了理论依据。DNA 甲基化与组蛋白修饰双重表观遗传调节, 以及 ERV 转录诱导的“病毒模拟”免疫应答作用^[26], 有助于靶向表观遗传可塑性的进一步研究, 并作为阻碍膀胱癌抵抗和进展的潜在手段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sharma S, Kelly T K, Jones P A. Epigenetics in cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(1): 27-36.
- [2] Xu R, Lin S K, Xin J, et al. DNA methylation-based biomarkers in urological cancers [J]. *Inf Technol J*, 2013, 12(17): 4289-4297.

- [3] Xin J, Xu R, Lin S, *et al.* Clinical potential of TCF21 methylation in the diagnosis of renal cell carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(2): 1265-1270.
- [4] 丁小明, 许 嵘, 张文州, 等. 膀胱尿路上皮癌中候选生物标志物转录因子 21 的甲基化机制及意义 [J]. 解剖学报, 2019, 50(5): 608-612.
- [5] Xu R, Xin J, Lin S, *et al.* Tumor suppressor gene 21, TCF21, is critically important for organogenesis and DNA methylation biomarker [A] // 2014 International Conference on Biological Engineering and Biomedical BEAB [C]. Yichang: DEStech Publications Inc., 2014.
- [6] Roulois D, Loo Yau H, Singhanian R, *et al.* DNA-demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts [J]. *Cell*, 2015, 162(5): 961-973.
- [7] 王 璐. 低剂量地西他滨与支持治疗对骨髓增生异常综合征低危患者预后的影响 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(8): 1572-1575.
- [8] Oki Y, Aoki E, Issa J P. Decitabine: bedside to bench [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 61(2): 140-152.
- [9] Bitler B G, Aird K M, Garipov A, *et al.* Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers [J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 231-238.
- [10] Okemoto K, Kasai K, Wagner B, *et al.* DNA demethylating agents synergize with oncolytic HSV1 against malignant gliomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 5952-5959.
- [11] 许 嵘, 张文州, 辛 军, 等. DNA 去甲基化药物的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(1): 158-164.
- [12] 许 嵘, 张文州, 陈琳琳, 等. DNA 去甲基化药物作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(1): 152-157.
- [13] Baylin S B, Jones P A. Epigenetic determinants of cancer [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(9): a019505.
- [14] Avgustinova A, Benitah S A. The epigenetics of tumour initiation: Cancer stem cells and their chromatin [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2016, 36: 8-15.
- [15] Liao B B, Sievers C, Donohue L K, *et al.* Adaptive chromatin remodeling drives glioblastoma stem cell plasticity and drug tolerance [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(2): 233-246.
- [16] Cowan L A, Talwar S, Yang A S. Will DNA methylation inhibitors work in solid tumors? A review of the clinical experience with azacitidine and decitabine in solid tumors [J]. *Epigenomics*, 2010, 2(1): 71-86.
- [17] Pandiyan K, You J S, Yang X, *et al.* Functional DNA demethylation is accompanied by chromatin accessibility [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(7): 3973-3985.
- [18] Lay F D, Liu Y, Kelly T K, *et al.* The role of DNA methylation in directing the functional organization of the cancer epigenome [J]. *Genome Res*, 2015, 25(4): 467-477.
- [19] Charlet J, Duymich C E, Lay F D, *et al.* Bivalent regions of cytosine methylation and H3K27 acetylation suggest an active role for DNA methylation at enhancers [J]. *Mol Cell*, 2016, 62(3): 422-431.
- [20] Jadhav U, Nalapareddy K, Saxena M, *et al.* Acquired tissue-specific promoter bivalency is a basis for PRC2 necessity in adult cells [J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1389-1400.
- [21] Ernst T, Chase A J, Score J, *et al.* Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(8): 722-726.
- [22] Liu X, Wu Q, Li L. Functional and therapeutic significance of EZH2 in urological cancers [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 38044-38055.
- [23] Chiappinelli K B, Strissel P L, Desrichard A, *et al.* Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses [J]. *Cell*, 2016, 164(5): 1073.
- [24] Topper M J, Vaz M, Chiappinelli K B, *et al.* Epigenetic therapy ties MYC depletion to reversing immune evasion and treating lung cancer [J]. *Cell*, 2017, 171(6): 1284-1300.
- [25] Xu T, Li H T, Wei J, *et al.* Epigenetic plasticity potentiates a rapid cyclical shift to and from an aggressive cancer phenotype [J]. *Int J Cancer*, 2020, 146(11): 3065-3076.
- [26] Dear A E. Epigenetic modulators and the new immunotherapies [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(7): 684-686.

[责任编辑 刘东博]