

网络出版时间: 2020-9-24 13:29 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200923.1150.010.html>

# 普鲁卡因抑制人结肠癌细胞增殖与 DNA 甲基化

朱波, 解爽, 张思莹, 陈渊, 胡漫辉, 温聪娜, 刘伟华, 问明, 张涛, 刘经纬, 李日恒

**摘要** 目的 分析普鲁卡因(PCA)对Septin9甲基化状态和表达水平的影响,探讨PCA抑制结肠癌DLD-1、HCT116细胞增殖的分子机制。方法 不同浓度PCA对结肠癌细胞处理不同时间,MTS法检测细胞增殖活性;流式细胞术、Transwell实验检测PCA对细胞周期、凋亡和迁移能力的影响;BGS法、qRT-PCR检测PCA作用前后Septin9甲基化状态和表达水平。结果 PCA对结肠癌细胞增殖抑制呈浓度和时间依赖效应( $P < 0.05$ )。与对照组比较,PCA处理后将细胞生长阻滞在G<sub>2</sub>/M期,显著诱导凋亡且抑制细胞的迁移( $P < 0.05$ )。PCA处理后Septin9甲基化程度下降,Septin9 mRNA表达量上升,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 PCA可以通过逆转Septin9甲基化,抑制结肠癌细胞的增殖、迁移。

**关键词** 结肠癌;普鲁卡因;Septin9;DNA甲基化

**中图分类号** R 735.3+5

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2020)11-1695-06  
**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.010

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率近年来均保持上升趋势,严重威胁人类健康<sup>[1-2]</sup>。DNA甲基化是表观遗传学分子机制之一,在结肠癌的发生、发展中发挥关键作用<sup>[3-4]</sup>。肿瘤抑制基因启动子区域CpG岛高甲基化导致其转录沉默已被认为是肿瘤发生的一个共同特征<sup>[5-6]</sup>,由此通过去甲基化药物使抑癌基因重新表达为肿瘤治疗提供了新的思路和途径。普鲁卡因(procaine, PCA)作为一种新型去甲基化剂,在人乳腺癌细胞系MCF-7<sup>[7]</sup>、胃癌细胞系SGC-7901<sup>[8]</sup>中具有生长抑制的作用。然而,PCA对结肠癌细胞DNA甲基化调节以及生物学功能的影响鲜见报道,该研究以人结肠癌DLD-1、HCT116细胞作为研究对象,探讨PCA对

Septin9基因甲基化状态和表达水平的影响及其抑制细胞增殖的分子机制。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料与试剂** 人结肠癌细胞株DLD-1购于武汉普诺赛生命科技有限公司;人结肠癌细胞株HCT116购于石家庄华沃科瑞生物科技有限公司;RPMI-1640、DMEM培养基购于美国Gibco公司;血清购于美国BI公司;MTS试剂盒购于美国Promega公司;重亚硫酸盐DNA甲基化试剂盒购于德国Qia-gen公司;总RNA提取试剂盒购于美国Omega公司;逆转录、荧光定量PCR试剂盒购于日本TaKaRa公司;引物设计及合成由上海生物工程有限公司完成。

**1.2 主要仪器与设备** 全波长酶标仪(型号:Epoch)购于美国Bio Tek公司;流式细胞仪(型号:CytoFLEX)购于美国BECKMAN公司;倒置相差显微镜(型号:ECLIPSE Ts2)购于日本Nikon公司;热循环仪(型号:Veriti)、荧光定量PCR仪(型号:7300)购于美国BioSystems公司。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞培养** 结肠癌DLD-1细胞用含10%血清和1%双抗的RPMI-1640培养基于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。结肠癌HCT116细胞用含10%血清和1%双抗的DMEM培养基于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。

**1.3.2 MTS检测细胞增殖活力** 取处于对数生长期的DLD-1、HCT116细胞,每孔按 $5 \times 10^3$ 个接种至96孔板,每孔体积约100 μl,培养箱内培养过夜;待细胞密度生长至70%以上,加处理因素;分别设对照组和PCA处理组,处理组药物浓度设为1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L 4个浓度,每组设4个复孔;在培养24、48、72 h时加入MTS液20 μl/孔,继续培养1~4 h,于酶标仪上读取490 nm吸光度值,计算细胞生长抑制率。

**1.3.3 形态学观察** 胰蛋白酶消化并收集DLD-1、HCT116细胞,以 $2 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于6孔板,培养箱内培养过夜;待细胞贴壁后分别设对照组

2020-06-12 接收

基金项目:河北省政府资助临床医学优秀人才培养和基础课题研究项目(编号:361007);河北大学附属医院重点科研基金项目(编号:2019Z006)

作者单位:河北大学附属医院胃肠外科,保定 071000

作者简介:朱波,男,硕士研究生;

李日恒,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:lrhzy@sina.com

和 PCA 处理组 ,处理组药物终浓度为 2 mmol/L ,继续培养 48 h ;倒置显微镜下观察 DLD-1、HCT116 细胞形态变化。

**1.3.4 流式细胞术检测细胞周期及凋亡** 调整 DLD-1、HCT116 细胞密度至  $2 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板 ,每孔体积约 4 ml ,DLD-1、HCT116 细胞 PCA 终浓度为 2 mmol/L ,每组设 3 个复孔 ,同时设不加药对照孔 ,置于培养箱内 ,培养 48 h 后收集细胞以进行染色 ,流式细胞仪上机检测。

**1.3.5 Transwell 实验检测细胞迁移** 无血清培养基重悬 DLD-1、HCT116 细胞浓度至  $2.5 \times 10^5$  个/ml ;在 24 孔板中预先加入 800  $\mu$ l 含 10% 血清的培养基并放入 Transwell 小室 ,1 h 后在上室分别接入 200  $\mu$ l 细胞悬液 ,培养箱内培养 24 h ;取出小室 ,擦去上层细胞 ,PBS 清洗后 70% 冰乙醇固定 1 h ;0.5% 结晶紫染液染色 20 min ,倒置显微镜下观察拍照。

**1.3.6 BGS 检测 Septin9 甲基化状态** 甲基化 Septin9 上游引物为 5'-GGATGAATAGTGGGAATAG-TATTG-3' ,下游引物为 5'-CAAAAAAAAAACCCTA-AAAAATCACC-3' ,扩增片段 234 bp 。根据制造商的说明书 ,用细胞 DNA 提取试剂盒从 DLD-1、HCT116 细胞中提取总 DNA ,用重亚硫酸盐 DNA 甲基化试剂盒进行 DNA 甲基化检测。

**1.3.7 qRT-PCR 检测 Septin9 表达水平** Septin9 上游引物为 5'-ACTGCTGCCTCTACTTCA-3' ,下游引

物为 5'-CTGGTGATGTCCTTGATGT-3' ,扩增片段 300 bp 。 $\beta$ -actin 上游引物为 5'-CGGGAAATCGTGCGT-GAC-3' ,下游引物为 5'-TGGAAGGTGGACAGCGA-GG-3' ,扩增片段 550 bp 。根据 Omega 试剂盒说明书 ,提取 DLD-1、HCT116 细胞总 RNA ,cDNA 逆转录和目的片段扩增按照 TaKaRa 试剂盒说明书进行操作 ,记录 Ct 值进行分析。

**1.4 统计学方法** 所得数据均用 SPSS19.0 软件进行统计分析 ,定量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示 ,3 组及 3 组以上的比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 或非参数检验 (Kruskal-Wallis H) 进行统计 ,两组之间的比较采用独立样本的 *t* 检验 ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PCA 抑制 DLD-1、HCT116 细胞增殖** MTS 检测结果显示 ,不同时间点上 ,PCA 处理后 ,DLD-1、HCT116 细胞的抑制率随着 PCA 浓度的增加 (1.0、1.5、2.0 和 2.5 mmol/L) 呈上升趋势 ,高浓度 (2.5 mmol/L) 对细胞的增殖抑制最明显。见图 1A、B。且 PCA 对 DLD-1、HCT116 细胞的生长抑制有浓度依赖性和时间依赖性。见表 1、2。结果表明药物作用的最佳浓度为 2.0 mmol/L ,最佳时间为 48 h。与此同时 ,倒置显微镜观察显示 ,DLD-1 细胞生长密度下降 ,细胞体积缩小 ;HCT116 细胞皱缩成团 ,出现空泡现象并从它们生长的表面回缩。见图 1C。

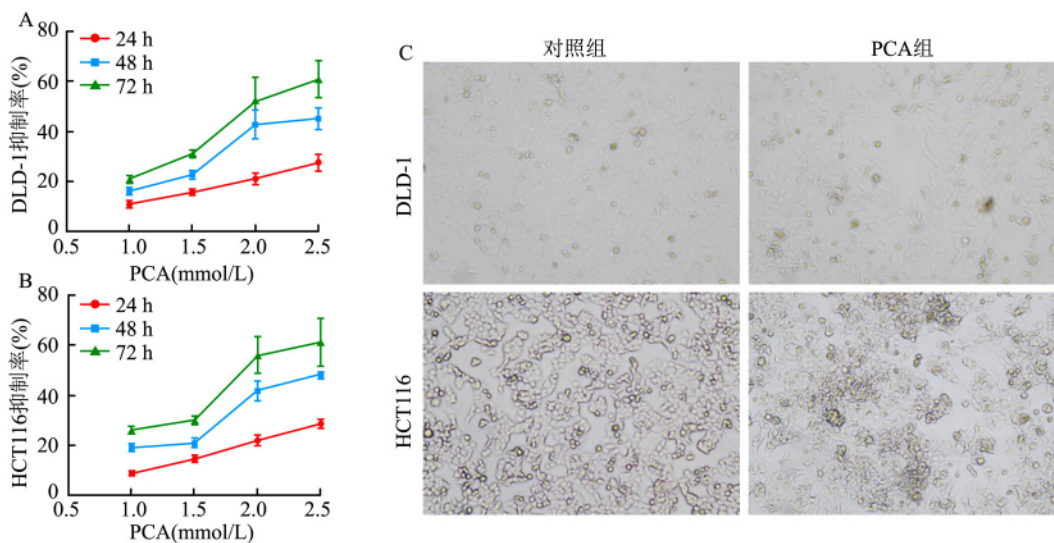


图1 PCA 抑制 DLD-1、HCT116 细胞的增殖

A: PCA 对 DLD-1 细胞的浓度和时间依赖性; B: PCA 对 HCT116 细胞的浓度和时间依赖性; C: 倒置显微镜下 DLD-1、HCT116 细胞形态变化  $\times 100$

表1 不同浓度 PCA 作用不同时间 DLD-1 细胞生长抑制率比较( %  $n=3, \bar{x} \pm s$ )

PCA 浓度( mmol/L)	24 h	48 h	72 h	F/H 值	P 值
1.0	10.80 ± 1.32	16.27 ± 1.19	20.90 ± 1.35 ▲	45.978	<0.001
1.5	15.63 ± 1.02*	22.53 ± 1.59	30.97 ± 1.46 ▲	92.953	<0.001
2.0	21.03 ± 2.34* #	42.57 ± 5.65* #	52.13 ± 9.31* #	18.393	0.003
2.5	27.37 ± 3.46* #&	44.87 ± 4.35* #	60.67 ± 7.34▲**	29.462	0.001
F/H 值	30.127	44.727	28.099		
P 值	<0.001	<0.001	<0.001		

与 24 h 比较:  $P < 0.05$ ; 与 48 h 比较: ▲ $P < 0.05$ ; 与 1.0 mmol/L PCA 比较: \* $P < 0.05$ ; 与 1.5 mmol/L PCA 比较: # $P < 0.05$ ; 与 2.0 mmol/L PCA 比较: & $P < 0.05$

表2 不同浓度 PCA 作用不同时间 HCT116 细胞生长抑制率比较( %  $n=3, \bar{x} \pm s$ )

PCA 浓度( mmol/L)	24 h	48 h	72 h	F/H 值	P 值
1.0	8.73 ± 0.81	19.00 ± 1.49	25.90 ± 1.35 ▲	142.180	<0.001
1.5	14.63 ± 1.12*	20.97 ± 1.81	30.17 ± 1.45 ▲	82.689	<0.001
2.0	21.97 ± 2.08* #	41.53 ± 4.01* #	55.73 ± 7.28▲**	35.274	0.001
2.5	28.50 ± 1.75* #&	47.83 ± 1.29* #&	60.90 ± 9.59▲**	24.727	0.001
F/H 值	95.634	108.802	25.241		
P 值	<0.001	<0.001	<0.001		

与 24 h 比较:  $P < 0.05$ ; 与 48 h 比较: ▲ $P < 0.05$ ; 与 1.0 mmol/L PCA 比较: \* $P < 0.05$ ; 与 1.5 mmol/L PCA 比较: # $P < 0.05$ ; 与 2.0 mmol/L PCA 比较: & $P < 0.05$

## 2.2 PCA 阻滞 DLD-1、HCT116 细胞于 G<sub>2</sub>/M 期

流式细胞仪检测结果显示,PCA 处理后,DLD-1 细胞 S 期细胞比例(37.81 ± 3.36)% 和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例(26.89 ± 3.98)% 高于对照组 S 期细胞比例(33.29 ± 4.52)% 和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例(17.94 ± 3.00)%;HCT116 细胞 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例(43.64 ± 7.53)% 高于对照组 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例(28.92 ± 4.68)%;两者处理前后比较,G<sub>2</sub>/M 期细胞比例差

异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 2。

## 2.3 PCA 促进 DLD-1、HCT116 细胞凋亡

流式细胞仪检测结果显示,PCA 处理后,DLD-1 细胞总凋亡率为(11.15 ± 0.64)% ,明显高于对照组(4.32 ± 0.07)%;HCT116 细胞总凋亡率为(11.93 ± 1.16)% ,明显高于对照组(4.65 ± 1.30)%;两者处理前后比较,总凋亡率差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 3。

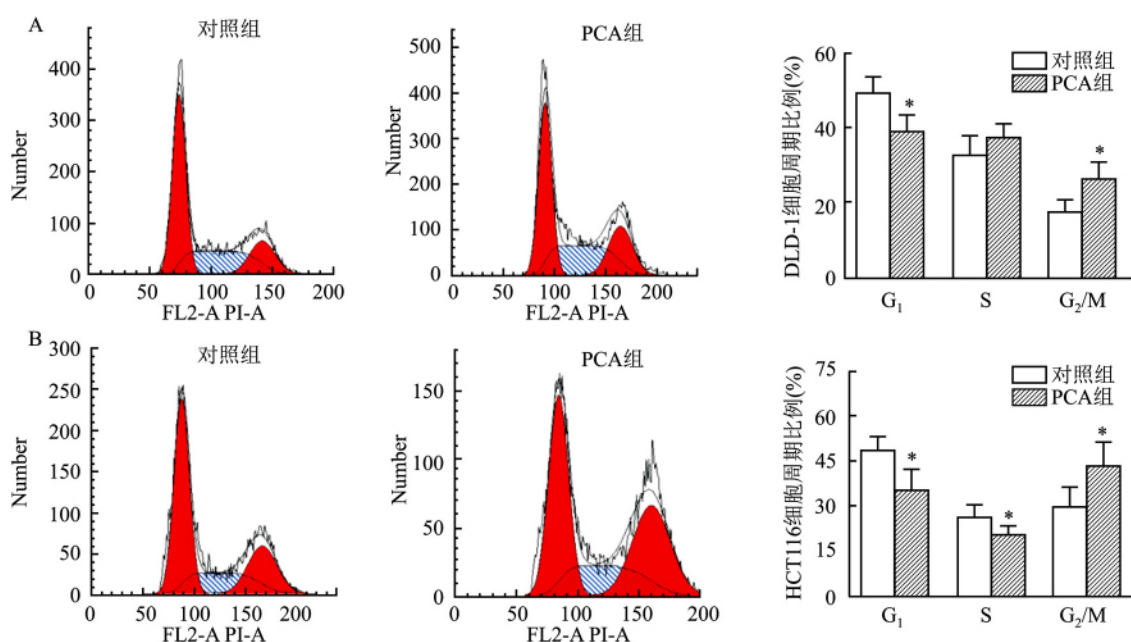


图2 PCA 处理前后 DLD-1、HCT116 细胞周期

A: DLD-1 细胞; B: HCT116 细胞; 与对照组比较: \* $P < 0.05$

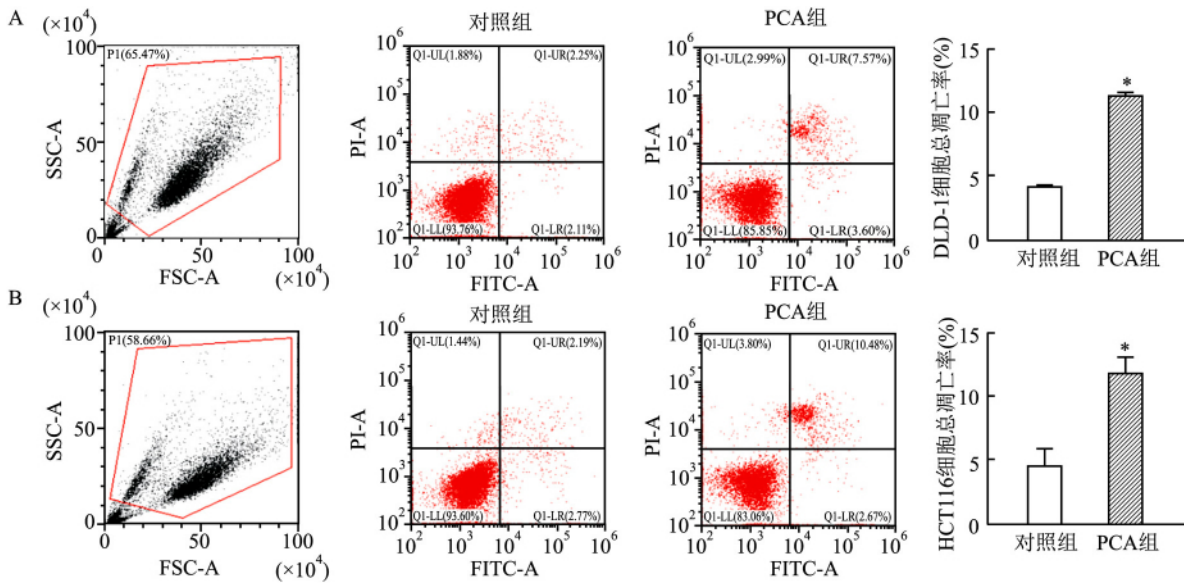


图3 PCA 处理前后 DLD-1、HCT116 细胞凋亡率

A: DLD-1 细胞; B: HCT116 细胞; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

**2.4 PCA 抑制 DLD-1、HCT116 细胞迁移** 结晶紫染色结果显示,PCA 处理前后,DLD-1 细胞跨膜数分别为(  $34.00 \pm 7.55$  )、(  $16.60 \pm 5.24$  )个;HCT116 细胞跨膜数分别为(  $34.33 \pm 7.77$  )、(  $13.53 \pm 5.64$  )个;两者处理前后比较差异均有统计学意义(  $P < 0.05$  )。见图4。

**2.5 PCA 逆转 Septin9 高甲基化状态** 亚硫酸氢钠测序结果显示,PCA 作用于 DLD-1、HCT116 细胞后,Septin9 启动子区域 CpG 位点甲基化平均水平分别为(  $45.20 \pm 2.48$  )%、(  $48.63 \pm 1.24$  )%,均低于对照组(  $63.50 \pm 2.76$  )%、(  $68.24 \pm 2.34$  )%,两者比较差异均有统计学意义(  $P < 0.05$  )。见图5。

**2.6 PCA 上调 Septin9 表达水平** qRT-PCR 检测结果显示,PCA 处理后,DLD-1 细胞 Septin9 mRNA 相对表达量为(  $6.43 \pm 0.54$  ),明显高于对照组(  $1.00 \pm 0.19$  );HCT116 细胞 Septin9 mRNA 相对表达量为(  $8.60 \pm 1.00$  ),明显高于对照组(  $1.00 \pm 0.17$  )。两者比较差异均有统计学意义(  $P < 0.05$  )。见图6。

### 3 讨论

结肠癌的发生是一个多因素、多阶段的复杂过程,涉及一系列经典遗传学和表观遗传学事件的积累。根据 KNUDSON 提出经典的肿瘤发生的“二次

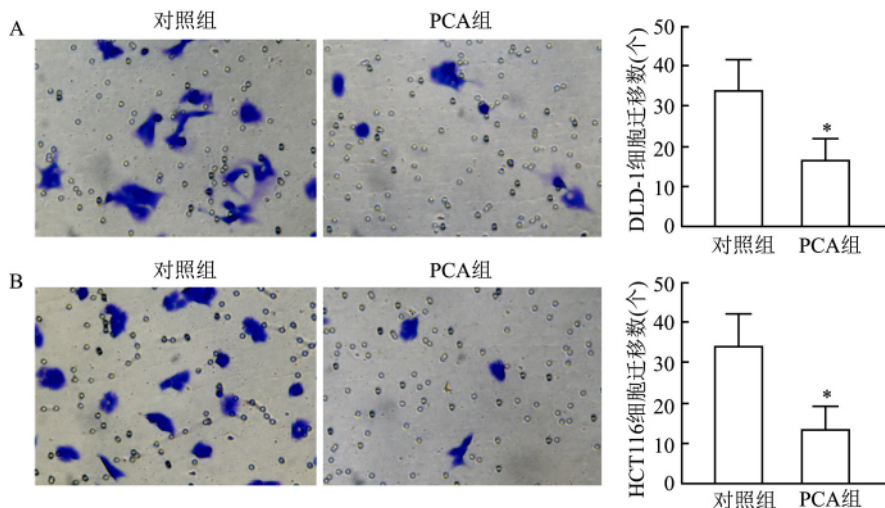


图4 PCA 处理前后 DLD-1、HCT116 细胞迁移 × 200

A: DLD-1 细胞; B: HCT116 细胞; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$



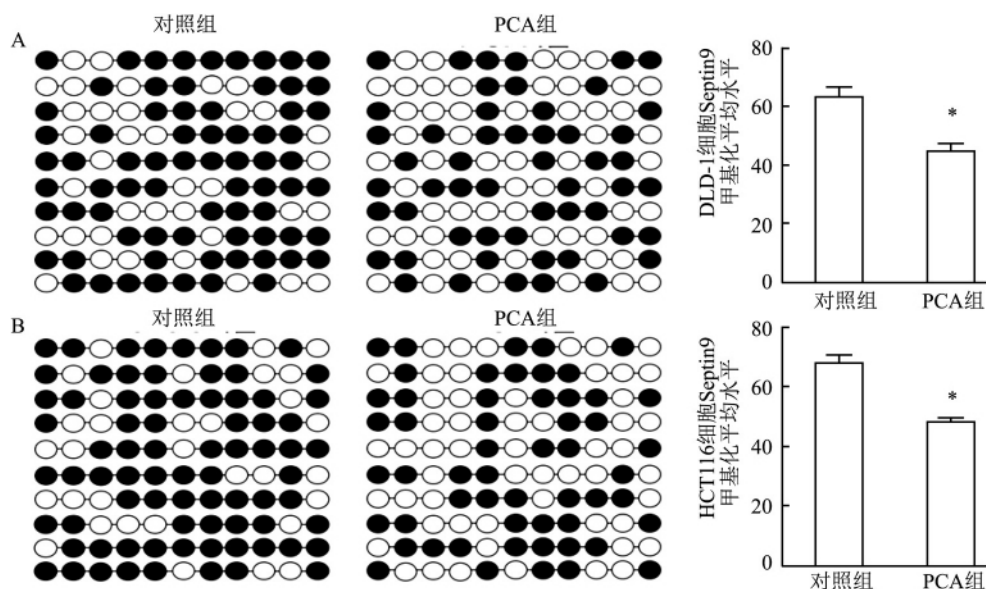


图5 PCA处理前后DLD-1、HCT116细胞Septin9甲基化状态

A: DLD-1细胞; B: HCT116细胞; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 黑色和空白的圈代表甲基化和非甲基化的CpG位点, 共有11个甲基化位点, 每条线代表一次单独的克隆, 共有10个克隆

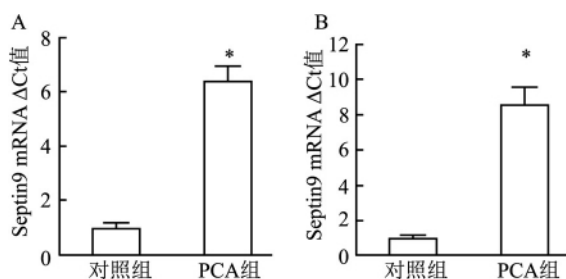


图6 PCA处理前后DLD-1、HCT116细胞Septin9 mRNA表达量

A: DLD-1细胞; B: HCT116细胞; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

打击理论”, 表观遗传异常改变在结肠癌发生过程中发挥着更重要的作用。Septin9是抑癌基因家族成员之一, 其高甲基化会导致自身表达异常, 从而失去正常的抑癌作用。研究<sup>[9]</sup>表明Septin9基因高甲基化及转录缺失见于多种肿瘤。

DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)催化下, 以S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体, 将甲基转移到胞嘧啶的5位碳原子上。由于DNA甲基化不同于经典遗传学改变, 具有可逆性的特点, 因此可以应用DNMTs抑制剂逆转DNA甲基化, 使得抑癌基因重新被激活, 发挥抑制肿瘤生长的作用, 这对于肿瘤治疗来说是十分有意义的<sup>[10]</sup>。PCA是临床常用的局部麻醉药物, 也是常见的非核苷类DNMTs抑制剂之一, 能够逆转多种实体肿瘤的恶性生物学行为。Xuan et al<sup>[7]</sup>研究发现PCA对人乳腺癌细胞具有生长抑制作用, 其

对乳腺癌细胞DNA甲基化的抑制作用是通过抑癌基因的活化发挥的。Li et al<sup>[8]</sup>在对人胃癌SGC-7901细胞的研究中发现, PCA可以通过上调抑癌基因CDKN2A和RAR $\beta$ 的表达来抑制胃癌细胞的增殖并且促进其凋亡。方洁等<sup>[11]</sup>通过对人膀胱癌T24细胞的研究发现, PCA可以抑制膀胱癌细胞的增殖, 诱导其凋亡, 将肿瘤细胞阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期。Ying et al<sup>[12]</sup>通过研究发现PCA能抑制人骨肉瘤MG63细胞增殖和迁移, 同时通过上调肿瘤抑制基因MiR-433b促进骨肉瘤细胞的凋亡。在非小细胞肺癌A549、NCI-H1975细胞株和其他的一些肿瘤模型中, PCA也表现出了潜在的治疗作用<sup>[13]</sup>。本研究发现, PCA抑制结肠癌DLD-1、HCT116细胞的增殖和迁移能力, 并且对其生长抑制有浓度依赖和时间依赖效应; PCA能显著诱导结肠癌DLD-1、HCT116细胞凋亡, 并且主要将细胞阻滞在G<sub>2</sub>/M期。未经PCA处理的结肠癌DLD-1、HCT116细胞, 其Septin9基因5'端启动子区域CpG岛出现不同程度的甲基化, 而使用去甲基化药物PCA处理后, Septin9基因的甲基化程度明显下降。进一步通过qRT-PCR检测Septin9基因的表达水平, 结果显示, PCA处理后Septin9 mRNA的表达量明显增加。以上结果表明, PCA能够通过逆转Septin9甲基化, 上调其表达水平, 从而抑制结肠癌DLD-1、HCT116细胞的增殖。

目前已报道的DNMTs抑制剂主要分为核苷类抑制剂和非核苷类抑制剂。地西他滨在几种核苷类

抑制剂中具有最强的去甲基化作用,并且被用于初治及难治复发 MDS 等恶性血液病患者的治疗<sup>[14]</sup>,但由于常导致患者出现严重的胃肠道反应和表现出骨髓毒性而限制了其广泛的临床应用<sup>[15]</sup>。可能是由于核苷类抑制剂通过在 DNA 复制过程中掺入新合成的 DNA 分子发挥作用。而非核苷类抑制剂 PCA 由于其毒副作用小、价格便宜、特异性强等优点,具有更广阔的临床应用前景,未来有望成为基于表观遗传学结肠癌治疗的安全候选药物。

### 参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394–424.
- [2] Siegel R L, Miller K D, Fedewa S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(3): 177–93.
- [3] Okugawa Y, Grady W M, Goel A. Epigenetic alterations in colorectal cancer: emerging biomarkers[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(5): 1204–25.
- [4] Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, et al. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(2): 79–92.
- [5] Werner R J, Kelly A D, Issa J P J. Epigenetics and precision oncology[J]. *Cancer J*, 2017, 23(5): 262–9.
- [6] Liang G N, Weisenberger D J. DNA methylation aberrancies as a guide for surveillance and treatment of human cancers[J]. *Epigenetics*, 2017, 12(6): 416–32.
- [7] Xuan W, James H, Zhao H L, et al. The potential benefits of the use of regional anesthesia in cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(12): 2774–84.
- [8] Li Y C, Wang Y, Li D D, et al. Procaine is a specific DNA methylation inhibitor with anti-tumor effect for human gastric cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 2240–9.
- [9] 张苗苗, 余辉, 陈庆, 等. SEPT9 基因在肿瘤中的研究进展[J]. *国际检验医学杂志* 2019 40(4): 453–8.
- [10] Kanwal R, Datt M, Liu X Q, et al. Correction: dietary flavones as dual inhibitors of DNA methyltransferases and histone methyltransferases[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0167897.
- [11] 方洁, 朱建坡, 张虎, 等. 普鲁卡因联合肌成束蛋白 1 对膀胱癌细胞的影响及机制研究[J]. *癌症进展* 2019, 17(13): 1561–4, 1578.
- [12] Ying B D, Huang H, Li H F, et al. Procaine inhibits proliferation and migration and promotes cell apoptosis in osteosarcoma cells by upregulation of microRNA-133b[J]. *Oncol Res*, 2017, 25(9): 1463–70.
- [13] Ma X W, Li Y, Han X C, et al. The effect of low dosage of procaine on lung cancer cell proliferation[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(22): 4791–5.
- [14] Li H M, Wang L R, Wu Y, et al. Very-low-dose decitabine is effective in treating intermediate- or high-risk myelodysplastic syndrome[J]. *Acta Haematol*, 2017, 138(3): 168–74.
- [15] Santini V, Allione B, Zini G, et al. A phase II, multicentre trial of decitabine in higher-risk chronic myelomonocytic leukemia[J]. *Leukemia*, 2018, 32(2): 413–8.

## Procaine inhibits the proliferation and DNA methylation in human colon cancer cells

Zhu Bo, Xie Shuang, Zhang Siying, et al

(Dept of Gastrointestinal Surgery, The Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000)

**Abstract Objective** To analyze the effect of procaine (PCA) on the methylation status and expression level of Septin9, and to explore the molecular mechanism of PCA inhibiting the proliferation of colon cancer DLD-1 and HCT116 cells. **Methods** Different concentrations of PCA treated colon cancer cells at different times, and MTS method was used to detect cell proliferation activity. Flow cytometry and Transwell experiments were used to detect the effects of PCA on cell cycle, apoptosis and migration ability; BGS method and qRT-PCR were used to detect the methylation status and expression level of Septin9 before and after PCA treatment. **Results** PCA inhibited the proliferation of DLD-1 and HCT116 cells in a concentration- and time-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, PCA treatment blocked cell growth in  $G_2/M$  phase, significantly induced apoptosis and inhibited cell migration ( $P < 0.05$ ). After PCA treatment, the degree of Septin9 methylation decreased, the expression of Septin9 mRNA increased, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** PCA can inhibit the proliferation and migration of colon cancer cells by reversing Septin9 methylation.

**Key words** colon cancer; procaine; Septin9; DNA methylation