

5-杂氮-2'-脱氧胞苷诱导鼻咽癌细胞株Syk 基因启动子去甲基化的研究

金巧智¹ 鄢 冲¹ 陶宝鸿² 李志海² 蔡志毅^{2*}

(¹温州医学院第一临床医学院, 温州 325000; ²浙江省台州市立医院耳鼻咽喉-头颈外科, 台州 318000)

摘要 利用5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-CdR)处理体外培养的鼻咽癌细胞株CNE-1、CNE-2及永生化非癌性人鼻咽上皮细胞株NP-69, 采用BS-PCR、Q-RT-PCR及Western blot方法分别检测经5 μ mol/L的5-aza-CdR处理前后, 各细胞株中Syk基因启动子甲基化状况及Syk mRNA和蛋白质表达情况。探讨去甲基化药物5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-aza-CdR)对鼻咽癌细胞株中脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)启动子甲基化水平及其表达的影响。结果显示, Syk基因启动子甲基化水平与鼻咽癌细胞分化程度呈负相关, 两种鼻咽癌细胞株的Syk mRNA和蛋白质表达水平显著低于NP-69细胞($P<0.01$); 经5-aza-CdR处理后两种鼻咽癌细胞株的Syk基因启动子甲基化水平降低, Syk mRNA及蛋白质表达升高($P<0.05$); 高分化鼻咽癌细胞株对药物敏感性高于低分化鼻咽癌细胞株($P<0.01$)。由此可见, 两种鼻咽癌细胞株中存在不同程度的Syk基因启动子甲基化状态, 5-aza-CdR能有效逆转鼻咽癌细胞株Syk基因启动子的甲基化状态, 升高Syk mRNA及蛋白质表达, 同时鼻咽癌细胞分化程度越高恢复Syk基因表达的比率越高。

关键词 鼻咽癌; 去甲基化; 5-杂氮-2'-脱氧胞苷; Syk基因

脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)是一种非受体酪氨酸激酶, 其编码基因为Syk, 位于人类染色体9q22, 蛋白质分子量为72 $\times 10^3$ kDa, 由629个氨基酸组成。它的表达与多种细胞功能及恶性肿瘤播散、发病机制密切相关, 是控制细胞生理功能的关键分子^[1], 近年来, 大量研究表明, Syk基因在多种恶性肿瘤中存在表达减少或者缺失, 启动子甲基化能抑制Syk基因表达从而导致肿瘤的发生^[2-3], 在胃癌^[4]、宫颈癌^[5]及肺癌^[6]等中发现, Syk基因启动子CpG岛中存在甲基化, 由此推断Syk基因启动子的甲基化有可能是其基因沉默的一种机制。

虽然DNA甲基化在功能上与DNA突变一样可导致基因功能失活。但不同于基因突变或缺失, DNA甲基化修饰是可逆的, 应用甲基转移酶抑制剂5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-CdR)可逆转DNA甲基化, 使甲基化沉默的基因重新表达^[7]。5-aza-CdR是一种DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)抑制剂, 与DNA结合后抑制DNMT活性, 从而降低甲基化水平, 使因启动子甲基化而沉默的基因重新表达^[8-9], 在治疗肿瘤中起到重要作用。它也是第一个被美国FDA批准上市治疗

恶性肿瘤的去甲基化药物, 在发达国家已被广泛应用于临床^[10]。5-aza-CdR运用在乳腺癌、肺癌、膀胱癌等体外培养的肿瘤细胞系中, 逆转了*Rb*、*VHL*、*p15*、*p16*、*E-cadherin*和*APC*等多个抑癌基因启动子的甲基化状态, 使不同的抑癌基因得以重新表达, 进而有效地抑制了肿瘤的进展。

本研究通过去甲基化药物5-aza-CdR处理的永生化非癌性人鼻咽上皮细胞株NP-69-SV40T(简称NP-69)及其他鼻咽癌细胞株, 观察经去甲基化处理后各细胞株Syk基因启动子CpG岛的甲基化状态及其与Syk mRNA和蛋白质表达水平之间的关系, 探讨去甲基化处理对NP-69和鼻咽癌细胞株Syk基因表达的影响及意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 高分化鼻咽癌细胞株CNE-1、低

收稿日期: 2012-04-26 接受日期: 2012-06-07

台州市科技计划(No.08KY23)和台州学院青年基金(No.2011-QN31)资助项目

*通讯作者。Tel: 0576-88858023, E-mail: caizy008@tom.com

分化鼻咽癌细胞株CNE-2及NP-69由赢润生物科技有限公司从ATCC公司代购。

1.1.2 试剂 5-aza-CdR购自Sigma公司; 核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)抽提试剂盒Trizol和keratinocyte-sfm培养基购自Invitrogen公司; 兔抗人Syk多克隆抗体、兔抗人 β -actin单克隆抗体购自Cell Signaling公司; EZ DNA Methylation-Gold™ Kit购自ZYMO Research公司; 2×Taq PCR MasterMix购自Tiangen公司; DL 2 000 DNA Marker和pMD19-T购自TaKaRa公司; 质粒提取试剂盒购自Axygen公司; Q-RT-PCR试剂盒购自碧云天生物技术研究; 小牛血清和RPMI-1640培养基、DNA抽提试剂盒(Genomic DNA purification kit)及DNA纯化试剂盒、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗、蛋白质含量测定试剂盒均购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与药物处理 NP-69细胞接种于不含血清的keratinocyte-sfm培养液中, 鼻咽癌细胞株接种于含10 mL/L小牛血清、 1×10^5 U/L青霉素及 1×10^5 U/L链霉素的RPMI1640培养液中(pH7.2), 在37 °C、含5% CO₂、湿润空气的恒温密闭式培养箱中培养, 经胰蛋白酶消化后按每瓶 3×10^4 接种于25 cm²培养瓶中, 待细胞贴壁后在培养液中加入5-aza-CdR, 终浓度为5 μ mol/L, 每24 h更换培养液, 72 h后收集细胞。

1.2.2 重亚硫酸氢盐测序 PCR(bisulfite sequencing PCR, BS-PCR)检测Syk基因启动子甲基化状态 在GenBank检索人类Syk基因序列, 以转录起始点上游1 000 bp为启动子区域, 延伸至转录起始点下游200 bp为研究对象, 采用MethPrimer设计BS-PCR引物: 上游引物为: 5'-AGT TTG TTG GTT TGG TGA TTA A-3', 下游引物为: 5'-CCC ATA AAC CCR AAA CTA AA-3', 扩增产物长度为331 bp, 含有25个CG位点。按照试剂盒说明提取总DNA, 重亚硫酸盐将未甲基化胞嘧啶(cytosine, C)转化为胸腺嘧啶(thymine, T)。BS-PCR总反应体系为50 μ L, 甲基化修饰后的DNA 5 μ L。BS-PCR反应条件: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性30 s, 57 °C

退火30 s, 72 °C延伸30 s, 循环42个周期后72 °C延伸10 min结束。BS-PCR产物采用TA克隆方法连接到pMD19-T质粒, 连接体系为: pMD19-T 1 μ L、PCR回收产物4 μ L、Solution I 5 μ L。将连接产物转化至DH5 α 感受态细胞, 挑选10个阳性克隆测序, 每个样本重复三次, 测序结果采用BiQ Analyzer分析。

1.2.3 实时荧光定量PCR(quantitative real time fluorescence polymerase chain reaction, Q-RT-PCR)检测Syk mRNA的表达 按Trizol说明书中步骤提取各实验细胞株的总RNA, 取得的RNA在紫外分光光度计下测 D_{260}/D_{280} , 比值在1.8~2.1, 符合纯度要求。利用琼脂糖凝胶电泳测18S和28S, 检测其完整性; 反转录反应(20 μ L反应体系): 分别取各细胞株2 μ L RNA, 各加10×RT mix、Oligo-dT15和dNTP混合液2 μ L及Quant Reverse Transcriptase 1 μ L, 再加RNase Free ddH₂O至终体积20 μ L, 于37 °C孵育60 min; 采用SYBR Green荧光染料, 参照试剂盒说明完成Q-RT-PCR, 20 μ L反应体系包括: 2.5×Real Master Mix/20×SYBR solution混合反应液9 μ L、cDNA溶液2 μ L、上下游引物(100 nmol/L)各2 μ L, 再加ddH₂O至终体积20 μ L, 每个样本重复10次。记录各个细胞株CT值, 取平均值。结果采用相对定量(comparative delta-delta Ct)法计算, 引物序列见表1。

1.2.4 Western blot检测Syk蛋白的表达 将培养的细胞用预冷的PBS漂洗两次后加入200 μ L预冷的RIPA裂解液, 4 °C放置10 min, 然后在4 °C下12 000 r/min离心15 min, 取上清, 用BCA法测蛋白质浓度。将样品(含40 μ g蛋白)加入4×SDS凝胶加样缓冲液, 100 °C变性10 min, 顺序加样, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(10%分离胶, 5%浓缩胶)分离后转移至PVDF膜(正电荷尼龙膜)上, 经5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 一抗4 °C孵育过夜, 二抗室温孵育1 h, 经增强发光法发光, X线胶片显影。每个样本重复3次。实验中检测 β -actin蛋白表达水平作为内参照, 利用图像分析软件Gel-Pro Analyzer 4.0对X线胶片上的条带进行吸光度值分析, 以Syk蛋白条带与 β -actin蛋白条

表1 Syk和 β -actin基因引物序列

Table 1 The primer sequences of Syk and β -actin

基因	上游引物	下游引物	产物长度	退火条件
Gene name	Forward primer	Reverse primer	Product size	Annealing condition
Syk	5'-GGA ACT GTG AAA AAG GGC TA-3'	5'-CTG TGC ACA AAA TTG CTC TC-3'	332 bp	59 °C, 60 s
β -actin	5'-GCT CCG GCA TGT GCA A-3'	5'-AGG ATC TTC ATG AGG TAG T-3'	537 bp	58 °C, 60 s

带吸光度值的比值作为Syk蛋白表达的相对强度。

1.3 统计学分析

采用SPSS17软件进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两样本均数比较采用配对 t 检验; 多样本均数比较采用单因素方差分析; 不同细胞对药物的敏感性比较采用析因设计的方差分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

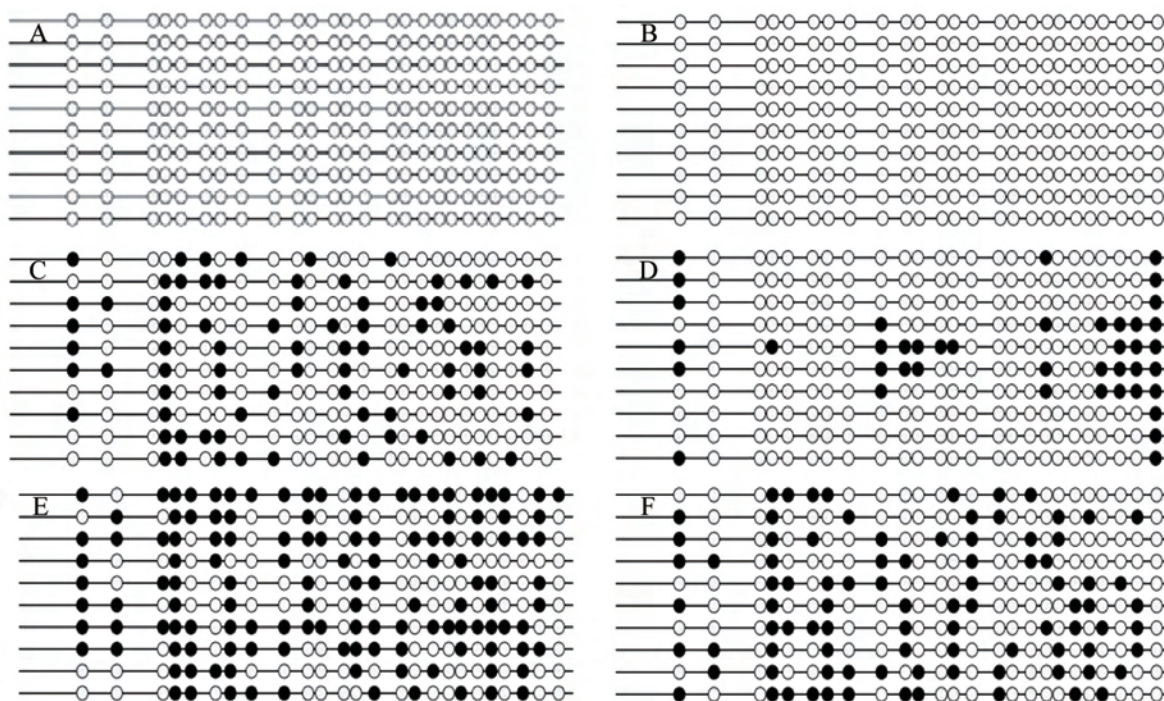
2.1 5-aza-CdR对各细胞株Syk基因启动子甲基化的影响

经5 $\mu\text{mol/L}$ 的5-aza-CdR处理后的细胞株作为处理组, 未经5-aza-CdR处理的细胞株作为对照组。BS-PCR检测结果见图1, 对照组和处理组细胞的Syk基因启动子甲基化率CNE-1分别为 $31.2\%\pm 1.2\%$ 和 $16.8\%\pm 2.3\%$ 、CNE-2分别为 $52.8\%\pm 1.6\%$ 和 $36.4\%\pm 1.9\%$, 各鼻咽癌处理组细胞的Syk基因启动子甲基化率与对照组相比存在显著差异($P<0.01$)。而

NP-69细胞在5-aza-CdR处理前后均未检测到Syk基因启动子的甲基化。

2.2 5-aza-CdR对各细胞株Syk mRNA表达的影响

各细胞株经5-aza-CdR处理前后Syk基因及内参照基因 $\beta\text{-actin}$ 的扩增曲线和熔解曲线见图2, 它们的PCR扩增效率恒定, 且均已达到平台期, 相应的阈值循环数(cycle threshold, CT)稳定, 重现性好; 它们的熔解曲线均为单峰特异, 引物的特异性好且无引物二聚体产生, 结果可靠, 故可以使用该体系对目的基因Syk进行检测, 结果采用相对定量方法 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算。各细胞株经5-aza-CdR处理前后的Syk基因和内参照 $\beta\text{-actin}$ 基因的阈值循环数(CT)见表2。Q-RT-PCR检测结果见图3, NP-69细胞的Syk mRNA的表达水平(NP-69的Syk mRNA按100%计算)明显高于两种鼻咽癌细胞株($P<0.01$), 并且高分化的鼻咽癌细胞(CNE-1)Syk mRNA表达水平也明显高于低分化的鼻咽癌细胞(CNE-2)($P<0.01$); 两种鼻咽癌细胞株经5-aza-CdR处理后Syk mRNA表达量与加药处理前相比显著提高($P<0.05$), 而在NP-69细胞株中Syk mRNA表达量的变

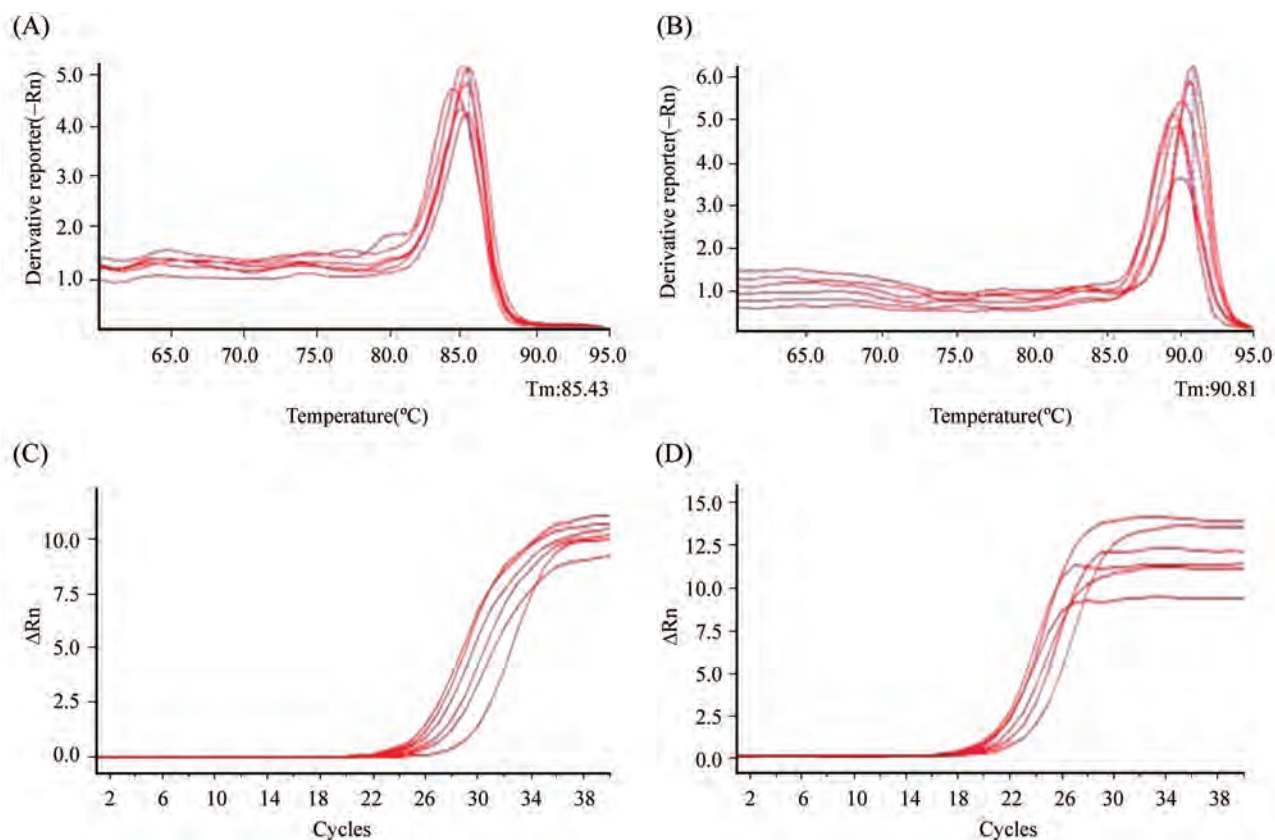


每一个圆圈代表一个CG, 黑色圆圈代表甲基化, 白色圆圈代表未甲基化。A: NP-69; B: NP-69经5-aza-CdR处理后; C: CNE-1; D: CNE-1经5-aza-CdR处理后; E: CNE-2; F: CNE-2经5-aza-CdR处理后。

Each circle represents a CG, black circles represent the methylation, white circles represent the unmethylation. A: NP-69 group; B: NP-69 treated with 5-aza-CdR; C: CNE-1 group; D: CNE-1 treated with 5-aza-CdR; E: CNE-2 group; F: CNE-2 treated with 5-aza-CdR.

图1 5-aza-CdR对鼻咽癌细胞株及NP-69细胞株的Syk基因启动子甲基化的影响

Fig.1 The effect of 5-aza-CdR on Syk promoter methylation in nasopharyngeal carcinoma and NP-69 cell lines



A: *Syk*溶解曲线; B: β -*actin*溶解曲线; C: *Syk*扩增曲线; D: β -*actin*扩增曲线。

A: *Syk* melting curves; B: β -*actin* melting curves; C: *Syk* amplification curves; D: β -*actin* amplification curves.

图2 鼻咽癌细胞株及NP-69细胞株经5-aza-CdR处理前后*Syk*和 β -*actin*基因的溶解曲线和扩增曲线

Fig.2 *Syk* and β -*actin* melting and amplification curves of NP-69 and nasopharyngeal carcinoma cell lines before and after treatment with 5-aza-CdR

表2 鼻咽癌细胞株及NP-69细胞株经5-aza-CdR处理前后*Syk*和 β -*actin*基因的CT值($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 2 *Syk* and β -*actin* CT values of NP-69 and nasopharyngeal carcinoma cell lines before and after treatment with 5-aza-CdR($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

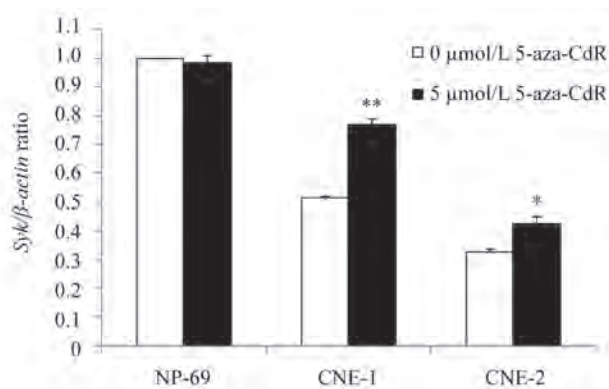
细胞株 Cell lines	<i>Syk</i> 基因 <i>Syk</i>		β - <i>actin</i> 基因 β - <i>actin</i>	
	0 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	0 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$
NP-69	26.38 $\pm$ 0.04	26.41 $\pm$ 0.01	21.29 $\pm$ 0.01	21.31 $\pm$ 0.02
CNE-1	28.44 $\pm$ 0.03	26.70 $\pm$ 0.04	22.35 $\pm$ 0.04	21.21 $\pm$ 0.07
CNE-2	29.89 $\pm$ 0.06	27.51 $\pm$ 0.02	23.17 $\pm$ 0.06	21.17 $\pm$ 0.03

化无明显差异($P>0.05$)。同时结果显示, 与对照组相比, 处理组CNE-1和CNE-2细胞的*Syk* mRNA表达水平分别升高25.8% $\pm$ 3.2%和9.7% $\pm$ 2.1%, 5-aza-CdR对提高高分化鼻咽癌细胞株*Syk* mRNA表达的影响大于低分化鼻咽癌细胞株($P<0.01$)。

2.3 5-aza-CdR对各细胞株*Syk*蛋白表达的影响

两种鼻咽癌细胞株和NP-69细胞株用5 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR处理72 h作为各自处理组, 未经药物处理的细胞株作为对照组。Western blot检测结果见

图4, 两种鼻咽癌细胞的*Syk*蛋白表达水平明显低于NP-69细胞($P<0.01$); 低分化的鼻咽癌细胞*Syk*蛋白表达明显低于高分化的细胞($P<0.01$); NP-69细胞株处理组与对照组相比, *Syk*蛋白表达量无明显变化($P>0.05$), 两种鼻咽癌细胞处理组与各自对照组相比, *Syk*蛋白表达量显著提高($P<0.01$); 与对照组相比, 处理组CNE-1和CNE-2细胞的*Syk*蛋白表达水平分别升高21.7% $\pm$ 5.1%和12.7% $\pm$ 1.5%, 5-aza-CdR对提高高分化鼻咽癌细胞*Syk*蛋白表达的影响大于低分化

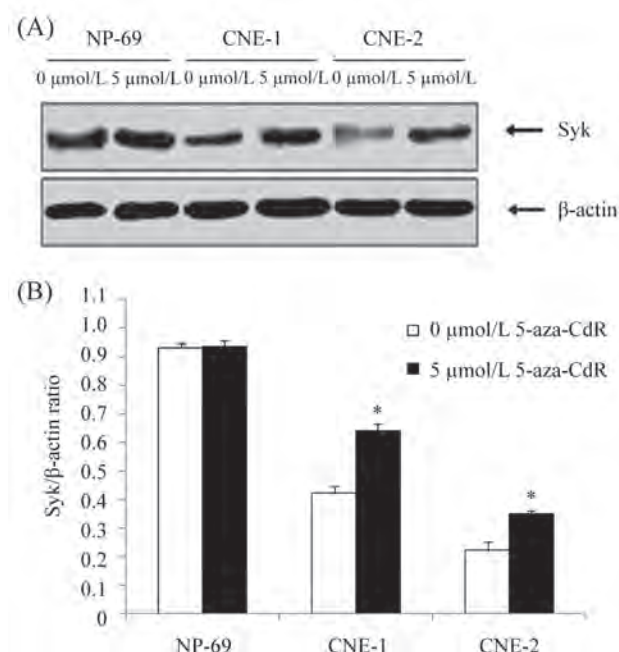


* $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR相比。

* $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR.

图3 5-aza-CdR对各细胞株Syk mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig.3 The effect of 5-aza-CdR on the expression of Syk mRNA in various cell lines($\bar{x} \pm s$, $n=10$)



* $P < 0.01$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR相比。A: 蛋白质印迹实验检测Syk蛋白的表达水平; B: 经5-aza-CdR处理前后Syk蛋白的相对表达量。

* $P < 0.01$ compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR. A: Western blot analysis for detection of the Syk protein level; B: the relative expression of Syk protein before and after treatment with 5-aza-CdR.

图4 5-aza-CdR对各细胞株Syk蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.4 The effect of 5-aza-CdR on the expression of Syk protein in various cell lines($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

鼻咽癌细胞株($P < 0.01$)。

3 讨论

大量研究表明, Syk基因在多种恶性肿瘤中存在

表达减少或者缺失。Bailet的研究认为, Syk基因的表达产物可通过促进细胞凋亡而抑制肿瘤生长, Syk基因在肿瘤中表达降低或缺失与肿瘤的发生、发展、侵袭迁移能力增加密切相关^[1]。Nakashima等^[4]研究发现, 早期胃癌中Syk基因的表达高于进展期胃癌, 有淋巴结转移组Syk基因表达低于无淋巴结转移者, Syk基因阳性患者的5年生存率明显高于Syk基因阴性者, 提示Syk蛋白表达缺失可能与胃癌的浸润和转移有关, 其表达缺失增加了胃癌的侵袭能力。Murphy等^[11]研究发现, 剔除小鼠的Syk基因将导致小鼠胰腺组织的增生、恶变。当Syk基因缺失的胰腺癌细胞株导入野生型Syk基因后, 胰腺癌细胞株在裸鼠中的生长和转移可明显受到抑制, 揭示了Syk基因可能是抑制肿瘤发生的调控子。而Syk基因启动子区域CpG岛的异常甲基化与基因转录抑制密切相关, 异常的DNA甲基化导致Syk基因表达缺失^[12]。Toyama等^[13]研究发现, 在正常乳腺上皮细胞中Syk基因高表达, 但是由于Syk基因启动子的甲基化使超过30%的乳腺癌组织中Syk基因表达降低, 将野生型Syk基因转染Syk基因阴性的乳腺癌细胞株, 发现Syk基因可以明显抑制无胸腺小鼠株抑制瘤的生长和转移。Ogane等^[14]研究显示, 大多数由于Syk基因启动子甲基化而导致Syk基因表达缺失的肿瘤有淋巴转移, 而没有转移的肿瘤Syk基因启动子甲基化水平较低。Syk基因的表达水平较高, 提示肿瘤的恶性程度与Syk基因启动子甲基化水平有关, Schuhe-Merker等^[15]和Zhang等^[16]的研究也证明了这一点。本实验经BS-PCR研究显示, 低分化的鼻咽癌细胞Syk基因启动子的甲基化水平高于高分化的鼻咽癌细胞, 由此推断在鼻咽癌细胞中, 其分化程度可能与Syk基因甲基化水平呈负相关。

DNA甲基化由DNMT催化完成, DNMT分为三类: DNMT1、DNMT3a和DNMT3b。其中, DNMT1参与DNA复制阶段对新生链相应位置进行甲基化修饰。5-aza-CdR是一种DNMT1抑制剂, 在DNA复制过程中与DNA分子相结合, 并与DNMT1形成共价复合物, 抑制该酶的甲基转移活性, 生成低甲基化子链, 使许多抑癌基因启动子CpG岛去甲基化, 从而恢复其表达^[17]。Lo等^[18]率先报道5-aza-CdR能使鼻咽癌细胞株沉默的内皮素B型受体基因重新表达, Yi等^[19]报道, 5-aza-CdR能恢复CNE-1细胞连接蛋白43基因的表达。他们的研究结果均发现, 5-aza-CdR

能使CNE-1细胞阻滞于G₀/G₁期从而出现生长抑制。Dong等^[20]发现, 3种肺癌细胞株的*Syk*基因5'调控区CpG岛过度甲基化, 而且异常甲基化与*Syk*基因表达缺失密切相关, 同时发现16例肺癌组织中都存在*Syk*基因过甲基化, 而相连的正常肺癌组织无甲基化修饰, 用去甲基化药物5-aza-CdR处理后, *Syk*基因重新表达。Ogane等^[14]通过对体外培养的口腔鳞状细胞癌细胞系和正常口腔角化细胞的研究发现, 癌细胞的*Syk* mRNA和蛋白质表达量要明显低于正常口腔角化细胞, 同时研究发现5-aza-CdR可提高这些癌细胞的*Syk* mRNA和蛋白质的表达量, 从而对肿瘤的发生发展起到抑制作用。

本研究用BS-PCR检测经5-aza-CdR处理前后的各细胞株的甲基化水平, 结果显示对照组和处理组NP-69细胞*Syk*启动子均无甲基化, 各处理组鼻咽癌细胞株的*Syk*启动子甲基化率与对照组相比存在显著差异($P<0.01$)。提示, 5-aza-CdR能有效逆转鼻咽癌细胞株*Syk*启动子的甲基化状态, *Syk*基因启动子甲基化可能是导致鼻咽癌发生发展的原因之一。Q-RT-PCR和Western blot检测结果显示, 5-aza-CdR在逆转鼻咽癌细胞*Syk*启动子甲基化状态的同时能够上调其mRNA和蛋白质的表达水平($P<0.05$), 从而证实了启动子甲基化导致鼻咽癌细胞株*Syk*表达降低或缺失。5-aza-CdR通过重新激活因甲基化处于沉默状态的*Syk*基因的转录活性, 恢复*Syk*基因的表达, 提示可以把*Syk*基因启动子甲基化作为鼻咽癌监测的标记, 从而为评估肿瘤风险、制定预防策略、获得早期诊断和跟踪肿瘤预后提供指导; 并且为*Syk*基因成为鼻咽癌基因治疗的新靶点提供实验依据, 从而进一步用诱导沉默的*Syk*基因重新表达的方法对鼻咽癌进行基因治疗奠定理论基础。与鼻咽癌细胞株不同的是, NP-69细胞在5-aza-CdR处理前后*Syk* mRNA和蛋白的表达均无明显变化, 表明5-aza-CdR在逆转鼻咽癌细胞*Syk*基因启动子甲基化恢复其表达的同时, 其本身存在的细胞毒性对正常的鼻咽上皮细胞*Syk*基因的转录活性没有影响。本研究结果还显示, 甲基化程度较低的CNE-1细胞对5-aza-CdR的敏感性明显高于甲基化程度较高的CNE-2细胞($P<0.01$), 提示5-aza-CdR逆转鼻咽癌细胞*Syk*启动子甲基化状态与细胞分化程度有关, 细胞分化程度越高逆转启动子甲基化后恢复*Syk*基因表达的比率越高, 从而在评估鼻咽癌去甲基化治疗的可行性和潜

在价值时还需要考虑肿瘤的分化程度。本研究从生物学角度观察了5-aza-CdR对鼻咽癌细胞株的影响, 肯定了其逆转*Syk*启动子甲基化恢复*Syk*基因表达的作用, 为鼻咽癌的临床诊疗提供了新的思路, 同时对该领域的进一步探讨将有利于阐明鼻咽癌发生发展的确切分子机制。

参考文献 (References)

- 1 Bailet O, Fenouille N, Abbe P, Robert G, Rocchi S, Gonthier N, *et al.* Spleen tyrosine kinase functions as a tumor suppressor in melanoma cells by inducing senescence-like growth arrest. *Cancer Res* 2009; 69(7): 2748-56.
- 2 鄢冲, 金巧智, 李志海, 刘池波, 陶宝鸿, 蔡志毅. 鼻咽癌细胞株*Syk*基因启动子甲基化的研究. 中国卫生检验杂志(Yan Chong, Jin Qiaozhi, Li Zhihai, Liu Chibo, Tao Baohong, Cai Zhiyi. Methylation of *Syk* gene in promoter region and *Syk* gene expression in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*) 2012; 21(2): 233-6.
- 3 Dhillon VS, Young AR, Husain SA, Aslam M. Promoter hypermethylation of *MGMT*, *CDH1*, *RAR- β* and *SYK* tumour suppressor genes in granulosa cell tumours (GCTs) of ovarian origin. *Br J Cancer* 2004; 90(4): 874-81.
- 4 Nakashima H, Natsugoe S, Ishigami S, Okumura H, Matsumoto M, Hokita S, *et al.* Clinical significance of n-uclear expression of spleen tyrosine kinase(*Syk*) in gastric cancer. *Cancer Lett* 2006; 236(1): 89-94.
- 5 Zhao S, Sun G, Tony PW, Ma D, Zhao C. Expression and methylation status of the *Syk* gene in cervical carcinoma. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 283(5): 1113-9.
- 6 Ma L, Dong S, Zhang P, Xu N, Yan H, Liu H, *et al.* The relationship between methylation of the *Syk* gene in the promoter region and the genesis of lung cancer. *Clin Lab* 2010; 56(9/10): 407-16.
- 7 Cui M, Wen ZQ, Chen J, Yang Z, Zhang H. 5-aza-2'-deoxycytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase3B and induces apoptosis in human endometrial cancer cell lines with the up-regulation of hMLH1. *Med Oncol* 2010; 27(2): 278-85.
- 8 Chu SH, Ma YB, Feng DF, Zhang H, Qiu JH, Zhu ZA. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on SLC22A18 in glioma U251 cells. *Mol Med Report* 2012; 5(1): 138-41.
- 9 Wozniak RJ, Klimecki WT, Lau SS, Feinstein Y, Futscher BW. 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressorgene reactivation. *Oncogene* 2007; 26(1): 77-90.
- 10 Steensma DP, Stone RM. Practical recommendations for hypomethylating agent therapy of patients with myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am* 2010; 24(2): 389-406.
- 11 Murphy MA, Schnall RG, Venter DJ, Barnett L, Bertoncello I, Thien CB, *et al.* Tissue hyperplasia and enhanced T-cell signaling via ZAP-70 in c-Cbl-deficient mice. *Mol Cell Biol* 1998; 18(8): 4872-82.
- 12 Lee HS, Kim BH, Chi NY, Yoo EJ, Choi M, Shin SH, *et al.* Prognostic implications of and relationship between CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15(3): 812-20.
- 13 Toyama T, Lwase H, Yamashita H, Hara Y, Omoto Y, Sujiura H,

- et al.* Reduced expression of the Syk gene is correlated with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Lett* 2003; 189(1): 97-102.
- 14 Ogane S, Onda T, Takano N, Yajima T, Uchiyama T, Shibahara T. Spleen tyrosine kinase as a novel candidate tumor suppressor gene for human oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2009; 124(11): 2651-7.
 - 15 Schuhe-Merker S, Sabine A, Petrova TV. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *J Cell Biol* 2011; 193(4): 607-18.
 - 16 Zhang X, Shrikhande U, Alicie BM, Zhou Q, Geahlen RL. Role of the protein tyrosine kinase Syk in regulating cell-cell adhesion and motility in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2009; 7(5): 634-44.
 - 17 Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, Shimato S, Ito M, Kuzushima K, *et al.* The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma. *Int J Cancer* 2008; 122(11): 2542-53.
 - 18 Lo KW, Tsang YS, Kwong J, To KF, Teo PM, Huang DP. Promoter hypermethylation of the EDNRB gene in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 98(5): 651-5.
 - 19 Yi ZC, Wang H, Zhang GY, Xia B. Downregulation of connexin 43 in nasopharyngeal carcinoma cells is related to promoter methylation. *Oral Oncol* 2007; 43(9): 898-904.
 - 20 Dong SW, Ma L, Xu N, Yan HQ, Liu HY, Li YW, *et al.* Research on the reactivation of Syk expression caused by the inhibition of DNA promoter methylation in the lung cancer. *Neoplasma* 2011; 58(1): 89-95.

Study on 5-aza-2'-deoxycytidine Induces Syk Gene Promoter Demethylation in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Lines

Jin Qiaozhi¹, Yan Chong¹, Tao Baohong², Li Zhihai², Cai Zhiyi*

(¹The First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China; ²Department of Otolaryngology, Zhejiang Taizhou Municipal Hospital, Taizhou, 318000, China)

Abstract The nasopharyngeal carcinoma cell lines, CNE-1, CNE-2 and the non-cancerous immortalized nasopharyngeal epithelial cell lines NP-69 were treated with 5 μ mol/L 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-CdR) *in vitro*. BS-PCR, Q-RT-PCR, Western blot were used to detect Syk promoter methylation and the level of Syk mRNA and protein. This study purposed to investigate the effect of 5-aza-CdR on the degree of promoter methylation and the expression of spleen tyrosine kinase (Syk) in nasopharyngeal carcinoma cell lines. It suggests that the mRNA and protein level of Syk in the two nasopharyngeal carcinoma cell lines were significantly lower than in NP-69 cell line ($P < 0.01$), and shows negative relation with the methylation level of Syk promoter. The promoter methylation level of Syk gene was significantly decreased and the expression of Syk mRNA and protein were up-regulated ($P < 0.05$) after treatment with 5-aza-CdR in the cell lines of CNE-1 and CNE-2, which was not observed in NP-69 cell line ($P > 0.05$). Compared with poorly differentiated nasopharyngeal carcinoma cell line, well-differentiated nasopharyngeal carcinoma cell line was more sensitive to 5-aza-CdR ($P < 0.01$). Taken together, Syk promoter methylation directly leads to the decreased expression of Syk in nasopharyngeal carcinoma cell lines. 5-aza-CdR induces the demethylation of the Syk promoter, restores the expression of Syk both in mRNA and protein levels. Meanwhile, the cytotoxicity of 5-aza-CdR did not affect the transcriptional activity of Syk gene in nasopharyngeal epithelial cells. Moreover, the different sensitivity of nasopharyngeal carcinoma cell lines to 5-aza-CdR was related with the methylation of Syk promoter.

Key words nasopharyngeal carcinoma; demethylation; 5-aza-2'-deoxycytidine; Syk gene

Received: April 26, 2012 Accepted: June 7, 2012

This work was supported by the Science and Technology Program of TaiZhou City (No.08KY23) and the Youth Fund of Taizhou College (No.2011QN31)

*Corresponding author. Tel: 86-576-88858023, E-mail: caizy008@tom.com