

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.12.007

· 基础研究 ·

RG108 调控 TFPI-2 甲基化/TMPRSS4 表达对 NSCLC 细胞增殖和凋亡的影响

胡军, 罗毅, 谢勇, 高文奎(南华大学附属第二医院 心胸外科, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] **目的:** 探讨 RG108 对人非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) A549 和 H1299 细胞增殖、凋亡的影响及其可能的作用机制。**方法:** 体外培养 A549 和 H1299 细胞, 经不同浓度 RG108 处理后, 采用 MTT 法、流式细胞术分别检测细胞增殖率、细胞周期和凋亡水平; qPCR 和 Western blotting(WB) 法检测细胞内 TFPI-2 mRNA 和蛋白的表达及 TMPRSS4 的表达量, 以甲基化特异性 PCR 和比色法检测细胞中 TFPI-2 启动子区域甲基化的状态和程度; 分别采用 siRNA-TFPI-2 和 pcDNA3.0-TMPRSS4 质粒敲减 TFPI-2 或过表达 TMPRSS4, 然后检测细胞增殖率及凋亡率的变化。**结果:** RG108 处理后, A549 和 H1299 细胞的增殖率显著降低(均 $P < 0.05$)、细胞周期阻滞于 G1/S 期(均 $P < 0.05$) 而凋亡率显著增加(均 $P < 0.01$), 细胞中 TFPI-2 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 同时细胞中 TFPI-2 启动子区域甲基化程度显著降低(均 $P < 0.05$)、TMPRSS4 的表达也明显减少($P < 0.05$)。沉默 TFPI-2 表达后, A549 和 H1299 细胞的增殖水平显著增加(均 $P < 0.05$), 而转染 pcDNA3.0-TMPRSS4 质粒则显著降低细胞的凋亡率(均 $P < 0.05$)。**结论:** RG108 能够通过抑制 TFPI-2 甲基化负向调控 TMPRSS4 表达进而抑制 A549 和 H1299 细胞的增殖, 并促进其凋亡。

[关键词] RG108; 非小细胞肺癌; 组织因子途径抑制物-2; 穿膜丝氨酸蛋白酶 4; 细胞增殖; 凋亡

[中图分类号] R734.2; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)12-1358-07

RG108 affects the proliferation and apoptosis of NSCLC cells by regulating TFPI-2 methylation and TMPRSS4 expression

HU Jun, LUO Yi, XIE Yong, GAO Wenkui (Department of Cardiothoracic Surgery, the Second Hospital Affiliated to University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of RG108 on the proliferation and apoptosis of human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines (A549, H1299) and explore its molecular mechanism. **Methods:** A549 and H1299 cells were cultured in vitro and treated with different concentrations of RG108. The cell proliferation, cell cycle and apoptosis were detected by MTT assay and Flow cytometry, respectively. qPCR and Western blotting (WB) were used to detect the TFPI-2 mRNA and protein expressions as well as the expression of TMPRSS4 in cells. Meanwhile, the methylation status and degree of TFPI-2 promoter in cells were detected with Methylation-specific PCR (MSP) and colorimetry. Finally, siRNA-TFPI-2 and pcDNA3.0-TMPRSS4 plasmids were used to silence TFPI-2 or overexpress TMPRSS4, and then the changes in cell proliferation and apoptosis were detected. **Results:** After treatment with RG108, the proliferation rate of A549 and H1299 cells were significantly decreased (all $P < 0.05$), while the apoptosis rate were significantly increased ($P < 0.05$), the cell cycle were arrested in G1/S phase ($P < 0.05$), and the intracellular mRNA and protein expressions of TFPI-2 were significantly increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Meanwhile, the methylase degree in TFPI-2 promoter region and the expression of TMPRSS4 in cells were all significantly decreased (all $P < 0.05$). After TFPI-2 silence, the proliferation levels of A549 and H1299 cells were significantly increased (all $P < 0.05$); however, the apoptosis rate of A549 and H1299 cells were significantly reduced after transfection with pcDNA3.0-TMPRSS4 (all $P < 0.05$). **Conclusion:** RG108 can inhibit proliferation of A549 and H1299 cells and promote apoptosis by inhibiting the methylation of TFPI-2 and negatively regulates the expression of TMPRSS4.

[Key words] RG108; non-small cell lung cancer(NSCLC); tissue factor pathway inhibitor-2(TFPI-2); transmembrane protease serine 4 (TMPRSS4); cell proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(12): 1358-1364. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.12.007]

[基金项目] 湖南省卫生健康委科研发立项课题资助项目(No.20201917)。Project supported by the Health Commission Scientific Research Project of Hunan Province (No. 20201917)

[作者简介] 胡军(1979-),男,硕士,副主任医师,主要从事心胸外科疾病诊断与防治的基础与临床研究,E-mail:hujun0207@sina.com

[通信作者] 高文奎(Gao Wenkui, corresponding author),硕士,副主任医师,主要从事心胸疾病的基础与临床研究,E-mail:gwkw201@163.com

肺癌是全世界癌症死亡的主要原因之一,虽然化疗和放疗等标准治疗能够有效提高人非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的生活质量,但其5年生存率仍然较低^[1]。DNA甲基化作为人类表观遗传调控机制之一,其在肿瘤相关基因的表达调控上发挥着关键作用。通过调节甲基转移酶的活性可以改变甲基化状态,进而恢复细胞正常功能^[2]。因此,针对肿瘤细胞采取去甲基化治疗已成为目前肿瘤治疗的新方向。RG108是目前已知的一种小分子的甲基化转移酶抑制剂,其能高效地抑制DNA甲基化,且无细胞毒性^[3]。目前RG108已广泛应用于结肠癌与白血病的研究^[4]。

穿膜丝氨酸蛋白酶4(transmembrane protease serine 4, TMPRSS4)属于II型穿膜丝氨酸蛋白酶家族成员,已有研究^[5]通过用cDNA微阵列筛选了90例NSCLC患者的手术切除组织标本,确认TMPRSS4是一个新颖的药物治疗的基因靶点。此外,组织因子途径抑制物-2(tissue factor pathway inhibitor-2, TFPI-2)作为一种丝氨酸蛋白酶抑制剂对胰蛋白酶、糜蛋白酶、纤溶酶、血浆激肽释放酶的活性均有较强的抑制作用^[6];且目前已有研究^[7]证实TFPI-2还是一个可直接调节TMPRSS4表达的调控基因。考虑到TFPI-2、TMPRSS4与NSCLC的发生发展均存在密切关系,本研究拟通过探讨RG108对NSCLC细胞株增殖和凋亡的影响,以及其与TFPI-2、TMPRSS4之间关系,以期为临床治疗NSCLC患者提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人非小细胞肺癌细胞株A549、H1299购自中科院细胞库,DNA甲基转移酶抑制剂RG108购自CSNpharm公司,TRIzol试剂盒、逆转录试剂盒均购自美国Invitrogen公司,pcDNA3.0-TMPRSS4质粒和siRNA-TFPI-2由上海生物工程有限公司构建,荧光素酶报告基因pGL4.10-TMPRSS4由汉恒生物科技有限公司构建,MTT试剂购自北京索莱宝科技有限公司,兔源性TFPI-2一抗抗体、兔源性TMPRSS4一抗抗体、 β -actin抗体购自Cell Signaling公司,HRP标记的羊抗兔二抗抗体购自美国CST公司,Annexin V-FITC凋亡试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,Epiquik甲基化分析(比色法)试剂盒、甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MSP)试剂盒均购自北京百奥莱博科技有限公司。

1.2 细胞培养与处理

在A549、H1299细胞中加入含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,随后将细胞置于37℃、5% CO₂

培养箱中培养24 h,待细胞生长汇合度为80%左右时,采用浓度为0、20、40 μ mol/L RG108分别处理A549和H1299细胞,48 h后收集细胞待用。

1.3 MTT法检测A549、H1299细胞的增殖能力

收集RG108处理后的A549、H1299细胞,分别加入至96孔板中(细胞密度为 5×10^4 /ml,每孔100 μ l)。按照上述条件以RG108处理细胞,并设置3个复孔,细胞继续培养24 h。随后在各孔中分别加入10 μ l MTT试剂,继续培养4 h后加入150 μ l DMSO,待其充分混匀,用酶标仪于490 nm波长处检测各组细胞的光密度(D)值,并计算细胞增殖率,计算公式为:细胞增殖率= $[(D_{\text{处理组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{未处理组}} - D_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.4 qPCR法检测A549和H1299细胞中TFPI-2、TMPRSS4 mRNA的表达

取处理后的A549、H1299细胞,提取细胞总RNA,并用TaqMan逆转录试剂将其逆转录为cDNA,随后进行引物扩增。PCR反应条件:95℃ 5 min、95℃ 30 s、55℃ 20 s、72℃ 20 s,40个循环。引物设计如下:TFPI-2上下游引物为5'-GGGCAACGCCAACAATTTC-3'、5'-TTTCTTTGGTGCAGAAAGC-3',TMPRSS4上下游引物为5'-CCGATGTGTTCAACTGGAAG-3'、5'-CCCATCCAAT GATCCAGAGT-3',GAPDH上下游引物为5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'、5'-GAA GATGGT GATGGGATTTC-3'。扩增完毕后,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算TFPI-2和TMPRSS4 mRNA的相对表达量。

1.5 WB法检测A549和H1299细胞中TFPI-2和TMPRSS4蛋白的表达

收集RG108处理后的A549、H1299细胞并提取细胞总蛋白,用BCA法检测蛋白浓度。在蛋白样本中加入上样缓冲液后进行SDS-PAGE。随后进行转膜,并将膜置于5%脱脂奶粉中封闭2 h。加入TFPI-2一抗抗体以及TMPRSS4一抗抗体(均以1:1 000稀释)4℃孵育过夜,再加HRP标记羊抗兔二抗(1:5 000稀释)后室温孵育2 h。最后在膜上滴加ECL发光液后置于显影仪中避光显影,并通过Image J2X软件进行灰度值扫描,并计算各蛋白的相对表达量。

1.6 siRNA敲减A549、H1299细胞中TFPI-2表达

将对数生长期的A549、H1299细胞加入至6孔板中培养,随后将稀释好的siRNA-TFPI-2及siRNA-control分别加入至6孔板中,孵育20 h后弃去上清,并加入新的完全培养基继续培养72 h进行传代。干扰完成后通过WB法检测细胞内TFPI-2的表达水平,以评估RNA干扰效果。

1.7 流式细胞术检测A549、H1299细胞周期与凋亡

收集经过RG108处理后的A549、H1299细胞,用PBS缓冲液清洗细胞2~3次,随后800 \times g离心5 min,弃

上清并用 100 μl Binding 缓冲液重悬混匀细胞。随后加入 10 μl Annexin-V FITC 和 10 μl 的 PI 溶液(细胞凋亡检测)或加入 2 μl RNA 酶和 10 μl PI 溶液(细胞周期检测), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 20 min 后于流式细胞仪上进行检测。

1.8 MSP 法检测 A549、H1299 细胞内 TFPI-2 启动子区域甲基化状态

提取上述细胞 DNA 并用亚硫酸氢钠处理, DNA 纯化后按照试剂盒说明书以 10 μl 反应体系进行扩增 (5 μl PCR Mix、2 μl 引物、2 μl DNA、1 μl ddH₂O), 反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 随后以 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、56 $^{\circ}\text{C}$ 22 s、58 $^{\circ}\text{C}$ 32 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 反应 40 个循环。将 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 用溴化乙锭染色, 凝胶成像系统拍照并分析。

1.9 比色法检测 A549、H1299 细胞中 TFPI-2 启动子区域甲基化程度

收集 RG108 处理后的 A549、H1299 细胞, 提取总蛋白, 并用 BCA 法检测蛋白浓度。使用 Epiquik 甲基化分析试剂盒进行以下操作: 将 15 μg 细胞总蛋白加入到含有胞嘧啶 DNA 的样品孔中, 按照试剂盒的说明先后加入捕获抗体与显色剂, 并使用酶标仪于 450 nm 波长处读取各孔的光密度 (D) 值。细胞中 TFPI-2 启动子区域甲基化程度 = (处理组 D 值/对照组 D 值) \times 100%。

1.10 荧光素酶实验检测 A549、H1299 细胞中 TMPRSS4 的转录活性

采用转染试剂将构建好的 pGL4.10-TMPRSS4 荧光质粒分别转染至 A549 和 H1299 细胞中, 并以 pGL4.10 荧光质粒作为对照, 继续培养 48 h。随后在上述细胞中加入裂解液, 室温孵育 15 min, 孵育完成后 9 000 \times g 离心 10 min, 取上清进行 TMPRSS4 荧光素酶活性测定, 结果以相对光单位 (relative light units, RLU) 表示。计算公式: RLU = 萤火虫荧光素酶荧光强度/内参海肾荧光素酶荧光强度。

1.11 统计学处理

所有数据均取自 3 次独立实验。采用 SPSS 18.0 统计学软件进行分析。计数资料以百分率表示, 两组间率的比较采用 χ^2 检验; 正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数间比较采用双侧 t 检验, 多组间两两比较采用单因素方差分析后再进行 LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RG108 抑制肺癌细胞的增殖和诱导周期阻滞并促进其凋亡

采用 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ RG108 处理 A549 或 H1299 细胞后, MTT 法检测结果 (图 1A) 显示, RG108 在一定

程度上抑制细胞增殖, 其中 40 $\mu\text{mol/L}$ RG108 处理后细胞增值率降低最为明显, 分别为对照组的 (58 \pm 2.35)% 和 (65 \pm 1.67)% (均 $P < 0.05$)。流式细胞术检测结果 (图 1B, 表 1) 显示, RG108 处理后能诱导 A549、H1299 细胞周期阻滞, 主要表现为 G1 和 S 期细胞增多, 其中 40 $\mu\text{mol/L}$ RG108 处理 A549、H1299 细胞后 G1、S 期细胞为 (80.81 \pm 1.64)% 和 (14.14 \pm 0.97)%、(78.97 \pm 2.13)% 和 (19.45 \pm 1.17)% (均 $P < 0.05$)。此外, RG108 也能促进 A549、H1299 细胞凋亡, 且随着 RG108 浓度的递增, 凋亡率逐渐增高 (图 1C), 其中 40 $\mu\text{mol/L}$ RG108 处理后凋亡率可达 (34.35 \pm 2.41)% 和 (36.78 \pm 3.07)% (均 $P < 0.05$)。

2.2 RG108 显著上调 A549、H1299 细胞中 TFPI-2 mRNA 和蛋白的表达

qPCR 检测结果 (图 2A) 显示, A549 或 H1299 细胞中 TFPI-2 mRNA 表达水平较低, 而采用不同浓度 RG108 处理后, TFPI-2 mRNA 表达水平逐渐增高。WB 检测结果 (图 2B) 也显示, RG108 处理后可显著上调细胞内 TFPI-2 蛋白的表达水平。

2.3 RG108 明显抑制 A549、H1299 细胞内 TFPI-2 启动子区域甲基化

MSP 法检测结果 (图 3A) 显示, 不同浓度 RG108 处理细胞后, 能有效减少 TFPI-2 的甲基化, 而非甲基化的 TFPI-2 逐渐增多。比色法检测结果 (图 3B) 显示, 不同浓度 RG108 处理后, A549 或 H1299 细胞内 TFPI-2 甲基化程度均有所降低, 其中 40 $\mu\text{mol/L}$ RG108 处理后, A549 和 H1299 细胞中甲基化程度较对照组均降低了 (44.6 \pm 2.78)% 和 (53.4 \pm 3.01)% (均 $P < 0.05$)。

2.4 RG108 抑制肺癌细胞中 TMPRSS4 表达

采用 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ RG108 处理 A549 和 H1299 细胞后, WB 检测结果 (图 4A) 显示, 胞内 TMPRSS4 蛋白表达水平随着 RG108 浓度的递增而降低。荧光素酶报告实验检测结果 (图 4B) 显示, 经 RG108 处理后, A549 和 H1299 细胞内 TMPRSS4 报告基因活性显著降低 (均 $P < 0.05$)。以上实验结果提示, RG108 能从基因转录活性和蛋白表达水平上抑制 TMPRSS4 表达。

2.5 沉默 TFPI-2 或过表达 TMPRSS4 显著减轻 RG108 对 A549 和 H1299 细胞的增殖抑制作用并降低凋亡率

采用 siRNA 沉默 TFPI-2 表达后, 再用 40 $\mu\text{mol/L}$ RG108 处理 48 h, MMT 法检测结果 (图 5A、B) 显示, 沉默 TFPI-2 表达后可显著减轻 RG108 对 A549 和 H1299 细胞增殖的抑制作用 (均 $P < 0.05$)。同时, qPCR 法检测结果 (图 5C) 显示, 沉默 TFPI-2 也能明显削弱 RG108 对 TMPRSS4 mRNA 表达的抑制作用 ($P < 0.05$)。此外, WB 法检测结果也显示, 转染 pcDNA3.0-TMPRSS4 质粒后,

细胞内 TMPRSS4 蛋白的表达水平显著上升(图 5D), 图 5E)。以上结果提示, RG108 通过 TFPI-2/TMPRSS4 轴而影响 A549 和 H1299 细胞的增殖和凋亡。

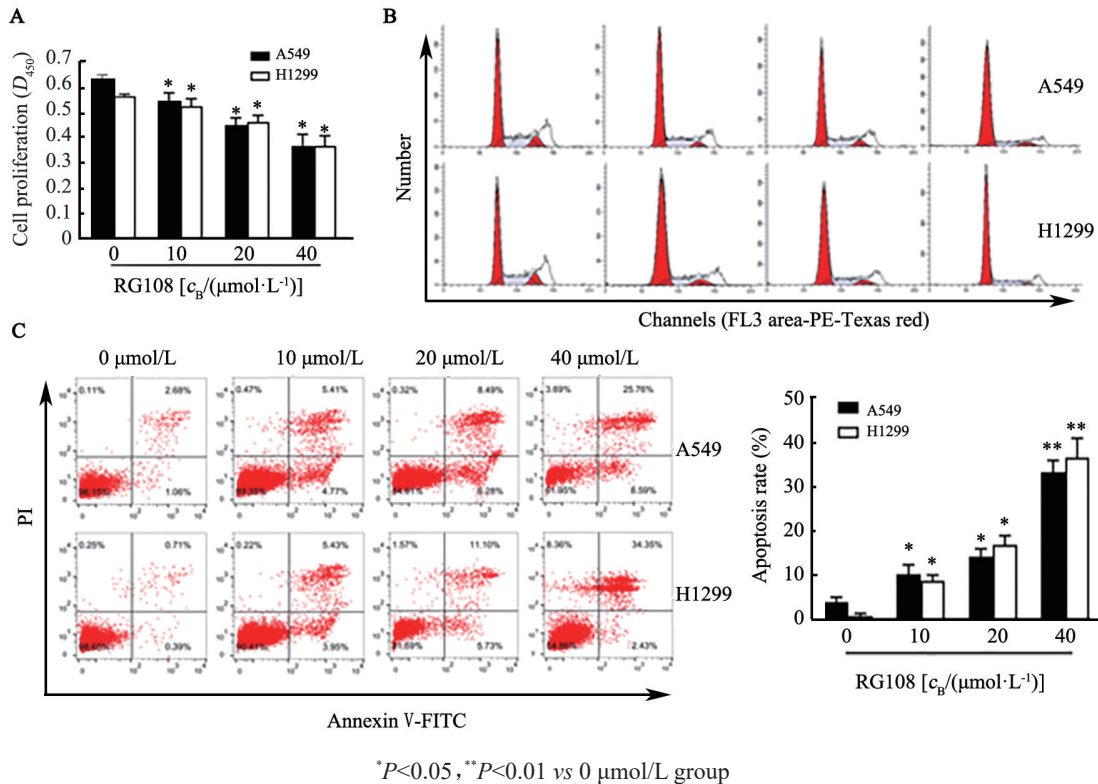


图 1 不同浓度 RG108 对 A549 或 H1299 细胞增殖(A)、周期(B)和凋亡(C)的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of RG108 on proliferation (A), cell cycle (B) and apoptosis (C) of A549 or H1299 cells

表 1 RG108 对 A549 或 H1299 细胞周期的影响(%)

Tab.1 Effect of RG108 on cell cycle of A549 or H1299 cells (%)

RG108 ($c_B/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	A549			H1299		
	G1	G2	S	G1	G2	S
0	59.95±2.12	10.16±1.08	29.9±1.32	56.89±2.05	11.31±0.76	31.80±1.65
10	67.15±0.83	5.38±1.22	27.47±0.72	64.16±1.63	7.47±0.56	28.37±1.07
20	74.25±1.54	7.48±1.45	18.27±0.25	72.79±1.18	6.37±1.04	20.84±1.98
40	80.81±0.89	5.05±0.23	14.14±0.79	78.97±1.76	1.58±0.21	19.45±1.88
F	4.71	3.62	5.71	4.58	6.12	3.92
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

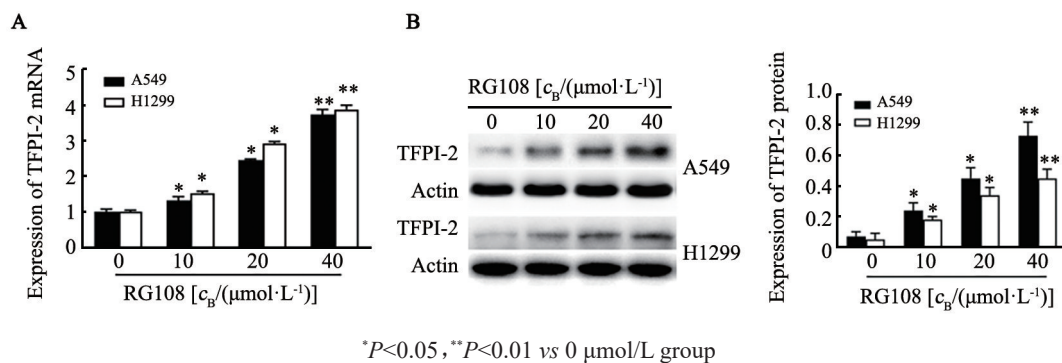


图 2 RG108 对 A549 或 H1299 细胞中 TFPI-2 mRNA(A)以及蛋白(B)表达的影响

Fig.2 Effect of RG108 on TFPI-2 mRNA (A) and protein (B) expressions in A549 or H1299 cells

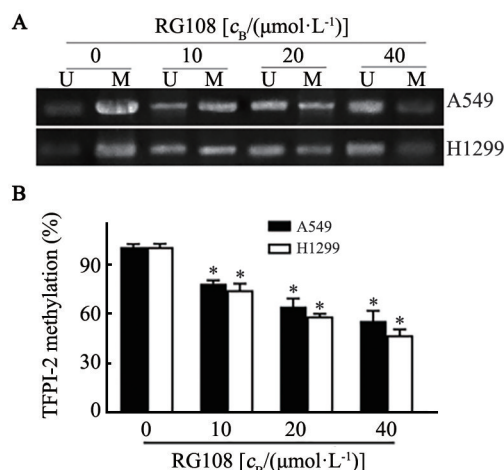


图3 RG108对细胞中TFPI-2启动子区域甲基化状态(A)和程度(B)的影响

Fig.3 Effects of RG108 on methylation status (A) and degree (B) of TFPI-2 promoter region in cells

3 讨论

NSCLC 约占所有肺癌类型的 80%，与小细胞癌相比，其癌细胞生长分裂较慢，扩散转移相对较慢。

目前 NSCLC 确切发病机制尚不清楚，可能与生活方式、遗传因素等均存在关系^[8]。有研究^[9]表明，RG108 可使 RASSF1A 基因启动子区域去甲基化，进而抑制肺癌 A549 细胞增殖。本研究采用 RG108 处理 A549、H1299 细胞后，进一步证实 RG108 能够抑制肺癌细胞增殖并促进其凋亡。笔者推测可能是由于 RG108 具有特异性较高的抑制作用，通过抑制肿瘤细胞中胞嘧啶的甲基化水平而发挥抑制肿瘤的作用。

TFPI-2 是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂，广泛存在于人体内的多个组织中。研究^[6]显示，TFPI-2 的表达与肿瘤的发生发展密切相关，其可能通过抑制胰蛋白酶、纤溶酶等多种酶的活性而发挥促进肿瘤细胞凋亡的作用。在肝癌细胞中过表达 TFPI-2 可显著抑制肝癌细胞增殖，表明 TFPI-2 可作为一种抑癌基因来调控肝癌细胞增殖^[10]。本研究发现，RG108 处理肺癌细胞能够促进 TFPI-2 表达进而抑制细胞增殖，而采用 siRNA 沉默 TFPI-2 表达则会减轻 RG108 对 A549、H1299 细胞增殖的抑制作用。说明 TFPI-2 参与了 RG108 对肺癌细胞的调控作用，RG108 可能通过 TFPI-2 来抑制肺癌细胞中某些胰蛋白酶以及溶解酶的活性，从而抑制肿瘤细胞增殖。

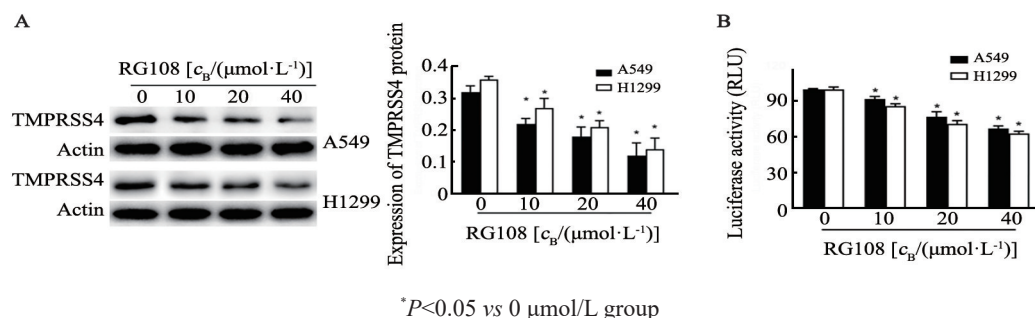


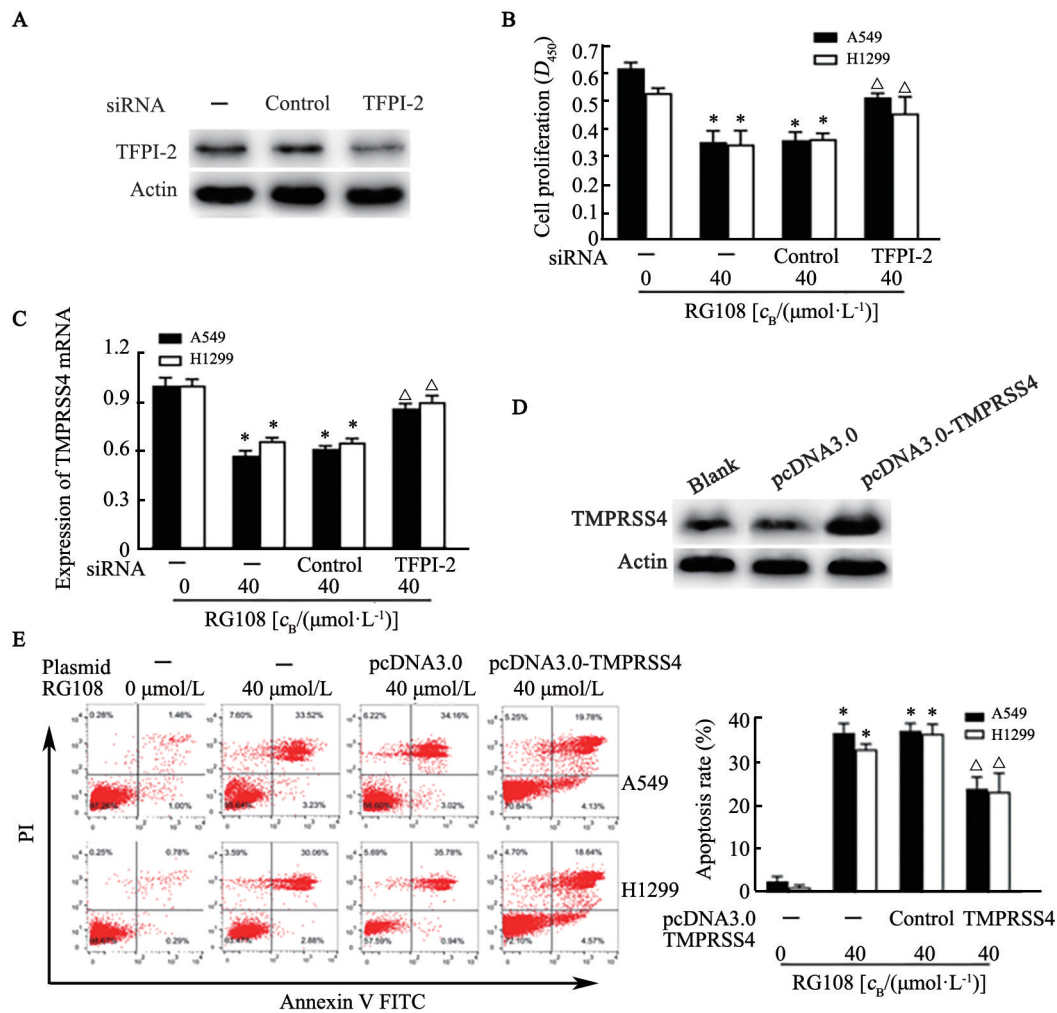
图4 RG108对TMPRSS4蛋白表达(A)及其基因转录活性(B)的影响

Fig.4 Effects of RG108 on TMPRSS4 protein expression (A) and gene transcriptional activity (B)

研究^[11-13]表明，在结肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤组织中，TFPI-2 表达水平变化可能是由于 TFPI-2 启动子甲基化改变引起的。相关研究^[14]证实，在 NSCLC 患者体内 TFPI-2 的甲基化程度与肿瘤发展的恶性程度呈负相关。本研究中，经 RG108 处理后的肺癌细胞中 TFPI-2 启动子区域甲基化程度显著减轻。RG108 处理 A549、H1299 细胞后能够抑制细胞增殖可能就是通过降低 TFPI-2 的甲基化水平进而发挥作用。本实验进一步证实了 TFPI-2 能够参与 RG108 对肺癌 A549、H1299 细胞增殖与凋亡的调控作用。

TMPRSS4 作为一种穿膜丝氨酸蛋白酶，具有丝氨酸蛋白酶保守结构域，能够参与多种细胞生理过程，包括细胞周期、增殖、凋亡等^[15]。如 TMPRSS4 表

达功能出现异常将直接影响肿瘤的发生发展。研究^[16]显示，TMPRSS4 在结肠癌中呈高表达，而干扰细胞中 TMPRSS4 的表达可显著抑制癌细胞的增殖与迁移。此外，TMPRSS4 基因还可有效抑制人乳腺癌细胞凋亡，并促进癌细胞增殖^[17]。本研究在 RG108 处理的 A549、H1299 细胞中发现 TMPRSS4 的表达水平显著降低，而转染 pcDNA3.0-TMPRSS4 质粒后，A549、H1299 细胞凋亡率也出现了降低，提示 TMPRSS4 与肺癌的发生发展也存在密切关系。由于 TMPRSS4 可与其他因子相互作用激活相关蛋白酶进而促进肿瘤细胞增殖，因此本研究中 RG108 处理 A549、H1299 细胞后，主要通过调控 TMPRSS4 表达来发挥抑制癌细胞增殖的作用。



* $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ group; $\Delta P < 0.05$ vs Control group or pcDNA3.0 group

A, B: Effect of silencing TFPI-2 on cell proliferation; C: Effect of silencing TFPI-2 on intracellular expression of TMPRSS4; D: The level of intracellular TMPRSS4 after transfection with pcDNA3.0-TMPRSS4 plasmid; E: Effect of TMPRSS4 overexpression on the apoptosis

图5 沉默 TFPI-2 或过表达 TMPRSS4 对细胞增殖与凋亡的影响

Fig.5 Effects of TFPI-2 silencing or TMPRSS4 overexpression on cell proliferation and apoptosis

综上所述,本研究初步证实 RG108 能够通过抑制 TFPI-2 甲基化负向调控 TMPRSS4 表达进而抑制 A549 以及 H1299 细胞增殖,并促进其发生凋亡。但 RG108 在调控肺癌细胞增殖与凋亡过程中是否还存在其他机制目前尚不清楚,有待进一步探讨,本研究结果为临床 NSCLC 的治疗提供了新的思路。

[参考文献]

[1] RECK M, RABE K F. Precision diagnosis and treatment for advanced non-small-cell lung cancer[J]. N Engl J Med, 2017, 377 (9): 849-861. DOI:10.1056/NEJMra1703413.
 [2] MARI-ALEXANDRE J, DIAZ-LAGARES A, VILLALBA M, et al. Translating cancer epigenomics into the clinic: focus on lung cancer [J]. Transl Res, 2017, 189: 76-92. DOI:10.1016/j.trsl.2017.05.008.
 [3] WU C F, ZHANG D F, ZHANG S S, et al. Optimizing treatment of DNA methyltransferase inhibitor RG108 on porcine fibroblasts for somatic cell nuclear transfer[J]. Zuchthygiene, 2019, 54(12): 1604-1611. DOI:10.1111/rda.13569.

[4] BRUECKNER B, GARCIA BOY R, SIEDLECKI P, et al. Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases[J]. Cancer Res, 2005, 65(14): 6305-6311. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2957.
 [5] WALLRAPP C, HÄHNEL S, MÜLLER-PILLASCH F, et al. A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(10): 2602-2606.
 [6] SPRECHER C A, KISIEL W, MATHEWES S, et al. Molecular cloning, expression, and partial characterization of a second human tissue-factor-pathway inhibitor[J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(8): 3353-3357 [2020-08-06]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC 43575/. DOI:10.1073/pnas.91.8.3353.
 [7] HAMAMOTO J, SOEJIMA K, NAOKI K, et al. Methylation-induced downregulation of TFPI-2 causes TMPRSS4 overexpression and contributes to oncogenesis in a subset of non-small-cell lung carcinoma [J/OL]. Cancer Sci, 2015, 106(1): 34-42[2020-08-05]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4317784/. DOI:10.1111/cas.12569.
 [8] LARSEN J E, CASCONI T, GERBER D E, et al. Targeted therapies for lung cancer: clinical experience and novel agents[J/OL]. Cancer J,

- 2011, 17(6): 512-527[2020-08-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3381956/>. DOI:10.1097/PPO.0b013e31823e701a.
- [9] 姜蕊, 宋伟. RG108对肺腺癌A549细胞增殖、凋亡及RASSF1A基因表达的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2009, 18(4): 354-358. DOI: 10.3870/zgzzhx.2009.04.002.
- [10] SUN F K, SUN Q, FAN Y C, et al. Methylation of tissue factor pathway inhibitor 2 as a prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after hepatectomy[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 31(2): 484-492. DOI:10.1111/jgh.13154.
- [11] HIBI K, GOTO T, KITAMURA Y H, et al. Methylation of TFPI2 gene is frequently detected in advanced well-differentiated colorectal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(4): 1205-1207.
- [12] ANDRESEN M S, ALI H O, MYKLEBUST C F, et al. Estrogen induced expression of tissue factor pathway inhibitor-2 in MCF7 cells involves lysine-specific demethylase 1[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 443: 80-88. DOI:10.1016/j.mce.2017.01.016.
- [13] 韩东兴, 刘兵, 潘卉, 等. TFPI-2在结直肠癌及正常结肠黏膜组织中的表达差异[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2015, 22(3): 385-387. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.03.019.
- [14] ROLLIN J, IOCHMANN S, BLÉCHET C, et al. Expression and methylation status of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in non-small-cell lung cancer[J/OL]. *Br J Cancer*, 2005, 92(4): 775-783[2020-08-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2361876/>. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602298.
- [15] 李培超, 田辉, 岳韦名, 等. 早期非小细胞肺癌组织中TMPRSS4的表达与肿瘤血管形成的关系[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2015, 22(4): 484-488. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2015.04.013.
- [16] 黄傲, 周厚民, 赵红超, 等. TMPRSS4在结肠直肠癌中高表达并影响结肠癌细胞的增殖及迁移能力[J]. 外科理论与实践, 2013, 18(4): 346-351. DOI: CNKI:SUN:WKLL.0.2013-04-021.
- [17] ASSANI G, SEGBO J, YU X Y, et al. Downregulation of TMPRSS4 enhances triple-negative breast cancer cell radiosensitivity through cell cycle and cell apoptosis process impairment[J/OL]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(12): 3679-3687[2020-08-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7173382/>. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.12.3679.

[收稿日期] 2020-08-15

[修回日期] 2020-11-20

[本文编辑] 阮芳铭