

S-腺苷蛋氨酸对 VEGF-C 表达及胃癌生长的影响^{*}

张永斌¹, 达明绪^{2△}, 姚继彬², 段耀星²

1. 宁夏医科大学临床医学院(银川 750004); 2. 甘肃省人民医院 肿瘤外科(兰州 730000)

【摘要】目的 通过观察 S-腺苷蛋氨酸(SAM)对胃癌细胞(MGC803、SGC7901 细胞株)、裸鼠移植瘤生长的影响,以及对胃癌细胞株血管内皮生长因子-C(VEGF-C)表达及甲基化状态的影响,探讨其抗肿瘤效应及可能机制。**方法** 体外采用 MTT 法检测不同浓度 SAM(终浓度 0.5、1、2、4、8、16 mmol/L)对胃癌细胞增殖的影响;亚硫酸氢盐基因组测序法(BGS)检测 SAM 对胃癌细胞株 VEGF-C 基因启动子序列甲基化状态的影响;Western blot 检测 SAM(2、4 mmol/L)对胃癌细胞 VEGF-C 蛋白表达的影响。体内建立人胃癌裸鼠移植瘤模型,实验组给予 SAM [192 μmol/(kg·d)、768 μmol/(kg·d)]腹腔注射,对照组给予等量生理盐水腹腔注射,1 次/d,15 d 后检测肿瘤体积变化。**结果** SAM 处理 MGC803、SGC7901 细胞后,随药物浓度增大,细胞增殖受到明显抑制($P<0.05$);VEGF-C 基因在 MGC803、SGC7901 细胞中呈高度去甲基化状态,经 SAM 处理后其甲基化程度增高,VEGF-C 蛋白表达降低。SAM 对人胃癌裸鼠移植瘤的生长有明显的抑制作用,移植瘤体积减小,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** SAM 可以改变胃癌细胞株 MGC803 和 SGC7901 中 VEGF-C 启动子序列的低甲基化状态,抑制其蛋白表达,抑制胃癌的生长。

【关键词】 S-腺苷蛋氨酸 血管内皮生长因子-C 甲基化 胃癌

S-Adenosylmethionine Inhibits Expression of Vascular Endothelial Growth Factor-C Protein and Cellular Proliferation in Gastric Cancer ZHANG Yong-bin¹, DA Ming-xu^{2△}, YAO Ji-bin², DUAN Yao-xing². 1. Clinical Medicine College, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Department of Surgical Oncology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China

△ Corresponding author, E-mail: hxdamingxu@hotmail.com

【Abstract】Objective To explore inhibitory effects of S-adenosylmethionine on vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) protein and cellular proliferation in gastric cancer by regulating methylation status of VEGF-C promoter. **Methods** MTT analyses and nude mice model were employed to examine the effects of S-adenosylmethionine on inhibiting gastric cancer growth *in vitro* and *in vivo*. The protein expression of VEGF-C in gastric cancer cells was assessed by Western blot. The methylation status of VEGF-C promoter was assessed by bisulfite genomic DNA sequencing analysis. **Results** VEGF-C promoter was hypomethylated in MGC803 and SGC7901. The treatment of S-adenosylmethionine resulted in a heavy hypermethylation of VEGF-C promoter, which consequently down regulated protein level of VEGF-C. S-adenosylmethionine effectively inhibited the growth of gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo* ($P<0.05$). **Conclusion** S-adenosylmethionine can effectively reverse DNA hypomethylation on VEGF-C promoter which down-regulates VEGF-C protein expression and inhibit gastric cancer growth.

【Key words】 S-adenosylmethionine VEGF-C Methylation Gastric cancer

胃癌是全世界最常见的消化道恶性肿瘤^[1],近年来研究发现,其发生发展机制不仅涉及基因的突变和缺失,还包括以 DNA 甲基化为代表的表观遗传学改变^[2]。DNA 甲基化在调节肿瘤相关基因表达方面所起的作用已逐渐被人们重视^[3-5]。S-腺苷蛋氨酸(SAM)作为生物体内一种主要的甲基供

体^[6],其在细胞内的含量直接影响着 DNA 的甲基化水平^[7]。目前,SAM 已应用于抗肿瘤研究^[8,9]。本研究通过用 SAM 作用于人胃癌细胞系及裸鼠移植瘤模型,观察 SAM 对胃癌生长的影响,并研究血管内皮生长因子-C(VEGF-C)基因启动子区甲基化状态以及蛋白表达的变化,从而探讨 SAM 可能的抗肿瘤机制。

1 材料与方法

1.1 材料

^{*} 国家自然科学基金(No. 30960371)和甘肃省卫生行业科研计划项目(No. GSWST-09-11)资助

△ 通讯作者, E-mail: hxdamingxu@hotmail.com

人胃癌细胞株 MGC803、SGC7901 购于中科院上海生物科学研究所。BALB/c 裸鼠购于中国科学院上海实验动物中心。SAM、VEGF-C 兔抗人多克隆抗体、氢醌和亚硫酸氢钠(NaHSO_3)购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 胃癌细胞复苏培养 MGC803、SGC7901 细胞贴壁生长于含 10% 胎牛血清及青、链霉素各 100 U/mL 的 RPMI1640 中,在 37 °C、含 5% CO_2 的恒温密闭式培养箱中培养。在细胞传代 24 h 后,随机选取两个细胞株中的部分细胞,进行实验。

1.2.2 SAM 对胃癌细胞增殖的影响 采用 MTT 实验检测细胞的增殖。取对数生长期的 MGC803、SGC7901 细胞,经 0.25% 胰蛋白酶消化,用含 10% 胎牛血清的培养液制成浓度为 2.5×10^4 /mL 的细胞悬液接种于 96 孔板中,每孔加 200 μL 。待 24 h 细胞贴壁后,每孔加入终浓度分别为 0.5、1、2、4、8、16 mmol/L 的 SAM 培养液,以只加细胞和培养液的孔作为阴性对照,只加培养液的孔作为空白对照,每组均设 3 个复孔。在 24 h、48 h、72 h 各时间点分别随机取一板。加入 MTT(5 mg/mL)20 μL ,37 °C 孵育 4 h 后弃上清,再加入 DMSO 150 μL ,于微型振荡器上震荡 10 min 后,在酶标仪 492 nm 处检测各孔吸光度值(A 值),按常规计算细胞增殖率及半数抑制浓度(IC_{50})。实验重复 3 次。

1.2.3 亚硫酸氢盐基因组测序(BGS) 收集对照组和 2、4 mmol/L SAM(低、高剂量组,由 MTT 法得出 SAM 对 MGC803、SGC7901 两种细胞的 IC_{50} 分别为 4.12 mmol/L、4.56 mmol/L)组作用 3 d 后的 MGC803、SGC7901 细胞,常规酚-氯仿-异戊醇法提取细胞 DNA。紫外分光光度法检测 DNA 浓度和纯度。向 2 μg DNA 中加入 5.5 μL 新鲜配制的 3 mol/L NaOH,42 °C 水浴 30 min 后加入 10 mmol/L 氢醌及 520 μL 3.6 mol/L NaHSO_3 至上述水浴后溶液中。PCR 仪上进行 55 °C 15 min,95 °C 30 s,共 20 个循环。甲基化上游引物 5'-GAATATYGYGGGTGTTTTGGT-3',甲基化下游引物 5'-ATCCRCTAACRAAAACAAAAATAAAAAC-3',350 bp(引物的设计、合成均由上海生工生物工程公司完成)。以碱基修饰后的 DNA 为模板,PCR 扩增,反应条件为 98 °C 预变性 4 min;94 °C 45 s,66 °C 45 s,72 °C 1 min,20 个循环;94 °C 45 s,56 °C 45 s,72 °C 1 min,20 个循环;72 °C 延伸 8 min。30 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察

结果。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒纯化,与 pUC18-T 载体连接,连接产物转化后进行蓝白筛选,分别挑取 5 个克隆测序(上海生工生物工程公司完成)。

1.2.4 SAM 对胃癌细胞 VEGF-C 表达的影响

采用 Western blot 检测。收集对照组和低、高剂量 SAM 组作用 3 d 后的 MGC803、SGC7901 细胞,加入裂解液,提取总蛋白,变性 10 min 后于 100 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳,后转移至 PVDF 膜,10% 脱脂奶粉封闭 1 h,置于 1:200 比例兔抗人 VEGF-C 抗体,在 4 °C 下过夜,再置于 1:2 000 比例二抗中孵育 2 h,DAB 显色,用凝胶成像仪拍照并测定各显色条带的灰度值,以对照组条带与 β -actin 灰度值的比值为 1,计算目的蛋白的相对表达量。

1.2.5 人胃癌裸鼠移植瘤模型的建立 6 周龄雄性裸鼠生长于无特定病原体(specific pathogen free, SPF)实验室环境中,裸鼠用灭菌的小鼠饲料喂养,饮用无菌水。实验协议由甘肃省人民医院动物护理与伦理委员会批准。将预先培养的对数增长期 MGC803、SGC7901 细胞消化后悬浮于 PBS 中,用含 5×10^7 /mL 细胞的 PBS 液 200 μL 分别注射于雄性裸鼠右肋皮下。7 d 后选取两种细胞皮下肿瘤长至 60 mm^3 以上的裸鼠各 24 只,随机分为 SAM 低[192 $\mu\text{mol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]、高[768 $\mu\text{mol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]剂量实验组和对照组。按裸鼠体重质量计算,实验组给予 SAM 腹腔注射,对照组给予等量生理盐水腹腔注射,1 次/d,共 15 d,第 16 d 处死裸鼠。用游标卡尺测量肿瘤长径(a)和短径(b),并计算其体积($V = a \times b^2 / 2$)。

1.2.6 统计学方法 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组之间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnett- t 检验。 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 SAM 对细胞增殖的影响

经 SAM 处理后,MGC803 和 SGC7901 细胞的增殖活性明显抑制,随 SAM 药物浓度的增加其抑制作用逐渐增大,各 SAM 组与阴性对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 SAM 对 VEGF-C 启动子序列甲基化状态的影响

BGS 结果显示,VEGF-C 启动子序列的 38 个 CpG 岛呈高度去甲基化状态。在 2、4 mmol/L SAM 作用于胃癌细胞株 MGC803、SGC-7901 3 d 后,其启动子序列的甲基化程度逐渐升高。见图 2。

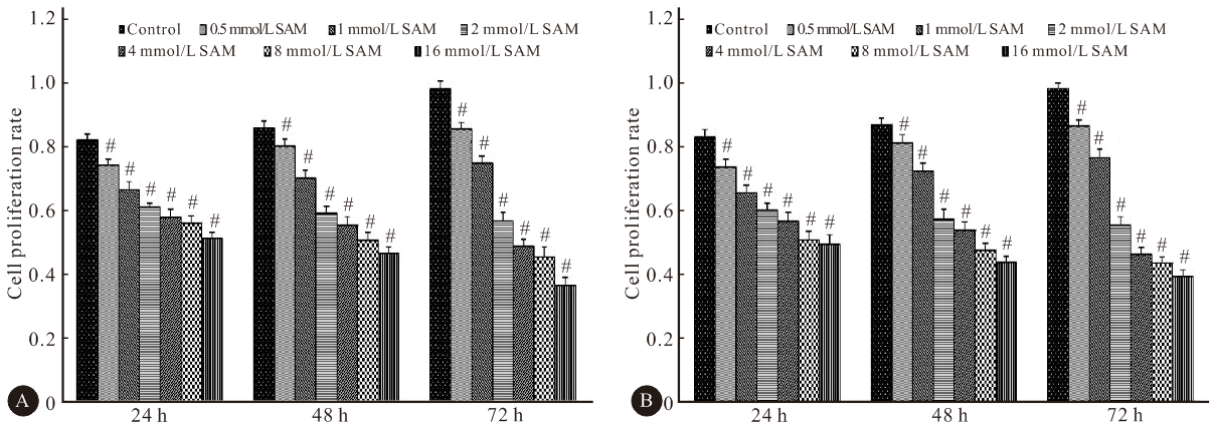


图 1 MTT 检测不同浓度 SAM 对细胞增殖的影响

Fig 1 The effect of SAM on cell growth in different concentration measured by MTT

A: MGC803 cells; B: SGC7901 cells. # $P < 0.05$, vs. control group

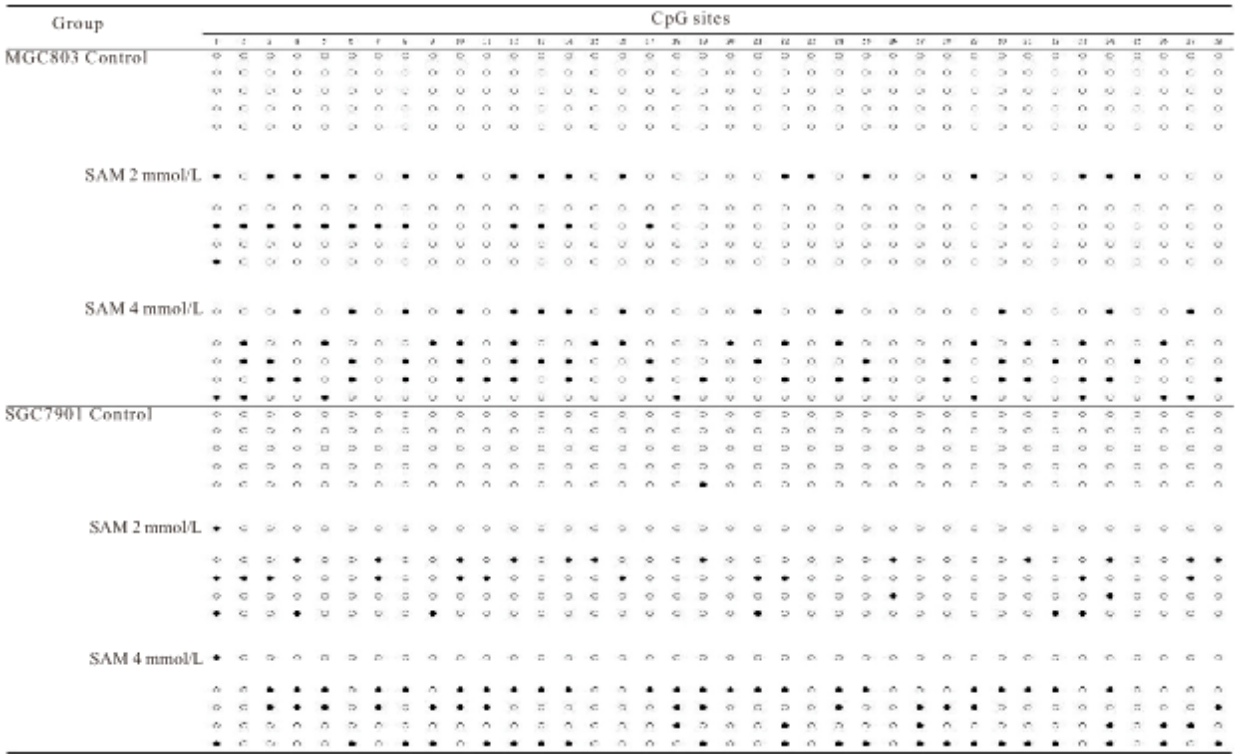


图 2 BGS 法检测 VEGF-C 基因启动子 CpG 位点甲基化状态

Fig 2 Methylation status of GpG sites in the promoter regions of VEGF-C before and after SAM treatment measured by bisulfite genomic DNA sequencing analysis

VEGF-C had 38 CpG sites. ●: Methylation; ○: Demethylation

2.3 SAM 对 VEGF-C 蛋白表达的影响

由图 3 可见,2、4 mmol/L SAM 作用于胃癌细胞株后,VEGF-C 蛋白表达均减弱〔MGC803 细胞 VEGF-C 蛋白相对表达量为(0.170 4±0.000 2)、(0.035 9±0.000 1);SGC7901 细胞为(0.183 4±0.000 2)、(0.060 7±0.000 3)],与对照组比较〔(MGC803 为(0.221 6±0.000 6);SGC7901 为

(0.258 4±0.000 4)]差异有统计学意义($P < 0.05$)。SAM 高、低浓度组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 SAM 对人胃癌裸鼠移植瘤生长的影响

裸鼠腹腔注射 SAM 后,移植瘤体积明显减小。MGC803 组裸鼠移植瘤的体积〔SAM 低剂量组(129.19±112.45) mm³,高剂量组(102.20±

48.25) mm³] 小于对照组的体积 [(819.95 ± 375.95) mm³, *P* 均<0.05]。SGC7901 组裸鼠移植瘤体积 [SAM 低剂量组为 (259.26 ± 34.19) mm³, 高剂量组为 (68.39 ± 46.54) mm³] 小于对照组 [(1 234.20 ± 354.58) mm³, *P* 均<0.05]。SAM 低、高剂量组间差异无统计学意义 (*P*>0.05)。

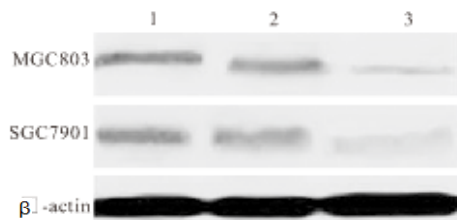


图 3 Western blot 检测 VEGF-C 蛋白的表达

Fig 3 Western blot analysis of VEGF-C protein

1: Control group; 2: SAM 2 mmol/L group; 3: SAM 4 mmol/L group

3 讨论

SAM 是人体内甲基化反应的甲基供体,由腺苷蛋氨酸合成酶催化三磷酸腺苷和蛋氨酸合成。近年来的研究发现,SAM 作为细胞内一种促甲基化试剂,可以导致 DNA 的甲基化,从而沉默癌基因的表达,抑制肿瘤的生长^[10]。本实验在体内、体外两方面研究了 SAM 对胃癌生长的影响。MTT 结果显示,经 SAM 处理后,不同分化程度的人胃癌细胞 MGC803、SGC7901 的增殖活性有明显抑制;在裸鼠腹腔注射 SAM 后,移植瘤的体积明显减小。

近年来,DNA 甲基化修饰在肿瘤的发生发展过程中所起到的作用已逐渐被人们所重视,成为肿瘤基础研究的一个热点领域。早期的甲基化研究主要集中在相关基因启动子的高甲基化以及使用去甲基化药物来逆转这种高甲基化状态^[11-13]。随着更进一步的研究发现,在肿瘤的发生发展过程中基因组整体甲基化水平降低,且其低甲基化程度与恶性程度有正比关系^[14],这种低甲基化水平导致了基因的不稳定和转位子插入突变几率的增加^[15,16]。有学者发现,肿瘤特异性抗原(MAGE)基因^[17]和 synuclein γ 基因^[18]的低甲基化与胃癌的淋巴结转移有关;去甲基化制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷可以激活尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)的表达从而使非转移性乳腺癌细胞转变为高侵袭性癌细胞^[19]。因此,逆转基因组的低甲基化状态,促进癌基因的重新甲基化,为抑制癌基因表达从而抑制肿瘤细胞的生

长及转移提供了新的思路。在本实验中,我们发现胃癌细胞株 MGC803、SGC7901 中 VEGF-C 基因启动子序列的 38 个 CpG 岛呈高度去甲基化状态,而这一去甲基化状态被认为与其在胃癌中的过表达有关^[20]。在使用促甲基化试剂 SAM 作用于这两种分化程度不同的胃癌细胞后,这种去甲基化状态发生了明显的改变,甲基化程度明显增高,VEGF-C 蛋白的表达量也随之降低。

目前,VEGF-C 被认为是介导肿瘤发生发展的一种新因子^[21],它在包括胃癌在内的很多肿瘤中都有表达,且与患者不良预后有关^[22-24]。已有很多实验证实,抑制 VEGF-C 的表达可以抑制肿瘤的生长;VEGF-C RNA 干扰慢病毒可以抑制 VEGF-C 的表达,从而抑制乳腺癌裸鼠移植瘤的生长^[25];重组质粒 pCI-neo-anti VEGF-C 转染人胃癌细胞株 SGC7901 后,VEGF-C 的表达下降且细胞的增殖被抑制^[26]。在我们前期的研究中发现^[27],VEGF-C-shRNA 可以成功抑制 VEGF-C 的表达和胃癌裸鼠移植瘤的生长。本实验中,SAM 抑制了胃癌细胞 MGC803 和 SGC7901 中 VEGF-C 蛋白的表达,同时体内、体外实验证实 SAM 可以抑制胃癌的生长,提示 VEGF-C 表达的抑制在 SAM 抗肿瘤效应中很可能起到关键作用,为胃癌的药物治疗提供了一个新的研究思路。

参 考 文 献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al*. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*,2005;55(2):74-108.
- 2 Rashid A, Issa JPJ. CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: a maturing field. *Gastroenterology*,2004;127(5):1578-1588.
- 3 Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*,2006;6(2):107-116.
- 4 Bhutani N, Brady JJ, Damian M, *et al*. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature*,2009;463(7284):1042-1047.
- 5 Laird PW. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nat Rev Cancer*,2010;11(3):191-203.
- 6 Lu SC, Mato JM. Role of methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in alcohol-associated liver cancer. *Alcohol*,2005;35(3):227-234.
- 7 Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, *et al*. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*,1992;69(6):905-914.
- 8 Ramani K, Yang H, Kuhlenkamp J, *et al*. Changes in the

- expression of methionine adenosyltransferase genes and S-adenosylmethionine homeostasis during hepatic stellate cell activation. *Hepatology*,2010;51(3):986-995.
- 9 Luka Z, Mudd SH, Wagner C. Glycine N-methyltransferase and regulation of S-adenosylmethionine levels. *J Biol Chem*, 2009;284(34):22507-22511.
- 10 Luo J, Li YN, Wang F, *et al*. S-adenosylmethionine inhibits the growth of cancer cells by reversing the hypomethylation status of c-myc and H-ras in human gastric cancer and colon cancer. *Int J Biol Sci*,2010;6(7):784-784.
- 11 Escoubet-Lozach L, Lin IL, Jensen-Pergakes K, *et al*. Pomalidomide and lenalidomide induce p21WAF-1 expression in both lymphoma and multiple myeloma through a LSD1-mediated epigenetic mechanism. *Cancer Res*, 2009; 69(18): 7347-7356.
- 12 Majid S, Dar AA, Ahmad AE, *et al*. BTG3 tumor suppressor gene promoter demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer. *Carcinogenesis*,2009; 30(4):662-670.
- 13 McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res*,2009;15(12):3927-3937.
- 14 Ehrlich M. DNA methylation in cancer; too much, but also too little. *Oncogene*,2002;21(21):5400-5413.
- 15 Choi JY, James SR, Link PA, *et al*. Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. *Carcinogenesis*,2009;30(11):1889-1897.
- 16 Richards KL, Zhang B, Baggerly KA, *et al*. Genome-wide hypomethylation in head and neck cancer is more pronounced in HPV-negative tumors and is associated with genomic instability. *PLoS One*, 2009; 4(3): e4941. doi: 10.1371/journal.pone.0004941.
- 17 Honda T, Tamura G, Waki T, *et al*. Demethylation of MAGE promoters during gastric cancer progression. *Br J Cancer*, 2004;90(4):838-843.
- 18 Yanagawa N, Tamura G, Honda T, *et al*. Demethylation of the synuclein γ gene CpG island in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines. *Clin Cancer Res*,2004;10(7):2447-2451.
- 19 Guo Y, Pakneshan P, Gladu J, *et al*. Regulation of DNA methylation in human breast cancer. Effect on the urokinase-type plasminogen activator gene production and tumor invasion. *J Biol Chem*,2002;277(44):41571-41579.
- 20 Matsumura S, Oue N, Mitani Y, *et al*. DNA demethylation of vascular endothelial growth factor-C is associated with gene expression and its possible involvement of lymphangiogenesis in gastric cancer. *Int J Cancer*,2007;120(8):1689-1695.
- 21 Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, *et al*. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood*,2007;109(3):1010-1017.
- 22 Da MX, Wu XT, Wang J, *et al*. Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor-C correlates with lymphangiogenesis and lymphatic invasion in human gastric cancer. *Arch Med Res*,2008;39(1):92-99.
- 23 Liu L, Ma XL, Xiao ZL, *et al*. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in resected gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*,2012;13(13):3089-3907.
- 24 He W, Tang B, Yang D, *et al*. Double-positive expression of high-mobility group box 1 and vascular endothelial growth factor C indicates a poorer prognosis in gastric cancer patients. *World J Surg Oncol*,2013 Jul 18;11:161. doi: 10.1186/1477-7819-11-161.
- 25 Guo B, Zhang Y, Luo G, *et al*. Lentivirus-mediated small interfering RNA targeting VEGF-C inhibited tumor lymphangiogenesis and growth in breast carcinoma. *Anat Rec*, 2009;292(5):633-639.
- 26 Zhu P, Zhang J, Chen Q, *et al*. Expression of vascular endothelial growth factor-C in gastric carcinoma and the effect of its antisense gene transfection on the proliferation of human gastric cancer cell line SGC-7901. *Am J Sur*,2012;204(1):78-83.
- 27 Yao JB, Da MX, Guo TK, *et al*. RNAi-mediated gene silencing of vascular endothelial growth factor-C inhibits tumor lymphangiogenesis and growth of gastric cancer *in vivo* in mice. *Tumor Biol*,2013;34(3):1493-1501.

(2014-05-12 收稿,2014-12-28 修回)

编辑 沈进