

# 5-Aza-CdR 对绒毛膜癌 JEG-3 细胞生长及 Dnmt3a 表达的影响

王元虎 丁裕斌 陈雪梅 刘学庆 王应雄 何俊琳\*

(重庆医科大学公共卫生学院, 重庆 400016)

**摘要** 用不同浓度(1、4、8、16、32  $\mu\text{mol/L}$ )的 DNA 甲基化酶抑制剂 5-Aza-CdR 处理绒毛膜癌 JEG-3 细胞, 显微镜下观察细胞形态的变化, MTT 法检测 5-Aza-CdR 对 JEG-3 细胞增殖的抑制作用, 流式细胞术检测 5-Aza-CdR 对 JEG-3 细胞凋亡的影响, Transwell 小室检测 JEG-3 细胞侵袭能力的改变, 进一步应用 Real Time PCR 及 Western 印迹检测 5-Aza-CdR 处理细胞后 DNA 甲基化转移酶 3a (DNA methyltransferase 3a, *Dnmt3a*) 基因及其蛋白的表达变化。研究结果显示, 5-Aza-CdR 能致细胞皱缩、细胞核聚集成块, 可明显抑制细胞增殖, 促进其凋亡, 降低细胞侵袭力。5-Aza-CdR 同时还可抑制 *Dnmt3a* mRNA 和其蛋白的表达。

**关键词** 5-Aza-CdR; 绒毛膜癌; DNA 甲基化转移酶 3a; 细胞凋亡

绒毛膜癌(chorionic carcinoma, CH)简称绒癌, 是一种极为常见的、高度恶性的妊娠性滋养细胞肿瘤(gestational trophoblastic neoplasia, GTN), 其临床治疗以化疗为主, 治愈率可达 90%。然而, 近年来难治性、多药耐药性绒癌的增多, 使临床治愈率大大降低, 因此寻找安全、有效且毒副作用小的抗绒癌药物, 首要解决的问题就是阐明绒癌发生的机制。绒癌发病机制较为复杂, 遗传学水平研究显示多种原癌基因、抑癌基因、细胞转录因子的表达异常以及激素水平异常与其发病相关<sup>[1,2]</sup>。近来研究发现, 基因表观遗传修饰异常, 如 DNA 甲基化失衡可影响下游与细胞增殖、分化、凋亡有关的基因转录, 从而导致细胞增殖失控而诱发绒癌。绒癌细胞中肿瘤高甲基化基因 -1 (hypermethylated in cancer 1, *HIC-1*)、金属蛋白酶组织抑制因子 -3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3, *TIMP-3*)、抑癌基因 *p16*、组织因子途径抑制物 -2 (tissue factor pathway inhibitor-2, *TFPI-2*) 等基因的启动子都呈现高甲基化状态, 受表观遗传修饰方式调控的印迹基因也参与了绒癌的发生及发展过程<sup>[3-6]</sup>。由于表观遗传引发的基因转录异常是可以逆转的修饰过程, 且该逆转可直接恢复肿瘤细胞中基因的功能, 因此, 研究绒毛膜癌的发生机制可以为寻找新的治疗策略提供实验依据。

本研究采用不同浓度的 DNA 甲基化酶抑制剂 5-Aza-CdR 处理绒毛膜癌 JEG-3 细胞, 观察其对细胞形态、增殖、凋亡、侵袭等生长情况以及 DNA 甲基

化转移酶(DNA methyltransferase 3a, *Dnmt3a*) 基因和其蛋白表达的影响, 以期探索 *Dnmt3a* 在绒毛膜癌的发生中的作用。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 JEG-3 细胞培养

JEG-3 细胞(中国科学院动物所细胞库)以  $1 \times 10^5$  个/ml 接种于含 10% 胎牛血清(杭州四季青公司)、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司)中, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  和饱和湿度的培养箱中开放培养<sup>[7]</sup>。每 3 天传代 1 次。收集对数生长期细胞备用。

### 1.2 5-Aza-CdR 处理细胞

取对数生长期的 JEG-3 细胞, 预冷的 PBS 洗涤 2 次, 六孔板培养细胞, 接种密度为  $1 \times 10^4$  个/孔, 待细胞贴壁后, 分别用 1、4、8、16、32  $\mu\text{mol/L}$  的 5-Aza-CdR (Merck 公司)处理细胞, 48 h 后, 倒置显微镜下观察细胞形态的变化。

### 1.3 MTT 法检测细胞增殖

取对数生长期的 JEG-3 细胞, 预冷的 PBS 洗涤

收稿日期: 2009-09-17 接受日期: 2010-01-08

国家自然科学基金(No.30700898); 教育部博士点基金(No.20070631007); 重庆市科委自然科学基金(No.CSTC, 2007BB5286); 重庆医科大学校办课题(No.XBYB2008063)资助

\* 通讯作者。Tel: 023-68485926, Fax: 023-68485008, E-mail: hejunlin\_11@yahoo.com.cn

2次, 0.125%胰蛋白酶消化后, 用DMEM/F12培养基重悬, 使细胞密度为 $5 \times 10^4$ 个/ml, 以100  $\mu$ l/孔接种于96孔培养板中。接种8 h后, 分别用1、4、8、16、32  $\mu$ mol/L的5-Aza-CdR处理细胞, 用等量PBS做空白对照。于37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 和饱和湿度的培养箱中开放培养。48 h后吸去培养基, 每孔加80  $\mu$ l新鲜培养基和20  $\mu$ l MTT (5 mg/ml, Sigma公司), 继续培养4 h, 小心吸去上层培养基, 每孔加入100  $\mu$ l DMSO, 室温避光摇床15 min, 待全部结晶完全溶解后, 酶标仪492 nm处检测吸光度值, 计算出细胞活力值。实验重复3次后以平均值绘制出增殖曲线。

#### 1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

选取对数生长期细胞, 用预冷的PBS洗涤3次, 0.125%胰蛋白酶消化收集细胞, PBS重悬细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^5$ 个/ml。各取1 ml细胞悬液, 600 r/min离心4 min, 弃上清液, 再加入1 ml预冷的PBS, 用吸管轻轻吹打, 使细胞悬浮, 再次离心, 重复3次。将细胞重悬于200  $\mu$ l结合缓冲液中, 加入5  $\mu$ l Annexin V-FITC和5  $\mu$ l PI (BD公司), 轻轻混匀, 于室温避光15~20 min, 再加入200  $\mu$ l结合缓冲液, 30 min内流式细胞仪检测。

#### 1.5 Transwell 小室检测细胞侵袭能力

采用24孔板小室(12  $\mu$ m, Millipore公司), 用预冷的无血清培养基DMEM/F12稀释ECM胶(Sigma公司)至1 mg/ml, 将稀释的ECM胶铺在小室底部(50  $\mu$ l/孔), 置37  $^{\circ}$ C, 30 min风干。0.125%胰蛋白酶消化收集生长旺盛的细胞, 用无血清的培养基调整细胞密度至 $4 \times 10^4$ 个/ml, 实验组加入5-Aza-CdR使其终浓度为10  $\mu$ mol/L, 加入等量的PBS做对照, 每孔加入250  $\mu$ l细胞悬液, 下室加入500  $\mu$ l含10% FBS的培养基做趋化因子, 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱培养24 h后, 弃去孔中培养液, 用棉签擦去小室内侧膜细胞, 用4%多聚甲醛固定小室基底膜30 min, 苏木精染色, 倒置显微镜下(400 $\times$ )计数10个视野, 求平均值进行统计学分析, 实验重复3次。

#### 1.6 Real Time PCR 检测 *Dnmt3a* mRNA 的表达

RNA的提取按TRIzol reagent (Invitrogen公司)试剂盒操作, 用紫外分光光度计测定RNA 260/280比值, 判断RNA纯度及浓度, 取5  $\mu$ l RNA用1.5%琼脂糖凝胶电泳, 紫外光下检测其完整性。*Dnmt3a*基因(序列号: NM\_175629)上游引物: 5'-TGGAAGGGTA-TTTGGTT-3', 下游引物: 5'-AGAGGTGGCGGATGACT-3', 扩增片段长度114 bp, 内参*GAPDH*上游引物:

5'-CTCTCTGCTCCTCCTGTTTCGACAG-3', 下游引物: 5'-GTGGAATCATATTGGAACATGT-3' (Invitrogen公司合成)。扩增片段长度230 bp, 采用两步法进行Real Time PCR, 反应体系为20  $\mu$ l。包括10  $\mu$ l 2 $\times$ SYBR Premix Ex Tag、正向及反向引物各0.5  $\mu$ l (10  $\mu$ mol/L)、100 ng cDNA, 加水补充到20  $\mu$ l。PCR反应如下: 94  $^{\circ}$ C预变性4 min后, 94  $^{\circ}$ C变性30 s, 54  $^{\circ}$ C退火45 s, 72  $^{\circ}$ C延伸45 s, 扩增40个循环。每次循环后于72  $^{\circ}$ C收集荧光信号, 将Real Time PCR反应产物从55  $^{\circ}$ C缓慢而均匀地上升到95  $^{\circ}$ C, 温度每升高0.5  $^{\circ}$ C读一次荧光值。由荧光定量PCR仪(Bio-Rad iQ5)自动绘制溶解曲线。以*GAPDH*作内参对目的基因表达量进行归一化处理, 采用 $-\Delta\Delta\text{ct}$ 数据分析。定量结果采用实验重复3次, *t*检验进行统计学分析。

#### 1.7 Western 印迹检测 *Dnmt3a* 蛋白表达

分别收集空白对照及不同浓度5-Aza-CdR处理长势良好的JEG-3细胞约 $1 \times 10^7$ 个。用4  $^{\circ}$ C预冷PBS洗涤2次, 加入500  $\mu$ l蛋白裂液及5  $\mu$ l蛋白酶抑制剂PMSF (100 mmol/L), 冰浴下震荡裂解20 min, 4  $^{\circ}$ C下12 000 r/min离心10 min, 取1~2  $\mu$ l细胞裂解上清液用BCA试剂盒测定样品蛋白含量。各组取等量细胞蛋白提取样品(约50  $\mu$ g)按4:1溶于5 $\times$ 上样缓冲液中, 混匀, 沸水煮沸5 min, 8% SDS-PAGE凝胶电泳, 恒流250 mA、电泳2 h分离蛋白, 将分离的蛋白条带电转移至PVDF (0.22  $\mu$ m)膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h, 将膜浸泡在稀释的*Dnmt3a*抗体(Santa Cruz公司)及tubulin抗体中, 4  $^{\circ}$ C温育12 h, PBST洗涤5 min, 重复3次, 加入5%脱脂奶粉稀释的二抗室温温育1 h, 用PBST漂洗5 min, 重复3次, 化学发光ECL法显影检测条带。蛋白质条带用Quantity One软件进行灰度相对定量分析, 并以tubulin作为内参照。

#### 1.8 统计学分析

计量资料结果用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 所有数据均使用SPSS11.5统计软件数据处理。

## 2 结果

### 2.1 5-Aza-CdR 处理后细胞形态的变化

5-Aza-CdR处理细胞48 h后, 与对照组相比, 处理组细胞形态有较大改变, 细胞皱缩、变圆、细胞核聚集成块, 死亡脱落的细胞明显增多(图1)。

### 2.2 5-Aza-CdR 处理后细胞增殖水平的改变

根据在492 nm处所测的吸光度值, 计算出细胞的增殖效率。结果发现, 各浓度5-Aza-CdR均能抑

**Table 1 Cell apoptosis ratio of control and experiment group ( $\bar{x} \pm s$ )**

Group	A	B	C	D	E	F
Apoptosis ratio (%)	5.18±0.27	8.58±0.5*	10.3±0.58*	20.20±0.34*	20.95±0.89*	24.93±0.21*

\* $P < 0.01$ , compare with control group.

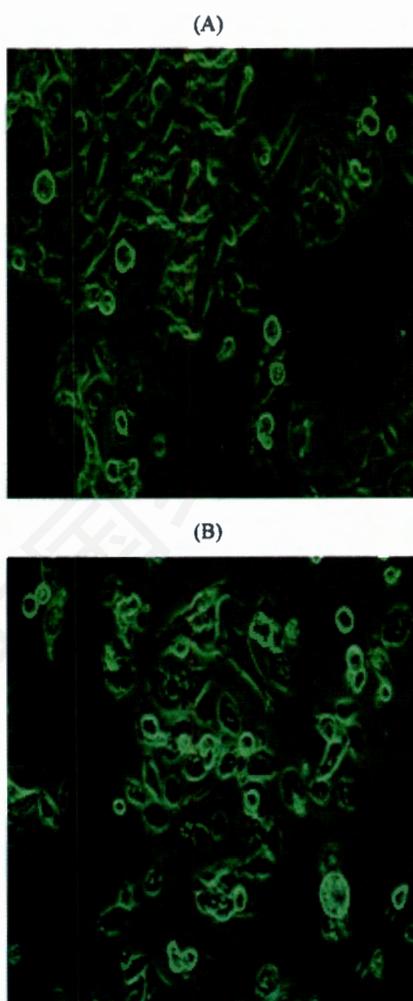
制细胞生长, 且表现为浓度依赖性, 随着 5-Aza-CdR 浓度的增加, 其抑制效应逐渐增强(图 2)。不同浓度处理组细胞的抑制率与对照组相比均有明显差异( $P < 0.05$ )。

### 2.3 5-Aza-CdR 处理后细胞凋亡水平的改变

经 5-Aza-CdR 处理后, 其细胞凋亡率随 5-Aza-CdR 浓度升高而逐渐升高(图 3), 与对照组相比变化有统计学意义( $P < 0.01$ ), 且表现为剂量依赖性(表 1)。

### 2.4 5-Aza-CdR 处理后细胞侵袭能力的变化

10  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR 处理细胞后, 其侵袭能力



**Fig.1 Morphology changes of JEG-3 cells before and after treatment of 5-Aza-CdR**

A: control group; B: JEG-3 cells after treatment of 5-Aza-CdR.

**Table 2 Ratio of Dnmt3/GAPDH in each group ( $\bar{x} \pm s$ )**

5-Aza-CdR treatment group ( $\mu\text{mol/L}$ )	Dnmt3a/GAPDH
0	1
1	0.82±0.13*
4	0.77±0.09*
8	0.67±0.07*
16	0.42±0.08*
32	0.35±0.09*

\* $P < 0.01$ , compared with control group.

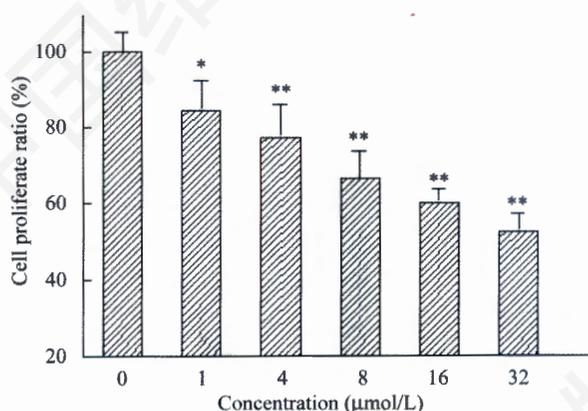
明显下降, 侵袭细胞数(平均 6 个/视野)与对照组(平均 53 个/视野)相比具有显著性差异( $P < 0.01$ , 图 4)。

### 2.5 5-Aza-CdR 处理后细胞 Dnmt3a mRNA 表达的变化

经 5-Aza-CdR 处理 JEG-3 细胞 48 h 后, 与对照组相比, Dnmt3a mRNA 表达降低, 各实验组  $A_{\text{Dnmt3a}}/A_{\text{GAPDH}}$  的比值差异有统计学意义( $P < 0.01$ , 图 5 和表 2)。

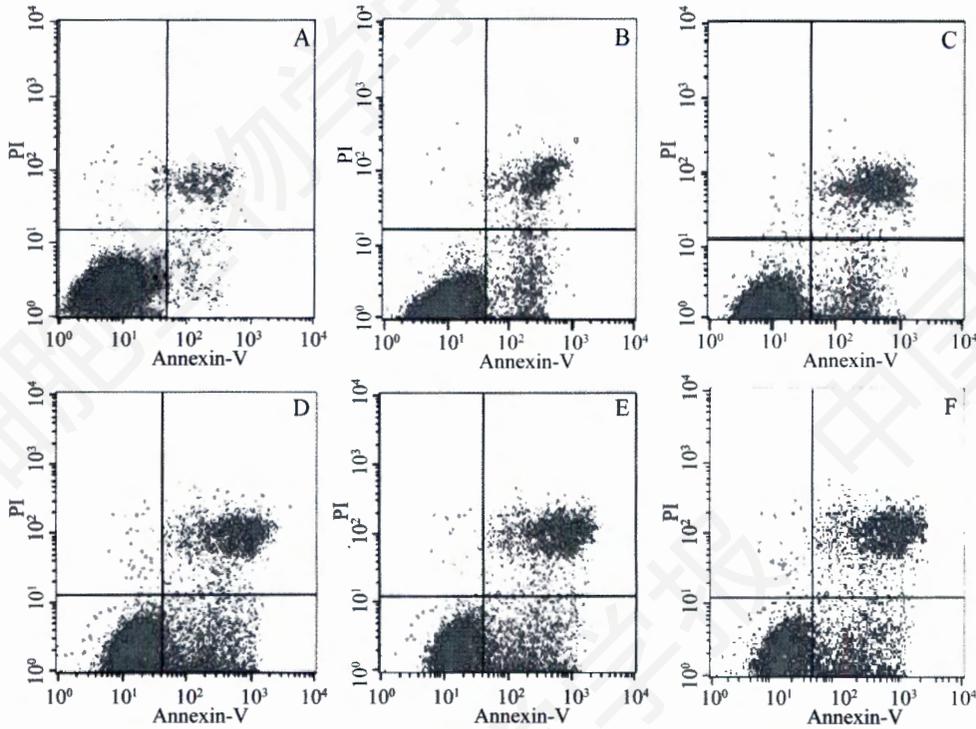
### 2.6 5-Aza-CdR 处理后细胞 Dnmt3a 蛋白表达的变化

5-Aza-CdR 处理 JEG-3 细胞 48 h 后, Western 印迹检测显示实验组 Dnmt3a 的蛋白表达水平下降, 并与 5-Aza-CdR 呈剂量依赖负相关, 均明显低于对照组( $P < 0.05$ , 图 6 和表 3)。



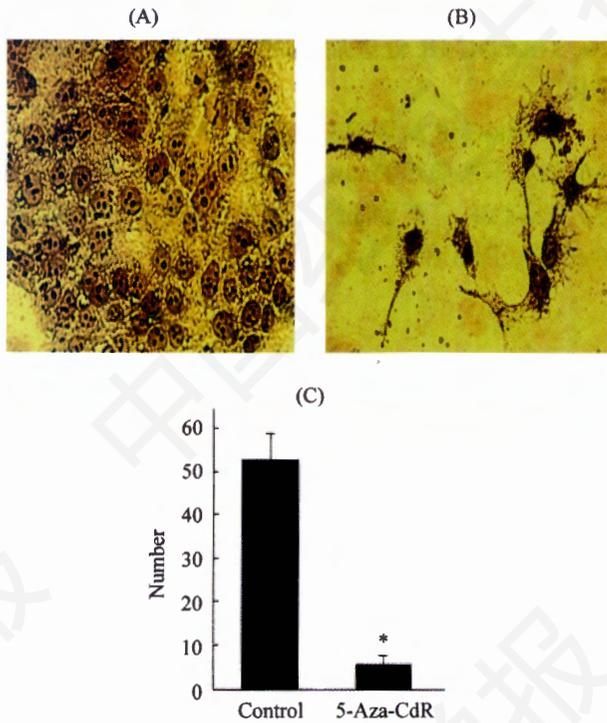
**Fig.2 Cell proliferation of JEG-3 cells before and after treatment of different concentrations of 5-Aza-CdR**

\* $P < 0.05$ , compared with control group; \*\* $P < 0.01$ , compared with control group.



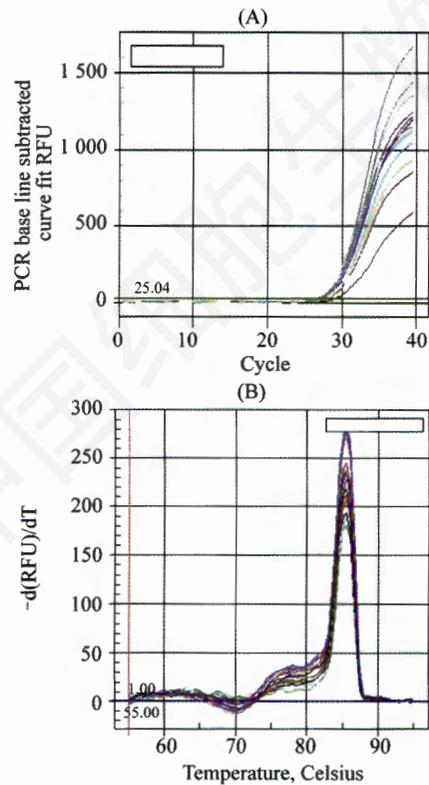
**Fig.3 Apoptosis ratio of JEG-3 cells before and after treatment of different concentrations of 5-Aza-CdR detected by flow cytometry**

A: control group; B: 1  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR treatment group; C: 4  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR treatment group; D: 8  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR treatment group; E: 16  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR treatment group; F: 32  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR treatment group.



**Fig.4 Invasive ability of JEG-3 cells in control group and experiment group detected by transwell**

A: control group; B: 10  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR treatment group; C: statistical analysis of invasive cell numbers in A and B. \* $P < 0.01$ , compared with control group.



**Fig.5 mRNA expression of *Dnmt3a* in JEG-3 cells before and after treatment of different concentrations of 5-Aza-CdR detected by Real Time PCR**

A: amplification chart; B: melt peak chart.

Table 3 Protein expression of Dnmt3a in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	1	2	3	4	5	6
Dnmt3a/tubulin	0.17±0.032	0.68±0.015	0.65±0.021	0.26±0.01*	0.19±0.017*	0.14±0.017*

\* $P < 0.01$ , compare with control group.

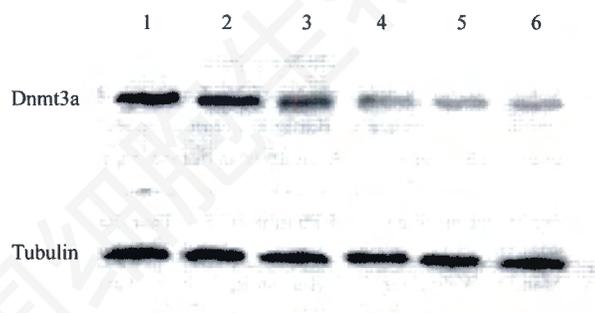


Fig.6 Expression of Dnmt3a before and after treatment of different concentrations of 5-Aza-CdR in JEG-3 cells detected by Westernblotting

1: control group; 2: 1  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR treatment group; 3: 4  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR treatment group; 4: 8  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR treatment group; 5: 16  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR treatment group; 6: 32  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR treatment group.

### 3 讨论

肿瘤的发生是多种因素相互作用所导致的正常细胞恶变。导致肿瘤发生的核心因素是基因调控的失常。典型表现是正常凋亡程序受阻, 形成细胞的恶变和无限增殖<sup>[8,9]</sup>。细胞增殖和死亡速度之比失衡, 引起细胞生长失控而引起肿瘤发生, 许多癌基因和抑癌基因都是通过控制细胞凋亡来诱导或抑制肿瘤的发生, 其中非常重要的一点就是细胞凋亡的抑制。我们的实验结果显示 5-Aza-CdR 抑制 JEG-3 细胞的生长并呈剂量依赖性, 且引起细胞凋亡率显著增加( $P < 0.01$ ), 提示 5-Aza-CdR 可以抑制 JEG-3 细胞增殖及诱导细胞凋亡, 这可能是因为 5-Aza-CdR 促进了促凋亡基因的表达或者抑制了凋亡抑制基因的表达, 但目前仍不能确定究竟是哪些凋亡调控相关基因受到了影响。5-Aza-CdR 是已知的 DNA 甲基化转移酶抑制剂, 因此凋亡相关基因可能是通过 DNA 甲基化转移酶的作用而受到了影响。

Dnmt3a 是生物体内一种非常重要的 DNA 甲基化转移酶, 它主要催化 DNA 的从头甲基化, 它的正确表达和阶段性的翻译后调节是维持胚胎 DNA 正常甲基化模式和顺利发育所不可缺的<sup>[10]</sup>。5-Aza-CdR 是一种重要的核苷类甲基转移酶抑制剂, 已经证实 5-Aza-CdR 可有效抑制 Dnmts 的活性, 进而导致细胞内

整个基因组水平的去甲基化, 使得一些由于甲基化而沉默或低表达的基因重新表达。在不同组织细胞中, 5-Aza-CdR 发挥其功能的原理并不完全相同。薛京伦等<sup>[11]</sup>认为, 在 DNA 的合成过程中, 5-Aza-CdR 作为 5-氮胞苷的脱氧核酸类似物随机参与 DNA 的合成, 而 Dnmt3a 可以使 DNA 上 CpG 二核苷酸的胞嘧啶和 5-Aza-CdR 都甲基化, 从而形成 Dnmt3a-5-Aza-CdR 加成复合物使 Dnmt3a 无法从 DNA 上脱落而失去活性, 这会导致细胞内 Dnmt3a 迅速被清除, 即 Dnmt3a mRNA 和其蛋白的表达均下降。本实验检测发现, 5-Aza-CdR 处理后 Dnmt3a mRNA 和其蛋白表达均明显下降( $P < 0.05$ ), 与前人 Schneider-Stock 等<sup>[12]</sup>和 Meng 等<sup>[13]</sup>在其它肿瘤细胞中的研究结果吻合。

细胞的侵袭能力与基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)降解体内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)相关。诸多研究表明, 肿瘤的侵袭和转移能力增强, 往往与 MMPs 的过度表达和活化有关, 基质金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)是一种内源性 MMPs 特异性抑制子, MMPs 与 TIMPs 结合后会使其失去生物学活性。JEG-3 细胞具有高度的侵袭能力, 本实验结果显示 5-Aza-CdR 显著抑制 JEG-3 细胞的侵袭能力, 结合文献推测其原因可能是, 5-Aza-CdR 降低了 Dnmt3a 的表达, 使 TIMPs 甲基化水平降低, 使 TIMPs 的表达增强, 从而抑制了 MMPs 的活性, 改变了 MMPs/TIMPs 之间的平衡状态, 最终导致 JEG-3 细胞的侵袭能力降低。

本研究结果表明 5-Aza-CdR 能有效抑制人绒毛膜癌 JEG-3 细胞增殖, 促进其凋亡, 降低其侵袭能力, 这将为进一步揭示恶性滋养细胞疾病的发生机制提供重要基础和实验依据。

### 参考文献(References)

- Li XN, Li YL, Liu GB, Ding YQ. Selection of choriocarcinoma-associated genes using bioinformatics. J First Mil Med Univ 2005; 25(1): 1-6.
- Jain P, Cietak KA. Post-tern choriocarcinoma with unusually low beat-hCG. J Obstet Gynaecol 2008; 28(6): 661-2.
- Xue WC, Chan KY, Feng HC, Chiu PM, Ngan HY, Tsao SW, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in hydatid-

- form mole and choriocarcinoma. *J Mol Diagn* 2004; 6(4): 326-34.
- 4 Hube F, Reverdiau P, Iochmann S, Rollin J, Cherpi-Antar C, Gruel Y. Transcriptional silencing of the TFPI-2 gene by promoter hypermethylation in choriocarcinoma cells. *Biol Chem* 2003; 384(7): 1029-34.
  - 5 Kanduri C, Kanduri M, Liu L, Thakur N, Pfeife R S, Ohlsson R. The kinetics of deregulation of expression by *de novo* methylation of the h19 imprinting control region in cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62(16): 4545-8.
  - 6 Arima T, Matsuda T, Takagi N, Wake N. Association of IGF2 and H19 imprinting with choriocarcinoma development. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 93(1): 39-47.
  - 7 Al-Nasiry S, Spitz B, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* 2006; 21(1): 193-201.
  - 8 Hussein MR. Analysis of p53, BCL-2 and epidermal growth factor receptor protein expression in the partial and complete hydatidiform moles. *Exp Mol Pathol* 2009; 87(1): 63-9.
  - 9 项文娟, 张英杰, 朱明伟, 李明发. JNK 介导的细胞凋亡在发育与疾病中的作用. *细胞生物学杂志* 2009; 31(1): 21-7.
  - 10 FitzGerald J, Luo M, Chaudhury A, Berger F. DNA methylation causes predominant maternal controls of plant embryo growth. *PLoS One* 2008; 3(5): e2298.
  - 11 薛京伦, 汪旭, 吴超群. 表观遗传学——原理、技术与实践. 上海, 上海科学技术出版社, 2006, 312-14.
  - 12 Schneider-Stock R, Diab-Assef M, Rohrbeck A, Foltzer-Jourdainne C, Boltze C, Hartig R, *et al.* 5-Aza-cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53-dependent mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312(2): 525-36.
  - 13 Meng F, Wehbe-Janeck H, Henson R, Smith H, Patel T. Epigenetic regulation of microRNA-370 by interleukin-6 in malignant human cholangiocytes. *Oncogene* 2008; 27(3): 378-86.

## Effects of 5-Aza-CdR on Cell Growth and Dnmt3a Expression in JEG-3 Human Choriocarcinoma Cell

Yuan-Hu Wang, Yu-Bin Ding, Xue-Mei Chen, Xue-Qin Liu, Ying-Xiong Wang, Jun-Lin He\*

(College of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** The choriocarcinoma JEG-3 cells were treated with different concentrations (1, 4, 8, 16, 32  $\mu\text{mol/L}$ ) of the DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-CdR. Changes of cell morphology were observed under the microscope and cell proliferation was detected by MTT. The apoptosis and invasion of JEG-3 cells were specially measured by flow cytometry and Transwell chamber respectively. The expression of *Dnmt3a* mRNA and protein were measured. The results showed that 5-Aza-CdR induced the cell shrinkage, chromatin integrated, and inhibited JEG-3 cell growth in a dose-dependent manner. 5-Aza-CdR treatment led to cell apoptosis and the depression of cell invasiveness. Expression of *Dnmt3a* mRNA levels and Dnmt3a protein expression levels decreased remarkably after 5-Aza-CdR treatment.

**Key words** 5-Aza-CdR; choriocarcinoma; Dnmt3a; cell apoptosis

Received: September 17, 2009 Accepted: January 8, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30700898), the Ministry of Education Doctoral Foundation (No.20070631007), the Natural Science Foundation of Chongqing Science and Technology Commission (No.CSTC, 2007BB5286) and Chongqing Medical University School Subject (No.XBYB2008063)

\*Corresponding author. Tel: 86-23-68485926, Fax: 86-23-68485008, E-mail: hejunlin\_11@yahoo.com