

求的骨植入材料,具有良好的应用前景。

#### 参考文献

- [1] SHEKHAWAT D, SINGH A, BANERJEE M K, et al. Bio-ceramic composites for orthopaedic applications: A comprehensive review of mechanical, biological, and microstructural properties [J]. *Ceramics International*, 2021, 47 (3): 3013-3030.
- [2] LI B, WEBSTER T J. Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2018, 36 (1): 22-32.
- [3] 陆肖璇, 张露露, 阳曦, 等. 钛植入物促骨整合及抗感染涂层的研究进展 [J]. *中国生物医学工程学报*, 2021, 40 (5): 620-627.
- [4] 李雷, 江少群, 王刚, 等. 阳极氧化工艺及改性对 TiO<sub>2</sub> 纳米管阵列薄膜疏水性的影响 [J]. *机械工程材料*, 2021, 45 (4): 8-12, 18.
- [5] 魏丽英, 李景欣. HPLC 法对阿仑膦酸钠成分的测定 [J]. *北方药学*, 2021, 18 (12): 1-3.
- [6] 熊雯, 郑萍, 袁宇琳. HPLC-PAD 法测定硫酸庆大霉素氯化钠注射液中的庆大霉素 C 组分及有关物质 [J]. *华西药杂志*, 2021, 36 (5): 558-562.
- [7] THARANI KUMAR S, PRASANNA DEVI S, KRITHIKA C, et al. Review of metallic biomaterials in dental applications [J]. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2020, 12 (5): 14-19.
- [8] VAN HENGEL I J, PUTRA N E, TIEROLF M W M, et al. Biofunctionalization of selective laser melted porous titanium using silver and zinc nanoparticles to prevent infections by antibiotic-resistant bacteria [J]. *Acta Biomater*, 2020, 107: 325-337.
- [9] 李欣濛, 李佳月, 张欣, 等. 纳米黑磷在光疗和药物载体方面的研究与应用 [J]. *药学报*, 2021, 56 (1): 178-189.
- [10] 中国科学院深圳先进技术研究院. 一种纳米级黑磷及其制备方法与应用: 106185849A [P]. 2016-12-07.
- [11] 中国科学院深圳先进技术研究院. 一种载药黑磷壳聚糖复合纳米球及其制备方法和应用: 110090307A [P]. 2019-08-06.
- [12] 中山大学. 一种空心纳米颗粒二氧化钛/黑磷烯光催化剂及其制备方法与应用: 108514887A [P]. 2018-09-11.
- [13] 深圳大学. 一种纤维素/黑磷量子点复合水凝胶及其制备方法和应用: 108084460A [P]. 2018-05-29.

#### • 临床研究 •

## 5-Aza-CdR 对胃癌中 SOX17 基因表达的影响

沈惠群<sup>1</sup> 沈松菲<sup>2</sup>

**【摘要】** 目的 检测胃癌中 SOX17 的表达情况,探讨 5-Aza-CdR 对胃癌细胞 SOX17 表达的影响。方法 采用免疫组织化学染色 (immunohistochemistry, IHC) 法检测胃癌组织及癌旁组织中 SOX17 蛋白的表达情况,分析其表达与患者临床病理参数的关系。实时定量聚合酶链式反应 (real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR) 和蛋白质印迹 (Western blot) 法检测胃癌细胞株 MGC-803、MKN-45、AGS 及正常胃黏膜细胞株 GES-1 中 SOX17 基因 mRNA 和蛋白的表达情况。甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 法检测胃癌细胞系 SOX17 基因启动子区甲基化情况。CCK-8 法和流式细胞仪分别检测 5-Aza-CdR 对 AGS 细胞增殖和细胞周期的影响。结果 与癌旁组织相比,胃癌组织 SOX17 蛋白阳性表达率明显降低 (癌旁组织 80.48% vs. 胃癌组织 19.51%,  $P < 0.001$ ),与胃癌患者性别、年龄、临床分期、分化程度、是否伴脉管癌栓无关。SOX17 基因 mRNA 和蛋白在各胃癌细胞系表达明显降低 ( $P < 0.05$ ),且在 AGS 细胞中表达最低。SOX17 基因启动子区在 AGS 和 MKN45 细胞中均完全甲基化, MGC-803 细胞部分甲基化, GES-1 细胞完全非甲基化。去甲基化药物 5-Aza-CdR 可下调甲基转移酶的表达,逆转 SOX17 基因甲基化,使其 mRNA 和蛋白表达上调。5-Aza-CdR 还可抑制 AGS 细胞的增殖并使细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。结论 5-Aza-CdR 可逆转胃癌细胞 SOX17 基因甲基化,上调其 mRNA 和蛋白表达,从而抑制胃癌的发生发展。

**【关键词】** 胃癌; SOX17 基因; 甲基化

**【中图分类号】** R735.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2024)01-0024-06

**基金项目:** 福建医科大学启航基金 (2022QH1276)

**作者单位:** 1 福建医科大学附属漳州市医院肿瘤内科,漳州 363000; 2 福建医科大学附属协和医院肿瘤内科,福州 350001

**通信作者:** 沈松菲, Email: shensongfei@163.com

**DOI:** 10.20148/j.fmj.2024.01.007

胃癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率分别居于全部恶性肿瘤的第四位和第三位<sup>[1]</sup>。据 2015 年最新统计数据,在我国胃癌的发生率和致死率均位列第二<sup>[2]</sup>。胃癌患者总体预后仍不容乐观,总生存率不到 50%,晚期胃癌的 5 年生存率不到 20%。SOX17 基因是 SOX 基因家族的一员,除了参与调控组织特异性、分化、器官发育、干细胞稳态等重要生命过程<sup>[3]</sup>,还可通过调节细胞增殖和细胞周期<sup>[4]</sup>参与肿瘤的发生发展。在多种恶性肿瘤中,SOX17 基因均可因其启动子区 CpG 岛异常甲基化而表达沉默,从而丧失其抑癌基因的功能,促进肿瘤的发生<sup>[5-7]</sup>。SOX17 基因的高频突变或异常表达可能与其 DNA 甲基化相关,并影响临床预后,SOX17 基因可能成为胃癌诊断和预后的重要分子标记物。本研究分析了胃癌组织和癌旁组织中 SOX17 蛋白的表达情况,并从细胞学水平上进一步阐明其异常表达可能的机制,旨在提高对胃癌相关基因表达的认识。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

收集福建医科大学附属协和医院 2016 年 12 月至 2017 年 2 月间经病理检查确诊的胃癌 41 例,相应癌旁组织作为对照,癌旁组织取自距离癌组织 2~5 cm 处。患者中位年龄 67 岁(35~83 岁),包括 31 例男性、10 例女性。全部患者术前均未经化疗、放疗、靶向治疗等任何新辅助治疗。所取标本均浸泡于福尔马林中,固定后进行石蜡包埋,制备 4  $\mu$ m 的切片用于免疫组化染色。本研究经患者知情同意及医院伦理委员会批准(伦理编号 2021KYB265)。

### 1.2 主要试剂

反转录试剂盒、Easstep qPCR Master Mix (2X) 试剂盒(Promega 公司),EpiTect Fast Bisulfite Kit (50) 试剂盒(QIAGEN 公司),兔抗人 SOX17 基因单克隆抗体(1:100)(CST 公司),免疫组化 Elivision plus 试剂盒(福州脉新生物技术开发有限公司),CKK-8 试剂盒(北京碧云天生物技术公司),qPCR 及 MSP 引物由上海生物工程技术有限公司设计。SOX17 上游引物 5'-GCCCTGGG-TACGCTGTAGAC-3',下游引物 5'-CTGGCTCT-GGTCGTCAGTGG-3'; DNMT1 上游引物 5'-CCGAGTTGGTGATGGTGTGTAC-3',下游引物 5'-AGGTTGATGTCTGCGTGGTAGC-3'; DNMT3A 上游引物 5'-TAT TGATGAGCGCACA-

AGAGAGC-3',下游引物 5'-GGGTGTTCCA-GGGTA ACATTGAG-3'; DNMT3B 上游引物 5'-GACTTGGTGATTGGCGGAA-3',下游引物 5'-GGCCCTGTGAGCAGCAGA-3'。SOX17 甲基化上游引物 5'-GGAGATTCGCGTAGTTTTTCG-3',甲基化下游引物 5'-AACCCGACCATCACCG-CG-3'; SOX17 非甲基化上游引物 5'-GGA-GATTTGTGTAGTTTTTG-3',SOX17 非甲基化下游引物 5'-AACCCAACCATCACCA-3'<sup>[8]</sup>。

### 1.3 方法

**1.3.1 免疫组织化学(IHC)法** 采用 Elivision 二步法检测 41 例胃癌组织及癌旁组织中 SOX17 蛋白的表达情况。将石蜡包埋的组织制备成 4  $\mu$ m 厚的切片,常规脱蜡至水,按照 Elivision plus 试剂盒说明书,进行后续实验。由两名经验丰富的病理科医师采用双盲法阅片,以细胞染色强度及阳性率的乘积来半定量表达水平。按阳性细胞数及染色强度两项乘积值进行计分。

**1.3.2 RNA 提取和 Real-time PCR** 采用 TRIzol 试剂法提取胃癌组织和胃癌细胞总 RNA,并测定 RNA 纯度。取 1  $\mu$ g 总 RNA 用反转录试剂盒逆转录合成 cDNA,取 2  $\mu$ L cDNA 加入含 10  $\mu$ L Easstep qPCR Master Mix、正向和反向引物的反应体系中,加水补足至 20  $\mu$ L。于 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪进行扩增,反应条件:第一阶段 95  $^{\circ}$ C 10 min,1 个循环;第二阶段 95  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 40 s,70  $^{\circ}$ C 15 min,40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 SOX17 mRNA 的相对表达量。

**1.3.3 DNA 提取和 MSP** 采用酚/氯仿抽提法提取组织 DNA,进行定量后取适量 DNA。用 EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (50) 试剂盒对基因组 DNA 进行亚硫酸盐修饰与纯化。以经甲基化转移酶(M. SssI)处理过的外周血淋巴细胞 DNA 为甲基化阳性对照、未经处理的外周血淋巴细胞 DNA 甲基化阴性对照、H<sub>2</sub>O 为空白对照。MSP 结果判定<sup>[9]</sup>:(1)完全甲基化:甲基化引物扩增出特异性的目的条带而用非甲基化引物未能扩增出目的条带。(2)完全非甲基化:甲基化引物未能扩增出特异性目的条带而用非甲基化引物扩增出产物为 SOX17 基因完全非甲基化。(3)部分甲基化:两者都可扩增出目的条带。

**1.3.4 去甲基化药物 5-Aza-CdR 干预及实验细胞制备** 以不同浓度 5-Aza-CdR 处理实验细胞株,用药后常规培养,培养过程不换液。待不同浓度 5-

Aza-CdR 作用 48 h 后, 消化、收集各实验组细胞悬液, 分别于 800 r/min 离心 5 min, 再以 PBS 洗涤 2 次, 保证细胞总数大约为  $2 \times 10^6$  /mL, 以备下一步实验。

**1.3.5 CCK-8 和流式细胞实验** CCK-8 实验: 取对数生长期的 AGS 细胞, 按 2 000 个/孔的密度接种于 96 孔板, 分别加入 50  $\mu$ L 浓度为 1、5、10  $\mu$ mol/L 的 5-Aza-CdR 于培养板, 每孔设置 3 个复孔。培养 24、48、72 h 后加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 继续孵育 2 h, 测吸光值, 计算抑制率。流式细胞实验: 消化、离心、收集对照组及不同浓度 5-Aza-CdR (0、1、5、10  $\mu$ mol/L) 作用 48 h 后的细胞样品, 预冷的 70% 乙醇固定细胞, 碘化丙啶染色液染色 30 min, 在流式细胞仪 (FACSVerser) 上分析。所有实验均至少重复 3 次。

1.4 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件, 计量资料用均数  $\pm$  标准差表示, 两组样本的均数比较采用两个独立样本 *t* 检验, 多组样本间均数比较采用单因素方差分析。两样本率的比较采用连续校正卡方检验。以  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

2 结果

2.1 胃癌组织中 SOX17 蛋白表达情况及其与胃癌临床病理特征的关系

胃癌组织和癌旁组织中 SOX17 蛋白阳性表达率分别为 19.51% (8/41) 和 80.48% (33/41), 胃癌组织 SOX17 蛋白阳性表达率明显低于癌旁组织 ( $P < 0.001$ )。SOX17 蛋白阳性表达率与胃癌患者性别、年龄、临床分期、分化程度、是否伴脉管癌栓无关 (表 1)。

2.2 胃癌细胞系中 SOX17 mRNA 和蛋白表达情况

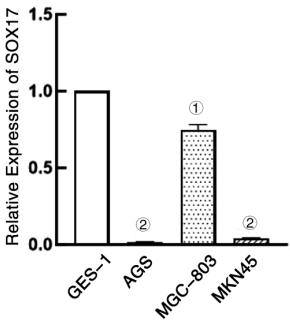
3 种胃癌细胞株 AGS、MGC-803、MKN-45 和正常胃黏膜上皮细胞株 GES-1 中 SOX17 基因 mRNA 的相对表达量分别为  $0.018 \pm 0.000$ 、 $0.750 \pm 0.028$ 、 $0.040 \pm 0.003$  和  $1 \pm 0.000$ 。与 GES-1 相比, 3 株胃癌细胞 SOX17 基因的表达均降低 ( $P < 0.05$ ), 且 AGS 细胞的表达最低。Western blot 法显示 SOX17 在蛋白水平的检测结果与 mRNA 水平的改变一致 (见图 1、2)。

2.3 4 种细胞株中 SOX17 基因启动子区甲基化情况的差异

SOX17 基因启动子区在 AGS 和 MKN45 中为完全甲基化, MGC-803 中为部分甲基化, GES-1 中为完全非甲基化 (见图 3)。

表 1 SOX17 蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系 (例)

临床病理参数	例数	SOX17 蛋白表达		$\chi^2$ 值	P 值
		阳性	阴性		
性别					
男	31	5	26	0.254	0.615
女	10	3	7		
年龄					
<65 岁	17	3	14	<0.001	1
$\geq 65$ 岁	24	5	19		
分化程度					
分化好	18	4	14	<0.001	1
分化差	23	4	19		
脉管癌栓					
无	12	1	11	0.531	0.466
有	29	7	22		
临床分期					
I、II 期	18	3	15	<0.001	0.992
III、IV 期	23	5	18		



注: ①  $P < 0.001$ ; ②  $P < 0.000 1$ 。

图 1 不同细胞株 SOX17 基因 mRNA 相对表达量

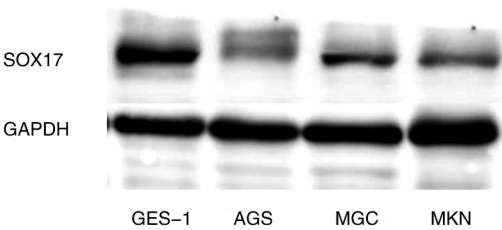


图 2 不同细胞株 SOX17 蛋白表达量

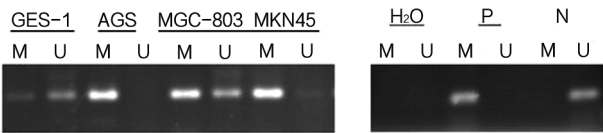
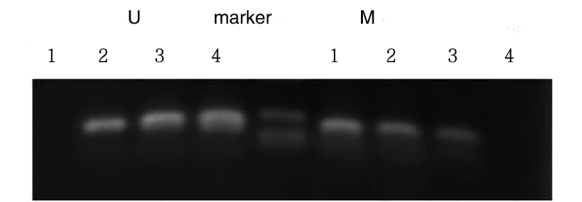


图 3 不同细胞株 SOX17 基因启动子区甲基化情况

2.4 5-Aza-CdR 对胃癌细胞系 SOX17 基因表达和甲基化的影响

**2.4.1 5-Aza-CdR 对 SOX17 基因启动子区甲基化的影响** 选取 SOX17 最低表达和高甲基化的胃癌

细胞株 AGS 为实验细胞株。不同浓度 5-Aza-CdR 处理 AGS 细胞 48 h 后, SOX17 基因启动子区甲基化状态被不同程度地抑制, 且随着药物浓度逐渐增高, 其甲基化程度逐渐减低, 即甲基化条带逐渐减弱, 非甲基化条带逐渐增强。提示去甲基化药物 5-Aza-CdR 可逆转 SOX17 基因启动子区甲基化状态, 使其成为非甲基化状态, 且呈药物浓度依赖性 (图 4)。



注: 1, 对照组 (未加药组); 2, 1  $\mu\text{mol/L}$  组; 3, 5  $\mu\text{mol/L}$  组; 4, 10  $\mu\text{mol/L}$  组。

图 4 不同浓度 5-Aza-CdR 对 AGS 细胞 SOX17 基因启动子区甲基化的影响

**2.4.2 5-Aza-CdR 对 SOX17 基因 mRNA 表达的影响** 不同浓度 5-Aza-CdR 处理 AGS 细胞 48 h 后, 与对照组相比, 各药物干预组 SOX17 mRNA 表达均不同程度上调 ( $P < 0.05$ ), 且药物浓度越大上调越显著, 呈浓度依赖性, 差别有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 见表 2)。

表 2 不同浓度 5-Aza-CdR 对 AGS 细胞 SOX17 mRNA 表达的影响

组别	RQ 值	F 值	P 值
对照组	1 $\pm$ 0.0		
1 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.633 $\pm$ 0.444 <sup>①</sup>		
5 $\mu\text{mol/L}$ 组	2.374 $\pm$ 0.325 <sup>①</sup>	53.170	<0.001
10 $\mu\text{mol/L}$ 组	4.989 $\pm$ 0.589 <sup>①</sup>		

注: ①与对照组比较,  $P < 0.05$ 。

**2.4.3 5-Aza-CdR 对 SOX17 蛋白表达的影响** 不同浓度 5-Aza-CdR 作用于 AGS 细胞 48 h 后, 与对照组相比各药物干预组 SOX17 蛋白表达均不同程度上调, 且药物浓度越大上调越显著, 呈浓度依赖性 (见图 5)。SOX17 蛋白水平变化与 mRNA 水平一致。

**2.4.4 5-Aza-CdR 对 DNA 甲基转移酶 mRNA 表达的影响** MSP 结果表明, 当药物浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  时, 5-Aza-CdR 对 SOX17 基因甲基化的逆转作用最大。取 10  $\mu\text{mol/L}$  作为最终药物干预浓度, 检测药物干预前后 DNA 甲基转移酶 mRNA 表达的改

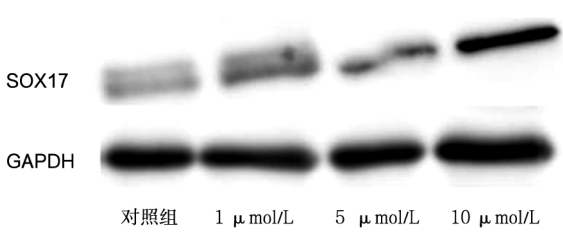


图 5 不同浓度 5-Aza-CdR 对 AGS 细胞 SOX17 蛋白表达的影响

变, 结果显示: 10  $\mu\text{mol/L}$  5-Aza-CdR 处理 48 h 后, DNMT1 mRNA 表达下调 ( $P < 0.05$ ), 但 DNMT3A、DNMT3B mRNA 未见明显下调 ( $P > 0.05$ ) (表 3)。

表 3 不同浓度 5-Aza-CdR 对 AGS 细胞 DNA 甲基转移酶表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	DNMT1	DMNT3A	DMNT3B
对照组	1 $\pm$ 0.000	1 $\pm$ 0.000	1 $\pm$ 0.000
10 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.354 $\pm$ 0.140	0.429 $\pm$ 0.153	0.575 $\pm$ 0.230
t 值	6.547	5.280	2.611
P 值	0.030	0.060	0.050

**2.5 5-Aza-CdR 对胃癌 AGS 细胞增殖和细胞周期的影响**

**2.5.1 5-Aza-CdR 对 AGS 细胞增殖的影响** 5-Aza-CdR 处理后 AGS 细胞的增殖受到不同程度的抑制, 当药物浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$  和 5  $\mu\text{mol/L}$  时, 生长抑制率随着药物作用时间的延长而增加 ( $P < 0.05$ ); 当 5-Aza-CdR 作用浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  时, 24 h 和 48 h 的生长抑制率差异均无统计学意义。而在处理时间一样时, 药物浓度越大生长抑制率越高 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 呈药物浓度依赖性 (表 4)。

表 4 不同浓度 5-Aza-CdR 对 AGS 细胞的生长抑制率 ( $n=3, \%, \bar{x} \pm s$ )

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	0	0	0
1 $\mu\text{mol/L}$ 组	16.43 $\pm$ 0.72 <sup>①</sup>	39.3 $\pm$ 1.40 <sup>①</sup>	53.76 $\pm$ 2.04 <sup>①</sup>
5 $\mu\text{mol/L}$ 组	32.48 $\pm$ 2.87 <sup>①</sup>	52.50 $\pm$ 2.89 <sup>①</sup>	63.32 $\pm$ 2.02 <sup>①</sup>
10 $\mu\text{mol/L}$ 组	50.77 $\pm$ 2.19 <sup>①</sup>	63.02 $\pm$ 2.96 <sup>①</sup>	69.90 $\pm$ 3.89 <sup>①</sup>

注: ①与对照组比较,  $P < 0.05$ 。

**2.5.2 5-Aza-CdR 对 AGS 细胞周期的影响** FCM 结果显示不同浓度 5-Aza-CdR 作用 AGS 细胞 48 h 后, G<sub>1</sub> 期细胞逐渐增多, G<sub>2</sub> 期细胞逐渐减少, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。即



AGS 细胞经 5-Aza-CdR 处理后, 细胞周期不同程度阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 且药物浓度越大, 细胞周期阻滞越明显, 呈浓度依赖性 (表 5)。

表 5 不同浓度 5-Aza-CdR 对 AGS 细胞周期的影响 (%)

组别	G <sub>0</sub> ~G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> ~M 期
对照组	58.05±4.14	16.29±4.15	27.05±1.32
1 μmol/L 组	62.73±2.26	15.97±4.04	20.93±1.36
5 μmol/L 组	67.71±1.99 <sup>①</sup>	16.33±3.62	15.99±2.31 <sup>①</sup>
10 μmol/L 组	72.27±0.93 <sup>①</sup>	15.38±3.21	11.41±3.24 <sup>①</sup>

注: ①与对照组比较,  $P<0.05$ 。

### 3 讨论

胃癌是全球最常见的癌症之一, 其癌症相关致死率位居所有恶性肿瘤第 3 位。由于发病隐袭, 60% 以上的胃癌患者在确诊时已经失去手术机会, 即使经过根治性手术切除, 仍有 60% 胃癌患者术后会出现复发, 表现为腹膜复发、远处复发等<sup>[9]</sup>。因此, 寻求新的早期诊断与更为有效的综合治疗策略显得迫在眉睫。随着分子生物学和表观遗传学的发展, 人们发现胃癌发病过程中存在多种肿瘤相关基因的异常甲基化, 在胃癌的早期诊断、治疗、预后判断中发挥重要作用<sup>[10-11]</sup>。DNA 异常甲基化导致的基因表达沉默是一种重要的表观遗传学机制, 近年人们发现多种重要的抑癌基因或转移抑制基因的异常甲基化会导致基因功能丧失, 促进肿瘤发生或转移<sup>[12]</sup>。

SOX17 基因是转录因子的家族成员, 定位于 8q11.23, 参与调控组织特异性、分化、器官发育、干细胞稳态等重要生命过程<sup>[13]</sup>。除上述功能外, SOX17 基因在肿瘤形成过程中同样发挥重要作用。近年来多个研究发现, SOX17 基因通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 参与子宫内膜癌、肺癌、胶质细胞瘤等多种人类恶性肿瘤的发生和发展, 并被认为是候选的抑癌基因<sup>[14-16]</sup>。SOX17 基因启动子区 CpG 岛频繁出现甲基化。乳腺癌、甲状腺癌、宫颈癌等多种肿瘤中 SOX17 基因均可因其启动子区 CpG 岛甲基化而出现表达减低甚至转录抑制, 从而丧失其抑癌基因的功能, 促进癌变发生<sup>[17-19]</sup>。近年来胃癌中 SOX17 基因的作用日益受到关注, 相关研究越来越多。YE 等<sup>[20]</sup>研究发现 SOX17 基因可通过调控细胞周期和增殖而参与胃癌的发展, 成为胃癌新的诊断和预后指标。FUKAMACHI 等<sup>[21]</sup>研究表明: SOX17 基因可能是通过调节 CD133 的表达参与胃肿瘤的发生和发展。此外, 胃癌中 SOX17

基因表达沉默可能与其启动子区高甲基化密切相关。郭艳丽等<sup>[22]</sup>通过比较观察 96 例胃癌患者术后癌组织及癌旁组织标本中 SOX7、SOX17 基因甲基化状态及 mRNA 表达, 发现两者甲基化状态与其表达呈负相关。BALGKOURANIDOU 等<sup>[23]</sup>检测了 73 例可手术的胃癌患者 ctDNA 中 SOX17 基因甲基化状态, 58.9% (43/73) 胃癌患者 SOX17 基因启动子甲基化, 而 20 例正常人 ctDNA 中 SOX17 基因甲基化均未检出, 进一步分析发现 SOX17 基因甲基化与总生存时间和肿瘤分化程度相关, 由此推测胃癌患者 ctDNA 中 SOX17 基因启动子甲基化是频发的事件, 可为这类患者提供重要预后信息。

本研究首先从组织学水平上采用 IHC 法证实: 胃癌组织中 SOX17 蛋白阳性表达率明显低于癌旁组织, 提示 SOX17 基因异常表达可能参与胃癌的发生。虽其阳性表达率与 GC 患者性别、年龄、临床分期、分化程度、是否伴脉管癌栓等无明确相关, 考虑样本量较少, 有待后续扩大样本量进一步验证。随后在细胞水平上证实: 相比于 GES-1, 3 种胃癌细胞株 (AGS、MGC-803 和 MKN45) 中 SOX17 基因 mRNA 的表达明显降低, 以 AGS 细胞表达最低。且 SOX17 蛋白在上述细胞株中的表达差异与其 mRNA 水平一致。综上, 本研究从组织学、蛋白和 mRNA 分子水平上证实胃癌中 SOX17 基因表达减低或失活, 从而丧失其抑癌基因的功能, 促进胃癌形成。

同时, 本研究对各细胞株 SOX17 基因甲基化情况进行检测发现, 与 GES-1 相比, 各胃癌细胞株 SOX17 基因启动子区均存在不同程度的高甲基化, 且其甲基化程度与表达水平的变化趋势相反。目前公认的 DNA 去甲基化药物是 5-Aza-CdR, 它可以抑制 DNA 甲基转移酶活性, 上调目的基因的表达, 使沉默的抑癌基因恢复功能<sup>[24]</sup>。本研究发现 5-Aza-CdR 处理后, 胃癌 AGS 细胞 SOX17 基因启动子区甲基化被抑制, 但 mRNA 和蛋白表达上调, 呈药物浓度依赖性; 同时 DNA 甲基转移酶 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 基因 mRNA 的表达均减低, 以 DNMT1 mRNA 下调最显著。由此证实了: (1) 胃癌细胞中 SOX17 启动子区高甲基化水平抑制其表达; (2) 胃癌中 5-Aza-CdR 可通过抑制 DNA 甲基转移酶活性逆转 SOX17 基因启动子区甲基化水平而恢复 SOX17 基因表达。以上结果与以往研究报道一致, 胃癌细胞中 SOX17 基因可能因其启动子区 CpG 岛异常甲基化而表达沉默, 从而丧失其

抑癌基因的功能,促进胃癌的发生发展。

此外,为了进一步探讨 5-Aza-CdR 对 SOX17 基因表达的影响及可能的机制,本研究进行了细胞增殖及细胞周期实验。CCK-8 实验结果表明,不同浓度 5-Aza-CdR 作用后 AGS 细胞增殖受到不同程度的抑制,且抑制程度呈药物浓度依赖性。FCM 结果显示,5-Aza-CdR 作用于 AGS 细胞后, G<sub>1</sub> 期细胞逐渐增多, G<sub>2</sub> 期细胞逐渐减少,细胞周期不同程度阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,且药物浓度越大,细胞周期阻滞越明显。从而表明 5-Aza-CdR 通过某种机制使胃癌细胞阻滞于 G<sub>1</sub>/S 期,阻止细胞增殖。

综上所述,5-Aza-CdR 可逆转胃癌细胞 SOX17 基因甲基化,上调其 mRNA 和蛋白表达,从而抑制胃癌的发生发展。当然,由于甲基化失活的抑癌基因并非只有 SOX17 一种,5-Aza-CdR 去甲基化作用可能同时激活其他抑癌基因参与胃癌的发生发展,SOX17 基因在胃癌中的具体作用机制还需后续 SOX17 基因过表达与沉默等实验进一步证实。

#### 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] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66 (2): 115-132.
- [3] LIU Y, ASAKURA M, INOUE H, et al. Sox17 is essential for the specification of cardiac mesoderm in embryonic stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104 (10): 3859-3864.
- [4] YE Y W, WU J H, WANG C M, et al. Sox17 regulates proliferation and cell cycle during gastric cancer progression [J]. Cancer Lett, 2011, 307 (2): 124-131.
- [5] YIN D, JIA Y, YU Y, et al. SOX17 methylation inhibits its antagonism of Wnt signaling pathway in lung cancer [J]. Discov Med, 2012, 14 (74): 33-40.
- [6] HOPMAN A, MOSHI J M, HOOGRUIN K J, et al. SOX17 expression and its down-regulation by promoter methylation in cervical adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma [J]. Histo-pathology, 2020, 76 (3): 383-393.
- [7] JIA Y, YANG Y, ZHAN Q, et al. Inhibition of SOX17 by microRNA 141 and methylation activates the WNT signaling pathway in esophageal cancer [J]. J Mol Diagn, 2012, 14 (6): 577-585.
- [8] 郭艳丽, 潘盼, 郭炜, 等. Sox17 基因甲基化状态与贲门腺癌发生发展关系研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39 (14): 965-969.
- [9] 杨恒颖, 单治理, 孙明浩, 等. 高龄胃癌患者手术治疗的短期疗效及预后影响因素 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39 (10): 2350-2354.
- [10] LING Z Q, LV P, LU X X, et al. Circulating methylated XAF1 DNA indicates poor prognosis for gastric cancer [J]. PLoS One, 2013, 8 (6): e67195.
- [11] LING Z Q, GE M H, LU X X, et al. Ndr2 promoter hypermethylation triggered by helicobacter pylori infection correlates with poor patients survival in human gastric carcinoma [J]. Oncotarget, 2015, 6 (10): 8210-8225.
- [12] DU Y C, OSHIMA H, OGUMA K, et al. Induction and down-regulation of Sox17 and its possible roles during the course of gastrointestinal tumorigenesis [J]. Gastroenterology, 2009, 137 (4): 1346-1357.
- [13] CLARKE R L, YZAGUIRRE A D, YASHIRO-OHTANI Y, et al. The expression of Sox17 identifies and regulates haemogenic endothelium [J]. Nat Cell Biol, 2013, 15 (5): 502-510.
- [14] ZHOU W, WANG K, WANG J, et al. SOX17 inhibits tumor metastasis via Wnt signaling in endometrial cancer [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 8275-8286.
- [15] YIN D, JIA Y, YU Y, et al. SOX17 methylation inhibits its antagonism of Wnt signaling pathway in lung cancer [J]. Discov Med, 2012, 14 (74): 33-40.
- [16] CHEN H L, CHEW L J, PACKER R J, et al. Modulation of the Wnt/beta-catenin pathway in human oligodendroglioma cells by Sox17 regulates proliferation and differentiation [J]. Cancer Lett, 2013, 335 (2): 361-371.
- [17] FU D, REN C, TAN H, et al. Sox17 promoter methylation in plasma DNA is associated with poor survival and can be used as a prognostic factor in breast cancer [J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94 (11): e637.
- [18] LI J Y, HAN C, ZHENG L L, et al. Epigenetic regulation of Wnt signaling pathway gene SRY-related HMG-box 17 in papillary thyroid carcinoma [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125 (19): 3526-3531.
- [19] CHEN Y C, HUANG R L, HUANG Y K, et al. Methylomics analysis identifies epigenetically silenced genes and implies an activation of beta-catenin signaling in cervical cancer [J]. Int J Cancer, 2014, 135 (1): 117-127.
- [20] YE Y W, WU J H, WANG C M, et al. Sox17 regulates proliferation and cell cycle during gastric cancer progression [J]. Cancer Lett, 2011, 307 (2): 124-131.
- [21] FUKAMACHI H, SHIMADA S, ITO K, et al. CD133 is a marker of gland-forming cells in gastric tumors and Sox17 is involved in its regulation [J]. Cancer Sci, 2011, 102 (7): 1313-1321.
- [22] 郭艳丽, 郭炜, 张国强, 等. 胃癌组织中 Sox7、Sox17 基因甲基化及临床意义 [J]. 中国肿瘤, 2015, 24 (7): 613-617.
- [23] BALGKOURANIDOU I, KARAYIANNAKIS A, MATTHAIOS D, et al. Assessment of SOX17 DNA methylation in cell free DNA from patients with operable gastric cancer. Association with prognostic variables and survival [J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51 (7): 1505-1510.
- [24] BRECCIA M, SALAROLI A, LOGLISCI G, et al. 5'-Azacitidine for therapy-related myelodysplastic syndromes after non-Hodgkin lymphoma treatment [J]. Leuk Res, 2011, 35 (10): 1409-1411.