

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.04.003
文章编号: 1005-8982 (2020) 04-0016-05

普鲁卡因对结肠癌细胞中孕酮及脂联素受体3 甲基化的影响*

梁田田¹, 李日恒², 张爱民², 郑三龙³, 丁丽坤³, 彭鑫宇²,
问明², 郝欣², 郭剑², 王伟森², 李杰²

(1. 河北大学, 河北 保定, 071002; 2. 河北大学附属医院, 河北 保定 071000;
3. 保定涞源县医院, 河北 涞源 074300)

摘要: 目的 研究孕酮及脂联素受体3 (PAQR3) 在结肠癌细胞中的表达水平及甲基化状态, 检测普鲁卡因逆转 PAQR3 甲基化的作用。**方法** 通过 RT-PCR 检测 PAQR3 在结肠癌细胞株 (SW620、COLO205 及 SW480) 中的表达水平; 甲基化特异性聚合酶链反应检测 PAQR3 在结直肠癌细胞中的甲基化状态及药物处理后的甲基化状态; Western blotting 检测不同浓度普鲁卡因处理 SW480 细胞中 PAQR3 蛋白的表达。**结果** PAQR3 在 SW620 结肠癌细胞中的表达量高于 COLO205 和 SW480 ($P < 0.05$)。3 种结肠癌细胞株可见 PAQR3 基因甲基化特异性扩增产物条带, 且甲基化百分比比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。SW620 细胞较 SW480 和 COLO205 细胞中 PAQR3 甲基化百分比高 ($P < 0.05$); 普鲁卡因处理后 3 种结肠癌细胞株可见甲基化特异性扩增产物条带和非甲基化特异性扩增条带, 且 3 种细胞中 PAQR3 甲基化百分比降低 ($P < 0.05$)。对照组与实验组 PAQR3 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 实验组 PAQR3 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)。**结论** PAQR3 在结直肠癌中低表达, 可能与其发生启动子甲基化有关。普鲁卡因可部分逆转结直肠癌细胞中 PAQR3 甲基化状态, 上调 PAQR3 蛋白表达量。

关键词: 结直肠肿瘤; 甲基化; 基因表达

中图分类号: R735.35

文献标识码: A

Effects of procaine on the methylation of PAQR3 gene in colon cancer cells*

Tian-tian Liang¹, Ri-heng Li², Ai-min Zhang², San-long Zheng³, Li-kun Ding³, Xin-yu Peng²,
Ming Wen², Xin Xi², Jian Guo², Wei-sen Wang², Jie Li²

(1. Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China; 2. Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China; 3. Laiyuan County Hospital, Laiyuan, Hebei 074300, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of progesterin and adiponectin receptor family member 3 (PAQR3) in colon cancer cell lines and detection of the aberrant methylation status in its promoter, and to detect the demethylating effect of procaine hydrochloride (PCA). **Methods** The mRNA expression of PAQR3 in colon cancer cell lines (SW620, COLO205, SW480) was detected by realtime-PCR (RT-PCR). The promoter methylation status of PAQR3 in colon cancer cells and the methylation status after drug treatment were detected by methylation-specific PCR. The expression of PAQR3 protein in procaine hydrochloride treating SW480 cells was detected by

收稿日期: 2019-08-25

* 基金项目: 2015 年政府资助临床医学优秀人才项目 (No: 361007)

[通信作者] 李日恒, E-mail: 15833346275; Tel: lrhzy@sina.com

western blot. **Results** The expression of PAQR3 was decreased in three colon cancer cells, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), and the expression of SW620 was lower than COLO205 and SW480 ($P < 0.05$); the methylation-specific amplification product bands of PAQR3 gene were observed in all three colon cancer cell lines, and the difference in methylation percentage was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with SW620 cells, the percentage of PAQR3 methylation was significantly lower in SW480 and COLO205 cells ($P < 0.05$); methylation-specific amplification product bands and non-methylation-specific amplification bands were observed in the three colon cancer cell lines treated with procaine hydrochloride, and the percentage of PAQR3 methylation was significantly decreased in the three cells, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There was a statistically significant difference in the relative expression of PAQR3 protein between the control group and the procaine hydrochloride treatment group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the PAQR3 protein in the procaine hydrochloride treatment group was increased ($P < 0.05$). **Conclusions** The relative expression of PAQR3 mRNA in colon cancer cells was significantly decreased, which may be related to its promoter methylation. PCA can partially reverse the methylation status of PAQR3 in colon cancer cell lines and up-regulate the expression of PAQR3 protein.

Keywords: colorectal neoplasms; methylation; gene expression

结直肠癌是世界范围内常见的一种癌症。2012年全球癌症数据统计,结直肠癌发病率在男性恶性肿瘤中排第3位,女性中排第2位,死亡率高达49%^[1]。

孕酮及脂联素受体3(progesterin and adipoQ receptor 3, PAQR3)参与细胞信号传导、能量代谢及细胞分裂分化等多种生物学过程。近年来研究发现,PAQR3在食管癌、喉鳞状细胞癌及脑胶质瘤等多种肿瘤中发挥抑癌作用^[2-4]。普鲁卡因作为局部麻醉药物对结直肠癌细胞中PAQR3基因表达的研究报道较少。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料与试剂 人结肠癌细胞株SW620、SW480、COLO205,胎牛血清(美国Gemini公司),L-15、RPMI 1640培养基(美国Gibco公司),普鲁卡因(日本TCT公司),RT-PCR试剂盒(日本TaKaRa公司),EpiTect MSP试剂盒(德国Qiagen公司),兔抗人PAQR3抗体、辣根酶标记羊抗兔IgG抗体等均购自石家庄华沃科瑞生物公司。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.1.2 仪器与设备 全波长酶标仪(美国EPOCH基因有限公司),ChampGel 5000全自动凝胶成像仪(中国容智创业),7300实时荧光定量PCR仪、Veriti普通PCR仪(美国Applied Biosystems公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物处理 人结肠癌细胞株SW620培养于L-15完全培养基,置于低二氧化碳

CO₂培养箱。人结肠癌细胞株SW480、COLO205培养于RPMI 1640完全培养基,置于5% CO₂培养箱。将SW480细胞以 5.0×10^5 个/100 mm²的浓度接种于培养皿中,随机标记为对照组和实验组:对照组用RPMI 1640完全培养基继续培养,实验组分别用0.5、1.0、2.0、5.0及10.0 mmol/L不同浓度的普鲁卡因处理细胞。普鲁卡因溶于RPMI 1640完全培养基中,对照组和实验组继续培养48 h。

1.2.2 实时聚合酶链反应(RT-PCR) 使用日本TaKaRa株式会社SYBR Premix Ex Taq II试剂盒,7300实时荧光定量PCR仪进行聚合酶链反应。引物序列查阅文献[5]设计PAQR3引物,正向引物:5'-TCTGTATGCTTTGCTCTGTGGG-3';反向引物:5'-TTTGCCATTGCTGCGTGAG-3',长度252 bp。内参基因为 β -actin,正向引物:5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3';反向引物:5'-AAAGGGTGTAACGCAACTAA-3',长度302 bp。记录 Δ Ct值进行分析。

1.2.3 甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific PCR, MSP) 依据EpiTect MSP试剂盒说明书,以PAQR3特异性甲基化及非甲基化引物进行扩增。甲基化正向引物:5'-TTGTTGAAGAGCGCGTATTATATC-3';反向引物:5'-TAAAAACCCGAAAATCTACTCGTA-3',长度109 bp。非甲基化正向引物:5'-TTGTTGAAGAGTGTGTATTATATTGA-3';反向引物:5'-TAAAAACCCAAAAATCTACTCATA-3',产物长度109 bp。扩增完成后,对产物进行2%琼脂糖凝胶电泳,全自动凝胶成像

仪分析结果。甲基化百分比 = 甲基化条带光密度值 / (甲基化条带光密度值 + 非甲基化条带光密度值) × 100%。

1.2.4 Western blotting 收集对照组及实验组的细胞,按 RIPA 法提取细胞总蛋白;Bradford 法测定蛋白浓度,定量上样后电泳,转膜后封闭 1 h。加入一抗,4℃过夜,TTBS 漂洗,二抗 37℃孵育 1 h,TTBS 漂洗,ECL 发光,C-DIGIT 印迹扫描器扫描,Image Studio Didits 系统分析。

1.2.5 药物处理及 MSP 将结肠癌细胞接种于培养皿中,培养 24 h,2 mmol/L 普鲁卡因处理细胞 24 h 后,进行 MSP 反应。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用方差分析,进一步两两比较用 SNK-*q* 法;计数资料以百分比 (%) 表示,比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PAQR3 mRNA 在结肠癌细胞株中的表达

RT-PCR 结果显示,PAQR3 在结肠癌细胞株中呈低表达。3 种结肠癌细胞株中 (SW480、COLO205 及 SW620) PAQR3 mRNA 分别为 (7.68 ± 0.20)、(8.62 ± 0.37) 和 (14.14 ± 0.56),经方差分析,差异有统计学意义 ($F = 458.391, P = 0.000$),SW620 表达量高于 COLO205 和 SW480 ($P < 0.05$)。见图 1。

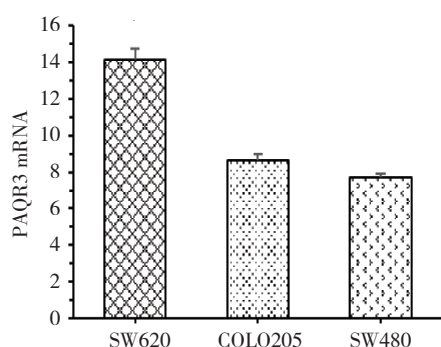
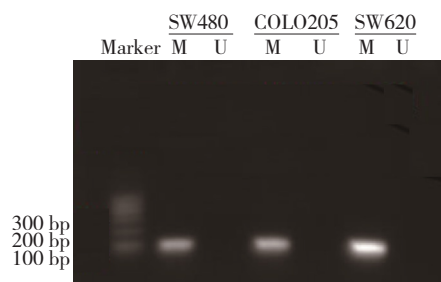


图 1 不同结肠癌细胞中 PAQR3 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 PAQR3 基因启动子在结直肠癌细胞株中的甲基化程度

MSP 检测结果显示,SW480、COLO205 及 SW620 细胞株可见甲基化特异性扩增产物条带 (见图 2)。SW480、COLO205 及 SW620 细胞株甲基化条带光密

度值比较,经方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。SW480、COLO205 及 SW620 细胞株中 PAQR3 基因甲基化百分比比较,经 χ^2 检验,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);SW480 和 COLO205 细胞中 PAQR3 甲基化百分比比较 SW620 细胞低 ($P < 0.05$)。见表 1。



M: 甲基化扩增产物; U: 非甲基化扩增产物。

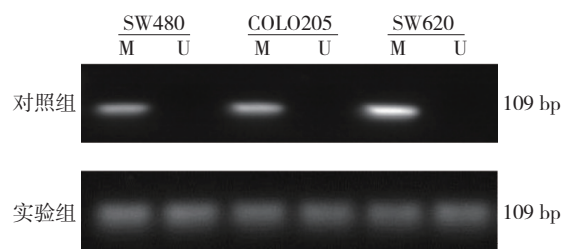
图 2 PAQR3 基因启动子甲基化状态

表 1 3 种结肠癌细胞株中 PAQR3 基因甲基化比较

组别	甲基化条带光密度值 / ($\bar{x} \pm s$)	甲基化百分比 / %
SW480	54 706 ± 134	70.90
COLO205	65 119 ± 82	73.52
SW620	112 991 ± 161	81.39
F/χ^2 值	17 0840.253	3 625.054
P 值	0.000	0.000

2.3 普鲁卡因处理后 3 种结直肠癌细胞株中 PAQR3 甲基化程度

MSP 显示,SW480、COLO205 及 SW620 细胞株可见甲基化特异性扩增产物条带和非甲基化特异性扩增条带 (见图 3)。普鲁卡因处理后,对照组和实验组 3 种细胞株中 PAQR3 甲基化百分比比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);实验组较对照组 PAQR3 甲基化百分比降低 ($P < 0.05$)。见表 2。



M: 甲基化扩增产物; U: 非甲基化扩增产物。

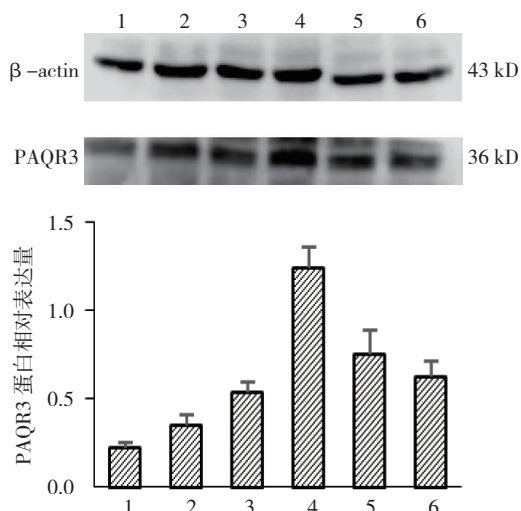
图 3 对照组和实验组 PAQR3 基因启动子甲基化状态

表2 对照组与实验组3种细胞中PAQR3甲基化比较 %

组别	SW480	COLO205	SW620
对照组	70.90	73.52	81.39
实验组	45.81	52.57	57.46
χ^2 值	18 135.499	14 572.831	29 638.927
P 值	0.000	0.000	0.000

2.4 不同浓度普鲁卡因处理SW480细胞后PAQR3蛋白的表达

Western blotting 检测结果显示, 各组 PAQR3 蛋白表达情况 (见图4)。对照组、0.5 mmol/L 实验组、1 mmol/L 实验组、2 mmol/L 实验组、5 mmol/L 实验组及 10 mmol/L 实验组结肠癌细胞中 PAQR3 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 实验组中 PAQR3 蛋白相对表达量增加 ($P < 0.05$)。见表3。



1: 对照组; 2: 0.5 mmol/L 实验组; 3: 1.0 mmol/L 实验组; 4: 2.0 mmol/L 实验组; 5: 5.0 mmol/L 实验组; 6: 10.0 mmol/L 实验组。

图4 普鲁卡因对PAQR3蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

表3 各组细胞中PAQR3蛋白相对表达量比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	PAQR3 蛋白
对照组	0.217 ± 0.032
0.5 mmol/L 实验组	0.350 ± 0.060
1.0 mmol/L 实验组	0.533 ± 0.061
2.0 mmol/L 实验组	1.240 ± 0.120
5.0 mmol/L 实验组	0.753 ± 0.130
10.0 mmol/L 实验组	0.620 ± 0.085
F 值	49.424
P 值	0.000

3 讨论

近年来,基因甲基化的研究成为热点。SHALABY等^[6]发现,大肠癌患者血液和组织中MGMT和ERCC1甲基化频率高于良性肿瘤者,且MGMT和ERCC1基因甲基化与其mRNA表达下调有关。KATZENMAIER等^[7]分析9种大肠癌细胞系中调控半乳糖凝集素表达的表观遗传学机制,发现在未分化的大肠癌细胞系中半乳糖凝集素-12的表达缺失和其启动子区高甲基化有关。此外,国内学者通过检测结肠癌组织中SFRP2启动子甲基化状态,也证实启动子CpG位点甲基化水平与结肠直肠癌的临床及病理特点有相关性^[8]。国内外学者的研究都证实,基因甲基化在结肠直肠癌的发生、发展及预后中起重要作用。

PAQR3在多种肿瘤组织及细胞中表达降低,而过表达则可抑制肿瘤细胞的侵袭表型,提示PAQR3在肿瘤的发生、发展中发挥抑癌基因的作用^[2-4]。近期研究发现,PAQR3在前列腺癌、乳腺癌等肿瘤组织出现基因甲基化,而这可能与PAQR3表达沉默相关^[9-10]。本实验组前期检测结肠直肠癌组织及癌旁组织中PAQR3的表达水平及甲基化状态^[5],与上述研究结论一致^[9-10]。本实验发现,PAQR3在3种结肠直肠癌细胞株中呈低表达状态;在3种结肠直肠癌细胞中同样发现PAQR3呈现甲基化状态。随后笔者又用普鲁卡因进行逆甲基化实验,发现在其浓度为2 mmol/L时,可上调PAQR3蛋白相对表达量。最后以最佳浓度普鲁卡因处理3种结肠直肠癌细胞发现,PAQR3在3种细胞株中甲基化率降低。通过实验笔者发现,PAQR3甲基化是其在结肠直肠癌中表达沉默的重要因素,而普鲁卡因可以逆转甲基化,上调结肠直肠癌细胞株中PAQR3蛋白相对表达。

综上所述,PAQR3甲基化在结肠直肠癌发生、发展中起重要作用。而普鲁卡因可以逆转PAQR3甲基化,上调PAQR3蛋白的表达。

参考文献:

- [1] TORRELA, BRAYF, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics,2012[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] ZHOU F, WANG S, WANG J. PAQR3 inhibits the proliferation and tumorigenesis in esophageal cancer cells[J]. Oncol Res, 2017(25): 663-671.
- [3] QIANG W, ZHUANG K, LI H. PAQR3 plays a suppressive role in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Tumor Biology, 2016,

- 37(1): 1-5.
- [4] TANG S L, GAO Y L, HU W Z. PAQR3 inhibits the proliferation, migration and invasion in human glioma cells[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 92: 24-32.
- [5] LI R H, ZHANG A M, LI S, et al. PAQR3 gene expression and its methylation level in colorectal cancer tissues[J]. *Oncology letters*, 2016, 12(3): 1773-1778.
- [6] SHALABY S M, EI SHAL A S, ABDELAZIZ L A, et al. Promoter methylation and expression of DNA repair genes MGMT and ERCC1 in tissue and blood of rectal cancer patients[J]. *Gene*, 2018, 644: 66-73.
- [7] KATZENMAIER E M, KLOOR M, GABIUS H J, et al. Analyzing epigenetic control of galectin expression indicates silencing of galectin-12 by promoter methylation in colorectal cancer[J]. *IUBMB Life*, 2017, 69(12): 962-970.
- [8] 张楠, 李沛雨, 黄晓辉, 等. SFRP2 启动子 CpG 岛高甲基化与结直肠癌的相关性 [J]. *中国现代普通外科进展*, 2017, 20(4): 264-267.
- [9] KOWIT L, ANDREY B, PICHET S. Aberrant promoter methylation of the PAQR3 gene is associated with prostate cancer[J]. *Pathology, Research and Practice*, 2018, 214(1): 126-129.
- [10] CHEN J P, WANG F R, XU J F, et al. The role of PAQR3 gene promoter hypermethylation in breast cancer and prognosis[J]. *Oncology Reports*, 2016, 36(3): 1612-1618.

(唐勇 编辑)

本文引用格式: 梁田田, 李日恒, 张爱民, 等. 普鲁卡因对结肠癌细胞中孕酮及脂联素受体 3 甲基化的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(4): 16-20.